



HAL
open science

Etude des mécanismes anti-cancéreux induits par milieux activés par jet de plasma froid : vers une nouvelle approche thérapeutique

Julie Chauvin

► **To cite this version:**

Julie Chauvin. Etude des mécanismes anti-cancéreux induits par milieux activés par jet de plasma froid : vers une nouvelle approche thérapeutique. Plasmas. Université Toulouse 3 Paul Sabatier (UT3 Paul Sabatier), 2018. Français. NNT: . tel-02901454

HAL Id: tel-02901454

<https://hal.science/tel-02901454v1>

Submitted on 17 Jul 2020

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 l'Université Toulouse 3 - Paul Sabatier

Présentée et soutenue par
Julie CHAUVIN

Le 03 décembre 2018

**Etude des mécanismes anti-cancéreux induits
par milieux activés par jet de plasma froid :
vers une nouvelle approche thérapeutique**

Ecole doctorale : **GEET – Génie Electrique Electronique et Télécommunications :
du système au nanosystème**

Spécialité : **Ingénierie des Plasmas**

Unité de recherche :
LAPLACE - Laboratoire PLASma et Conversion d'Energie - CNRS-UPS-INPT

Thèse dirigée par
Nofel MERBAHI & Patricia VICENDO

Jury

Magali GARY-BOBO, *Chargée de recherche à l'IBMM – Université de Montpellier*, Rapporteur

Dunpin HONG, *Professeur au GREMI – Université d'Orléans*, Rapporteur

Valérie PLANAT-BENARD, *Maître de conférences à STROMALab – Université de Toulouse*, Examineur

Halima KERDJOUJ, *Maître de conférences à BISO – UFR d'Odontologie de Reims*, Examineur

Nofel MERBAHI, *Professeur au LAPLACE – Université de Toulouse*, Co-directeur de thèse

Patricia VICENDO, *Directeur de recherche au CNRS – IMRCP Toulouse*, Co-directeur de thèse

Mohammed YOUSFI, *Directeur de recherche au CNRS – LAPLACE Toulouse*, Invité

Résumé

Les thérapies anticancéreuses basées sur des principes physiques (radiofréquences, ultrasons, laser, électroporation...) ont considérablement augmenté lors de la dernière décennie. Leurs objectifs sont de détruire directement les cellules cancéreuses, de favoriser l'entrée ciblée de molécules thérapeutiques ou encore de stimuler le système immunitaire du patient afin d'éliminer la tumeur. Le plasma froid suscite l'intérêt dans le domaine de l'oncologie grâce à sa capacité à générer des espèces réactives oxygénées (ROS) et azotées (RNS) qui peuvent être génotoxiques et cytotoxiques pour les cellules cancéreuses. Deux approches d'utilisation du plasma sont étudiées : soit l'exposition directe de cellules au jet plasma, soit l'exposition indirecte via l'utilisation d'un Milieu Activé par Plasma (PAM). Le PAM étant plus facile à délivrer par injection dans la tumeur, c'est cette approche qui est choisie lors de ces travaux.

Le travail de thèse présenté consiste à étudier l'effet génotoxique et cytotoxique du PAM, obtenu après exposition du milieu au jet de plasma d'hélium, sur des tumeurs *in vitro* et *in vivo*. Pour les études *in vitro*, nous avons choisi d'utiliser un modèle 3D : le sphéroïde (MCTS – MultiCellular Tumor Spheroid). Ce modèle présente des caractéristiques proches du modèle *in vivo* grâce à son organisation en sphéroïde. Les MCTS présentent en effet des gradients de pénétration d'oxygène, de nutriments et de prolifération cellulaire.

La première partie de la thèse concerne l'identification et la quantification des espèces générées dans le PAM. Les méthodes d'analyses utilisées sont la résonance paramagnétique électronique, la fluorimétrie, la colorimétrie, la chromatographie en phase liquide et la spectrométrie de masse. Ces analyses ont mis en évidence que la toxicité du PAM était due à plusieurs facteurs : d'un côté la génération de ROS et RNS mais aussi à la dégradation des nutriments pour les cellules contenues dans le milieu via par exemple l'oxydation et la nitrosylation des acides aminés.

La deuxième partie est dédiée à l'étude des effets du PAM sur les MCTS HCT-116 (cancer du côlon). En *in vitro*, le traitement PAM induit un détachement cellulaire en périphérie du sphéroïde 24h après traitement plasma. L'intérêt a donc été porté sur la cascade des mécanismes cellulaires mis en jeu et conduisant à la perte de volume du sphéroïde et à la mort des cellules en périphérie durant les premières 24h. L'étude de viabilité cellulaire a démontré une perte de viabilité de 50% après 2h de traitement. L'investigation des mécanismes de mort cellulaire a mis en évidence l'activation de mort cellulaire par apoptose et nécrose après 6h de traitement. Une étude pilote *in vivo* a permis de confirmer les effets génotoxiques et cytotoxiques du PAM.

La réponse au PAM d'une seconde lignée cellulaire (FaDu), cancer tête et cou, a été étudiée. En effet, bien qu'elle présente une réponse similaire aux HCT-116 à 24h, leur réponse à plus long terme diverge, avec une reprise de prolifération importante. Un traitement adapté par PAM a été mis en place pour pallier cette reprise de prolifération.

Tous ces résultats démontrent le potentiel des traitements PAM dans la recherche contre le cancer.

Mots Clés

Jet de plasma froid à la pression atmosphérique, applications biomédicales, cancer colorectal, cancer tête/cou, sphéroïdes tumoraux multicellulaires, milieu activé par plasma, effet antiprolifératif, effet génotoxique et cytotoxique, espèces réactives de l'oxygène, espèces réactives de l'azote, peroxyde d'hydrogène, caractérisation expérimentale des jets plasmas.

STUDY OF ANTI-TUMORAL MECHANISMS INDUCED BY COLD PLASMA JET ACTIVATED MEDIUM: TOWARDS A NEW THERAPEUTIC STRATEGY

Abstract

Cancer therapies based on physical principles (radiofrequency, ultrasound, laser, electroporation...) have considerably increased in the last decade. Their objectives are to directly destroy cancer cells, to favor the targeted entry of therapeutic molecules or to stimulate the patient's immune system in order to eliminate the tumor. Cold plasma still arouses interest in the field of oncology through its ability to generate reactive oxygen species (ROS) and nitrogen species (RNS) which can be genotoxic and cytotoxic for cancer cells. Two approaches to the use of plasma are studied: either direct exposure of cells to the plasma jet, or indirect exposure via the use of a Plasma Activated Medium (PAM). The PAM being easier to deliver by injection into the tumor, this approach was chosen in this work.

The work presented consists in studying the genotoxic and cytotoxic effects of PAM resulting from exposure of the medium to the helium plasma jet on *in vitro* and *in vivo* tumors. For *in vitro* studies, we chose to use a 3D model: the spheroid (MCTS - MultiCellular Tumor Spheroid). This model has similar characteristics to the *in vivo* model thanks to its spheroidal organization. The spheroids have indeed gradients of oxygen penetration, nutrients and cell proliferation.

The first part of the thesis concerns the identification and quantification of the species generated in PAM. The analytical methods used are paramagnetic electronic resonance, fluorimetry, colorimetry, liquid chromatography and mass spectrometry. These analyses revealed that the toxicity of PAM was due to several factors: on the one hand to the generation of ROS and RNS and on the other hand to the degradation of cell nutrients contained in the medium via, for example, the oxidation and nitrosylation of the amino acids.

The second part is dedicated to the study of the effects of PAM on HCT-116 (colon cancer) spheroids. *In vitro*, PAM treatment induces cell detachment at the periphery of the spheroid 24 hours after plasma treatment. An interest was therefore developed in the cascade of cellular mechanisms involved and leading to the loss of the spheroids volume and the death of peripheral cells during the first 24 hours. The cell viability study demonstrated a loss of viability of 50% after 2 hours of treatment. The investigation of cell death mechanisms revealed activation of cell death by apoptosis and necrosis after 6 hours of treatment. An *in vivo* pilot study confirmed the genotoxic and cytotoxic effects of PAM.

The response to PAM of a second cell line (FaDu), head and neck cancer, was studied. Indeed, although it has a similar response to HCT-116 at 24 hours, its longer-term response diverges, with a significant resumption of proliferation. Successive treatments with PAM have been put in place to overcome this proliferation.

All these results demonstrate the full potential of PAM treatments in cancer research.

Key Words

Cold plasma jet at atmospheric pressure, biomedical applications, colorectal cancer, head/neck cancer, multicellular tumor spheroid, plasma activated medium, antiproliferative effect, genotoxic and cytotoxic effect, reactive oxygen species, reactive nitrogen species, hydrogen peroxide, experimental characterization of plasma jets.

Publications & Conférences

Publications

J. Chauvin, F. Judée, M. Yousfi, P. Vicendo, N. Merbahi (2017). Analysis of Reactive Oxygen and Nitrogen Species Generated in Three Liquid Media by Low Temperature Helium Plasma Jet, **Scientific Reports**, Vol. 7, p.4562, DOI : 10.1038/s41598-017-04650-4

J. Chauvin, F. Judée, N. Merbahi, P. Vicendo (2018). Effects of Plasma Activated Medium on Head and Neck FaDu Cancerous Cells: Comparison of 3D and 2D Response, **Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry**, Vol. 18, No. 6, DOI : 10.2174/1871520617666170801111055

N. Merbahi, J. Chauvin, F. Judée, P. Vicendo, M. Yousfi (2018). Therapeutic Efficacy Of Plasma Activated Medium In 2D And 3D In Vitro Head And Neck FaDu Cancer Cell, **Clinical Plasma Medicine**, Volume 9, Supplement, DOI : 10.1016/j.cpme.2017.12.063

J. Chauvin, L. Gibot, M.P. Rols, M. Golzio, N. Merbahi, P. Vicendo (2018). Plasma-Activated Medium as Efficient Antitumor Treatment of Colorectal Cancer: Elucidation of *in vitro* Cellular Steps, **Scientific Reports**, Submitted

Conférences

Présentations orales

J. Chauvin, F. Judée, P. Vicendo, N. Merbahi, M.P. Rols, L. Gibot, M. Golzio, M. Yousfi (2016). Investigation of Cell Death Mechanisms of 3D Multicellular Tumor Spheroids (MCTS) after Contact with a Plasma Activated Medium (PAM), **ICPM-6**

J. Chauvin, F. Judée, P. Vicendo, N. Merbahi, M.P. Rols, L. Gibot, M. Golzio, M. Yousfi (2017). Cell Death Mechanism on Human Colorectal Cancer after PAM (Plasma Activated Medium) Treatment, **ICPIG XXXIII**

Posters

F. Judée, J. Chauvin, M. Yousfi, P. Vicendo, N. Merbahi (2016). Detection of Free Radicals Species Generated by Low-Temperature Plasma Jet in Culture Liquid Media, **ICPM-6**

J. Chauvin, F. Judée, N. Merbahi, M. Yousfi, J-M Plewa, B. Ducommun, V. Lobjois (2016). Effect of Low Temperature Plasma Activated Liquid Media on Multi Cellular Tumor Spheroids, **ICPM-6**

J. Chauvin, F. Judée, M. Yousfi, P. Vicendo, N. Merbahi (2017). Quantification of Free Radicals Species Generated by He Cold Atmospheric Plasma Jet in Different Liquid Media, **ICPIG XXXIII**

J. Chauvin, N. Merbahi, F. Judée, P. Vicendo (2017). Effect of Plasma Activated Medium on human Head & Neck Cancerous Tumor Spheroids, **ICPIG XXXIII**

J. Chauvin, L. Gibot, P. Vicendo, N. Merbahi, M.P. Rols, M. Yousfi, M. Golzio (2018). Plasma Activated Medium (PAM) Effect on Human Colorectal Cancer and Investigation of Cell Death Mechanisms, **ICPM-7**

N. Merbahi, J. Chauvin, P. Vicendo, L. Gibot, M. Yousfi (2018). Investigation of Effect of Plasma Activated Medium (PAM) on FaDu (Head & Neck Cancer) Multi Cellular Tumor Spheroids (MCTS), **ICPM-7**

J. Chauvin, F. Judée, N. Merbahi, P. Vicendo, M. Yousfi (2018). Investigation of the Cytotoxicity of Plasma Activated Medium by the Quantification of Free Radical Species Generated by Low Temperature Plasma Jet in Liquid Media, **ICPM-7**

Remerciements

Ce travail de thèse a été réalisé en co-direction entre deux laboratoires de l'université Paul Sabatier de Toulouse, à savoir le LAPLACE (LABoratoire PLASma et Conversion d'Énergie) et l'IMRCP (Interactions Moléculaires et Réactivités Chimiques et Photochimiques).

C'est donc logiquement que je vais commencer par grandement remercier mes deux directeurs de thèse Patricia Vicendo et Nofel Merbahi qui sont des modèles que ce soit au niveau professionnel ou humain. Également merci aux différents membres de ces deux équipes et laboratoires qui m'ont accueillie chaleureusement.

Je tiens à remercier Magali Gary-Bobo (IBMM, Université de Montpellier) et Dunpin Hong (GREMI, Université d'Orléans) d'avoir accepté d'être rapporteurs de ma thèse. Merci également aux autres membres du jury, Valérie Planat-Bénard (STROMALab, Université de Toulouse), Halima Kerdjoudj (BISO, UFR d'Odontologie de Reims) pour l'évaluation de ce travail en tant qu'examineurs et également Mohammed Yousfi (LAPLACE, Université de Toulouse) d'avoir pris part au jury en tant que membre invité. Je vous suis reconnaissante d'avoir pris du temps pour évaluer mon travail.

Je voudrais ensuite remercier les partenaires de l'IPBS, notamment Marie-Pierre Rols de m'avoir reçue dans son équipe et Muriel Golzio pour son aide dans les études *in vivo*. Je tiens à remercier aussi les souris utilisées dans nos expérimentations pour leur sacrifice dans la recherche contre le cancer. Enfin je voudrais remercier plus spécialement Laure Gibot, avec qui j'ai pris grand plaisir à travailler notamment pour les manips *in vitro*, mais également pour tous ses conseils que ce soit sur le plan professionnel et personnel.

Je remercie aussi Lionel Rechinat du LCC (Laboratoire de Chimie de Coordination) pour son aide précieuse en RPE et Catherine Claparols de l'ICT (Institut de Chimie de Toulouse) pour son aide en spectrométrie de masse.

Enfin je voudrais remercier mes camarades de route, en commençant par Florian qui m'a appris les rudiments du métier mais également à Joseph, Zoé, Maëva et Mélissa, tous ont grandement contribué à ma bonne intégration au laboratoire. Ensuite je voudrais remercier les doctorants Elena, Julien, Maxime, Marjorie, Tristan mais également Aurélie, John et Jérémie, pour leur bonne humeur quotidienne au laboratoire. Je leur souhaite une bonne réussite pour la fin de leur thèse ou une bonne continuation ! Je remercie aussi les Doctorants et notamment Chaimae et Inthu pour les instants de détente. Enfin, je voudrais remercier plus vivement Farah et Cyril pour tous les moments forts sympathiques à parcourir la région Occitanie.

Plus personnellement, je tiens à remercier les copines du waterpolo, pour leur joie de vivre et motivation durant les entraînements et matchs qui permettent de bien se défouler physiquement. Également un grand merci à Aurore et Carole, camarades de Polytech, qui ont traversé la France pour me voir soutenir.

Enfin je dédie mes derniers remerciements à ma famille (sans oublier les Chauvin bis) qui m'a toujours soutenue ainsi qu'à Philippe et Nestie pour m'avoir supportée dans les moments stressants.

Merci à tous d'avoir rendu ma thèse, déjà intéressante, encore plus enrichissante !

Table des matières

Résumé	3
Abstract	4
Publications & Conférences	5
Remerciements	7
Table des figures.....	13
Liste des tableaux.....	19
Liste des abréviations.....	21
Eléments chimiques	21
Introduction	23
Partie I : Contexte de l'étude	27
Chapitre 1 - Le plasma et ses applications	31
1.1 Physique des plasmas	31
1.1.1 Généralité sur les plasmas	31
1.1.2 Création et entretien de la décharge.....	32
1.2 Processus physico-chimiques élémentaires du plasma	34
1.2.1 Processus d'ionisation.....	34
1.2.2 Mécanismes de recombinaison électron-ion	35
1.2.3 Attachement et détachement électronique.....	36
1.3 Applications du plasma.....	37
1.4 Les dispositifs de plasma froid.....	41
1.5 Conclusion.....	46
Chapitre 2 - Le plasma en oncologie	47
2.1 Le cancer	47
2.1.1 Fonctionnement de la cellule.....	47
2.1.2 Caractéristiques d'une cellule tumorale	48
2.2 Les deux types de traitement au plasma : indirect vs direct.....	56
2.3 Objectifs de la thèse	58

Partie II : Matériels & Méthodes	61
Chapitre 3 - Caractérisation du jet plasma d'hélium	63
3.1 Configuration du jet d'hélium.....	63
3.2 Outils de diagnostic	65
3.2.1 Diagnostics électriques	65
3.2.2 Diagnostics optiques	65
Chapitre 4 - Caractérisation des milieux activés par plasma	67
4.1 Résonance Paramagnétique Électronique (RPE).....	67
4.1.1 Principe de la résonance paramagnétique électronique.....	67
4.1.2 Utilisation de piègeurs	73
4.2 Fluorescence.....	76
4.2.1 Principe de fluorescence.....	76
4.2.2 Dosage du peroxyde d'hydrogène	76
4.3 Colorimétrie.....	77
4.3.1 Principe de la colorimétrie.....	77
4.3.2 Dosage des nitrites/nitrates.....	78
4.4 Chromatographie en phase liquide et spectrométrie de masse (LC/MS).....	79
4.4.1 Principe de la LC/MS	79
4.4.2 Analyse de la dégradation des acides aminés par LC/MS	80
Chapitre 5 - Supports biologiques <i>in vitro</i> et <i>in vivo</i>	81
5.1 Lignées cellulaires	81
5.1.1 Cellules issues d'un cancer colorectal humain : lignée HCT-116.....	81
5.1.2 Cellules issues d'un cancer tête et cou humain : lignée FaDu.....	81
5.2 Culture cellulaire.....	81
5.3 Culture cellulaire en 3D : sphéroïdes tumoraux.....	83
5.4 Activation du milieu par jet plasma et traitement cellulaire	85
5.5 Analyses biologiques <i>in vitro</i>	86
5.5.1 Suivi de volume (courbe de croissance)	86
5.5.2 Viabilité cellulaire.....	87
5.5.3 Caractérisation de l'intégrité de la membrane plasmique	88
5.5.4 Détection de la mort cellulaire par apoptose : observation de l'activation des caspases	89
5.5.5 Analyses statistiques <i>in vitro</i>	90
5.6 Expérimentations biologiques <i>in vivo</i>	90

5.6.1 Éthique	90
5.6.2 Modèle murin : la souris nude	91
5.6.3 Implantation et traitement des tumeurs humaines dans un modèle murin.....	92
5.6.4 Suivi de la croissance tumorale.....	93
5.6.5 Analyse statistique <i>in vivo</i>	94
5.7 Conclusion.....	94
Partie III : Résultats expérimentaux - Caractérisation du jet plasma & Interactions avec une cible liquide.....	95
Chapitre 6 - Caractérisation du jet plasma d'hélium	97
6.1 Caractérisation électrique	97
6.2 Etude de la dynamique du jet du plasma	99
6.2.1 Jet libre.....	100
6.2.2 Cible de DMEM à 2 cm.....	101
6.2.3 Vitesse de propagation	103
6.3 Analyse par spectroscopie d'émission.....	103
6.4 Conclusion.....	107
Chapitre 7 - Interaction plasma/milieux : caractérisation physico-chimique.....	109
7.1 Analyse du pH et de l'osmolarité après exposition au plasma.....	110
7.2 Analyse du radical hydroxyle $\bullet\text{OH}$	111
7.3 Formation de l'anion superoxyde $\text{O}_2^{\bullet-}$	114
7.4 Quantification de la concentration du peroxyde d'hydrogène H_2O_2	115
7.5 Production d'oxygène singulet $^1\text{O}_2$	116
7.6 Production du radical hydrogène $\bullet\text{H}$	117
7.7 Formation d'oxyde nitrique $\bullet\text{NO}$	118
7.8 Anions nitrite NO_2^- et nitrate NO_3^-	121
7.9 Traitement plasma des acides aminés en milieu aqueux.....	123
7.10 Conclusion	127
Partie IV : Résultats expérimentaux - Effets biologiques du PAM sur les cancers du côlon (HCT-116) et de la tête et du cou (FaDu)	129
Chapitre 8 - Analyse <i>in vitro</i> et <i>in vivo</i> de l'activité cytotoxique et génotoxique du PAM sur les cellules de la lignée de cancer colorectal (HCT-116).....	131

8.1 Le PAM comme traitement anti-tumoral : mécanismes <i>in vitro</i> et preuve de concept <i>in vivo</i>	131
8.1.1 La croissance des sphéroïdes est ralentie avec l'augmentation du temps de contact avec le PAM.....	132
8.1.2 Le PAM altère la viabilité cellulaire et la mitochondrie.....	134
8.1.3 Induction de la mort cellulaire par apoptose et nécrose suite à un traitement PAM	136
8.1.4 Traitements successifs et effet cumulatif anti-cancéreux.....	138
8.1.5 Effets anticancéreux d'injections successives de PAM <i>in vivo</i> dans un modèle murin	139
8.1.6 Conclusion.....	144
Chapitre 9 - Analyse <i>in vitro</i> de l'activité cytotoxique et génotoxique du PAM sur les cellules de la lignée de cancer tête/cou (FaDu)	147
9.1 Effets biologiques du PAM sur des FaDu cultivées en monocouche, 24h après exposition	147
9.2 Étude en 3D, 24h après traitement	148
9.3 Effet du PAM sur les sphéroïdes.....	149
9.4 Comparaison entre les études 2D et 3D : Effets à 48h.....	151
9.5 Le PAM augmente la viabilité cellulaire des micro-tumeurs FaDu	153
9.6 Effet du peroxyde d'hydrogène	154
9.7 Traitements successifs des sphéroïdes FaDu par du PAM ou de l'H ₂ O ₂	156
9.8 Conclusion.....	159
Conclusions & Perspectives.....	161
 Bibliographie	 165

Table des figures

Figure 1-1 Courbes de Paschen pour différents gaz, représentant la tension de claquage en fonction du produit pression x distance (d'après le manuscrit de thèse de F. Girard ²).	33
Figure 1-2 Vue d'ensemble des techniques plasma pour l'industrie (d'après Henniker Plasma ⁹).	38
Figure 1-3 Photographie d'une décharge corona multi-pointes pulsée au laboratoire LAPLACE (d'après M.Yousfi et al. ⁴⁰). Conditions expérimentales : tension d'alimentation 8kV, durée d'impulsion 40μs, fréquence de répétition 100Hz, distance inter-électrode 8mm et rayon de courbure des pointes : 25μm. 14 pointes réparties en deux rangées de 7.	42
Figure 1-4 Schéma d'une décharge couronne à cathode creuse, d'après Meyer et al. ⁴⁴	43
Figure 1-5 Photographie d'une décharge DBD, dite à électrode flottante, développée au LAPLACE. Conditions expérimentales : tension 10kV, fréquence 10kHz, durée d'impulsion 1μs.	44
Figure 1-6 Schéma des principaux dispositifs de plasma froid de configuration DBD (a, b, c) et "DBD-like" (d) d'après Lu et al. ³	45
Figure 2-1 Les phases du cycle cellulaire ⁵⁷	48
Figure 2-2 Bases moléculaires de la cancérogénèse (d'après le Collège Français des Pathologistes CoPath).	49
Figure 2-3 Mécanismes d'altération conduisant à la cancérisation cellulaire (d'après Hanahan et Weinberg, modifiée).	50
Figure 2-4 Les trois principaux types de mort cellulaire : apoptose, autophagie et nécrose. Changements morphologiques induits par ces trois types de mort cellulaire suite à divers stimuli (l'irradiation pour l'apoptose, le manque de substrats pour l'autophagie et l'ischémie-reperfusion pour la nécrose). (D'après Hotchkiss et al., N Engl J Med, 2009) ⁷⁶	52
Figure 2-5 Comparaison des mécanismes de glycolyse entre cellule saine et cancéreuse ⁸⁸ . 1 Phosphorylation oxydative. 2 Glycolyse anaérobie. 3 Glycolyse aérobie.....	55
Figure 2-6 Traitement plasma indirect vs direct de sphéroïdes in vitro ou d'une tumeur in vivo. (a) Traitement indirect avec la génération dans un premier temps du PAM (milieu activé par plasma) avant traitement in vitro où le sphéroïde est ensuite plongé dans le PAM et (b) in vivo où le PAM est injecté dans la tumeur. (c) Photo du jet plasma lors de la génération du PAM dans une plaque 96 puits. (e) Traitement direct avec exposition au jet plasma du sphéroïde in vitro. (d) Traitement direct in vivo de la tumeur au jet plasma ¹⁰¹ ou (f) avec une DBD flottante ¹⁰³	57
Figure 3-1 Schéma du dispositif expérimental.....	63
Figure 3-2 (a) Schéma de la source plasma DBD. (b) Dispositif jet d'hélium. (c) Photo du jet plasma.	64
Figure 4-1 Moment magnétique de spin d'un électron dans un champ B_0	68
Figure 4-2 L'application d'un champ magnétique aligne ou oppose les électrons, l'énergie de l'électron dépend alors du champ magnétique. A droite exemple de signal RPE obtenu dans cette configuration.....	69
Figure 4-3 Effet Zeeman. L'énergie de l'électron dépend du champ magnétique.	69
Figure 4-4 Exemple de spectre RPE complexe. Spectre obtenu après exposition d'une solution de PBN au jet plasma.	70
Figure 4-5 Effet de m_l sur le nombre des raies pour $n=1$	71
Figure 4-6 Intensité des raies pour $m_l = 1/2$. L'intensité des raies suit le triangle de Pascal. .	72

Figure 4-7 Détermination du nombre et de l'intensité des raies pour (a) deux protons équivalents et (b) deux protons différents.	72
Figure 4-8 Structure moléculaire du DMPO et spectre RPE des adduits formés avec le radical hydroxyle et l'anion superoxyde (tiré de Dojindo Molecular Technologies, Inc.).	74
Figure 4-9 Formation de l'adduit PBN-Radical ¹¹²	74
Figure 4-10 Structure moléculaire du piègeur TEMP.	75
Figure 4-11 Structure moléculaire du piègeur C-PTIO.	75
Figure 4-12 Principe de fluorescence.	76
Figure 4-13 Courbes d'étalonnage du peroxyde d'hydrogène dans l'eau, le DMEM et le DMEM avec SVF.	77
Figure 4-14 Schéma de réaction pour la détection du NO ₂ ⁻ (from Sigma-Aldrich Nitrite/Nitrate Assay Kit datasheet).	78
Figure 4-15 Courbes d'étalonnage du nitrite (a) et du nitrate (b) dans l'eau, le DMEM et le DMEM avec SVF.	79
Figure 4-16 Triple quadripôles de spectromètre de masse. Q1 et Q3 servent de filtre de masse, Q2 est la chambre d'ionisation qui contient le gaz rare à basse pression ¹¹³	80
Figure 5-1 Images Microscope de cellules HCT-116 en faible densité (gauche) et en haute densité (droite). Echelle : 100µm [Images ATCC].	81
Figure 5-2 Organisation cellulaire d'un sphéroïde (d'après IP3D, ITAV-USR 3505) et photographie d'un sphéroïde après 5 jours de culture prise au microscope optique en lumière blanche.	84
Figure 5-3 Images microscope de la formation d'un sphéroïde. À gauche, cellules individuelles en suspension dans le milieu. Puis par l'action de la gravité et la prolifération, ces cellules forment un sphéroïde au bout de 5 jours-120h. Echelle : 100µm.	85
Figure 5-4 Protocole de génération du PAM. Le jet est placé à une distance fixe de 2cm du puits contenant 100µL de milieu culture (sans pyruvate) supplémenté avec du sérum de veau foetal et de la pénicilline/streptomycine. Le sphéroïde est ensuite plongé dans le PAM.	85
Figure 5-5 Illustration du protocole pour la détermination des diamètres des sphéroïdes dans le cadre des suivis de croissance. Images en lumière blanche en microscopie à champ large de sphéroïdes cancéreux FaDu. En rouge, cœur vivant du sphéroïde. En vert, couronne de cellules détachées.	87
Figure 5-6 (a) Sphéroïde HCT-116 vu au microscope (G=10X) 24h après un traitement PAM-120s. (b) Fluorescence rouge caractéristique de la perméabilisation cellulaire sur ce même sphéroïde. Echelle : 100µm.	88
Figure 5-7 (a) Détection de l'induction de l'apoptose, observation de l'activation des caspases 3/7 suite à un traitement au PAM (a) Sphéroïde HCT-116 vu au microscope (G=10X) 24h après un traitement PAM-120s. (b) Fluorescence verte (couleur modifiée par traitement d'image) caractéristique de l'activation des caspases sur ce même sphéroïde. Echelle : 100µm.	89
Figure 5-8 Photographie de souris nude. Modèle de souris utilisées pour nos expériences. .	91
Figure 5-9 (a) Mesure au pied à coulisse de la taille d'une tumeur. (b) Injection de milieu (activé ou non par plasma) dans une tumeur.	93
Figure 6-1 Tension et courant de la décharge plasma. Tension appliquée de 10kV, largeur d'impulsion 1µs, cible DMEM à 2cm.	97
Figure 6-2 Décomposition des différents courants. Le courant total peut être décomposé en deux, le courant capacitif et le courant de décharge. Tension appliquée de 10kV, largeur d'impulsion 1µs, cible DMEM à 2cm.	98

Figure 6-3 Photographie du jet plasma (a) en jet libre ou (b) avec une cible de DMEM placée à 2 cm. Conditions expérimentales : tension pulsée monopolaire d'amplitude 10 kV, fréquence de répétition 9,69 kHz, durée de l'impulsion 1 μ s, gaz porteur hélium et débit de gaz de 3 L/min.	100
Figure 6-4 Imagerie rapide du jet plasma DBD hélium avec une durée d'exposition de 5 ns (acquisition après instant $t = 75$ ns, après le début du pulse de tension). Conditions expérimentales : tension pulsée monopolaire d'amplitude 10 kV, fréquence de répétition 9,69 kHz, durée de l'impulsion 1 μ s, gaz porteur hélium et débit de gaz de 3 L/min.	101
Figure 6-5 Imagerie rapide du jet plasma DBD hélium avec présence de cible DMEM. Durée d'exposition de 5 ns (acquisition après instant $t = 75$ ns, après le début du pulse de tension). Conditions expérimentales : tension pulsée monopolaire d'amplitude 10 kV, fréquence de répétition 9,69 kHz, durée de l'impulsion 1 μ s, gaz porteur hélium et débit de gaz de 3L/min.	102
Figure 6-6 Vitesse de propagation de la décharge et de la bullet plasma. Conditions expérimentales : tension pulsée monopolaire d'amplitude 10 kV, fréquence de répétition 9,69 kHz, durée de l'impulsion 1 μ s, gaz porteur hélium et débit de gaz de 3 L/min.	103
Figure 6-7 Intensité relative des espèces dans l'UV (a) et le visible (b) à $z = 0$ mm (noir) et $z=20$ mm (rouge). Conditions expérimentales : tension pulsée monopolaire d'amplitude 10 kV, fréquence de répétition 9,69 kHz, durée de l'impulsion 1 μ s, gaz porteur hélium et débit de gaz de 3 L/min.	104
Figure 6-8 Intensité relative à $z = 0$ mm (noir) et $z=20$ mm (rouge) pour quatre espèces : hélium, diazote, oxygène et hydroxyde.	105
Figure 6-9 Température rotationnelle du OH. Spectre expérimental (rouge) et simulé (bleu).	106
Figure 7-1 Variation du pH dans différents milieux en fonction du temps d'exposition au plasma.	110
Figure 7-2 Spectre RPE du DMEM exposé 150s au jet plasma d'He en présence de DMPO (#DMPO-OH, *DMPO-CH ₃).	112
Figure 7-3 Variation de la concentration de DMPO-OH dans de l'eau Milli-Q et dans du DMEM \pm SVF en fonction du temps d'exposition au jet d'He.	113
Figure 7-4 Variation de la concentration de DMPO-OH et DMPO-OOH dans l'eau avec et sans 150U de SOD et pour différents temps d'exposition au jet plasma He. La SOD inhibe la formation de DMPO-OOH.	115
Figure 7-5 Variation de la concentration de peroxyde d'hydrogène dans l'eau Milli-Q et le DMEM \pm SVF pour différents temps d'exposition au jet plasma He.	116
Figure 7-6 (a) Spectre RPE du TEMPO après 150s d'exposition au plasma dans l'eau Milli-Q. (b) Evolution de la concentration du TEMPO dans trois milieux en fonction du temps d'exposition au jet plasma d'He.	117
Figure 7-7 (a) Spectre RPE du PBN-H après 150s d'exposition au plasma dans du DMEM. (b) Effet de l'exposition au plasma sur l'intensité du signal PBN-H dans l'eau Milli-Q et le DMEM \pm SVF.	118
Figure 7-8 Spectre RPE du C-PTIO dans l'eau avec et sans traitement plasma. (a) Spectre expérimental d'une solution d'eau Milli-Q contenant le piègeur CPTIO 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.	119
Figure 7-9 Variation de l'intensité du signal CPTI dans l'eau Milli-Q et le DMEM \pm SVF en fonction du temps d'exposition au plasma.	120

Figure 7-10 Variation de la concentration des ions (a) nitrite et (b) nitrate dans de l'eau Milli-Q et du DMEM \pm SVF en fonction du temps d'exposition au plasma.....	122
Figure 7-11 Spectre de masse de la tyrosine traitée au plasma pendant 0s, 90s, 240s. Les structures moléculaires des produits majeurs de dégradation sont proposées.	124
Figure 7-12 Spectre de masse du tryptophane traité au plasma pendant 0s, 90s. Les structures moléculaires des produits majeurs de dégradation sont proposées.....	125
Figure 7-13 Spectre de masse de la méthionine traitée au plasma pendant 0s, 60s. Les structures moléculaires des produits majeurs de dégradation sont proposées.	125
Figure 7-14 Spectre de masse de l'arginine traitée au plasma pendant 0s, 90s,240s. Les structures moléculaires des produits majeurs de dégradation sont proposées.	126
Figure 7-15 Pourcentage de dégradation des acides aminés en solution aqueuse (0,2mM) après différents temps d'exposition au plasma.....	127
Figure 8-1 (a) Aspect macroscopique des sphéroïdes après traitement PAM-120s, observés au microscope optique. Echelle : 100 μ m. Les flèches indiquent le détachement cellulaire. (b) Courbe de croissance sur 3 jours après traitement PAM-120s pour différents temps de contact.	133
Figure 8-2 Le traitement PAM-120s induit une perte d'ATP. (a) Quantification intracellulaire de l'ATP mesurée sur 24h post traitement PAM. L'ATP est évaluée par rapport aux sphéroïdes contrôles. (b) Stabilité de l'ATP dans le PAM. Une solution de 10nM d'ATP a été exposée au jet plasma et sa concentration mesurée sur 6h.....	134
Figure 8-3 Comparaison de la quantité d'ATP dans les sphéroïdes et le surnageant pendant 4h post traitement PAM-120s. Les niveaux d'ATP sont évalués par rapport aux contrôles.	135
Figure 8-4 Le PAM-120s induit un dysfonctionnement de la mitochondrie grâce au superoxyde. A gauche un sphéroïde contrôle, à droite un sphéroïde traité pendant 24h au PAM. Echelle : 100 μ m	135
Figure 8-5 Le traitement PAM-120s induit la perméabilisation cellulaire et la mort par apoptose. (A) Intégrité de la membrane plasmique observée sur 8h post traitement. Echelle : 100 μ m. (B) Quantification de la fluorescence du PI sur 24h. (C) Activation des caspases 3/7 observée sur 8h post traitement. Echelle : 100 μ m. (D) Pénétration du PI et activation des caspases 24h post traitement sur le cœur du sphéroïde. La couronne de cellules détachées ayant été détachée par pipetage. Echelle : 100 μ m.	137
Figure 8-6 Traitement successif au PAM. (a) Traitements réalisés quotidiennement. (b) Traitement réalisés tous les deux jours. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$	138
Figure 8-7 Protocole d'expérimentation in vivo. Les souris sont injectées avec 2,5 millions de cellules dans le flanc. Après une dizaine de jours, les tumeurs se forment jusqu'à atteindre 100mm ³ et l'étude peut commencer. Les tumeurs sont mesurées quotidiennement. Les tumeurs sont mesurées quotidiennement et les traitements réalisés tous les deux jours. L'étude se termine dès que les tumeurs atteignent le volume de 1000mm ³	139
Figure 8-8 Etude in vivo. Volume tumoral en fonction des jours. Pas d'effet notable sur le volume déduit des mesures au pied à coulisse des tumeurs traitées au PAM par rapport aux contrôles.....	140
Figure 8-9 Etude in vivo. Les tumeurs sont extraites au 24ème et dernier jour de l'étude post sacrifice. Elles sont ensuite mesurées puis pesées. (a) Volume tumoral moyen externe (mesuré au pied à coulisse par-dessus la peau) et interne (après extraction de la tumeur). (b) Poids des tumeurs extraites. Résultat significatif lorsque $p < 0,05$	141
Figure 8-10 Protocole d'expérimentation in vivo. Les souris sont injectées avec 2,5 millions de cellules dans chaque flanc. Après une dizaine de jours, les tumeurs se forment jusqu'à	

atteindre 100mm ³ et l'étude peut commencer. Les tumeurs sont mesurées quotidiennement et les traitements réalisés tous les deux jours. L'étude se termine dès que les tumeurs atteignent le volume de 1000mm ³	142
Figure 8-11 Etude in vivo. Les injections successives de PAM dans les tumeurs réduit significativement leur volume. *p<0,05, ns : non significatif.	143
Figure 8-12 Cascade d'évènements entraînant la mort cellulaire et le détachement cellulaire post traitement PAM. Les sphéroïdes restent en contact 24h avec le PAM-120s. Les dommages à l'ADN ont été observés par Judée et al. ³⁰	144
Figure 9-1 Viabilité des FaDu cultivées en 2D, à deux confluences différentes, 24h après traitement avec des PAM générés avec différents temps d'exposition au plasma.....	148
Figure 9-2 Viabilité des FaDu cultivées en 3D versus en 2D, à deux confluences différentes, 24h après traitement avec des PAM générés avec différents temps d'exposition au plasma.....	149
Figure 9-3 Effets de différents PAM sur la croissance relative des sphéroïdes FaDu.....	150
Figure 9-4 Viabilité Cellulaire après 2 jours pour des cellules en monocouche à 75% de confluence pour différents PAM.	152
Figure 9-5 Viabilité cellulaire des sphéroïdes FaDu 0h, 24h, 36h et 48h après un traitement PAM-120s. Les niveaux d'ATP des sphéroïdes traités sont normalisés par rapport à ceux des sphéroïdes contrôles aux mêmes timepoints.	153
Figure 9-6 Effets du peroxyde d'hydrogène ajouté en concentrations croissantes dans les milieux de culture des sphéroïdes FaDu.	154
Figure 9-7 Comparaison entre des sphéroïdes traités au PAM-240s vs 2,5mM de peroxyde d'hydrogène.	155
Figure 9-8 Traitements successifs au PAM-120s de sphéroïdes FaDu.....	157
Figure 9-9 Images microscope des sphéroïdes à divers moments des traitements successifs. Echelle : 100µm	158
Figure 9-10 Traitements successifs de sphéroïdes FaDu traités avec une concentration de 1,160mM de peroxyde d'hydrogène.....	159

Liste des tableaux

Tableau 6-1 Puissance et énergie dissipées par jet sans cible ou avec de l'eau ou du DMEM placé à 2cm. Conditions expérimentales : tension pulsée monopolaire d'amplitude 10 kV, fréquence de répétition 9,69 kHz, durée de l'impulsion 1 μ s, gaz porteur hélium et débit de gaz de 3 L/min.	99
Tableau 6-2 Espèces identifiées en fonction des raies observées. Conditions expérimentales : tension pulsée monopolaire d'amplitude 10 kV, fréquence de répétition 9,69 kHz, durée de l'impulsion 1 μ s, gaz porteur hélium et débit de gaz de 3L/min.	105
Tableau 7-1 Caractérisation de milieux en termes de pH, osmolarité (mOsmol/kg) et évaporation après exposition à l'hélium seul ou au jet plasma. Six expériences indépendantes ont été réalisées. Les données sont présentées comme moyenne \pm SD.....	111
Tableau 7-2 Demi-vie de l'adduit DMPO-OH après 150s d'exposition au jet d'He dans les trois milieux.	113
Tableau 9-1 Pourcentage de détachement cellulaire à 24h en fonction des différents PAM. Le détachement cellulaire est calculé à partir des mesures du volume du cœur des sphéroïdes entre J0 et J1.	150
Tableau 9-2 Taux de prolifération des MCTS post-détachement à 24h pour différents PAM. Le taux de prolifération est déduit de la pente des courbes de volumes des sphéroïdes.....	151
Tableau 9-3 Concentration de peroxyde d'hydrogène dans le PAM à différents temps d'exposition.	154
Tableau 9-4 Concentration de peroxyde d'hydrogène dans du DMEM+SVF+P/S en fonction de la distance jet/milieu pour un temps d'exposition de 60s.....	156
Tableau 9-5 Pourcentages de détachement et prolifération cellulaire pour différents nombres de traitements successifs.	158

Liste des abréviations

ADN : Acide DésoxyriboNucléique
DBD : Décharge à Barrière Diélectrique
DMEM : Dulbecco's Modified Eagle's Medium; Milieu de culture cellulaire
FCS : Fetal Calf Serum (= SVF)
MCTS : Multicellular Tumor Spheroid
PAM : Plasma Activated Medium; Milieu Activé par Plasma
PAM-30s; PAM-90s; PAM-120s; PAM-240s : PAM généré par des expositions de 30 à 120s
pH : Potentiel hydrogène
RNS : Reactive Nitrogen Species ; espèces réactives de l'azote
RONS : Reactive Oxygen and Nitrogen Species ; espèces réactives de l'oxygène et de l'azote
ROS : Reactive Oxygen Species ; espèces réactives de l'oxygène
RPE : Résonance Paramagnétique Electronique
SOD : SuperOxyde Dismutase
SVF : Sérum de Veau Fœtal
 T_{contact} : Temps de contact du sphéroïde dans le PAM
 T_{exp} : Temps d'exposition du milieu au jet plasma pour la génération du PAM

Éléments chimiques

•H : Radical hydrogène
•NO : Radical oxyde nitrique
•OH : Radical hydroxyle
 $^1\text{O}_2$: Oxygène singulet
 H^+ : Proton
 H_2O_2 : Peroxyde d'hydrogène
 HNO_2 : Acide nitreux
 HNO_3 : Acide nitrique
 HO_2NO : Acide peroxy nitreux
 NaN_3 : Azide de sodium
 N_2O_3 : Trioxyde de diazote
 NO_2^- : Anion nitrite
 NO_3^- : Anion nitrate
 O_2 : Dioxygène
 $\text{O}_2^{\bullet-}$: Anion superoxyde
 ONOO^- : Anion peroxy nitrite

Introduction

Le cancer est l'une des causes majeures de mortalité dans le monde et est responsable du décès de 8,8 millions de personnes dans le monde en 2015. D'après l'organisation mondiale de la santé, le nombre de cas devrait augmenter de 70% dans les 20 ans à venir. Les cancers les plus mortels sont (dans l'ordre) : les poumons, le foie, le colon, l'estomac et le cancer du sein¹. Plusieurs approches thérapeutiques sont utilisées pour traiter le cancer : la chimiothérapie, la radiothérapie, la thérapie photodynamique et la résection. Ces méthodes sont souvent douloureuses pour le patient et ont des effets secondaires parfois difficilement supportables. C'est pourquoi il est nécessaire de développer de nouvelles approches thérapeutiques. En effet, l'arsenal des thérapies anticancéreuses basées sur des principes physiques (radiofréquences, ultrasons, laser, électroporation...) a considérablement augmenté ces dernières années. Leurs objectifs sont de détruire directement les cellules cancéreuses, de favoriser l'entrée ciblée de molécules thérapeutiques ou encore de stimuler le système immunitaire du patient afin d'éliminer la tumeur. Parallèlement, au cours des dernières années, il a été démontré que les plasmas froids à la pression atmosphérique ont des effets antiprolifératifs sur une grande variété de cellules cancéreuses. Les plasmas basse température ou dits froids sont des gaz faiblement ionisés impliquant diverses espèces actives de faible densité (particules chargées, des radicaux, des espèces excitées de longue durée de vie, des photons et champs électriques) immergés dans le gaz neutre à température ambiante. Le plasma peut être appliqué par jet direct sur les cellules ou des tissus. Récemment une nouvelle approche a été mise en place par activation de milieux liquides par plasma (Plasma Activated Medium ou PAM).

Dans le cadre de cette thèse, nous proposons d'étudier l'effet des PAM *in vitro* sur des modèles cellulaires humains en 3D (i.e. sphéroïdes) et de valider nos résultats *in vivo*.

Afin de pouvoir traiter ce sujet multi disciplinaire touchant aussi bien la physique que la (bio)chimie et la biologie, un partenariat de plusieurs laboratoires a donc été nécessaire. C'est pourquoi cette thèse a été réalisée en codirection entre :

- le groupe Plasma Réactif Hors Equilibre (PRHE) du Laboratoire PLAsma et Conversion d'Energie (LAPLACE) de l'université Paul Sabatier, CNRS UMR5213 de Toulouse spécialisé dans le domaine de physique des plasmas (ingénierie, caractérisation, simulation).

- le groupe Interface Dynamique et Assemblage Stimulable (IdeAS) du laboratoire Interactions Moléculaires et de la Réactivité chimique et Photochimique (IMRCP) de l'université Paul Sabatier, CNRS UMR5623 de Toulouse. Ils sont spécialisés dans la chimie et la physico-chimie de la matière molle et des systèmes auto-assemblés fondés sur des composés de synthèse (tels que des tensioactifs ou des polymères) ou des molécules biologiques.

Et avec la collaboration de :

- l'équipe Cellular Biophysics de l'Institut de Pharmacologie et Biologie Structurale (IPBS) de l'université Paul Sabatier, CNRS UMR5089 de Toulouse spécialisé dans l'identification et la caractérisation de nouvelles cibles thérapeutiques dans les domaines du cancer et des maladies infectieuses.

- la plateforme technologique de Résonance Paramagnétique Electronique (RPE) du Laboratoire de Chimie de Coordination (LCC) de l'université Paul Sabatier, CNRS UPR8241 de Toulouse

Ces travaux portent sur l'utilisation de milieux activés par jet plasma d'hélium pour le traitement de tumeurs (*in vitro* et *in vivo*) du cancer du côlon. L'objectif consiste dans un premier temps à identifier et analyser les espèces générées lors de l'interaction du jet de plasma avec le milieu de culture. Ceci permettra de mieux comprendre les effets observés sur les cellules cancéreuses du colon HCT 116 en *in vitro*. Un protocole de traitement par PAM sera validé lors d'une étude pilote *in vivo*. La réponse d'une deuxième lignée cellulaire du cancer de la tête et du cou (FaDu) sera ensuite investiguée, afin d'évaluer les réponses d'un autre type de cancer au traitement PAM, ce qui permettra d'avancer dans la recherche d'un traitement généralisé à tout type de cancer.

Cette thèse s'articule en trois parties : tout d'abord le contexte de l'étude, puis la description des moyens mis en œuvre pour réaliser ces travaux et enfin les résultats expérimentaux obtenus.

La première partie, composée de deux chapitres, est consacrée à l'étude bibliographique. Le premier chapitre est dédié aux généralités concernant les plasmas, c'est à dire à la physique des plasmas, aux différents types de réactions lors de la création du plasma, pour finir sur quelques exemples d'applications du plasma dans l'industrie et dans le biomédical. Le second chapitre présentera une première sous-partie dédiée à la biologie du

cancer pour expliquer les mutations d'une cellule cancéreuse. La seconde, détaillera les deux types de traitements au plasma froid pour la cancérologie. La dernière sous-partie introduit le sujet et l'intérêt de ces travaux de thèse dans ce contexte du plasma médecine.

La seconde partie, dédiée aux procédures expérimentales et matériels utilisés, est composée des chapitres 3, 4 et 5 correspondant respectivement aux trois domaines scientifiques abordés lors de ces recherches à savoir la physique des plasmas, la (bio)chimie et la biologie. Le chapitre 3 regroupe les techniques de caractérisation électrique et optique associées à la physique des plasmas. Le chapitre 4 détaille les techniques mises en œuvre pour l'analyse des espèces générées par le plasma lors de l'exposition d'un milieu. Enfin, le chapitre 5 présente les procédures biologiques de mise en place d'un modèle de culture cellulaire 3D *in vitro* ainsi que l'ensemble des techniques d'analyse cellulaire adoptées.

La troisième partie est consacrée aux résultats expérimentaux. Le chapitre 6 est consacré aux résultats électriques et optiques de la caractérisation de la décharge plasma du jet d'hélium. D'abord, les caractéristiques électriques sont présentées. Puis un suivi du déroulement de la décharge enregistré grâce à une caméra rapide est exposé. Enfin, une analyse spectrométrique est réalisée pour la détection d'espèces produites par le jet avec ou sans cible liquide. Le chapitre 7 de ce manuscrit est consacré à la compréhension de la toxicité du milieu activé par plasma, par l'identification et la quantification des espèces réactives produites par le jet en contact avec des milieux liquides de complexité différente. Plusieurs techniques sont mises en place en fonction des espèces ciblées : la résonance paramagnétique électronique pour les espèces radicalaires ainsi que la colorimétrie et la fluorescence pour les espèces non-radicalaires. Une étude de spectrométrie de masse a également permis d'observer la dégradation des acides aminés du milieu de culture cellulaire suite à une exposition au jet plasma. Le chapitre 8 traitera les résultats obtenus lors du traitement du cancer du côlon (HCT-116) par le PAM *in vitro* et *in vivo*. L'étude *in vitro* présente une chronologie des mécanismes mis en place après un traitement PAM. En effet, rapidement après un traitement PAM, la viabilité cellulaire est impactée et des mécanismes de mort cellulaire s'en suivent. Une optimisation des traitements a été ensuite réalisée afin de mettre au point un protocole *in vivo*. Une étude *in vivo* utilisant des souris nudes est détaillée à la fin de ce chapitre. Enfin, le chapitre 9 expose le traitement PAM de la seconde lignée cellulaire cancéreuse de la tête et du cou (FaDu) et présente les différences avec le cancer du côlon.

Une première étude *in vitro* en utilisant une culture cellulaire 2D (couches unitaires bidimensionnelles adhérentes de cellules) a été réalisée pour valider l'efficacité du PAM sur cette nouvelle lignée cellulaire. L'analyse du traitement *in vitro* a été poursuivie en utilisant des sphéroïdes (3D) et le protocole de traitement a été adapté.

Partie I

Contexte de l'étude

« The meaning of plasma in medicine is quite ordinary,
A simple explanation can be found in any dictionary.
It's the watery fluid of organic compounds and mixtures,
In which the cells of the blood are suspended as permanent fixtures.

Plasma in science is not at all the same,
Although mistakenly it acquired the exact name.
In blood plasma is a liquid, similar to water,
In science plasma is a gas and the fourth state of matter.

A cube of ice which is cold matter,
When heated up turns into water.
This liquid or water when heated some more,
Results in the production of a steam or vapor.

This vapor or gas when heated to extreme degrees
Results in a new type of gas release.
This new gas is the plasma creation
Whose process in physics is called IONIZATION.

The inhabitants in the solid, liquid and gas phase
Are moving molecules or atoms from place to place.
In the plasma state configuration,
The electrons and ions are in firm domination.

The electric forces govern the mobility
Of the different particles' CONDUCTIVITY.
While the gas is not a good candidate,
The plasma is a conductor of the 'top rate'.

The Coulomb force which is long ranged,
In the plasma scene becomes changed.
The range is shortened to the DEBYE LENGTH,
Since the shielding has weakened the force's strength.

The COLLISIONS in a plasma between its population
Are due to the Coulomb force dictation.

These probabilities are described by CROSS SECTIONS,
Which are the effective areas for the connections.

Plasma is a quasineutral combination
Of mobile charged particle correlation.
The collective behavior in plasma is related,
To the MANY WAVES that are created.

The gases of ion and electron compositions
Are achieved under very hot conditions.
Creating and containing the plasma depends on many aspects,
Temperature, density, INSTABILITIES and other effects.

Ignorance of plasma in science is due to the conclusion
That most of the educators prefer its exclusion.
Yet as most of our Universe is in a plasma form
Plasma in science should become more known.

The study of plasma is under serious investigations:
To develop cleaner and more efficient INDUSTRY APPLICATIONS,
To understand the UNIVERSE OF PLASMA situations
And to obtain FUSION ENERGY for the future generations. »

**The Fourth State of Matter
An Introduction to Plasma Science
Second Edition**

Shalom & Yaffa Eliezer

Institute of Physics Publishing

Chapitre 1 - Le plasma et ses applications

Au milieu du 19^{ème} siècle, le physiologiste tchèque Jan Evangelista Purkinje a utilisé le mot plasma, du grec signifiant « modelé », pour parler du liquide transparent qui reste une fois les composants du sang retirés. En 1922, le scientifique américain Irving Langmuir a pour la première fois employé le mot plasma pour parler de gaz ionisé, ce dernier transportant les ions et électrons de la même façon que le plasma sanguin transporte les globules blancs et rouges.

Avant de rentrer dans les détails du plasma en médecine, il convient de définir ce qu'est un plasma, ce qui sera le but de ce chapitre. Le plasma est communément appelé "4^{ème} état de la matière", après les états solides, liquides et gazeux. Bien que peu présent naturellement sur Terre, il compose 99% de l'univers (les aurores boréales et les étoiles en sont des exemples).

Ce chapitre abordera la physique des plasmas puis détaillera quelques applications industrielles et biomédicales pour finir sur les jets de plasma froid à pression atmosphérique.

1.1 Physique des plasmas

1.1.1 Généralité sur les plasmas

Contrairement au plasma sanguin, il n'y a pas de fluide transportant les ions et électrons dans un gaz ionisé. Ce dernier est donc composé d'électrons, d'ions, mais aussi de molécules et atomes excités. Afin de pouvoir ioniser un atome ou une molécule, il faut lui apporter de l'énergie de façon à faire quitter un électron de sa couche électronique pour qu'il devienne électron libre. Cette énergie peut être apportée de façon thermique, électrique, radiative, chimique ou mécanique. Il est donc possible de générer des plasmas en laboratoire grâce à ces diverses sources d'énergie.

Une des caractéristiques du plasma est sa neutralité électrique, c'est à dire la densité des électrons n_e est égale à la densité des espèces ionisées n_+ . De façon générale, si Z est le nombre d'ionisation :

$$n_e + \sum_j Z_j n_{j-} = \sum_i Z_i n_{i+}$$

Toutes les particules n'ont pas besoin d'être ionisées pour former un plasma. Le degré d'ionisation β est donc un paramètre pour caractériser un plasma. Il est défini comme suit :

$$\beta = \frac{n_e}{n_e + n_n}$$

avec n_e la densité électronique et n_n la densité des neutres. On considère également les températures des composés du plasma telles que T_e est la température électronique, T_i la température des ions et T_g la température du gaz.

Lorsque $\beta \approx 1$, le plasma est totalement ionisé. On distingue deux types de plasmas, les plasmas chauds en équilibre thermodynamique complet (tels que les étoiles et tokamaks) où $T_e = T_i \approx 10^6$ - 10^8 K (10^2 - 10^4 eV) et les plasmas "froids" en équilibre thermodynamique local qui sont des plasmas très collisionnels tels que les torches et arcs et dont $T_e \approx T_i = T_g = 2$ - $3 \cdot 10^4$ K (2-3 eV).

Lorsque β est faible, de l'ordre de 10^{-4} - 10^{-7} , le plasma est faiblement ionisé. Ces plasmas, "froids", hors état d'équilibre thermodynamique, ont une température électronique T_e (≈ 1 eV) qui est très supérieure à la température du gaz T_g qui est proche de la température ambiante. Cette différence de température entre les électrons et les autres particules du plasma froid s'explique car si le temps ou l'énergie n'est pas suffisant, les électrons ne peuvent pas s'équilibrer avec les autres particules. En effet, en présence d'un champ électrique \vec{E} entre deux électrodes, ce sont les électrons qui reçoivent en premier l'énergie à travers une force électrique $\vec{f} = q\vec{E}$.

1.1.2 Création et entretien de la décharge

De multiples décharges électriques permettent de générer des plasmas avec des paramètres pouvant être modulés (température, densité des espèces, etc.). On reconnaît par exemple les décharges thermiques (arc), non thermiques (décharges lumineuses), haute pression (coronas, Décharges à Barrière Diélectrique DBD), basse pression, radiofréquence et micro-ondes et décharge en courant continu. Chacune de ces sources plasma aura une application technologique particulière.

Courbes de Paschen

C'est dès 1901 que Sir J. Townsend démontre que la tension de claquage d'une décharge auto-entretenu dépend du produit "distance x pression" après que Friedrich

Paschen ait découvert de façon empirique cette loi en 1889. En effet, pour amorcer un plasma dans un gaz, il faut que la tension entre les électrodes soit suffisante. Cette tension de claquage est une tension seuil à partir de laquelle le gaz devient conducteur. Si le champ extérieur est maintenu, la décharge est dite auto-entretenu.

La tension de claquage dépend donc du produit pd (avec p la pression du gaz et d la distance entre deux électrodes planes et parallèles). Les courbes de Paschen sont présentées sur la Figure 1-1.

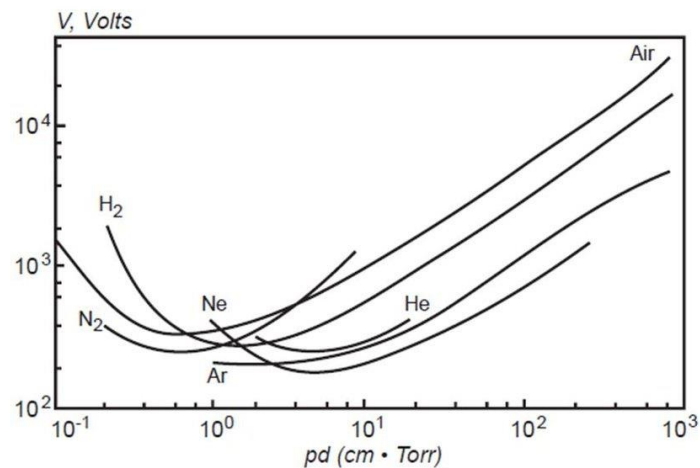


Figure 1-1 Courbes de Paschen pour différents gaz, représentant la tension de claquage en fonction du produit pression \times distance (d'après le manuscrit de thèse de F. Girard²).

Chaque courbe présente un minimum qui correspond à un produit pd optimal. Si la tension appliquée est inférieure à ce minimum, le plasma ne peut pas s'amorcer car le claquage du gaz n'a pas lieu.

Si le produit pd est faible, la probabilité de collision conduisant à l'ionisation est faible. Ceci est dû à deux phénomènes : d'une part au grand libre parcours moyen des électrons à cause de la faible pression et d'autre part à la faible probabilité d'avoir des collisions ionisantes à faible distance d . Pour augmenter la probabilité de collision d'un électron avec les autres particules, il faut donc augmenter la tension.

Si le produit pd est élevé, le libre parcours moyen des électrons est cette fois très faible, les empêchant d'acquérir l'énergie nécessaire pour ioniser le gaz. Il faut donc augmenter la tension pour leur fournir l'énergie nécessaire.

Ces courbes montrent également que les gaz les plus faciles à ioniser sont les gaz rares tels que le néon, l'argon et l'hélium comparés à l'air qui nécessite un champ électrique de 30 kV/cm.

1.2 Processus physico-chimiques élémentaires du plasma

Lors de la phase de décharge, plusieurs phénomènes se produisent (ionisation, excitation, dissociation ...) entraînant ainsi la création et la propagation du plasma. Dans ce paragraphe les principaux processus physico-chimiques qui se produisent durant la phase de décharge sont décrits.

1.2.1 Processus d'ionisation

L'ionisation est un processus élémentaire lors de la création d'un plasma, appartenant à la catégorie des collisions inélastiques, pour lesquelles l'énergie cinétique des espèces entrant en collision est convertie en énergie interne⁴.

Ils existent plusieurs mécanismes d'ionisation⁴⁻⁶, dont les principaux sont :

- **Ionisation directe par impact électronique** : un électron avec suffisamment d'énergie va ioniser une espèce lors d'une collision. Cet électron libre va interagir avec un électron de valence de l'espèce impactée. Si l'énergie est supérieure au potentiel d'ionisation, l'ionisation peut avoir lieu. Ce mécanisme est le principal processus dans les plasmas froids puisque les électrons ont une énergie élevée.
- **Ionisation par collision entre particules lourdes** : cette ionisation concerne les collisions ion-molécule, ion-atome et collisions d'espèces excitées lorsque l'énergie des deux espèces impliquées dans la collision est supérieure au potentiel d'ionisation. Contrairement à l'électron, même si l'énergie cinétique des atomes ou ions est légèrement plus élevée que le potentiel d'ionisation, l'ionisation n'a pas lieu. Ceci est dû au fait que la vitesse des atomes ou ions est plus faible que celle des électrons et donc ils ne peuvent pas transférer leur énergie à un électron dans un atome. Cependant, l'ionisation Penning^{7,8} intervient lorsque l'énergie électronique d'un atome métastable M^* est supérieur au potentiel d'interaction d'un autre atome A .
Ionisation Penning : $M^* + A \rightarrow M + A^+ + e^-$

- **Photo-ionisation** : dans ce cas, il s'agit d'une collision entre des espèces neutres et des photons, donnant une paire électron-ion. Soit A une particule neutre ayant un potentiel d'interaction I et un photon d'énergie $E = h\nu = \frac{hc}{\lambda}$ (h : constante de Planck = $6,63 \cdot 10^{-34}$ J.s ; ν fréquence en s^{-1} ; c : vitesse de la lumière ; λ : longueur d'onde en m.)

Photo-ionisation à une longueur d'onde λ : $h\nu + A \rightarrow A^+ + e^-$

$$\text{Avec } \lambda(\text{\AA}) < \frac{12400}{I(\text{eV})}$$

D'autres mécanismes peuvent intervenir, tels que l'ionisation par étapes par impact électronique ou l'ionisation de surface et permettent également de générer des électrons dans un plasma.

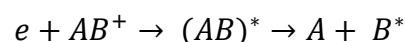
1.2.2 Mécanismes de recombinaison électron-ion

Les électrons formés par les divers mécanismes d'ionisation peuvent réagir de nouveau avec des ions (recombinaison) ou des molécules et atomes (attachement électronique).

Il existe plusieurs méthodes de recombinaison, dont les principales sont les suivantes⁵ :

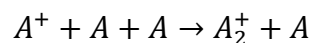
- **Recombinaison dissociative et associative**

Il s'agit du mécanisme le plus rapide de neutralisation des électrons en présence d'ions moléculaires :



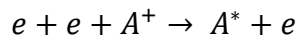
L'énergie excédentaire sert à dissocier la molécule intermédiaire $(AB)^*$ et exciter les produits de dissociation.

Ce processus est aussi important dans les gaz atomiques pour former des ions moléculaires :



- **Recombinaison à trois corps**

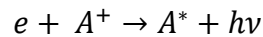
Processus majoritaire dans les plasmas de quasi-équilibre thermodynamique à haute densité, la faible concentration des ions moléculaires est due à la dissociation thermique existante. Dans un gaz atomique (sans ions moléculaires), les électrons sont neutralisés par les réactions à trois corps :



Ce processus n'est pas possible avec les particules lourdes puisque ces dernières ne sont pas assez rapides pour accumuler l'énergie cinétique et intervenir en tant que troisième corps.

▪ **Recombinaison radiative électron-ion**

L'énergie peut aussi être convertie en radiation selon l'équation :



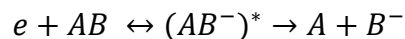
Si le plasma est de faible densité et sans ions moléculaires, cette recombinaison peut entrer en compétition avec celle à trois corps.

1.2.3 Attachement et détachement électronique

Ces processus élémentaires impliquant des ions négatifs sont importants notamment dans la production d'espèces chimiques très réactives telles que les métastables et les radicaux.

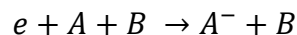
Attachement électronique

Un mécanisme majeur pour la formation d'ions négatifs dans les gaz électronégatifs (possédant du dioxygène O_2 par exemple) est **l'attachement électronique** :



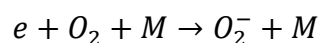
L'état intermédiaire $(AB^-)^*$ est généré en "auto-ionisation". Cet état excité instable peut se décomposer en $AB + e$ ou $A + B^-$.

La réaction à trois corps peut également former des ions négatifs :

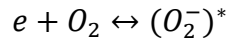


Cependant si le degré d'ionisation est faible, les électrons sont généralement moins efficaces qu'un atome B comme troisième corps.

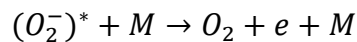
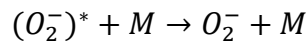
Dans les décharges à pression atmosphérique dans l'air, l'attachement électronique à trois corps joue un rôle important. En effet, dans l'air composé d'azote et d'oxygène électronégatif, la réaction suivante peut se produire :



M étant un partenaire de collision. Ce mécanisme est composé de deux étapes que l'on appelle le *mécanisme de Bloch-Bradbury*⁶. Durant la première étape, un ion négatif se forme et il se trouve dans un état instable d'auto-ionisation :

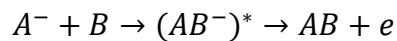


Dans un deuxième temps, cet ion négatif réagit avec un partenaire de collision M :

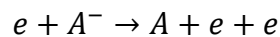


Détachement électronique

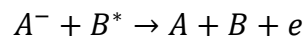
Le détachement électronique joue également un rôle clé dans les décharges plasmas non-thermiques. Le **détachement associatif**, est le mécanisme réversible de l'attachement électronique :



Lorsque le degré d'ionisation est élevé, le **détachement par impact électronique** intervient aussi :



Un troisième mécanisme peut également avoir lieu. Il s'agit du **détachement dans des collisions avec des particules excitées** :



1.3 Applications du plasma

Un plasma contient donc des espèces capables d'interagir avec une surface. En choisissant la composition du gaz, la puissance, la pression, etc. il est possible de régler et spécifier les effets d'un traitement par plasma. Son habilité à traiter des objets 3D complexes, des matériaux thermosensitifs, conducteurs, semi-conducteurs et isolants lui confère un grand intérêt pour de nombreuses applications industrielles (Figure 1-2), telles que le traitement de surface, la fabrication de composants micro-électroniques ou le traitement de déchets et pollution. Cette partie survolera les applications industrielles du plasma et donnera un aperçu de son application dans le biomédical.

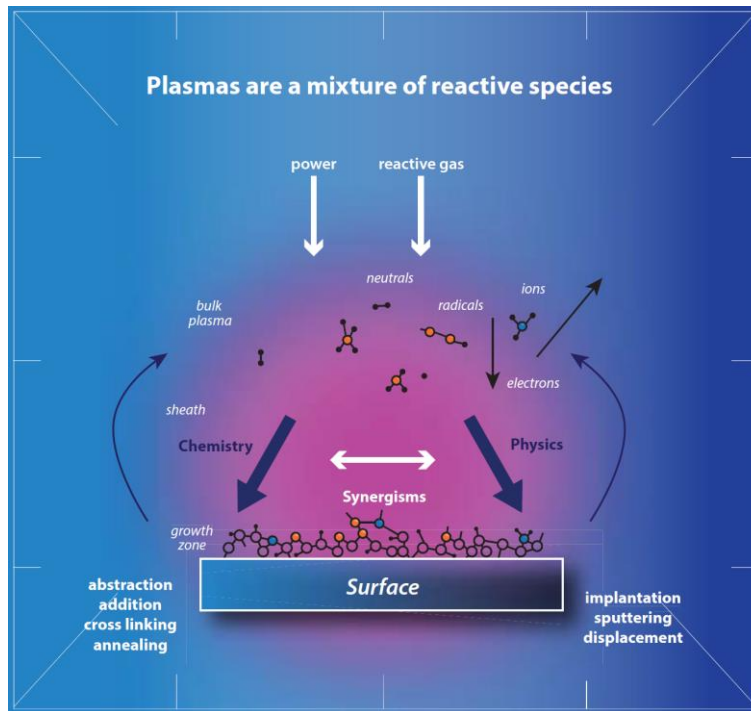


Figure 1-2 Vue d'ensemble des techniques plasma pour l'industrie (d'après Henniker Plasma⁹).

Traitement de surface

Dans un premier temps, l'activation de surface va permettre la production de groupes fonctionnels qui vont faciliter la liaison d'adhésifs et revêtements (ex : encre, peinture, colle).

L'oxygène est souvent utilisé comme gaz. Cependant l'activation peut aussi se faire avec l'air. Les espèces actives de l'oxygène (radicaux) du plasma vont se lier au matériau créant une surface hautement active pour les agents liants. Les surfaces traitées peuvent rester actives de quelques minutes à plusieurs mois en fonction du matériau traité.

Le plasma peut servir également pour nettoyer une surface en retirant des couches non voulues (ex : trace de moule, adhésifs, huiles et graisses). Le nettoyage avec des plasmas d'oxygène élimine les huiles et graisses à l'échelle nanométrique et réduit la contamination nettement plus efficacement que les méthodes traditionnelles de nettoyage. Les ultra-violets sont généralement utilisés en amont pour casser les liens des contaminants organiques avant l'action des espèces oxygénées. Ces dernières vont réagir avec les composants organiques pour former majoritairement de l'eau et du dioxyde de carbone qui est ensuite enlevé par un système de pompage durant le procédé.

Pour les matériaux s'oxydant rapidement tels que le cuivre ou l'argent, les gaz inertes sont utilisés à la place (argon, hélium).

Le plasma peut aussi être utilisé pour enrober ou déposer sur une surface (« coating ») en y appliquant une couche barrière et protectrice (ex : hydrophyle/phobe). Le dépôt plasma offre un potentiel énorme d'amélioration des propriétés de matériaux pour une grande variété d'applications. Une couche de polymère d'épaisseur nanométrique est formée sur l'entière surface d'un objet placé au milieu du plasma. Ce procédé de dépôt ne prend généralement que quelques minutes pour déposer une couche nanométrique permanente. Les monomères sont introduits en même temps que le flux de gaz plasma. Ces monomères sont des petites molécules qui, sous les bonnes conditions, se lient entre elles pour former des polymères. Le plasma crée les conditions adéquates sur la surface du matériau pour un procédé rapide et efficace. Le choix du monomère va influencer sur les propriétés finales du matériau, notamment en termes d'hydrophilie et hydrophobie.

Micro-électronique

Gravure

La gravure est un procédé utilisé pour augmenter la surface d'un matériau ou pour former des motifs dans un matériau afin de réaliser des composants plus complexes.

Grâce à l'utilisation d'un gaz réactif, le matériau de la surface est gravé puis converti en phase gazeuse avant d'être retiré par le système de pompage. La gravure avec des ions réactifs permet une gravure avec un flux directionnel d'énergie des ions vers la surface. Ceci permet donc de pouvoir contrôler précisément les motifs voulus sur la surface, notamment avec l'utilisation de masques.

Déposition

Deux techniques de dépôt existent, la PECVD (Plasma Enhanced chemical Vapor Deposition) et la pulvérisation cathodique.

Le dépôt chimique en phase vapeur assisté par plasma (PECVD) est une technologie de dépôt chimique en phase vapeur qui utilise un plasma pour fournir une partie de l'énergie nécessaire à la réaction de dépôt. Ceci offre un avantage de traitement à basse température par rapport aux procédés de traitement purement thermique comme le dépôt chimique en phase vapeur à basse pression (LPCVD). Les températures de traitement PECVD sont comprises entre 200 et 400°C. Les procédés LPCVD se situent entre 425 et 900°C. Les gaz réactifs (et de dilution) s'écoulent dans la chambre de traitement par une grande plaque

métallique perforée située au-dessus de l'échantillon, ce qui permet une distribution plus uniforme du débit de gaz réactif sur la surface de l'échantillon. Un potentiel RF est appliqué pour générer un plasma. Les électrons énergétiques présents dans le plasma ionisent ou dissocient les gaz réactifs pour générer davantage de radicaux réactifs chimiquement. Ces radicaux réagissent avec les précurseurs de dépôt pour former le film mince de matériau de dépôt au-dessus de l'échantillon.

Le dépôt par pulvérisation cathodique est lui un procédé de dépôt physique en phase vapeur de dépôt de film mince dans lequel un matériau source de haute pureté (appelé cathode ou cible) est soumis à un plasma (généralement d'argon). Les atomes énergétiques du plasma entrent en collision avec le matériau cible et détruisent les atomes sources qui se déplacent ensuite vers le substrat et se condensent en un film mince.

Applications biomédicales

Depuis une quinzaine d'année le plasma froid est étudié dans le domaine du biomédical et son intérêt ne cesse de s'accroître.

On peut citer de manière non exhaustive :

- La **décontamination, stérilisation**¹⁰⁻¹³

Cette application des plasmas froids est la plus étudiée. Grâce aux espèces actives produites dans le plasma froid, les micro-organismes peuvent être détruits sans les effets de la température.

- Le traitement des **ulcères** et des **plaies chroniques**¹⁴⁻¹⁷

Le traitement des ulcères et plaies chroniques est notamment utilisé pour traiter les pieds diabétiques. Le plasma froid, en plus d'induire un nettoyage de la plaie va stimuler la prolifération des tissus pour favoriser la cicatrisation.

- La **coagulation** du sang¹⁸⁻²¹

Les plasmas froids permettent d'obtenir des résultats semblables à ceux obtenus par les plasmas chauds (qui sont de nos jours utilisés pour cautériser les tissus lors de chirurgies) sans endommager les tissus alentours puisque la coagulation est obtenue par stimulation de mécanismes naturels.

- Le blanchiment ou les soins **dentaires** ^{22–26}

Trois applications principales existent en odontologie : le traitement de bactéries à la surface ou dans la racine des dents, l'amélioration de l'adhésion et incorporation des matériaux type implants ou encore le blanchiment de l'émail.

- Le traitement de **cellules cancéreuses** ^{10,27–31}

Deux types de traitement sont étudiés dans le domaine de la cancérologie. Le traitement direct, avec l'application du jet plasma directement au-dessus des cellules cancéreuses, ou le traitement indirect qui consiste dans un premier temps à "activer" un milieu (exposer le milieu au jet plasma) avant de mettre en contact ce milieu activé avec des cellules cancéreuses. L'exposition directe ne permet pas un traitement in-vivo de tumeurs sans chirurgie alors que l'approche indirecte permet d'injecter le milieu dans des endroits plus inatteignables, en plus de l'avantage d'être produit à l'avance.

Cette thèse s'inscrit dans ce domaine de recherche. Pour nos travaux, l'approche du traitement indirect a été choisie.

Dans le domaine de l'agriculture, le plasma froid commence également à émerger dans des applications telles que :

- Le traitement de **fruits et légumes** pour augmenter la durée de **conservation** ^{32–34}
- Le traitement de **graines** pour favoriser la **germination** et la productivité ^{35–38}

1.4 Les dispositifs de plasma froid

Les jets de plasma à pression atmosphérique non thermique jouent un rôle de plus en plus important dans diverses applications de traitement biomédical grâce à leur capacité de créer des espèces réactives d'oxygène et d'azote (respectivement ROS et RNS) par des plasmas non liés spatialement ou confinés entre des électrodes³⁹. Ils peuvent être générés avec diverses géométries d'électrodes et avec une large gamme de fréquences d'alimentation. Une exigence est commune à toutes les études : l'inhibition de la transition décharge luminescence/arc électrique.

Diverses méthodes permettent d'atteindre cette exigence par différents moyens³⁹.

La décharge couronne (ou **corona**) est une décharge partielle sans arc dans un fluide neutre entre deux électrodes dissymétriques où règne un fort champ électrique. Plusieurs configurations existent telles que la pointe-plan (Figure 1-3), le fil-cylindre et le fil-plan. Si l'électrode qui possède le rayon de courbure le plus faible est alimentée avec une tension continue positive par rapport à l'électrode de masse, il s'agit d'une décharge couronne positive. Quand la polarité des électrodes est inverse, on parle de décharge couronne négative. Cette distinction est importante car les phénomènes induits lors de la décharge vont différer significativement de par leur nature que par la quantité d'espèces chimiques formées (la décharge négative produit par exemple beaucoup plus d'ozone que la positive)⁴. Pour pouvoir augmenter la tension (et produire plus d'espèces chimiques sans générer un arc et détériorer les électrodes), les électrodes peuvent être alimentées avec une tension alternative et de fréquence de quelques kHz ou en utilisant un générateur de tension impulsionnelle. La durée d'impulsion est alors choisie de telle sorte que la tension inter-électrode repasse à zéro avant l'apparition d'un arc électrique.



Figure 1-3 Photographie d'une décharge corona multi-pointes pulsée au laboratoire LAPLACE (d'après M.Yousfi et al.⁴⁰). Conditions expérimentales : tension d'alimentation 8kV, durée d'impulsion 40 μ s, fréquence de répétition 100Hz, distance inter-électrode 8mm et rayon de courbure des pointes : 25 μ m. 14 pointes réparties en deux rangées de 7.

En utilisant des techniques de fabrication de semi-conducteurs, des structures de micro-décharge ont été utilisées pour générer des plasmas à courant continu⁴¹. Des **décharges à cathodes creuses** avec des dimensions de cathodes inférieures au millimètre ont également été largement exploitées⁴² (Figure 1-4). Les micro-décharges génèrent des plasmas non thermiques à haute pression en ayant des dimensions de cathodes dans la plage micrométrique, ce qui permet une augmentation de la pression tout en maintenant une

tension de maintien relativement faible. Les fréquences DC (50/60 Hz) ont également été employées pour produire des plasmas froids. Dans ce cas, on a recours à des décharges à barrières qui nécessitent un film diélectrique uniformément distribué pour recouvrir les électrodes⁴³. Ici, le courant de décharge est limité par la couche résistive, qui joue le rôle de ballast, et ne permet pas à la décharge de passer à un arc.

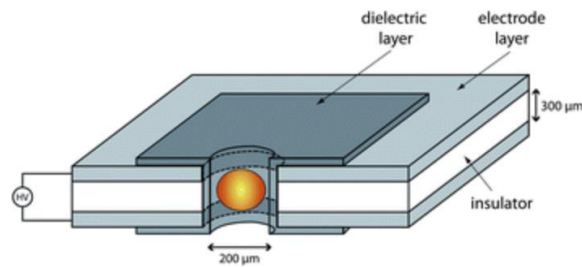


Figure 1-4 Schéma d'une décharge couronne à cathode creuse, d'après Meyer et al.⁴⁴

L'un des dispositifs les plus répandus pour générer des plasmas froids est la **décharge à barrière diélectrique (DBD)**⁴⁵. Les DBD disposent de matériaux diélectriques pour recouvrir une ou les deux électrodes et s'appuient sur des tensions élevées dans la gamme de fréquences du kHz pour amorcer la décharge. Des géométries d'électrodes planes et cylindriques ont été adoptées. Dans les DBD, la collecte de charge sur la couche diélectrique qui recouvre les électrodes provoque une chute de tension à travers le plasma et induit son extinction sans passage à l'arc. De ce fait, les DBD sont des décharges auto-pulsées qui ne permettent pas au courant de décharge d'augmenter à un niveau qui induit un arc électrique (Figure 1-5). Les DBD génèrent généralement des plasmas non uniformes qui présentent un grand nombre de filaments/streamers qui apparaissent de manière aléatoire entre les électrodes. Ces filaments sont des colonnes de plasma presque cylindriques avec des rayons inférieurs au millimètre et une durée de vie de quelques nanosecondes seulement⁴⁶. Dans certaines conditions particulières (gamme de fréquences et mélange de gaz), les DBD peuvent également générer des plasmas diffus uniformes sans filaments⁴⁷. Ce mode de fonctionnement des DBD a fait l'objet, au cours des deux dernières décennies, de nombreuses études en raison de son utilité dans le traitement des matériaux, notamment les applications biomédicales^{43,48}.

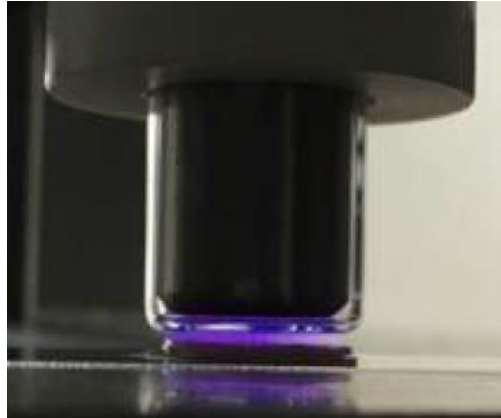


Figure 1-5 Photographie d'une décharge DBD, dite à électrode flottante, développée au LAPLACE. Conditions expérimentales : tension 10kV, fréquence 10kHz, durée d'impulsion 1 μ s.

Les **sources radiofréquence (RF)** ont également été mises à profit pour générer des plasmas froids avec des dispositifs similaires aux DBD et avec des dispositifs dont les électrodes sont en métal nu⁴⁹. Avec les électrodes en métal nu, l'arc est un problème et il faut donc contrôler à la fois la température des électrodes (généralement par refroidissement à l'eau) et ajuster le débit de gaz à un certain niveau pour minimiser le risque de formation d'arcs. Les dispositifs appliqués par RF nécessitent une adaptation d'impédance entre la source d'alimentation et le plasma pour optimiser la puissance déposée dans le plasma et minimiser la puissance réfléchie.

Les jets de plasma froid à pression atmosphérique

Les jets de plasma froid à pression atmosphérique sont des dispositifs récents dans l'histoire des plasmas. La plupart des jets de plasma sont alimentés par des gaz rares tels que l'hélium ou l'argon auxquels peuvent être ajoutés d'autres gaz comme l'oxygène ou l'azote afin de favoriser certaines réactions et la génération de certaines espèces^{3,50}.

Dans la plupart des cas, les sources de plasma sont composées d'électrodes couplées à un diélectrique. On distingue plusieurs types de jet plasma :

- La première configuration, représentée Figure 1-6 (a), consiste en un tube de diélectrique entouré de deux électrodes. Cette configuration DBD est largement utilisée dans la littérature⁵¹⁻⁵³ et c'est également avec cette configuration que nous travaillons. En effet, sa géométrie possède l'avantage d'éviter un passage à l'arc.

- La seconde configuration BDB, schématisée Figure 1-6 (b), consiste à remplacer l'électrode de haute tension externe par une électrode pointe interne recouverte d'un diélectrique^{54,55}.
- Un troisième type de configuration (Figure 1-6 (c)), est une configuration DBD comme vu précédemment mais l'électrode de masse a été retirée. La décharge est alors moins intense et la plume est moins longue.
- Un quatrième type de configuration (Figure 1-6 (d)) est une configuration "DBD-like" ou décharge à simple barrière diélectrique. Contrairement à la configuration précédente, elle ne possède pas de diélectrique autour de l'électrode interne. Dans ce cas, si un objet conducteur est mis en contact avec la plume, le risque du passage à l'arc existe.

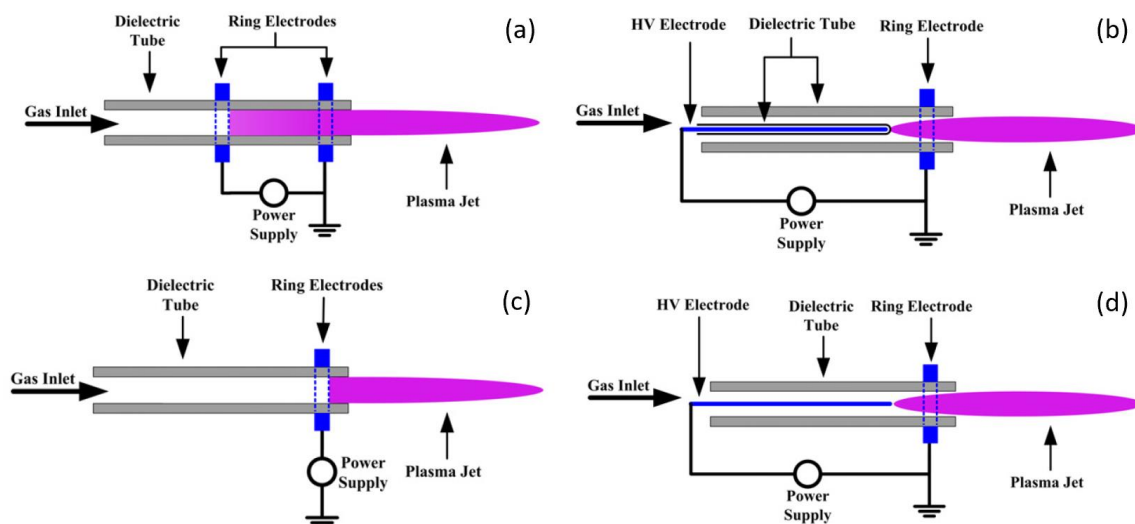


Figure 1-6 Schéma des principaux dispositifs de plasma froid de configuration DBD (a, b, c) et "DBD-like" (d) d'après Lu et al.³

Ces plasmas, ayant l'apparence d'une plume, ont la capacité de s'étendre jusqu'à plusieurs centimètres dans l'air. Ces configurations présentent l'avantage d'obtenir un plasma à une température de gaz proche de la température ambiante (ou ne dépassant pas environ 50°C), ce qui est nécessaire pour des applications sur le vivant.

1.5 Conclusion

Dans ce chapitre nous avons présenté de manière bibliographique les généralités sur la physique des plasmas ainsi que les réactions mises en jeu lors de l'établissement d'un plasma. Nous avons aussi détaillé les applications du plasma dans l'industrie et plus spécifiquement le domaine du biomédical. En effet, la variabilité des configurations (corona, DBD, etc.) et des paramètres (tension, gaz, etc.) permet au plasma d'avoir un large éventail d'applications.

Les applications biomédicales nécessitent un plasma non thermique avec une température de l'ordre de la température ambiante et sans passage à l'arc. Plusieurs configurations, notamment des décharges à barrières diélectriques (DBD), que ce soit sous forme de jets ou avec une électrode flottante ont été mises au point par les différentes équipes travaillant dans le domaine du plasma médecine.

Durant cette étude nous nous sommes servis d'un jet de plasma avec une configuration DBD dont les électrodes sont enroulées autour d'un tube de quartz. Cette configuration sera détaillée dans la partie "Matériels et Méthodes".

Chapitre 2 - Le plasma en oncologie

On estime à 400 000 le nombre de nouveaux cas de cancers (incidence) et à 150 000 le nombre de décès (mortalité) en 2017 en France⁵⁶. Les traitements classiquement adoptés à l'heure actuelle sont la chirurgie, la radiothérapie, la chimiothérapie, l'immunothérapie mais de nouvelles solutions sont en cours de développement pour augmenter l'efficacité des traitements anticancéreux et diminuer leurs effets secondaires.

La première partie de ce chapitre est consacrée à une brève introduction du cancer et ses caractéristiques, puis les méthodes de traitement plasma en oncologie sont détaillées.

2.1 Le cancer

Le cancer est une maladie qui se caractérise par la multiplication et la propagation anarchique de cellules anormales qui, si elles ne sont pas éliminées, vont provoquer plus ou moins rapidement le décès de la personne touchée. Il peut être dû à des facteurs externes tels que le mode de vie ou les facteurs environnementaux, ou bien internes comme les mutations héréditaires ou un dérèglement du système immunitaire.

2.1.1 Fonctionnement de la cellule

L'Homme possède des milliards de cellules qui se développent et remplissent une fonction définie, puis meurent de façon programmée. L'organisme fonctionne donc grâce à un équilibre entre la production de nouvelles cellules grâce au mécanisme du cycle cellulaire, la destruction d'autres cellules par apoptose et le mécanisme de mort programmée.

Le cycle cellulaire, représenté Figure 2-1, est découpé en 5 phases :

- **Etat de quiescence (G0)** : les cellules attendent un signal pour entrer dans la phase G1. Les cellules peuvent rester plusieurs années dans cet état de quiescence.
- **Phase de croissance (G1)** : les cellules, bien que remplissant l'ensemble des fonctions nécessaire à leur fonctionnement, se préparent à la division cellulaire. La cellule commence à fabriquer des protéines et de l'ARN (agents de l'expression génétique qui traduisent l'information génétique en protéines).

- **Phase de synthèse (S)** : l'ADN des cellules est copié, créant ainsi deux paires de chromosomes servant pour chacune de leurs deux cellules filles.
- **Phase de croissance (G2)** : les cellules continuent de fabriquer ARN et protéines en vue de la division.
- **Phase de division ou mitose (M)** : les cellules se divisent en deux cellules filles. La mitose comporte 4 phases appelées prophase, métaphase, anaphase et télophase. Durant ces étapes, les chromosomes se rassemblent à l'équateur de la cellule puis se séparent en chromatides qui vont migrer vers les pôles opposés de la cellule. L'enveloppe nucléaire va ensuite se refermer sur les extrémités de la cellule donnant naissance à deux cellules filles.

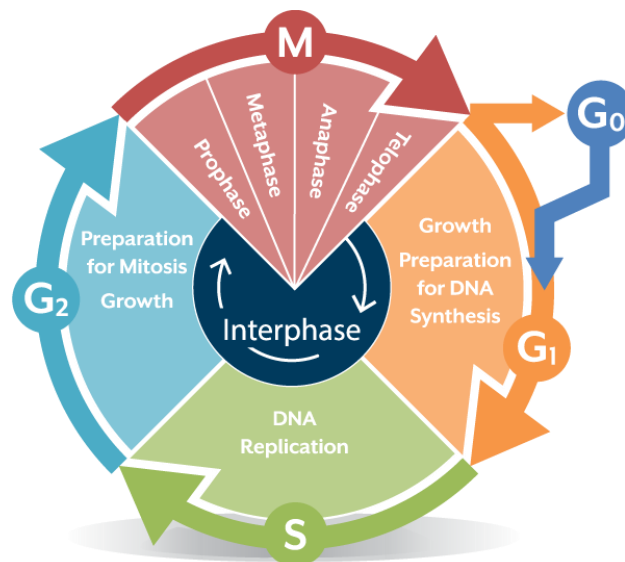


Figure 2-1 Les phases du cycle cellulaire⁵⁷.

Le cancer se caractérise par l'envahissement de l'organisme par des cellules qui échappent aux mécanismes d'homéostasie tissulaire (processus qui maintient certaines constantes du milieu intérieur de l'organisme pour en assurer le bon fonctionnement) et ayant une capacité à se répliquer de façon illimitée notamment à cause de mutations de gènes codant différents checkpoints du cycle cellulaire⁵⁸⁻⁶⁰.

2.1.2 Caractéristiques d'une cellule tumorale

Une cellule cancéreuse se développe à partir d'une cellule normale qui va être altérée par des mutations qui ne seront pas réparées par les processus habituels. Plusieurs étapes

dans le développement du cancer ont été identifiées : l'initiation, la promotion, la progression et l'apparition de métastase⁶¹.

Tout d'abord, une lésion majeure (due à des agents environnementaux) se produit au niveau de l'ADN d'une cellule. Cette cellule transformée présente une dérégulation de la prolifération qui augmente et une diminution de l'apoptose. La cellule se multiplie donc de façon anarchique et perd son caractère différencié. Enfin, la tumeur s'étend via le réseau sanguin et lymphatique vers d'autres endroits du corps pour former des métastases. La Figure 2-2 résume les principales étapes moléculaires de la cancérogénèse (d'après le Collège Français des Pathologistes CoPath).

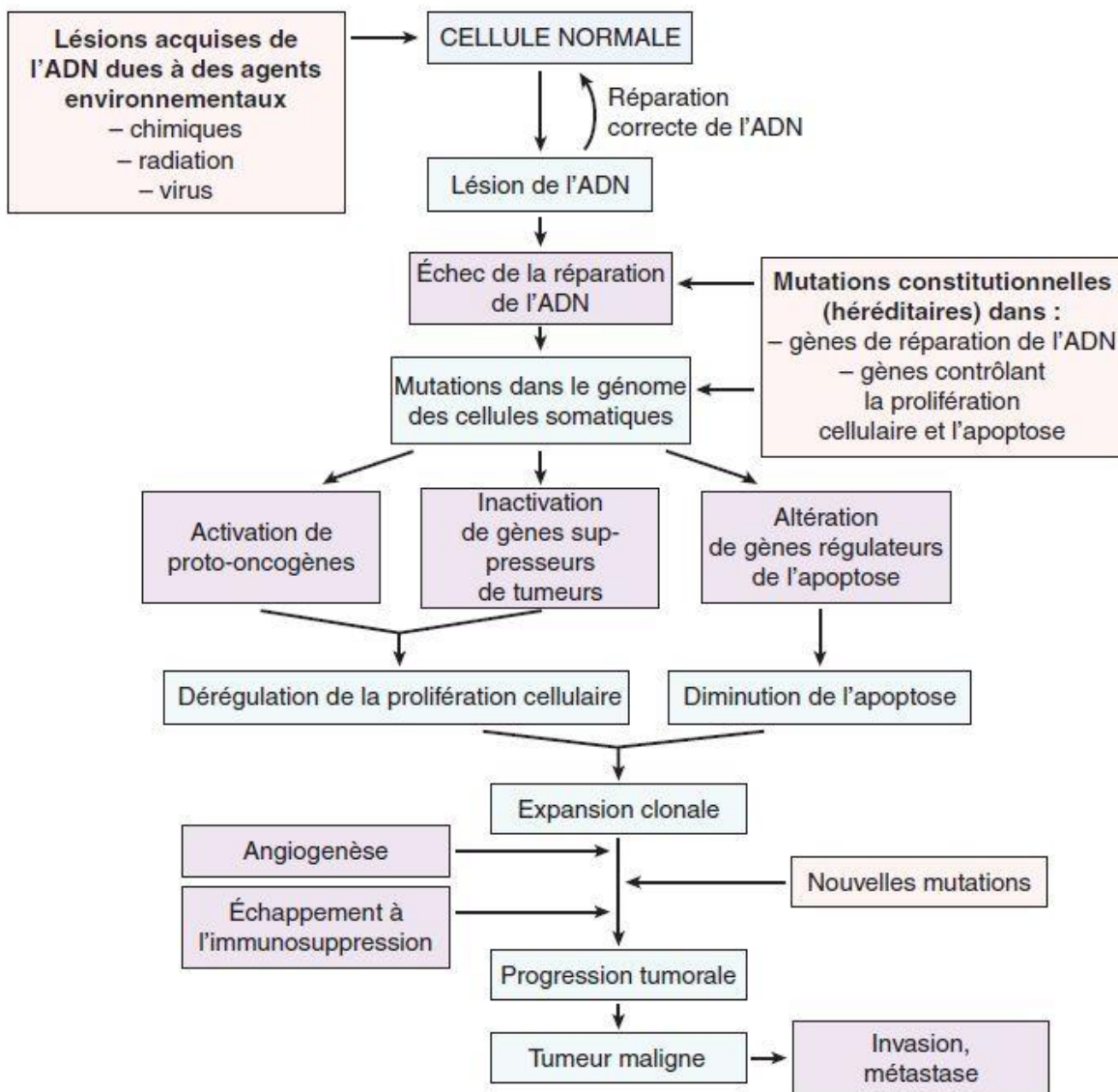


Figure 2-2 Bases moléculaires de la cancérogénèse (d'après le Collège Français des Pathologistes CoPath).

Cette transformation de la cellule normale en cellule cancéreuse est un processus long, qui peut durer des dizaines d'années. Au terme de cette transformation, la cellule cancéreuse a acquis un certain nombre de caractéristiques qui ont été mises en évidence par Hanahan et Weinberg en 2000⁶² puis précisées par les mêmes auteurs en 2011⁶³.

La Figure 2-3 présente les six principales altérations de la cellule cancéreuse : l'autosuffisance en facteurs de croissance, la résistance aux signaux antiprolifératifs, la réplification cellulaire illimitée, la résistance aux signaux de mort, l'induction de l'angiogénèse et activation de l'invasion et métastase⁶². Auxquelles ont été ajoutées deux caractéristiques supplémentaires : la reprogrammation du métabolisme énergétique et l'échappement au système immunitaire⁶³.

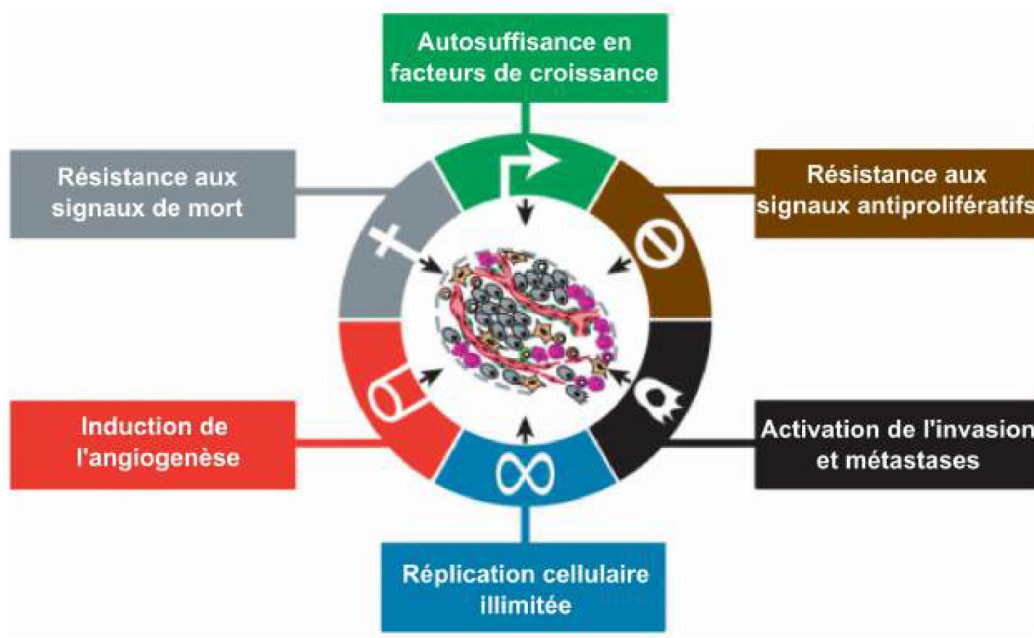


Figure 2-3 Mécanismes d'altération conduisant à la cancérisation cellulaire (d'après Hanahan et Weinberg, modifiée).

Autosuffisance en facteurs de croissance

Les cellules saines sont en général dans un état de quiescence (phase G0 du cycle cellulaire), qui peut durer plusieurs années, en attendant un signal pour rentrer dans le cycle cellulaire en phase G1. Ce passage, de l'état de quiescence au cycle de prolifération est géré par des facteurs de croissance (signaux de croissance, éléments nutritifs, etc.). Les cellules cancéreuses ont la particularité de générer elles-mêmes les facteurs de croissance nécessaires pour rentrer dans le cycle cellulaire.

Résistance aux signaux antiprolifératifs

Afin de gérer le nombre de cellule dans l'organisme (et de garder la meilleur homéostasie possible), celui-ci est régulé par un processus de mise en place de signaux antiprolifératifs. Ces signaux antiprolifératifs sont nécessaires afin de limiter le développement de cellules portant un ADN endommagé et présentant un potentiel oncogénique. Ils sont régulés par des gènes suppresseurs de tumeurs comme le p53, découvert en 1979 et vastement étudié à l'heure actuelle⁶⁴⁻⁶⁹. Ce dernier est une des molécules majeures qui intervient dans la protection contre la croissance de tumeurs. La perte de ce "gardien du génome" est une phase importante du processus de formation du cancer^{64,65}.

Réplication cellulaire illimitée

Plusieurs études ont mis en évidence que les télomères protégeant les extrémités des chromosomes jouent un rôle dans la capacité à proliférer de façon illimitée^{70,71}. En effet, les télomères sont des petites structures répétitives aux extrémités des chromosomes et qui sont raccourcies à chaque division cellulaire participant ainsi au vieillissement de la cellule. La limite de Hayflick⁷² ou plateau de sénescence réplivative correspond au nombre maximal de divisions cellulaires que peut subir une cellule⁷³. Chez les cellules cancéreuses, cette limite n'est pas observée⁷², car une enzyme nommée télomérase est capable d'ajouter des fragments de télomère lors des divisions cellulaires⁷⁴. C'est ainsi que la cellule cancéreuse présente un pouvoir de prolifération quasi illimité.

Résistance aux signaux de mort

Afin de gérer l'homéostasie cellulaire et l'élimination de cellules potentiellement dangereuses, l'organisme à recours à trois principaux types de mort cellulaire: l'apoptose, l'autophagie et la nécrose (Figure 1-4)⁷⁵.

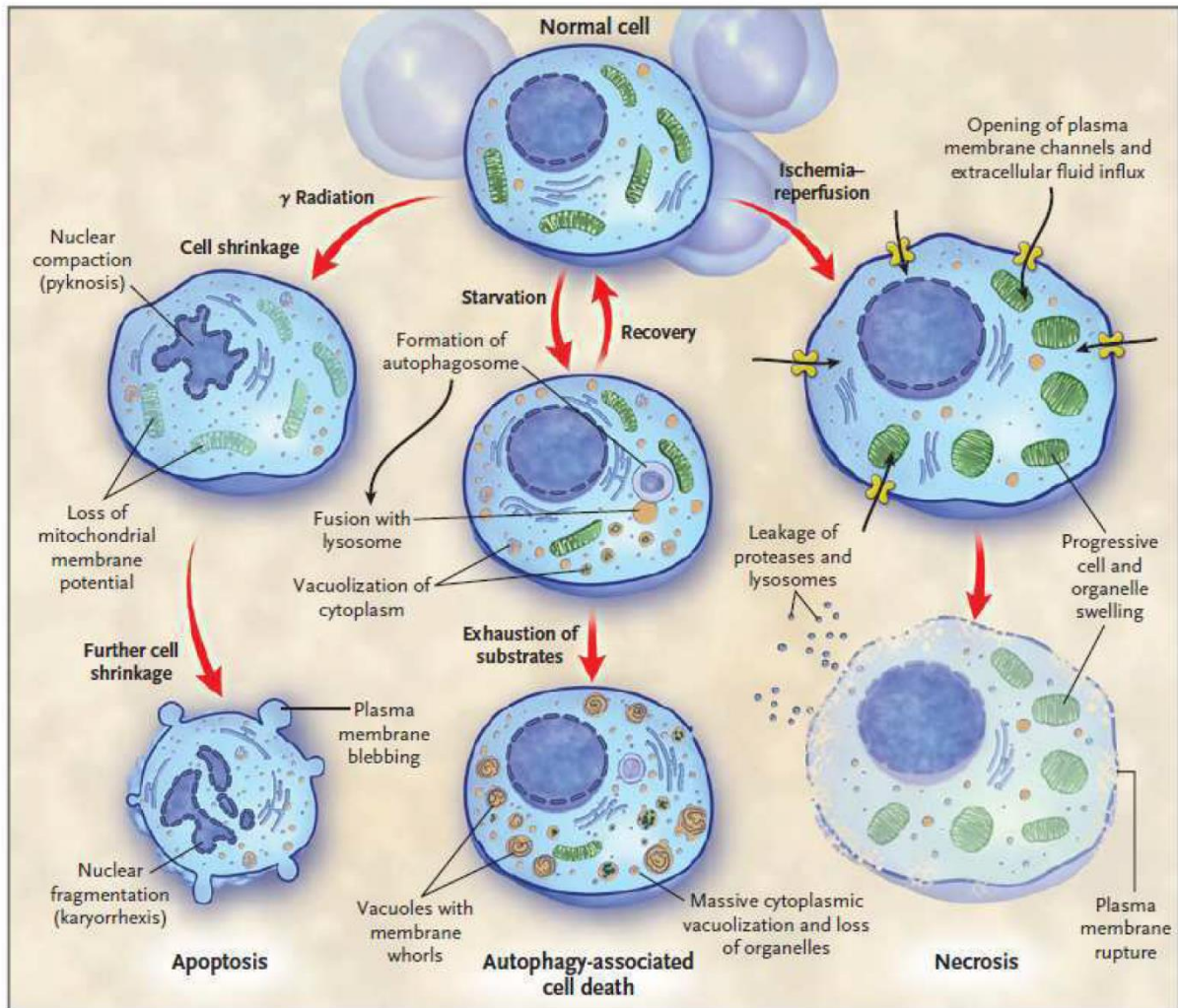


Figure 2-4 Les trois principaux types de mort cellulaire : apoptose, autophagie et nécrose. Changements morphologiques induits par ces trois types de mort cellulaire suite à divers stimuli (l'irradiation pour l'apoptose, le manque de substrats pour l'autophagie et l'ischémie-reperfusion pour la nécrose). (D'après Hotchkiss et al., N Engl J Med, 2009)⁷⁶

Apoptose

L'apoptose est caractérisée par le rétrécissement de la cellule et le maintien de l'intégrité de la membrane plasmique⁷⁷. C'est un mécanisme interne aux cellules qui permet sa mise à mort programmée ou autodestruction suite à un signal cellulaire. Durant l'apoptose, la cellule va fragmenter son ADN et générer des corps apoptotiques qui sont ensuite évacués par les phagocytes⁷⁷ (cellules possédant le pouvoir d'absorber et de digérer des particules étrangères). Ce mécanisme de mort cellulaire n'induit donc pas d'inflammation tissulaire⁷⁸.

L'apoptose est régulée par les caspases (groupe de protéases à cystéine) qui sont présentes dans le cytoplasme de la cellule sous forme inactive. Il en existe deux groupes, les caspases activatrices (caspases 2, 8, 9, 10...) qui vont activer à leur tour les caspases effectrices (caspases 3, 6, 7...) qui exécutent l'apoptose. La cellule peut recevoir des signaux soit externes,

soit internes pour activer les caspases activatrices. En effet, deux voies peuvent induire l'apoptose : la voie extrinsèque qui va mobiliser des récepteurs de domaine de mort situés à la surface de la cellule et la voie intrinsèque qui est dépendante des protéines du cytoplasme et de la mitochondrie.

Autophagie

L'autophagie est un mécanisme d'autodigestion qui consiste en la dégradation des composants intracellulaires par les lysosomes⁷⁹. Elle joue un rôle dans le maintien de l'homéostasie qui nécessite l'élimination et le remplacement en continue de matériel potentiellement dangereux qui peut s'accumuler lors du fonctionnement cellulaire normal (comme les mitochondries perméabilisées, des agrégats de protéines redox-actives)^{80,81}. Son activation peut également, lorsque la cellule est soumise à un stress nutritif, permettre de produire une énergie suffisante pour maintenir des fonctions vitales⁸². Cette mort cellulaire permet donc le maintien de l'homéostasie mais également la survie dans des conditions de stress important.

Nécrose

Durant le phénomène de nécrose, il y a perte d'intégrité de la membrane plasmique induisant un relargage du contenu intracellulaire dans l'environnement extracellulaire⁷⁸. Longtemps la nécrose a été considérée comme mort anormale et non programmée, mais celle-ci peut-être dans certains cas contrôlée et prendre le pas sur l'apoptose lorsque celle-ci est inhibée^{83,84}. Du fait de son relargage extracellulaire, la nécrose entraîne une réponse inflammatoire des tissus environnants⁷⁸.

Induction de l'angiogénèse

L'angiogénèse est la production de nouveaux vaisseaux sanguins à partir de vaisseaux existants. Ce processus physiologique normal est détourné à son profit par le cancer pour étendre sa croissance. En effet, c'est via la vascularisation que l'apport des nutriments et de l'oxygène se fait. A partir d'un certain volume, une tumeur non vascularisée ne va plus pouvoir se développer⁸⁵. L'angiogénèse va donc être déclenchée par la tumeur par l'émission de facteurs de croissance qui diffusent jusqu'au vaisseau sanguin le plus proche. Ainsi, les facteurs de croissance induisent la formation de nouveaux vaisseaux en multipliant les cellules de la paroi vasculaire. Le réseau vasculaire généré par une tumeur est donc anarchique. L'angiogénèse est également un mécanisme responsable de la formation de métastases,

puisque des cellules cancéreuses de la tumeur pourront utiliser les nouveaux vaisseaux sanguins pour migrer vers d'autres organes.

Activation de l'invasion et métastases

Lorsque les cellules cancéreuses quittent la tumeur dite primitive pour s'installer dans les organes voisins, ces colonies sont appelées métastases. C'est grâce à la vascularisation de la tumeur que le cancer peut effectuer cette propagation. Premièrement, les cellules cancéreuses entrent dans les vaisseaux sanguins. Ce phénomène est appelé intravasation. Lorsqu'elles arrivent dans les capillaires sanguins fins qui irriguent les organes, elles restent bloquées du fait de leur taille plus importante que celle des capillaires. Elles quittent ainsi la circulation sanguine et s'intègre à l'organe : c'est l'extravasation. Enfin, les cellules cancéreuses doivent s'adapter à ce nouvel environnement qui ne leur est pas favorable. Ce procédé qui peut prendre jusqu'à plusieurs années s'appelle la colonisation.

Reprogrammation du métabolisme énergétique

La prolifération illimitée des cellules cancéreuses est donc due notamment à la dérégulation du contrôle de la prolifération mais également à une adaptation du métabolisme énergétique (Figure 2-5). En présence d'oxygène (c'est-à-dire en condition aérobie), les cellules normales transforment le glucose, d'abord en pyruvate dans le cytosol (partie liquide du cytoplasme) et ensuite en dioxyde de carbone dans les mitochondries via le cycle de Krebs. Dans les conditions anaérobies (sans présence d'oxygène), la glycolyse est favorisée et relativement peu de pyruvate est envoyé aux mitochondries (qui consomment de l'oxygène). Otto Warburg^{86,87} a été le premier (en 1930 puis 1956) à observer une anomalie caractéristique des cellules cancéreuses: même en présence d'oxygène, les cellules cancéreuses peuvent reprogrammer leur métabolisme du glucose, et donc leur production d'énergie, en limitant largement leur métabolisme énergétique à la glycolyse, conduisant à un état appelé «glycolyse aérobie»⁶³. Ainsi les cellules cancéreuses peuvent produire leur énergie, sous forme d'ATP (adénosine triphosphate) sans passer par la mitochondrie.

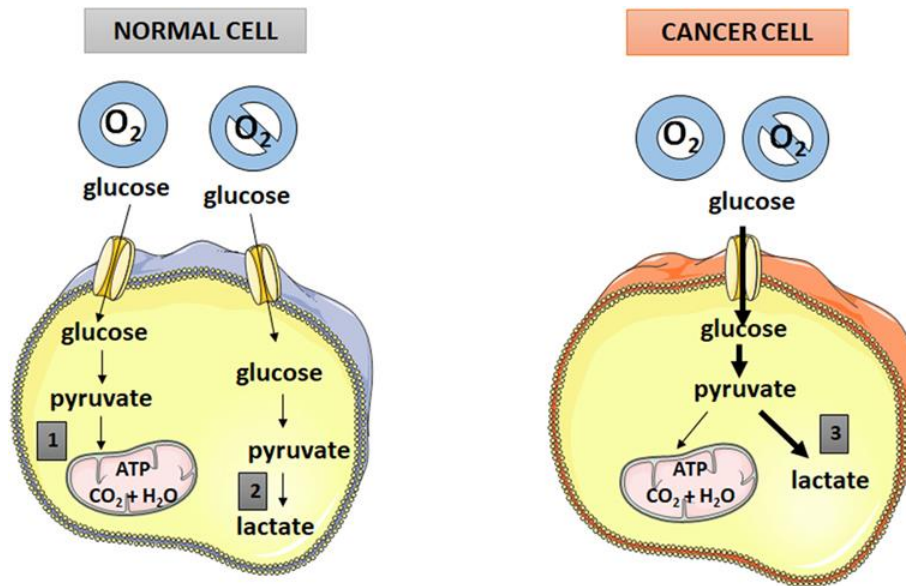


Figure 2-5 Comparaison des mécanismes de glycolyse entre cellule saine et cancéreuse⁸⁸.

1 Phosphorylation oxydative. 2 Glycolyse anaérobie. 3 Glycolyse aérobie.

Une telle reprogrammation du métabolisme énergétique semble contre-intuitive, dans le sens que les cellules cancéreuses doivent compenser l'efficacité 18 fois plus faible de la production d'ATP par la glycolyse par rapport à la phosphorylation oxydative mitochondriale. Une hypothèse soulevée^{89,90} serait qu'une glycolyse accrue permet de détourner les intermédiaires glycolytiques vers diverses voies de biosynthèse, y compris celles générant des nucléosides et des acides aminés; cela facilite à son tour la biosynthèse des macromolécules et des organites nécessaires à l'assemblage de nouvelles cellules. De plus, le métabolisme de type Warburg semble être présent dans de nombreux tissus embryonnaires à division rapide, ce qui suggère une fois de plus un rôle dans le soutien des programmes de biosynthèse à grande échelle nécessaires à la prolifération cellulaire active⁶³.

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. La théorie de longue date de la surveillance immunitaire propose que les cellules et les tissus soient constamment surveillés par un système immunitaire toujours vigilant et que cette surveillance immunitaire soit responsable de la reconnaissance et de l'élimination de la grande majorité des cellules cancéreuses naissantes. Selon cette logique, les tumeurs solides apparues ont en quelque sorte réussi à éviter la détection par les divers organes du système immunitaire ou ont été

en mesure de limiter l'étendue de la destruction immunologique, échappant ainsi à l'éradication.

Le rôle de la surveillance défectueuse immunologique des tumeurs semblerait être validé par les augmentations frappantes de certains cancers chez les sujets immunodéprimés⁹¹. Cependant, la grande majorité d'entre eux sont des cancers induits par des virus, ce qui suggère qu'une grande partie du contrôle de cette classe de cancers dépend normalement de la réduction de la charge virale chez les individus infectés, en partie par l'élimination des cellules infectées de virus. Cependant, ces dernières années un nombre croissant de preuves provenant à la fois de souris génétiquement modifiées et d'épidémiologie clinique, suggère que le système immunitaire agit comme une barrière importante à la formation et à la progression de la tumeur, au moins dans certaines formes de cancer non induit par un virus.

2.2 Les deux types de traitement au plasma : indirect vs direct

Les traitements au plasma dans la thérapie du cancer ont démontré un avantage qui est la sélectivité. Plusieurs études ont en effet présenté une efficacité du traitement sur les cellules cancéreuses, tout en n'impactant pas les cellules saines⁹²⁻⁹⁶. Deux types de traitement au plasma existent (Figure 2-6) : le traitement indirect, via la génération d'un milieu activé par plasma ou le traitement direct.

Le traitement direct (Figure 2-6 d, e, f), largement utilisé dans la littérature^{28,92,97-100}, consiste à exposer directement des cellules *in vitro* ou des tumeurs *in vivo* au jet plasma. Cette méthode, notamment pour les études *in vivo* ectopique, présente l'inconvénient de ne pas pouvoir accéder sans chirurgie à toutes les tumeurs. Les études sont alors faites soit en extrayant la tumeur chirurgicalement¹⁰¹, ou à travers la peau²⁸. Bien que la température des plasmas (jets ou DBD flottante) soit limitée, cette dernière méthode peut entraîner des lésions cutanée¹⁰².

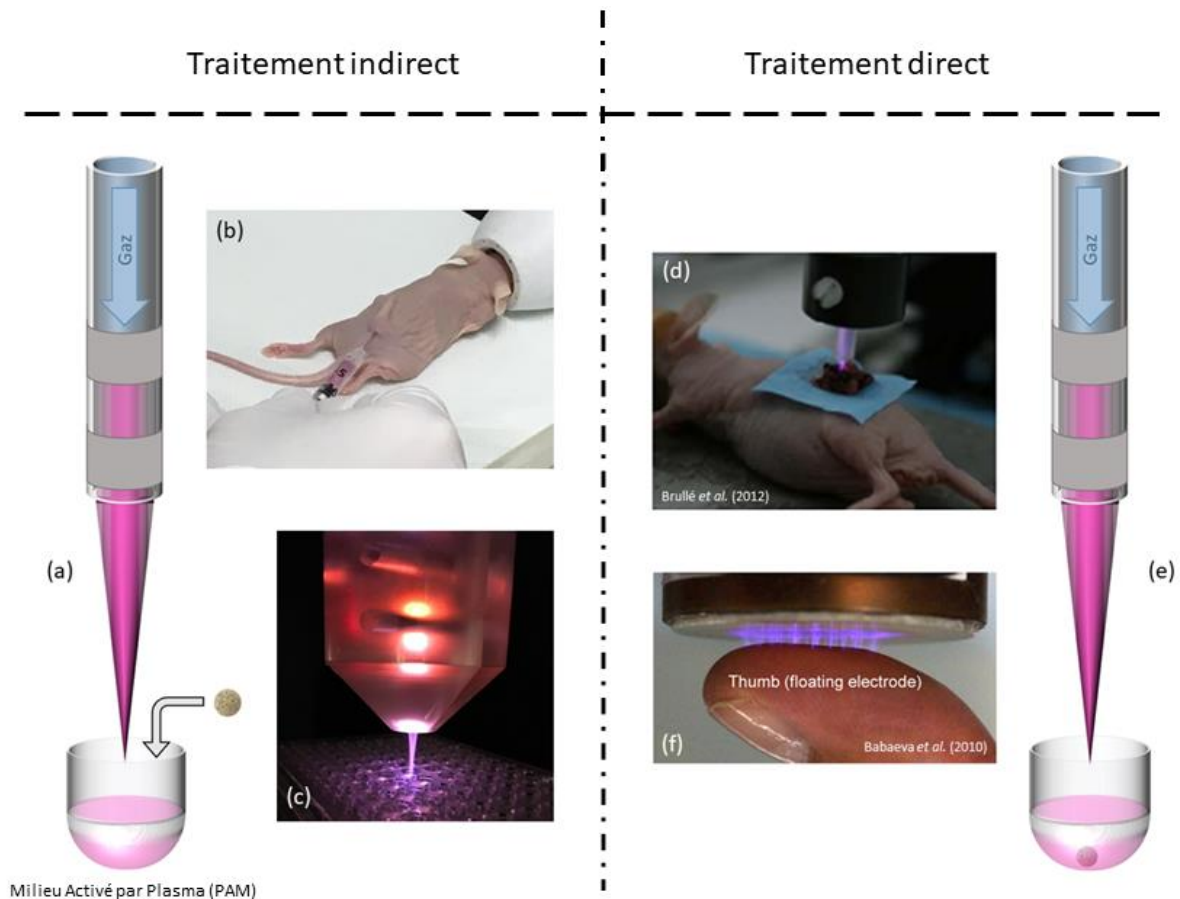


Figure 2-6 Traitement plasma indirect vs direct de sphéroïdes *in vitro* ou d'une tumeur *in vivo*. (a) Traitement indirect avec la génération dans un premier temps du PAM (milieu activé par plasma) avant traitement *in vitro* où le sphéroïde est ensuite plongé dans le PAM et (b) *in vivo* où le PAM est injecté dans la tumeur. (c) Photo du jet plasma lors de la génération du PAM dans une plaque 96 puits. (e) Traitement direct avec exposition au jet plasma du sphéroïde *in vitro*. (d) Traitement direct *in vivo* de la tumeur au jet plasma¹⁰¹ ou (f) avec une DBD flottante¹⁰³.

Le traitement indirect (Figure 2-6 a, b, c) quant à lui consiste dans un premier temps à "activer un milieu", c'est à dire placer le jet plasma au-dessus d'un milieu liquide (Plasma Activated Medium – PAM) afin de générer des espèces réactives¹⁰⁴. Dans un second temps, *in vitro* les cellules sont mises en contact avec le PAM^{30,31,93,105,106} ou le PAM est injecté dans une tumeur *in vivo*²⁹. Il présente les avantages de pouvoir être généré à l'avance et stocké³⁰ pour un usage futur, tel un médicament et de pouvoir être injecté *in vivo*²⁹ par voie endoscopique ou par capsule médicamenteuse ciblant uniquement la zone à traiter.

C'est donc cette approche de traitement indirect avec le PAM dont nous nous servirons dans nos études.

2.3 Objectifs de la thèse

Actuellement, les stratégies thérapeutiques de traitement du cancer dépendent de différents paramètres tels que le stade du cancer, l'emplacement et l'étendue de la tumeur ainsi que l'état de santé global du patient. Le traitement du cancer passe généralement par une étape de chirurgie (résection) qui, en plus de la chimiothérapie ou radiothérapie entraîne des effets secondaires non négligeables pour les patients. En effet, la résection consiste à retirer une partie ou la totalité des cellules cancéreuses. La difficulté réside dans la marge de tissu à retirer, une marge trop faible laisserait des cellules cancéreuses et une marge trop grande risquerait d'endommager les tissus sains alentours. La chimiothérapie, par l'usage de substances chimiques est personnalisée au type de cancer et au patient. Cependant cette méthode, qui doit être réalisée régulièrement, entraîne des effets secondaires (douloureux pour le patient, perte des cheveux, vomissement, etc.). Enfin la radiothérapie (que ce soit la radiothérapie externe¹ et la curiethérapie²) utilise des radiations pour détruire les cellules cancéreuses. La difficulté la plus importante liée à la radiothérapie vient du fait qu'en irradiant une tumeur, il n'est pas possible d'éviter totalement d'irradier les tissus environnants. Il y a donc un risque d'altération de cellules saines situées à proximité de la zone à traiter. Toutes ces stratégies, bien que de plus en plus précises, ne peuvent pas empêcher au patient des effets secondaires. C'est pourquoi de nouvelles stratégies thérapeutiques sont investiguées. C'est dans cette optique là qu'intervient le sujet de cette thèse.

Les études menées au laboratoire LAPLACE par le groupe PRHE ont permis la mise en place de dispositifs plasma optimisés pour différentes applications¹⁰⁷⁻¹⁰⁹. Récemment, l'équipe PRHE en collaboration avec le groupe IdeAs de l'IMRCP ont mené des études concernant les effets cytotoxiques du PAM sur les cellules cancéreuses du côlon^{27,30,93}. Ces investigations ont mis en évidence une perte de volume tumoral 24h après un traitement PAM lié à des dommages à l'ADN sur les couches externes des sphéroïdes, l'importance de la présence du peroxyde d'hydrogène et autres RONS (Espèces Réactives de l'Oxygène et de l'Azote) dans le PAM, la possibilité de stocker le PAM sans perte d'efficacité ainsi que la sélectivité des traitements au plasma en regard des cellules saines^{30,93}.

¹ Dans la radiothérapie externe, les rayons sont émis en faisceau par une machine située à proximité du patient et ils traversent la peau pour atteindre la tumeur.

² Dans la curiethérapie, des sources radioactives sont implantées directement à l'intérieur du corps de la personne malade.

Cette thèse va donc s'inscrire dans la continuité de ces travaux. Dans un premier temps les travaux de thèse vont s'attacher à l'identification et à la quantification des espèces réactives générées par l'exposition du milieu de culture cellulaire au jet de plasma d'hélium. Ensuite leur présence sera reliée aux effets observés sur des modèles 3D de sphéroïdes cancéreux (du côlon puis de la tête et du cou). Pour réaliser les traitements des sphéroïdes avec le plasma, nous avons choisi la méthode indirecte du milieu activé par plasma ou PAM.

Les prochains chapitres vont donc décrire les méthodes et dispositifs mis en place pour la réalisation de ces travaux puis les résultats obtenus.

Partie II

Matériels & Méthodes

Chapitre 3 - Caractérisation du jet plasma d'hélium

Dans le but comprendre la provenance des espèces générées dans le milieu activé après interaction avec le jet plasma, il est nécessaire de s'attarder sur la composition du plasma à la sortie du jet mais aussi à la périphérie du jet à l'interface plasma/air. Ce chapitre présente le dispositif expérimental ainsi que les outils de diagnostic mis en place pour caractériser le jet de plasma utilisé au cours de ce travail (Figure 3-1). Les outils de diagnostic sont répartis en deux catégories :

- Electriques (Sondes courant tension, Oscilloscope)
- Optiques (Spectroscopie d'émission, Caméra ICCD rapide)

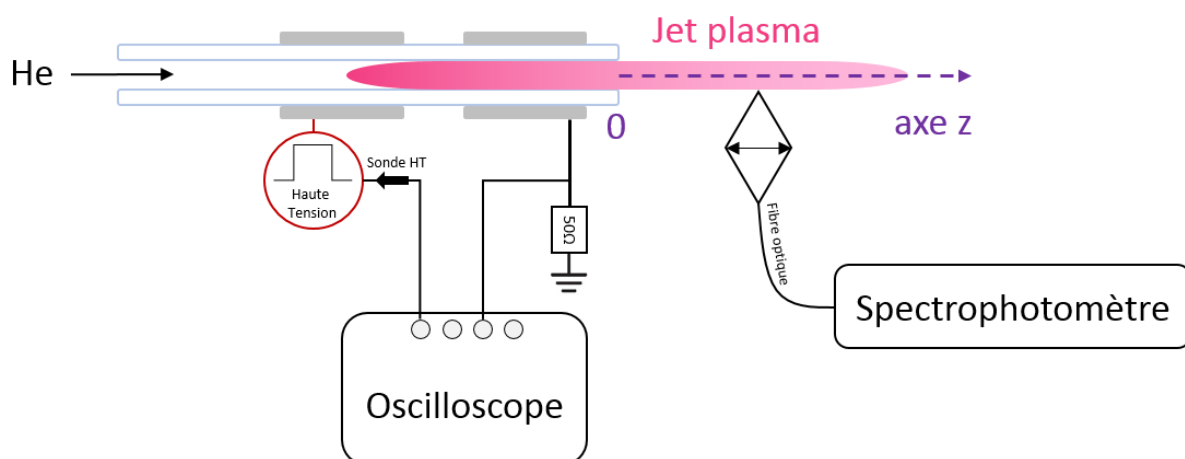


Figure 3-1 Schéma du dispositif expérimental.

3.1 Configuration du jet d'hélium

Le jet d'hélium, utilisé dans ce travail, fonctionne sur le principe de la Dielectric Barrier Discharge (DBD). Deux électrodes en aluminium (20mm de longueur) sont enroulées autour d'un tube de quartz (4mm de diamètre interne et 6mm diamètre externe). L'espace inter-électrodes est fixé à 10mm. Ces informations sont données dans la Figure 3-2 (a). L'ensemble (tube en quartz + électrodes) forme un dispositif de type DBD permettant ainsi d'éviter le passage à l'arc.

Le dispositif est alimenté avec de l'hélium 4.5. Le flux de gaz est contrôlé par un débitmètre massique (Brooks instrument SLA 5800 Series) étalonné pour l'hélium. Il présente l'avantage d'être insensible aux variations de pression et de température du gaz. Le débitmètre est commandé par l'unité de contrôle Brooks instrument 0254 permettant la variation du débit de gaz de 0 à 15L.min⁻¹. Au cours de ce travail de thèse le débit d'hélium est fixé à 3L.min⁻¹. La Figure 3-2 présente le schéma du dispositif (a et b) ainsi qu'une photographie du jet plasma d'hélium en fonctionnement (c).

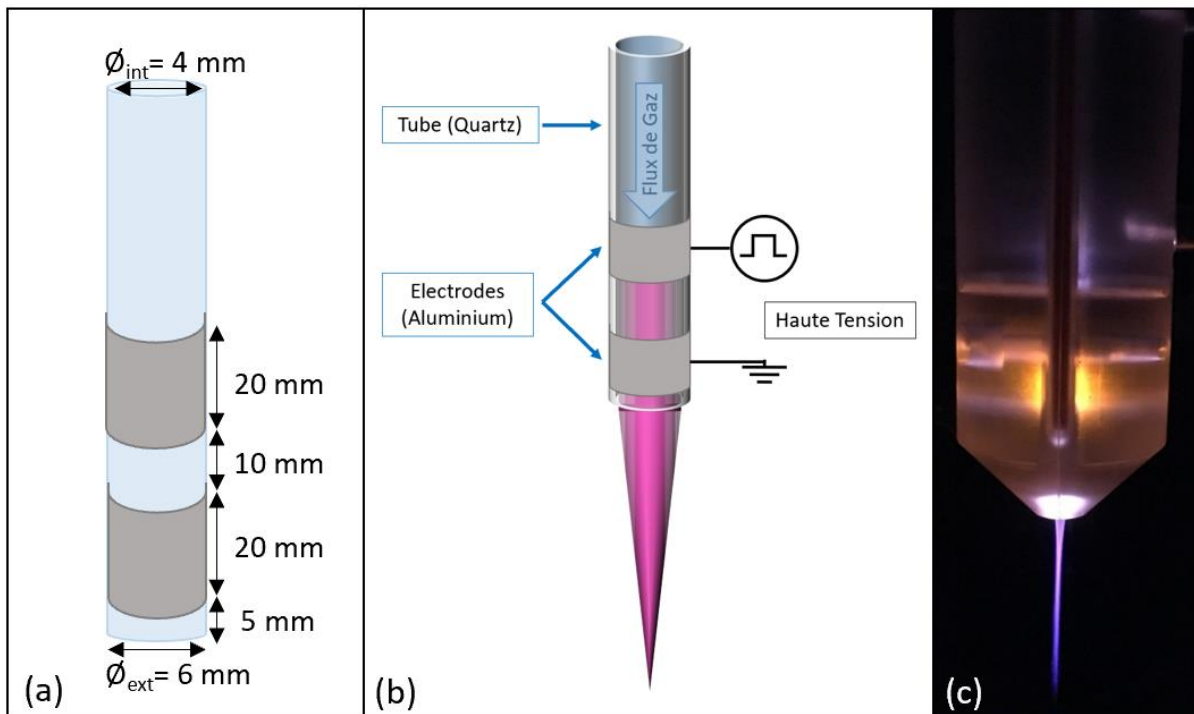


Figure 3-2 (a) Schéma de la source plasma DBD. (b) Dispositif jet d'hélium. (c) Photo du jet plasma.

Les caractéristiques typiques du signal à haute tension sont les suivantes : temps de montée et de descente de 80ns à plusieurs centaines de nanosecondes, tension continue allant jusqu'à 10kV, fréquence de répétition de 1Hz à 9.69kHz et largeur d'impulsion de 250ns à 1.75s.

Le jet de plasma est généré par l'application d'une tension impulsionnelle positive. L'alimentation repose sur le principe d'un hacheur série ; une haute tension continue délivrée par un générateur Technix SR10-R- 300 est connectée à un hacheur haute tension série DEI PVX 4110 commandé par un Générateur de basses fréquences.

Les caractéristiques générales de ce générateur de tension sont :

- Tension : variable de 0 à 10kV,
- Fréquence : variable de 1Hz à 10kHz,
- Durée d'impulsion : Variable de 500ns à 100 μ s,
- Temps de montée et de descente : 60ns.

Les conditions d'alimentation fixées durant la thèse sont ; tension 10kV, fréquence 9,69kHz et largeur d'impulsion de 1 μ s.

3.2 Outils de diagnostic

3.2.1 Diagnostics électriques

Une fois le jet de plasma allumé, les grandeurs électriques mesurées sont la tension inter-électrodes et le courant instantané. La tension inter-électrodes est mesurée par l'intermédiaire d'une sonde haute-tension (TEKTRONIX P6015A, rapport de conversion de 1 pour 1000, bande passante de 100MHz, tension maximale de 20kV, impédance de 1M Ω parallèlement à 20pF) disposée entre l'électrode active (anode) et la masse. Les signaux de courant instantané produits par la décharge DBD sont mesurés par l'intermédiaire de la mesure tension aux bornes d'une résistance de mesure de 50 Ω . Puis, ils sont visualisés sur un oscilloscope (LeCroy WaveRunner 104Xi), qui possède quatre voies de mesure, une bande passante de 1GHz et une fréquence d'échantillonnage de 10G.s⁻¹.

3.2.2 Diagnostics optiques

Spectroscopie d'émission

Le spectromètre employé dans cette étude est un Princeton Instruments Acton SP 2750 avec une distance focale de 0,75 mètre équipé de trois réseaux de diffraction : 2400 tr/mm centré à 240nm pour les diagnostics UV, 1800 tr/mm centré à 500nm pour le visible et 600 tr/mm centré à 500nm pour le visible et proche infrarouge. Le spectromètre est équipé avec une caméra CCD (PIXIS-100, 1340x100pixels de taille 20x20 μ m). Les émissions plasma sont collectées à travers une fibre optique (LG-UV-silicium 455-020-3) qui achemine les émissions sur la fente d'entrée de 200 μ m de large du spectromètre. Ce dernier peut couvrir un domaine spectral allant de 200nm à 920nm. Pour l'analyse de la gamme du visible un filtre

un passe-haut à 400nm est ajouté pour éviter les perturbations des spectres visibles par le second ordre de diffraction des radiations UV.

Caméra rapide

L'observation de la décharge du jet plasma est enregistrée grâce à une caméra intensifiée 512x512 CCD-Array (Intensified Charge-Coupled Device ICCD, PI-MAX Princeton Instruments) équipée d'un objectif Nikkor AF Micro 60mm. L'enregistrement d'une image (spectre de 360-920nm) peut se faire avec une durée d'exposition de seulement 4ns permettant de suivre la décharge au sein du jet plasma. L'utilisation de caméras ICCD en mode séquentiel donne accès à la commande du déclenchement de la caméra, au contrôle de la durée d'acquisition et au temps d'intégration ou temps de mesure. Les délais de déclenchement de l'impulsion de tension et de déclenchement de l'intensificateur de la caméra varient dans le temps. Ceci permet d'obtenir une série d'images qui apporte des informations spatio-temporelles du jet.

Chapitre 4 - Caractérisation des milieux activés par plasma

L'identification et la quantification des espèces dans les différents milieux sont nécessaires afin de pouvoir comprendre au mieux les effets des milieux activés par plasma (PAM) sur les composants biologiques. L'interaction du jet plasma avec le milieu de culture cellulaire induit la solvatation d'espèces créées par le jet de plasma mais aussi la formation d'espèces secondaires. Ces différentes espèces seront plus ou moins stables chimiquement et il est donc primordial d'adapter les techniques de détection à chaque espèce pour les identifier et les quantifier. Les deux familles d'espèces majoritaires présentes dans le milieu activé par plasma sont les radicaux et les espèces non radicalaires. Ces dernières sont stables et peuvent donc être identifiées via des techniques classiques telles que la fluorescence ou la colorimétrie. En revanche, les radicaux ont des temps de demi-vie très courts, nécessitant l'utilisation de piègeurs (spin-traps) dans le milieu avant exposition. La détection des adduits piègeurs-radicaux est réalisée grâce à la technique de résonance paramagnétique électronique (RPE).

Ce chapitre présentera tout d'abord le principe de fonctionnement de la RPE et les piègeurs utilisés, puis les méthodes classiques de quantification que sont la fluorescence et la colorimétrie, pour finir sur la chromatographie en phase liquide.

4.1 Résonance Paramagnétique Électronique (RPE)

La résonance Paramagnétique Electronique (RPE) est une technique basée sur la résonance magnétique entre un électron non-apparié et un champ magnétique extérieur.

4.1.1 Principe de la résonance paramagnétique électronique

La résonance de spin électronique a été découverte en 1944 par le physicien soviétique Ievgueni Zavoïsky de l'Université de Kazan en Russie, par la détection d'une raie d'absorption radiofréquence dans le composé $\text{CrCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}^{110}$. En 1952, les physiciens d'Oxford jettent les bases théoriques et expérimentales de cette nouvelle spectroscopie et le premier spectre d'un radical libre est réalisé.

La RPE est un puissant moyen d'investigation des systèmes paramagnétiques, c'est-à-dire ayant des électrons non appariés comme les sels et complexes de métaux de transitions ou les radicaux.

Deux moments magnétiques sont associés aux mouvements de l'électron : le moment magnétique de spin $\vec{\mu}_S$ (rotation sur lui-même, Figure 4-1) et le moment magnétique orbital $\vec{\mu}_L$ (orbite autour du noyau).

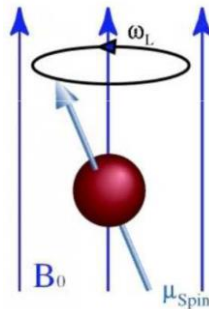


Figure 4-1 Moment magnétique de spin d'un électron dans un champ B_0 .

Ces moments magnétiques sont caractérisés par les nombres quantiques s et m_s pour le moment cinétique de spin et les nombres quantiques l et m_l pour le moment cinétique orbital. Pour un électron non apparié, le spin est décrit par le nombre $s = 1/2$, et $m_s = \pm s$. Le nombre quantique de spin total associé à un radical libre (1 électron non-apparié) est simplement $s=1/2$ et donc la situation est la même que pour un seul électron.

L'électron se comportant comme un barreau aimanté, il va s'aligner lorsqu'il est soumis à un champ magnétique B_0 (Figure 4-2). Deux populations existent alors, une de faible énergie alignée au champ et une de plus haute énergie opposée au champ.

L'énergie de l'électron est alors dépendante du champ magnétique :

$$E = gB_0\mu_B m_S$$

Avec :

g = facteur de Landé (2,0023 pour l'électron libre)

μ_B = magnéton de Bohr = $9,2740154 \cdot 10^{-24} \text{ J.T}^{-1}$

B_0 = champ magnétique appliqué, Tesla ou Gauss (1 G = 0.1 mT)

$m_S = + 1/2$ ou $- 1/2$

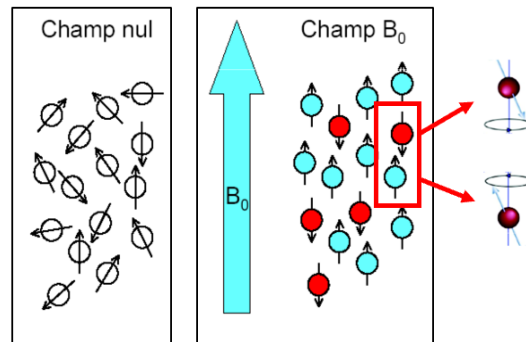


Figure 4-2 L'application d'un champ magnétique aligne ou oppose les électrons, l'énergie de l'électron dépend alors du champ magnétique. A droite exemple de signal RPE obtenu dans cette configuration.

Lorsque l'on applique une radiofréquence $\hbar\nu$ correspondant à la différence d'énergie ΔE , il y a résonance. Cette énergie permet de réaliser un retournement de spin. C'est cette levée de dégénérescence des niveaux de spin par un champ magnétique qui est appelée **Effet Zeeman** électronique et dont le signal est présenté Figure 4-3.

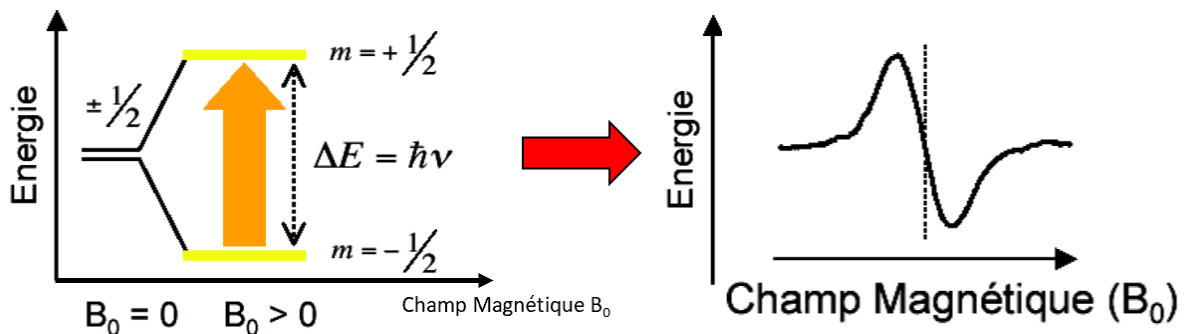


Figure 4-3 Effet Zeeman. L'énergie de l'électron dépend du champ magnétique.

L'écart d'énergie entre les deux niveaux est alors :

$$\Delta E = gB_0\mu_B$$

Cependant, un spectre RPE expérimental est en général plus complexe et consiste en un ensemble de raies (Figure 4-4).

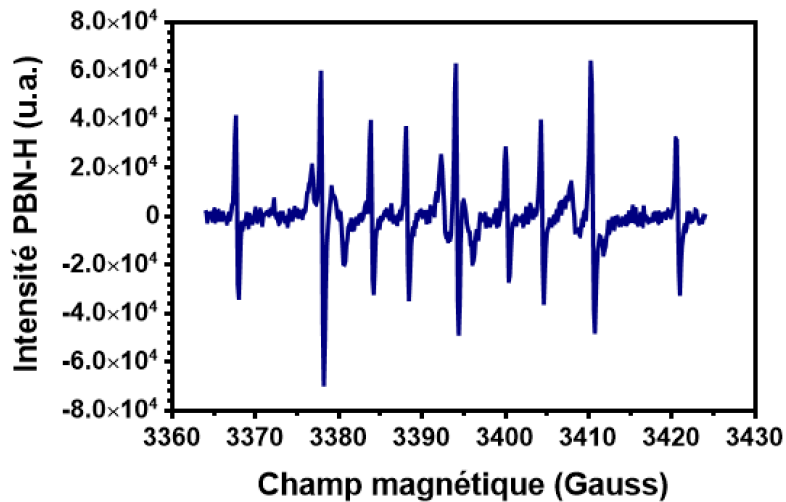


Figure 4-4 Exemple de spectre RPE complexe. Spectre obtenu après exposition d'une solution de PBN au jet plasma.

En effet, en addition du champ magnétique, les électrons appariés sont aussi sensibles à leur environnement local. Fréquemment, le noyau des atomes d'une molécule possède un moment magnétique, qui produit un champ magnétique local pour l'électron. Cette interaction électron-noyau est appelée interaction hyperfine. Les interactions hyperfines peuvent donner beaucoup d'informations, comme par exemple le nombre et l'identité des noyaux dans un complexe mais aussi leur distance à l'électron apparié.

Cette interaction hyperfine s'ajoute à l'équation précédente :

$$E = gB_0\mu_B m_S + am_S m_I$$

Avec :

a = constante de couplage hyperfine

m_I = nombre quantique de spin pour les noyaux voisins

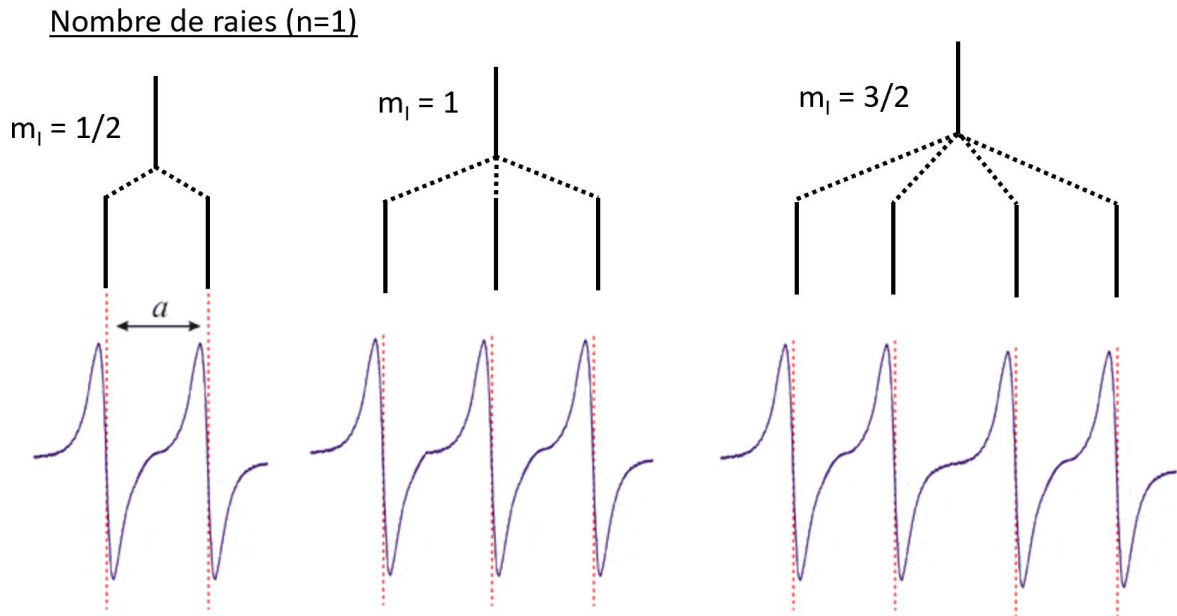


Figure 4-5 Effet de m_l sur le nombre des raies pour $n=1$.

Le nombre quantique de spin m_l influence donc le nombre de raies (Figure 4-5). Lorsque :

- n noyaux équivalents de spin nucléaire m_l sont couplés à l'électron non apparié :
Nombre de raies = $2 m_l (n+1)$
- n noyaux équivalents m_l et n' noyaux équivalents m_l' sont couplés à l'électron non apparié:

$$\text{Nombre de raies} = [2 m_l (n+1)][2 m_l' (n'+1)]$$

Alors que m_l détermine le nombre de raies, l'intensité des raies sera, elle, déterminée par le nombre de noyaux interagissant.

Dans le cas où les noyaux sont équivalents, pour $n = 1$, toutes les raies sont de même intensité (Figure 4-5). En revanche pour $n > 1$, les intensités dépendent du spin (Figure 4-7 (a)). Par exemple, pour le spin $m_l=1/2$, les intensités des raies suivent le triangle de Pascal dû au phénomène de recouvrement de raies (Figure 4-6).

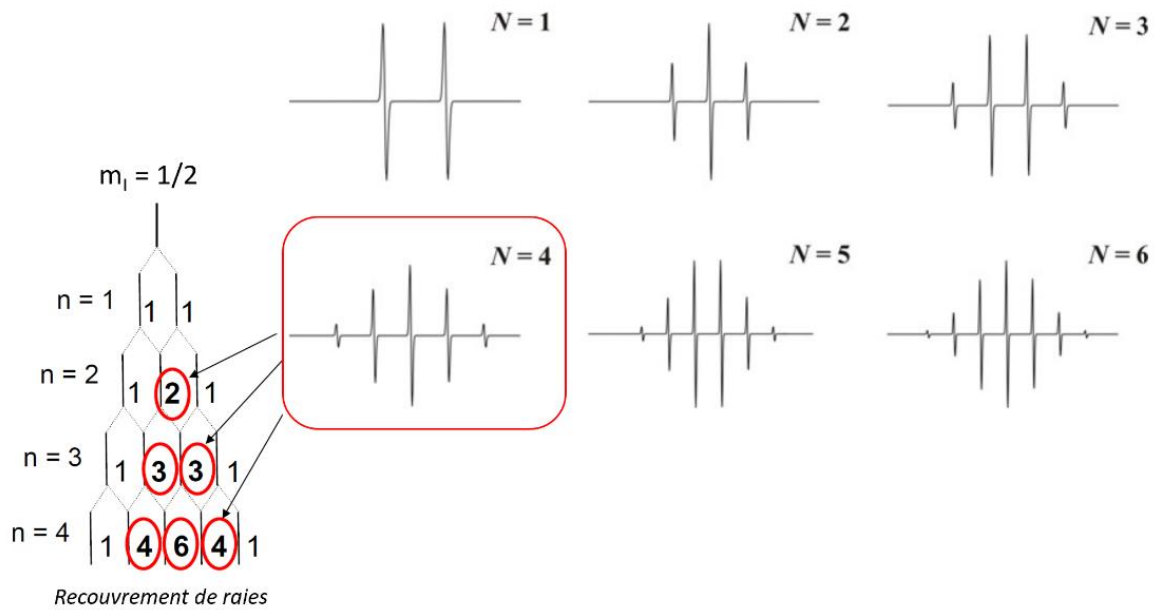


Figure 4-6 Intensité des raies pour $m_l = 1/2$. L'intensité des raies suit le triangle de Pascal.

Dans le cas où les noyaux interagissant sont différents, la forme générale est déterminée en appliquant d'abord le couplage avec le noyau le plus proche puis en séparant chacune des lignes en couplant avec le noyau le plus proche suivant. Cette configuration donne lieu à plusieurs constantes de couplage hyperfine (Figure 4-7 (b)).

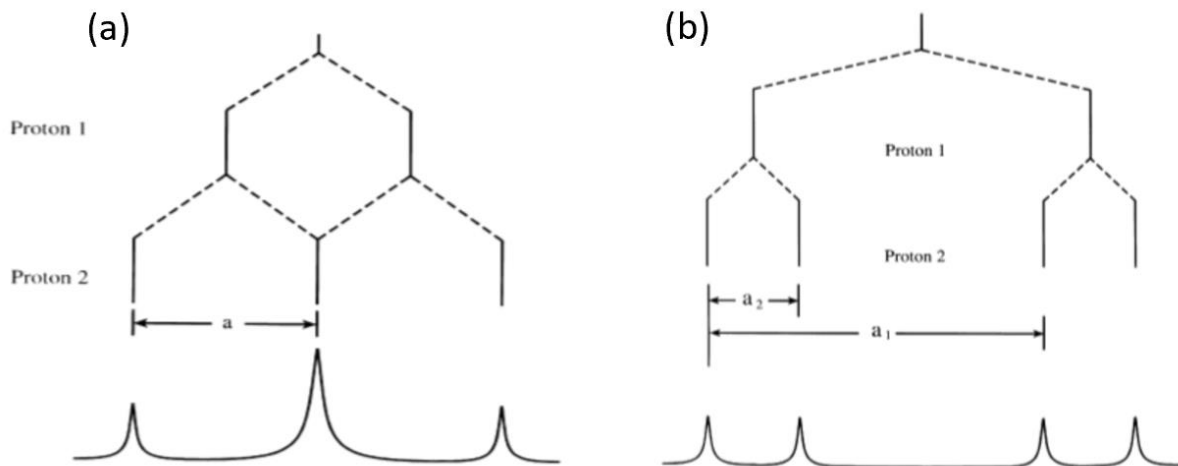


Figure 4-7 Détermination du nombre et de l'intensité des raies pour (a) deux protons équivalents et (b) deux protons différents.

Il faut donc, pour analyser un spectre RPE, tenir compte de tous ces critères. En effet, le nombre de raies et leur intensité permet de déterminer le nombre et l'identité des atomes de la molécule. Ensuite, la détermination des constantes de couplage fait référence à

l'intensité magnétique qui sépare les transitions. En général, leur détermination consiste à calculer les distances entre raies de même intensité.

L'identification des radicaux grâce à ces paramètres est réalisée par comparaison avec des nombreux travaux expérimentaux déjà réalisés. Buettner *et al.*¹¹¹ ont notamment réalisé une synthèse bibliographique des différentes expérimentations RPE qui nous a servi de référence dans nos travaux.

Les mesures RPE sont réalisées en utilisant un spectromètre Bruker ESP 500E à température ambiante. Les paramètres expérimentaux sont les suivants : champ central 3516G, étendue du balayage : 100G, fréquence micro-onde : 9,87GHz, fréquence de modulation : 100kHz, puissance micro-onde : 5,15mW, temps de scan : 84s, nombre de scan : 6.

4.1.2 Utilisation de piègeurs

Les radicaux sont des espèces à temps de demi-vie très courte, rendant leur détection impossible sans l'utilisation de piègeurs spécifiques. La réaction piègeur-radical entraîne la formation d'un adduit avec une durée de vie plus longue permettant sa détection. Pour caractériser la formation des différents radicaux, les piègeurs DMPO (252mM), TEMP (2mM), PBN (21,6mM) et C-PTIO (833 μ M) de Sigma-Aldrich ont été ajoutés aux différents échantillons juste avant traitement plasma. Tous les échantillons ont été transférés dans des tubes capillaires en verre (50 μ L) immédiatement après exposition plasma. Les mesures ont été réalisées en triple pour chaque échantillon et les changements dans le spectre RPE contrôlés pendant 2000 secondes après exposition plasma. Les logiciels WinSim2002 et la bibliothèque matlab "easypin" ont été utilisés pour les simulations des spectres.

Détection du radical hydroxyle et de l'anion superoxyde

Le DMPO (5,5-Dimethyl-1-pyrrolineN-oxyde, poids moléculaire 113,16g.mol⁻¹) est le piègeur le plus utilisé pour les radicaux hydroxyles et l'anion superoxyde (Figure 4-8).

La double liaison azote-carbone confère, sur la liaison simple N-O, une charge positive à l'azote et une négative à l'oxygène, ce qui facilite le piégeage de radicaux. La solution de DMPO (Sigma-Aldrich) présentera une concentration de 883.7 μ mol/mL.

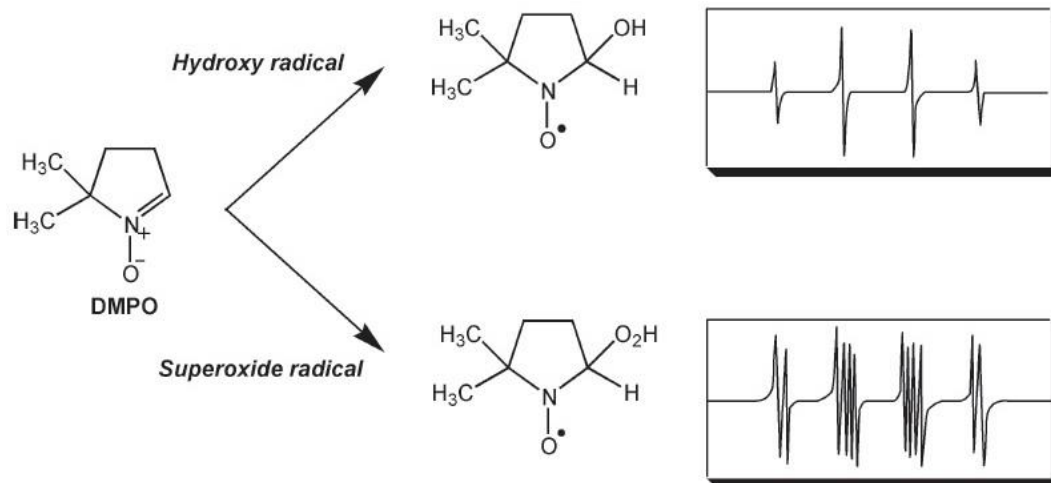


Figure 4-8 Structure moléculaire du DMPO et spectre RPE des adduits formés avec le radical hydroxyle et l'anion superoxyde (tiré de Dojindo Molecular Technologies, Inc.).

Bien que le DMPO piège le radical superoxyde, pour la détection de ce dernier, nous préférons l'utilisation de la SOD (superoxyde dismutase, 150 U/mL) qui va quencher le radical superoxyde en catalysant la conversion de $O_2^{\bullet-}$ en H_2O_2 et O_2 . La différence de signal entre le DMPO-OH avec et sans SOD nous donne donc la quantité de l'anion superoxyde.

Détection du radical hydrogène

Le piègeur PBN (N-tert-butyl- α -phenylnitrone de poids moléculaire 194,2 g.mol⁻¹) est utile dans ces travaux pour la détection du radical hydrogène (Figure 4-9). Le PBN, en présence d'un radical va rompre sa double liaison carbone-azote, rendant sa neutralité à l'atome d'azote. L'oxygène devient alors le seul atome avec un électron non apparié. La molécule ainsi formée est ainsi détectable par RPE.

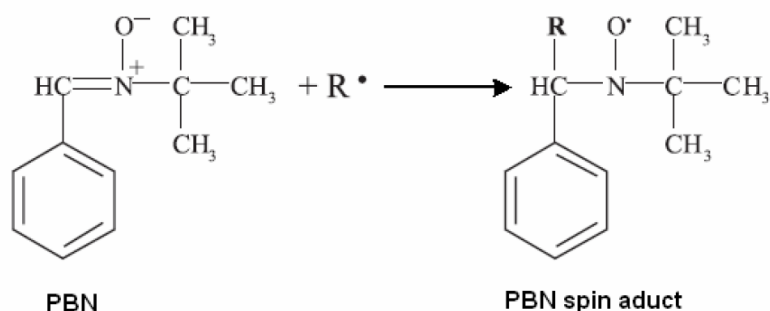


Figure 4-9 Formation de l'adduit PBN-Radical¹¹².

Détection de l'oxygène singulet

Le piègeur TEMP dont la structure moléculaire est présentée Figure 4-10 (2, 2, 6, 6 – tetramethylpiperidine, poids moléculaire $155,24 \text{ g.mol}^{-1}$) est utilisé pour son affinité avec l'oxygène singulet. L'adduit $\text{TEMP-}^1\text{O}_2$ formé entre le piègeur et le radical est stable dans le temps. Du fait de sa stabilité il est possible, grâce à une solution de TEMPO (adduit $\text{TEMP-}^1\text{O}_2$) vendu par le fabricant, de quantifier l'oxygène singulet.

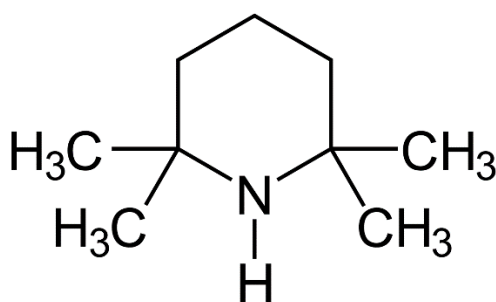


Figure 4-10 Structure moléculaire du piègeur TEMP.

Détection de l'oxyde nitrique

Contrairement aux autres piègeurs, le C-PTIO (2-4-carboxyphenyl-4,4,5,5-tetramethylimidazoline-1-oxyl-3-oxide, poids moléculaire $315,39 \text{ g.mol}^{-1}$) est naturellement radicalaire avec la présence d'un électron non apparié sur un atome d'oxygène (Figure 4-11). La réaction du C-PTIO avec le $\bullet\text{NO}$ va détruire la liaison N^+-O^- du C-PTIO et former également du NO_2^- . Le C-PTIO ayant une signature radicalaire, des dilutions de solution mère de C-PTIO permettent d'en tirer une courbe d'étalonnage et ainsi de détecter l'oxyde nitrique.

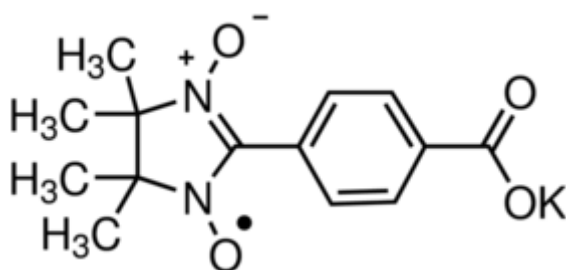


Figure 4-11 Structure moléculaire du piègeur C-PTIO.

4.2 Fluorescence

Pour les espèces non radicalaires comme le peroxyde d'hydrogène, la détection a été effectuée par analyse fluorescente.

4.2.1 Principe de fluorescence

Une molécule fluorescente possède la propriété d'absorber de la lumière d'excitation et de la restituer sous forme de lumière de fluorescence. En effet, une fois l'énergie du photon absorbée, la molécule se trouve dans un état excité et peut se désexciter vers le fondamental par la libération d'un photon d'énergie inférieure (Figure 4-12).

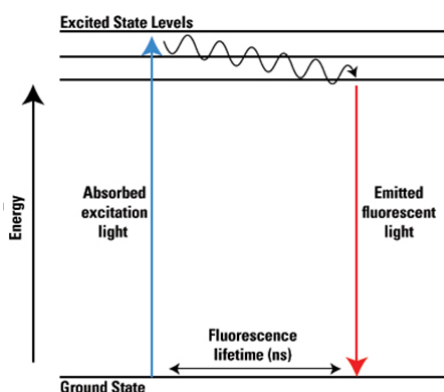


Figure 4-12 Principe de fluorescence.

Afin de pouvoir détecter par fluorescence un composé non fluorescent, des réactifs sont mis à profit. Ils sont composés soit d'une molécule fluorescente capable de se fixer au composé à identifier, soit ils peuvent être oxydés par le composé, cette oxydation rendant le réactif fluorescent.

Pour obtenir les meilleurs résultats, les solutions sont placées dans des plaques noires à fond transparent dans le but de ne pas capter la fluorescence des échantillons voisins. Ensuite, le fluorimètre permet d'exciter la solution à la bonne longueur d'onde et de mesurer la fluorescence résultante.

4.2.2 Dosage du peroxyde d'hydrogène

Le dosage du peroxyde d'hydrogène est accompli grâce au kit MAK165 de Sigma-Aldrich permettant un dosage entre 0 et 10 μM . Dans un premier temps, l'enzyme peroxydase de Raifort catalyse la réaction qui transforme l' H_2O_2 en H_2O . Dans un second temps, le produit Amplex Red (10-acetyl-3, 7-dihydroxyphenoxazine, $\lambda_{\text{ex}}/\lambda_{\text{em}}=540/590\text{nm}$) fourni dans le kit va

jouer le rôle de réducteur en étant neutre naturellement mais fluorescent lorsqu'il est réduit et va permettre ainsi la détection du peroxyde d'hydrogène.

Le kit ayant une gamme de détection entre 0-10 μ M, il est nécessaire lors de nos expériences de réaliser des dilutions de nos échantillons afin de rester dans la gamme linéaire d'étalonnage. Le rouge phénol dans les milieux de culture ayant une absorbance importante dans la zone d'émission, ceci implique l'utilisation du DMEM sans rouge phénol.

Le lecteur de plaque fluorimètre employé pour nos expériences est un CLARIOstar (BMG LABTECH) possédant une gamme spectroscopique d'émission et d'excitation entre 320nm et 850nm. Les courbes d'étalonnage réalisées sont présentées Figure 4-13.

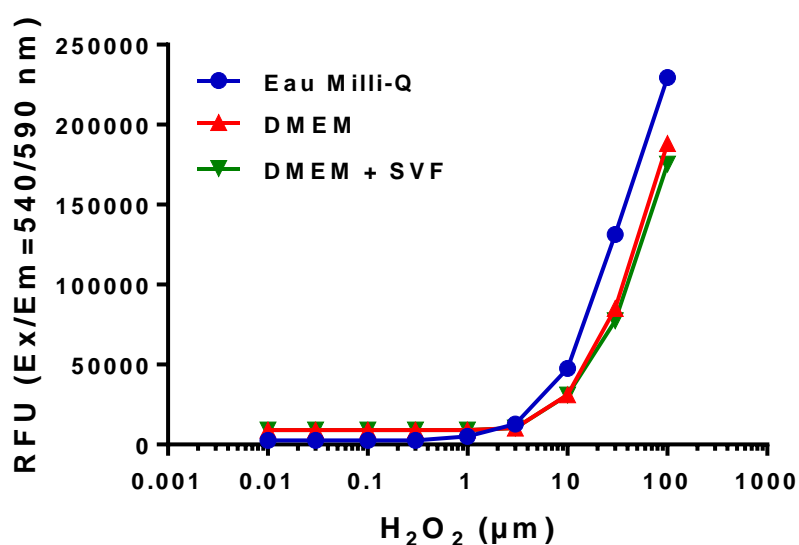


Figure 4-13 Courbes d'étalonnage du peroxyde d'hydrogène dans l'eau, le DMEM et le DMEM avec SVF.

4.3 Colorimétrie

L'analyse colorimétrique a été choisie pour quantifier les nitrites et nitrates présents dans nos milieux activés par jet de plasma.

4.3.1 Principe de la colorimétrie

La colorimétrie est une technique couramment adoptée pour mesurer des concentrations chimiques en solution. Elle fonctionne sur le principe de mesures d'absorbance reposant sur la capacité d'un milieu à absorber une radiation qui le traverse.

Lorsqu'une réaction entre un composé chimique de détection et l'élément à quantifier s'opère, une modification de l'absorbance du milieu est induite. Grâce à l'utilisation d'une solution étalon, il est alors possible de réaliser une courbe d'étalonnage qui permettra de quantifier l'élément intéressant.

4.3.2 Dosage des nitrites/nitrates

Le kit utilisé pour doser les nitrites/nitrates provient de Sigma-Aldrich (ref. 23479) pour une détection comprise entre 10-100µM. De la même façon qu'avec le dosage du peroxyde d'hydrogène, il convient de diluer nos échantillons pour rentrer dans la gamme de dilution et d'utiliser des milieux de culture sans rouge phénol.

Le principe du kit repose sur la réaction de Griess. Dans le procédé, le NO_3^- est converti en NO_2^- par le nitrate réductase. Les absorbances mesurées sont donc celles du NO_2^- et du $\text{NO}_2^- + \text{NO}_3^-$ à partir desquelles il est possible de déduire les concentrations du NO_2^- et du NO_3^- .

Le mécanisme de Griess est résumé par un couplage azoïque (réaction organique) entre les espèces diazonium qui sont produites par la réaction du NO_2^- avec la sulfanilamide (réactif de Griess A) et le naphthyl ethylenediamine (réactif de Griess B). De ceci en résulte un produit colorimétrique (540nm ou 570nm) proportionnel au nombre de NO_2^- présent en solution (Figure 4-14).

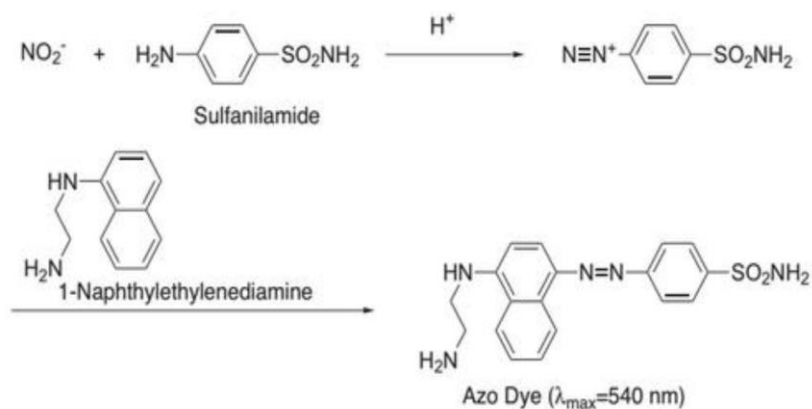


Figure 4-14 Schéma de réaction pour la détection du NO_2^- (from Sigma-Aldrich Nitrite/Nitrate Assay Kit datasheet).

Le lecteur de plaque utilisé durant nos expériences est un CLARIOstar (BMG LABTECH) réglé aux longueurs d'onde 540nm et 570nm comme indiqué dans le protocole. Afin de vérifier qu'il n'y ait pas un déplacement des pics d'absorbance dû à une éventuelle pollution de la

solution, une mesure sur la gamme 500-600nm a également été réalisée. Les courbes d'étalonnage réalisées sont présentées Figure 4-15.

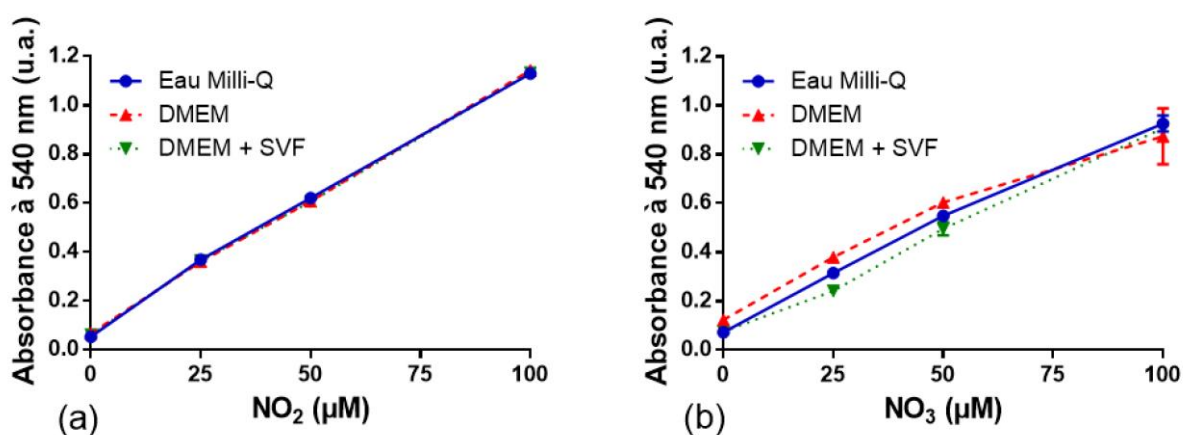


Figure 4-15 Courbes d'étalonnage du nitrite (a) et du nitrate (b) dans l'eau, le DMEM et le DMEM avec SVF.

4.4 Chromatographie en phase liquide et spectrométrie de masse (LC/MS)

Afin de déterminer la dégradation des acides aminés dans le milieu, une analyse chromatographique en phase liquide a été réalisée.

4.4.1 Principe de la LC/MS

Le système utilisé LC/MS (Liquid Chromatography/Mass Spectrometry) est équipé d'un chromatographe à haute performance (HPLC Agilent 1100 series) couplé à un spectromètre de masse à triple quadripôle (QTRAP Applied Biosystems - QTRAP 4500-MS).

Le spectromètre de masse opère en convertissant les molécules à analyser dans un état ionisé puis en analysant les ions et fragments d'ions générés pendant le procédé d'ionisation en fonction du ratio de leur masse sur leur charge (m/z)¹¹³.

L'analyse de la masse se fait grâce à un triple quadripôle (Figure 4-16). Cette configuration particulièrement intéressante est obtenue en plaçant une cellule de collision entre deux quadripôles d'analyse de masse.

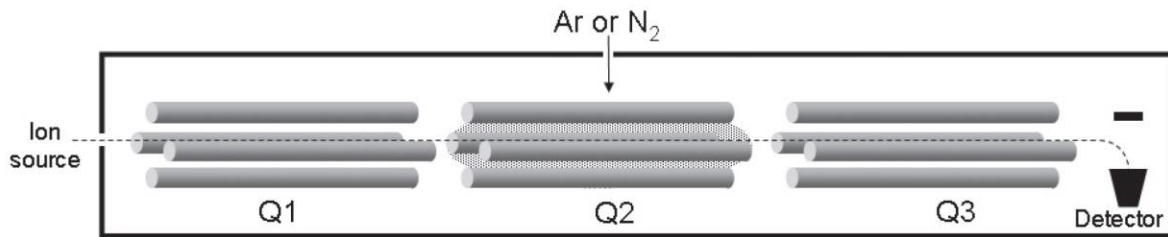


Figure 4-16 Triple quadripôles de spectromètre de masse. Q1 et Q3 servent de filtre de masse, Q2 est la chambre d'ionisation qui contient le gaz rare à basse pression¹¹³.

Le quadripôle d'analyse de masse est constitué de quatre tiges de métal. Une combinaison de tensions permet la transmission d'une bande étroite de valeur m/z le long de l'axe des tiges.

En variant les tensions, il est possible de scanner une gamme de valeur m/z pour obtenir un spectre de masse. Il est également possible de régler les quadripôles à une valeur spécifique de m/z pour augmenter la limite de détection d'espèces ciblées.

4.4.2 Analyse de la dégradation des acides aminés par LC/MS

Les analyses HPLC ont été effectuées en utilisant une colonne (2,1x150mm) Waters X Bridge C18 (3,5 μ m) et un gradient en élution démarrant avec 5% d'acétonitrile et 95% d'acétate d'ammonium à un débit de 0,6mL/min pour atteindre après 15 minutes un plateau à 50% d'acétonitrile et 50% d'acétate d'ammonium pendant 5 minutes. Le spectromètre de masse est équipé avec une source (ESI) électrospray d'ionisation (Turbo Ion Spray – TIS) et opère en mode positif. L'azote sert de gaz de collision et de nébuliseur. La détection s'est déroulée en mode scan avec un pas de 0,1 amu (unité de masse atomique) sur une zone de 50 à 500 amu.

Pour évaluer la dégradation des acides aminés, chaque solution contient 0,2mM d'un acide aminé ciblé (tryptophane, tyrosine, méthionine, arginine) dans de l'eau Milli-Q. La détermination du pourcentage de dégradation des acides aminés a été calculée comme suit :

$\frac{X-Y}{X}$ avec X : intensité du pic de l'acide aminé avant traitement, Y : intensité du pic après différents temps de traitement.

Chapitre 5 - Supports biologiques *in vitro* et *in vivo*

Ce chapitre est dédié à l'ensemble des approches biologiques mises en œuvre *in vitro* et *in vivo* pour étudier l'effet des PAM sur les cellules cancéreuses humaines.

5.1 Lignées cellulaires

5.1.1 Cellules issues d'un cancer colorectal humain : lignée HCT-116

La lignée cellulaire HCT-116 (ATCC #CCL-247) est issue de cellules cancéreuses humaines du côlon, prélevées sur un patient atteint d'adénocarcinome colorectal. Elles possèdent une haute capacité proliférative avec un doublement de population en 21h environ¹¹⁴. Ce type de cellules cancéreuses d'origine épithéliale est très adhérente et présente une morphologie pavimenteuse (cellules étroitement jointives) (Figure 5-1).

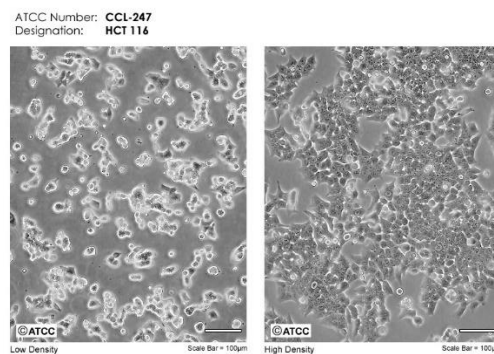


Figure 5-1 Images Microscope de cellules HCT-116 en faible densité (gauche) et en haute densité (droite). Echelle : 100µm
[Images ATCC]

5.1.2 Cellules issues d'un cancer tête et cou humain : lignée FaDu

La lignée FaDu (ATCC #HTB-43) a été établie en 1968 à partir d'une biopsie d'un patient masculin indien de 56 ans présentant une tumeur hypopharyngéal, plus généralement appelée cancer de la gorge. Les FaDu sont des cellules adhérentes et épithéliales dont le temps de doublement de population est d'environ 30 heures. La procédure de culture cellulaire est identique à celle des HCT-116 et est décrite dans la partie suivante.

5.2 Culture cellulaire

La culture cellulaire *in vitro* s'effectue selon des protocoles établis et rigoureux. Les cellules croissent dans un milieu de culture qui leur apporte les nutriments nécessaires à leur croissance tels que les acides aminés (constituants élémentaires des protéines), les sels, le

glucose et les vitamines. Ce milieu est appelé « milieu essentiel de Eagle » modifié par Dulbecco/Vogt (DMEM) enrichi avec 10% de sérum de veau fœtal (SVF/FCS) et 5% de pénicilline/streptomycine. Le sérum de veau fœtal apporte des protéines en quantités variables dépendantes du veau sur lequel est prélevé le sérum. La pénicilline/streptomycine sont des antibiotiques qui protègent le milieu contre d'éventuelles contaminations bactériennes en cas de mauvaises manipulations. La culture des cellules a lieu dans l'atmosphère contrôlée d'un incubateur à température fixe 37°C avec 5% de CO₂.

Les cellules sontensemencées dans des flasques en plastique où elles peuvent adhérer à la surface et proliférer. La confluence des cellules est le taux de recouvrement de la surface de la flasque par les cellules. Avant que les cellules ne recouvrent toute la surface, i.e. soient à 100% de confluence, la culture doit être relancée afin de garder des cellules en phase proliférative. Pour ce faire, le milieu de culture est retiré, puis de la trypsine est ajoutée afin de décoller les cellules de la surface. La trypsine est une protéase (enzyme digestive) clivant les protéines membranaires d'adhésion à la fois entre les cellules et entre les cellules et le plastique : les cellules se retrouvent alors en suspension. Afin de désactiver l'enzyme et protéger les cellules, le même volume de milieu de culture est ajouté (la trypsine ne cesse pas d'agir, mais va s'attaquer aux protéines du milieu). Il suffit ensuite de prélever quelques microlitres de la solution homogénéisée de cellules en suspension et de les déposer sur une cellule de Malassez pour comptage au microscope optique de la densité de la suspension cellulaire. Il est alors possible de calculer le nombre de cellules en suspension et d'en prélever la quantité désirée pour ensemenecer un nouveau flasque de culture cellulaire ou pour lancer une manipulation. La quantité de cellules prélevées pour l'ensemencement dépend de la lignée cellulaire (de sa vitesse de prolifération) et de la taille du flasque utilisé. Pour nos études avec les HCT-116 nous avons ensemencé 400 000 cellules par flasque T75 (=surface 75cm²), et pour les FaDu nous avons ensemencé 600 000 cellules par T75. Dans ces conditions, les cellules mettent environ 5 jours pour arriver à la limite de la confluence. Cela permet de ne pas relancer la culture des cellules ou « passer les cellules » trop souvent et donc de préserver leur intégrité.

Chaque relance de culture est appelée « passage ». Le nombre de passage ne doit pas être supérieur à 20 pour les HCT-116 et 13 pour les FaDu. En effet, un nombre de passage

élevé stresse les cellules (notamment à cause de l'utilisation de la trypsine) et peut ainsi biaiser les résultats.

5.3 Culture cellulaire en 3D : sphéroïdes tumoraux

Afin de pouvoir développer des nouvelles stratégies anticancéreuses efficaces et sûres, il convient de travailler sur des modèles cellulaires les plus proches possibles de la réalité physiologique *in vivo*.

Classiquement, les expérimentations *in vitro* sur ces nouvelles approches thérapeutiques anticancéreuses reposent des modèles d'études simples, principalement des cultures de cellules en monocouche, c'est-à-dire en 2 dimensions (2D). Pour développer les futures applications cliniques, l'utilisation de modèles animaux est indispensable pour attester des réponses *in vivo*. Cependant, bien que ces différents modèles d'étude soient indispensables, ils ne représentent que très partiellement la réalité physiologique des tissus humains¹¹⁵⁻¹¹⁷. Il est donc nécessaire de développer des modèles tissulaires plus complets mimant l'architecture et l'organisation 3D des tissus chez l'homme.

Nous avons choisi de travailler avec le modèle du sphéroïde. Il s'agit d'un modèle tissulaire de tumeur *in vitro* et en 3D qui mime de nombreuses propriétés des tumeurs *in vivo*¹¹⁸⁻¹²⁰. Lorsqu'elles sont cultivées dans un environnement n'autorisant pas leur adhésion au plastique de culture cellulaire, les cellules tumorales s'agrègent les unes aux autres jusqu'à former un ensemble cellulaire en 3D qui présente la forme d'une sphère. Cette organisation sphérique génère la mise en place de gradients (Figure 5-2) : gradients de pénétration des nutriments et de l'oxygène, d'évacuation des gaz et déchets métaboliques, induisant *in fine* un gradient de prolifération cellulaire. Ces gradients vont donc créer trois zones dans le sphéroïde : le cœur nécrotique, ne recevant pas ou peu de nutriments et d'oxygène, la zone quiescente où les cellules ont stoppé leur cycle cellulaire autour du cœur nécrotique et enfin la zone extérieure où les cellules prolifèrent activement puisqu'en contact direct avec le milieu de culture^{119,121}.

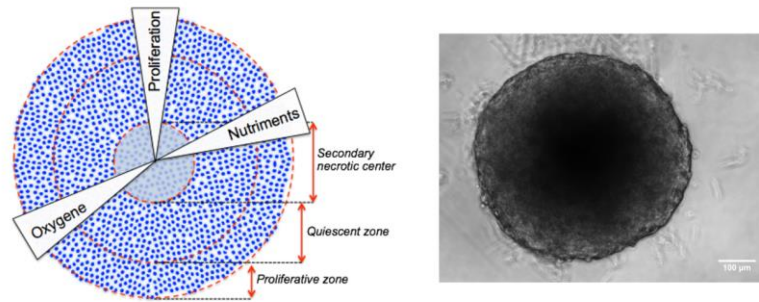


Figure 5-2 Organisation cellulaire d'un sphéroïde (d'après IP3D, ITAV-USR 3505) et photographie d'un sphéroïde après 5 jours de culture prise au microscope optique en lumière blanche.

Ainsi, le modèle de sphéroïde permet de reproduire *in vitro* différents types de gradients présents au sein d'une tumeur, et mime ainsi efficacement la zone avasculaire des tumeurs *in vivo*^{119,121-123}. Plusieurs études ont montré que les réponses des sphéroïdes à diverses modalités thérapeutiques, notamment la radiothérapie, donnent des résultats similaires à ceux observés sur les xénogreffes (transplantation d'un greffon où le donneur et le receveur ne sont pas de la même espèce biologique)^{124,125}. Il est intéressant de noter que du point de vue de l'industrie pharmaceutique il a été largement admis que l'intégration de sphéroïdes tumoraux dans le processus de développement de médicaments peut aider à sélectionner les candidats les plus prometteurs avant les essais cliniques.

Ainsi, le modèle sphéroïde permet donc une approche bien plus réaliste que le modèle monocouche pour étudier l'interaction plasma-cellules^{115,126}.

La génération de sphéroïdes (ou MultiCellular Tumor Spheroids – MCTS) se fait lors d'un passage de culture cellulaire. De la même façon que les cellules sont prélevées pour l'ensemencement, un nombre bien défini est prélevé pour produire des sphéroïdes. Les sphéroïdes sont formés à partir de 500 cellules individuelles de HCT-116 (5000 cellules pour le cas des FaDu) déposées par puits dans 300μL de DMEM avec pyruvate contenant 10% de SVF et 5% de pénicilline/ streptomycine. Les plaques 96 puits utilisées pour la culture des sphéroïdes sont des plaques ULA (Ultra Low Attachment), traitées spécialement par un dépôt d'hydrogel pour éviter l'adhésion des cellules sur le fond du puits (Corning, Fisher Scientific). De plus, ces plaques présentent un fond rond (ou en U), pour faciliter le regroupement des cellules par gravité au fond du puits. Les plaques ainsiensemencées sont ensuite placées dans l'atmosphère contrôlée de l'incubateur (37°C avec 5% CO₂) pendant 5 jours pour permettre

aux cellules de former des sphéroïdes grâce à l'effet de la gravité et de la prolifération (Figure 5-3)^{127,128}.

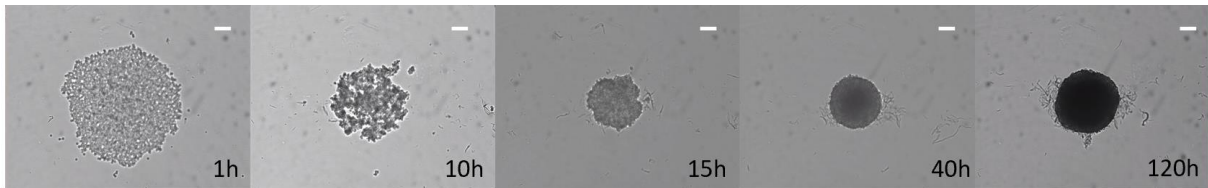


Figure 5-3 Images microscope de la formation d'un sphéroïde. À gauche, cellules individuelles en suspension dans le milieu. Puis par l'action de la gravité et la prolifération, ces cellules forment un sphéroïde au bout de 5 jours-120h. Echelle : 100µm

Au bout de 5 jours les sphéroïdes atteignent le diamètre d'environ 400µm pour les 2 lignées.

5.4 Activation du milieu par jet plasma et traitement cellulaire

Le milieu activé par plasma (PAM) est généré par l'exposition du milieu de culture cellulaire au jet plasma. Les conditions expérimentales restent inchangées pour toutes les expositions (tension, fréquence, débit de gaz, etc.). Le milieu de culture (DMEM) sans pyruvate est supplémenté par 10% sérum de veau foetal (SVF) qui contient les protéines et nutriments pour la croissance cellulaire et de 1% de pénicilline et streptomycine (antibiotiques) qui préviennent l'apparition de bactéries.

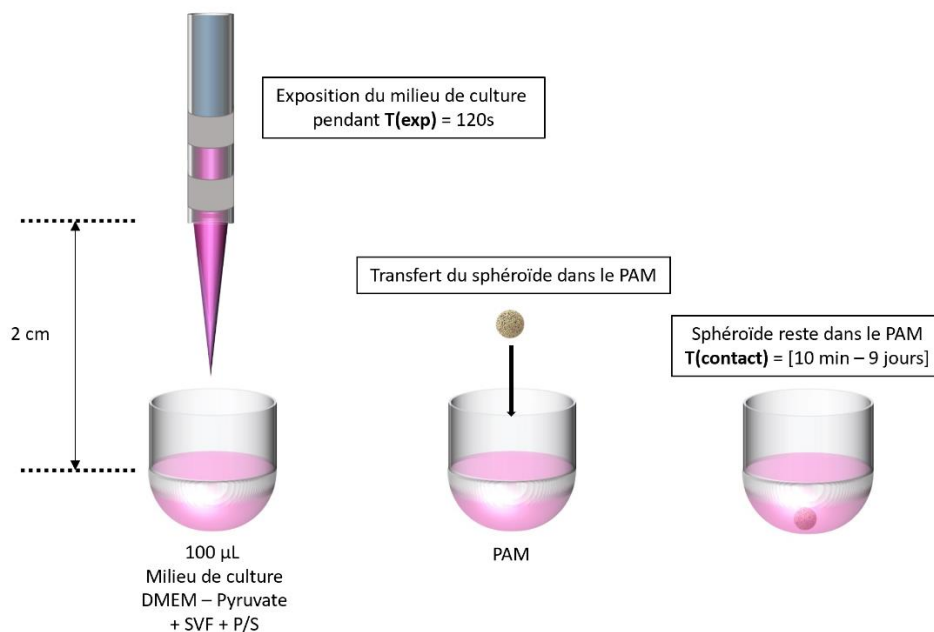


Figure 5-4 Protocole de génération du PAM. Le jet est placé à une distance fixe de 2cm du puits contenant 100µL de milieu culture (sans pyruvate) supplémenté avec du sérum de veau foetal et de la pénicilline/streptomycine. Le sphéroïde est ensuite plongé dans le PAM.

L'exposition se fait dans des puits à fond rond à faible attachement. 100µL de milieu est mis dans chaque puits de la plaque et le jet est placé à une distance fixe de 2cm au-dessus du milieu. L'exposition plasma du milieu est réalisée pendant un temps $T_{exp} = 120s$, temps de référence optimisé précédemment^{27,30}. Les sphéroïdes sont alors plongés dans le PAM et y restent en contact dans l'incubateur (37°C/5% CO₂) pendant un temps $T_{contact}$ variant de 10 minutes à 9 jours en fonction de l'expérience.

5.5 Analyses biologiques *in vitro*

Comme mentionné précédemment, les sphéroïdes sont cultivés pendant 5 jours durant lesquels les cellules vont s'organiser et murer pour produire un sphéroïde manipulable d'environ 400µm de diamètre. A ce diamètre-là, le cœur nécrotique est réduit à une taille minimale. Judée *et al.* ont en effet montré des coupes de sphéroïdes non traités qui ne présentent pas de dommages à l'ADN au cœur du sphéroïde, ce qui indique l'absence de nécrose³⁰. Plusieurs approches biologiques complémentaires ont été effectuées pour caractériser au mieux l'impact d'un traitement plasma sur les sphéroïdes, notamment en termes de viabilité et de mort cellulaire.

5.5.1 Suivi de volume (courbe de croissance)

La première méthode pour observer l'efficacité d'un traitement anticancéreux est de suivre l'évolution du volume des sphéroïdes au cours du temps. Pour cela le diamètre du sphéroïde est mesuré quotidiennement pendant plusieurs jours (généralement 9 jours) grâce au logiciel ImageJ à partir de photos prises au microscope optique (Leica DMIRB) couplé avec une caméra coolSNAP HQ (Roper Scientific, Photometrics).

Le volume est déduit grâce à la formule du volume d'une sphère : $V = \frac{4}{3}\pi r^3 = 0,523d^3$ avec r le rayon et d le diamètre.

La Figure 5-5 illustre la méthode de mesure de diamètre. En effet, le diamètre considéré est celui du cœur du sphéroïde, ne prenant pas en compte la couronne de cellules détachées qui apparaît rapidement à l'extrémité du sphéroïde après contact avec les milieux activés par plasma froid.

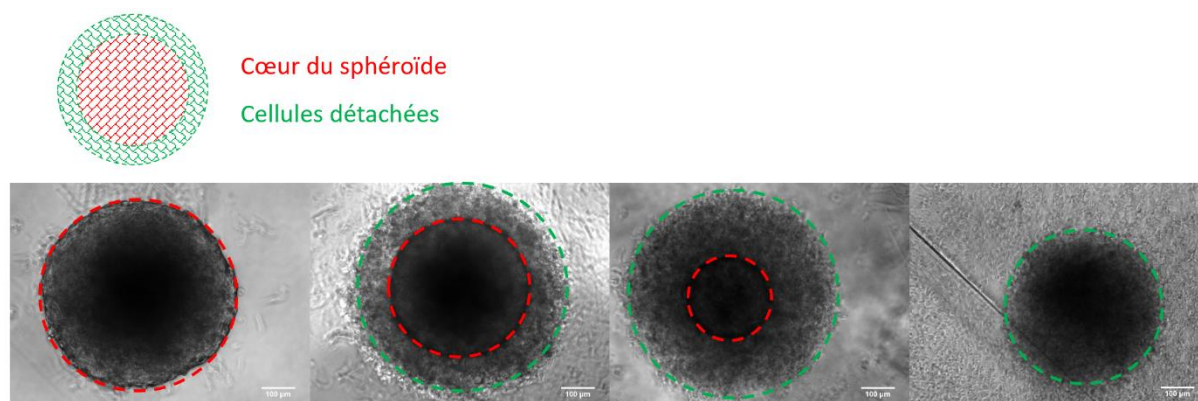


Figure 5-5 Illustration du protocole pour la détermination des diamètres des sphéroïdes dans le cadre des suivis de croissance. Images en lumière blanche en microscopie à champ large de sphéroïdes cancéreux FaDu. En rouge, cœur vivant du sphéroïde. En vert, couronne de cellules détachées.

5.5.2 Viabilité cellulaire

Afin de compléter les résultats obtenus avec les suivis de croissance, nous avons quantifié les cellules viables présentes dans le sphéroïde. Pour cela, nous avons quantifié la quantité d'adénosine triphosphate (ATP) au sein des sphéroïdes car l'ATP est considérée comme un marqueur de viabilité cellulaire. En effet, l'ATP, est un intermédiaire central dans le métabolisme énergétique avec un sucre, une base avec azote, et des phosphates (formule moléculaire $C_{10}H_{16}N_5O_{13}P_3$). Cette molécule, produite pendant la respiration cellulaire au niveau de la mitochondrie, est riche en énergie chimique et sert universellement aux cellules pour stocker et transporter l'énergie. L'hydrolyse de la molécule d'ATP, grâce à la rupture d'une liaison phosphodiester, libère de l'ADP (adénosine diphosphate) et permet le transfert d'un groupement phosphate vers une autre molécule, libérant donc une grande quantité d'énergie nécessaire à l'ensemble des réactions intracellulaires¹²⁹⁻¹³¹. Puisque l'ATP est un marqueur de viabilité cellulaire, une chute dans sa concentration intracellulaire est signe de mort cellulaire, quel que soit le mécanisme de mort cellulaire mis en jeu (apoptose, nécrose ou autophagie)¹³¹.

La quantification de la viabilité cellulaire est réalisée via l'utilisation du kit de Promega « CellTiter-Glo 3D cell viability », basé sur une réaction de luminescence puisque l'ATP est un des cofacteurs de l'enzyme luciférase. Plus il y a d'ATP dans le milieu réactionnel, plus le signal luminescent est fort. Après exposition au plasma de 100µL de milieu de culture et traitement des sphéroïdes pendant le temps désiré, 50µL de réactif est rajouté conformément aux instructions du fabricant. L'incubation pendant 30min sous agitation à 1000rpm à

température ambiante et à l'abri de la lumière assure la lyse des cellules et donc le relargage de l'ATP dans le milieu. Le signal luminescent est donc mesuré grâce à un lecteur de plaque CLARIOstar (BMG LABTECH) dans des plaques 96 puits blanches adaptées. Le taux d'ATP est alors obtenu en normalisant les échantillons traités avec les échantillons contrôles.

5.5.3 Caractérisation de l'intégrité de la membrane plasmique

L'exposition de cellules à certains stimulus physiques externes, comme l'électroporation par exemple, conduit à la déstabilisation de la membrane plasmique et à la création de défauts membranaires¹³². Nous avons donc voulu caractériser la présence ou l'absence de défaut membranaire suite à l'exposition au PAM de sphéroïdes cancéreux. La perméabilisation cellulaire est détectée grâce à l'iodure de propidium (PI). Cette molécule fluorescente de masse moléculaire 668,403 Da ne peut pénétrer que dans les cellules présentant un défaut d'intégrité membranaire. Sa nature d'agent intercalant de l'ADN va lui permettre de se fixer à l'ADN et l'ARN et en se faisant, d'augmenter son rendement quantique de fluorescence.

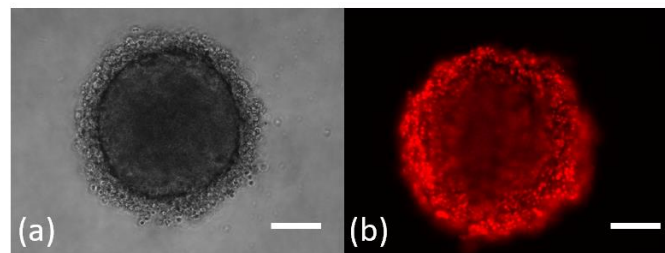


Figure 5-6 (a) Sphéroïde HCT-116 vu au microscope ($G=10X$) 24h après un traitement PAM-120s. (b) Fluorescence rouge caractéristique de la perméabilisation cellulaire sur ce même sphéroïde. Echelle : $100\mu\text{m}$

L'iodure de propidium (Sigma-Aldrich Co, Ltd) s'utilise à une concentration de $100\mu\text{M}$ (1X). La solution initiale (1mM) est diluée 5 fois dans du PBS $\text{Ca}^{++}/\text{Mg}^{++}$ pour avoir une solution à 2X. Les sphéroïdes sont traités au PAM selon les conditions et temps désirés puis le PI est ajouté volume à volume (pour $80\mu\text{L}$ de PAM, $80\mu\text{L}$ de PI est ajouté pour avoir une concentration 1X dans les puits). La fluorescence ($\lambda_{\text{ex}} = 538\text{nm}$; $\lambda_{\text{em}} = 617\text{nm}$) est ensuite observée au microscope optique Leica DMIRB couplé avec une caméra coolSNAP HQ (Roper Scientific, Photometrics). La Figure 5-6 présente le type d'images obtenues grâce à cette technique.

5.5.4 Détection de la mort cellulaire par apoptose : observation de l'activation des caspases

Les caspases (**cysteine-aspatic protease**) sont des protéases à cystéine indispensables à plusieurs fonctions cellulaires, dont le déroulement de l'apoptose. Parmi les caspases à activité pro-apoptotique, on distingue les caspases initiatrices (caspase 2, 8, 9, 10) et les caspases effectrices (caspase 3, 6 et 7). L'activation des caspases 3/7 a été observée avec le kit « Image-iT™ LIVE Red Caspase-3 and -7 Detection Kit » de Molecular Probes. Le réactif de ce kit présente dans sa structure les sites de clivages ciblés par les caspases 3/7. Lorsque les caspases 3/7 sont actives, elles vont cliver le substrat contenu dans le réactif et libérer une sonde qui ira s'intercaler dans l'ADN, sur le même principe que l'iodure de propidium décrit précédemment, et deviendra fluorescente. Brièvement, après exposition au PAM, les sphéroïdes sont incubés avec le réactif, qui est non toxique et perméant, c'est-à-dire qu'il pénètre facilement dans les cellules. La plaque est alors placée pendant une heure dans l'incubateur (37°C avec 5% de CO₂) avant de retirer le réactif grâce à 3 lavages dans le PBS Ca⁺⁺/Mg⁺⁺. Les lavages permettent de retirer le réactif FLICA restant et donc de diminuer le bruit de fond non spécifique. Le signal observé est donc significatif de l'activation des caspases. Le signal fluorescent rouge est détecté grâce à un microscope Leica DMIRB couplé avec une caméra coolSNAP HQ.

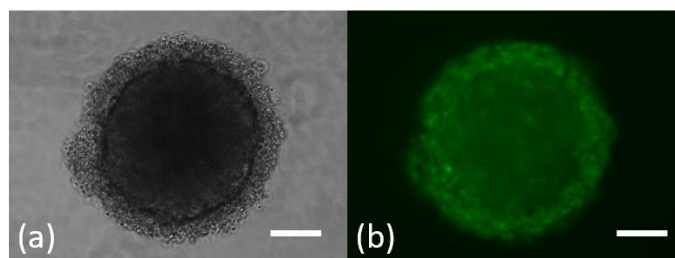


Figure 5-7 (a) Détection de l'induction de l'apoptose, observation de l'activation des caspases 3/7 suite à un traitement au PAM (a) Sphéroïde HCT-116 vu au microscope (G=10X) 24h après un traitement PAM-120s. (b) Fluorescence verte (couleur modifiée par traitement d'image) caractéristique de l'activation des caspases sur ce même sphéroïde. Echelle : 100µm

La Figure 5-7 présente le type d'images obtenues grâce à cette technique. Pour des soucis de représentation et éviter toute confusion avec les images de pénétration de l'iodure de propidium notamment, la fluorescence significative de l'activation des caspases sera colorée artificiellement en vert (ImageJ) plutôt qu'en rouge comme elle le devrait.

5.5.5 Analyses statistiques *in vitro*

Pour chaque étude *in vitro*, au moins deux expériences de six échantillons ont été analysés. Les résultats sont ensuite mis sous forme de moyenne \pm SEM. Les différences entre les données sont évaluées grâce au t-test de Student dont la valeur significative est placée pour $p < 0,05$.

5.6 Expérimentations biologiques *in vivo*

L'utilisation d'animaux est nécessaire afin d'améliorer la recherche contre le cancer que ce soit pour la compréhension des cancers ou pour étudier différentes stratégies thérapeutiques et de diagnostic. Cependant l'utilisation d'animaux est soumise à des règles strictes.

5.6.1 Éthique

La réflexion autour du statut moral des animaux remonte à l'antiquité mais ce n'est qu'à partir du 19^{ème} siècle que le terme « éthique animale » apparaît. L'évolution de la réflexion commence notamment avec R. Descartes (1596-1650). Selon lui un animal est incapable de souffrir car il ne possède pas d'âme, substance de la pensée (Discours de la méthode). Pour E. Kant (1724-1804), il y a deux catégories, tout est soit personne ou soit chose : l'animal n'étant pas une personne il est donc une chose. Cependant même si les animaux n'ont pas conscience d'eux-mêmes et ne sont par conséquent que des moyens au vue d'une fin, la cruauté envers les bêtes est la violation d'un devoir de l'Homme envers lui-même (Kant, Leçon d'éthique). J.J. Rousseau (1712-1778) voit les animaux comme des êtres doués de sensibilité et que « si je suis obligé de ne faire aucun mal à mon semblable, c'est moins car il est un être raisonnable que parce qu'il est un être sensible » (discours sur l'origine et les fondements de l'inégalité parmi les Hommes, 1755). Enfin, J. Bentham (1748-1832) déclare que c'est la faculté de souffrir et non de raisonner qui devrait être le critère pour évaluer le traitement juste des autres êtres.

De cette réflexion, sont nés deux courants de pensées principaux : le **déontologisme**, représenté par E. Kant, qui stipule que les actes ont une valeur intrinsèque, c'est -à -dire qu'ils sont bons ou mauvais en eux-mêmes et indépendamment des sujets et des conséquences ; et l'**utilitarisme** de J. Bentham, pour qui la valeur des actes doit être évaluée en fonction des conséquences escomptées. Pour les déontologistes, le critère unique de sensibilité n'est pas

suffisant, contrairement aux utilitaristes pour lesquels il suffit généralement pour attribuer le statut moral.

A l'heure actuelle, des règles précises concernant les expérimentations animales sont en vigueur à l'échelle nationale et européenne. En effet, seuls certains animaux peuvent être utilisés pour les expérimentations et ces derniers doivent provenir de fournisseurs agréés. Également, une expérience sur animaux n'est licite que si elle est nécessaire et irremplaçable. Les principes de remplacement (par une méthode ne nécessitant pas d'animaux), de réduction (par la diminution du nombre d'animaux au strict minimum) et de raffinement (par le choix des méthodes les plus douces) doivent être respectés (règle des 3R). De plus, tout projet de recherche qui inclut le recours à l'expérimentation animale doit faire l'objet d'une évaluation éthique favorable délivrée par un comité d'éthique agréé.

Toutes nos expérimentations *in vivo*, ont été conduites conformément à ces règles et notamment la directive 2010/63 de l'Union Européenne.

5.6.2 Modèle murin : la souris nude

La souris est souvent un animal privilégié pour la recherche contre le cancer. Sa taille, son taux de reproduction et de fécondité important, ainsi que ses coûts de production et d'entretien relativement faibles, en font un choix intéressant^{133,134}. L'utilisation accrue de ce modèle a engendré des lots d'animaux génétiquement proches dûs à une forte consanguinité. Cette consanguinité et la connaissance intégrale de leur génome permet de faciliter les analyses comparatives.

Pour nos études, la souris Nude femelle (BALB/c-nu) a été choisie (Figure 5-8) et est obtenue par le biais du laboratoire Janvier (Saint Berthevin, France).



Figure 5-8 Photographie de souris nude. Modèle de souris utilisées pour nos expériences.

Ces animaux présentent une mutation sur un gène spécifique les rendant albinos, sans poils et immunodéprimés (système immunitaire affaibli à cause de l'absence de lymphocytes

T³). L'utilisation de ces souris nude immunodéprimées permet de leur injecter des cellules cancéreuses humaines. Puisque le système immunitaire est quasiment absent, les cellules greffées ne seront pas rejetées et formeront des tumeurs que nous pourrons traiter par la suite avec les PAM.

5.6.3 Implantation et traitement des tumeurs humaines dans un modèle murin

Pour l'étude *in vivo* nous avons utilisé la greffe ectopique ou hétérotopique : il s'agit d'une greffe de cellules sur un site qui ne correspond pas à celui de la tumeur d'origine. Ces greffes sont le plus souvent réalisées en sous-cutané, ce qui permet le suivi de croissance de la tumeur par des mesures au pied à coulisse. Une injection de cellules humaines HCT-116 est donc faite en sous-cutané dans les flancs des souris. Cette localisation (classique) permet un traitement plus facile de la tumeur car elle est en effet plus accessible. De plus, il faut bien noter qu'il s'agit de cellules cancéreuses humaines implantées dans un modèle murin immunodéprimé.

Pour notre étude, 2,5 millions de cellules ont été injectées sous la peau des flancs de chaque souris deux semaines après leur arrivée (période de quarantaine pour l'acclimatation). Les souris sont alors âgées de 6-7 semaines. Lorsque les cellules forment une tumeur de 100mm³ au bout d'une quinzaine de jours, les souris sont divisées aléatoirement en 3 groupes de minimum 3 souris et au moins 4 tumeurs. Un groupe « contrôle » ne voit pas de traitement, les groupes « DMEM – Milieu non activé » et « PAM – Milieu activé par plasma » se voient injecter du milieu (activé ou non en fonction du groupe) 3 fois par semaine, le lundi/mercredi/vendredi. Les injections se font après endormissement des souris par anesthésie gazeuse à base d'isoflurane. Les tumeurs de tous les groupes ont été mesurées quotidiennement au pied à coulisse par-dessus la peau avant les injections (Figure 5-9).

³ Les lymphocytes T sont des cellules du système immunitaire (catégorie de leucocytes ou globules blancs) dont la maturation s'effectue dans la moelle osseuse puis dans le thymus – d'où leur nom –, glande située en haut de la poitrine, derrière le sternum.

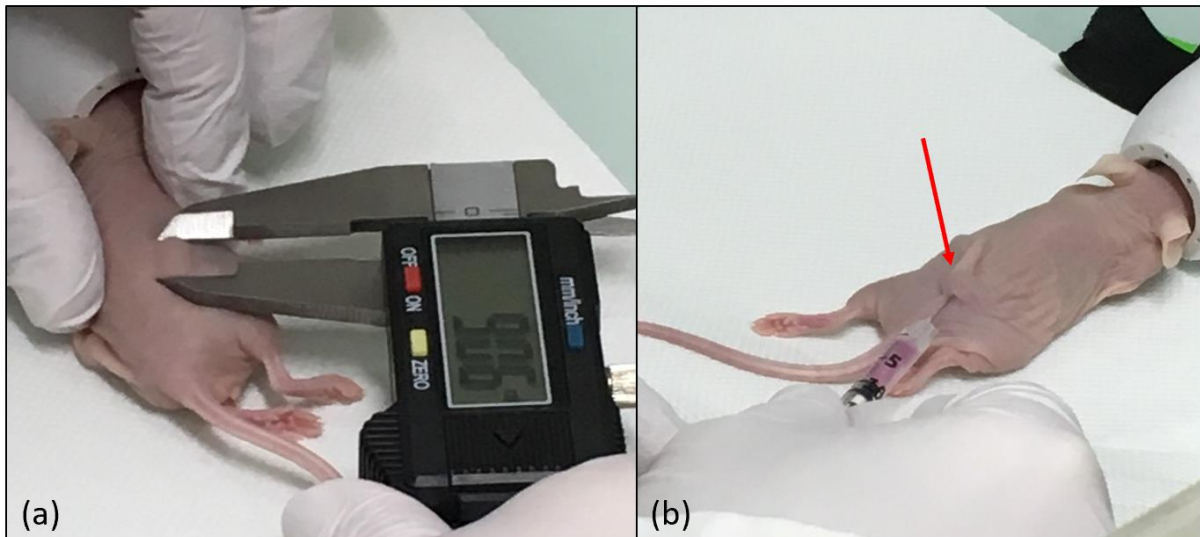


Figure 5-9 (a) Mesure au pied à coulisse de la taille d'une tumeur. (b) Injection de milieu (activé ou non par plasma) dans une tumeur.

Les souris sont sacrifiées soit aux premiers signes de détresse soit lorsque leurs tumeurs atteignent le volume de 1000mm^3 . L'ensemble de ces manipulations s'est déroulé en agrément du protocole éthique européen par une personne formée compétente.

5.6.4 Suivi de la croissance tumorale

Plusieurs méthodes de détermination de volume tumoral existent. Le protocole d'expérimentation et notamment le type de greffe va permettre de choisir la plus pertinente.

Contrairement au suivi de volume *in vitro* où les sphéroïdes sont des sphères, le caractère inhomogène des tumeurs *in vivo* ne permet pas d'utiliser la même formule. Cependant, la formule la plus couramment adoptée et la plus précise consiste à émettre l'hypothèse que la tumeur est un ellipsoïde de révolution¹³⁵. La mesure au pied à coulisse nous permet aisément d'obtenir les diamètres les plus grands et faibles des tumeurs, mais ne permet pas en revanche la mesure de la hauteur. C'est pourquoi la formule suivante est utilisée :

$$V = \frac{4}{3}\pi(LW^2) \approx \frac{2W^2}{2}$$

Avec L : longueur de la tumeur (grand diamètre) et W : largeur de la tumeur (petit diamètre)

Les biais induits par cette méthode sont l'épaisseur de la peau mais aussi le fait de ne pas pouvoir mesurer la hauteur de la tumeur (une tumeur pourrait se développer

dans le muscle) mais ceux-ci ne sont pas inclus car considérés identiques pour toutes les tumeurs. Afin de confirmer les mesures de diamètre, il est également possible de mesurer la tumeur extraite après sacrifice ou bien d'en mesurer sa masse.

5.6.5 Analyse statistique *in vivo*

Pour chaque étude *in vivo*, au moins quatre tumeurs par condition ont été analysées. Les résultats sont ensuite mis sous forme de moyenne \pm SEM. Les différences entre les données sont évaluées grâce au t-test de Student dont la valeur significative est placée pour $p < 0,05$.

5.7 Conclusion

Dans ces chapitres de matériels et méthodes, il a été présenté les différentes techniques d'analyse physique, (bio)chimique et biologique mises à profit lors de ces travaux de thèse.

La caractérisation électrique et optique du jet a permis de spécifier les courants de la décharge et d'imager la décharge pour en observer le déroulement en jet libre puis avec une cible de DMEM. Ensuite une analyse spectrométrique a permis d'identifier quelques espèces générées par le plasma à la sortie du jet et à la surface du liquide. Pour compléter cette analyse de l'interaction plasma/milieu, des études de résonance paramagnétique électronique, colorimétrie, fluorimétrie et spectrométrie de masse ont été mises en place.

Enfin, diverses techniques biologiques ont été mises au point sur le modèle *in vitro* 3D pour démontrer l'impact du milieu activé par plasma sur les cellules cancéreuses. La fluorescence et la luminescence en sont les principales.

Partie III

Résultats expérimentaux

- Caractérisation du jet plasma
- Interactions avec une cible liquide

Chapitre 6 - Caractérisation du jet plasma d'hélium

L'activation des milieux de culture est effectuée en utilisant un jet de plasma d'hélium. Afin de mieux comprendre les interactions du plasma avec son environnement, il convient de caractériser en premier lieu le jet plasma. Ce chapitre présente d'abord les caractéristiques électriques du jet, puis une observation en imagerie rapide, pour finir sur une étude en spectroscopie d'émission.

6.1 Caractérisation électrique

Notre jet plasma est généré en appliquant une tension impulsionnelle ayant les caractéristiques suivantes : tension maximale de 10kV, fréquence 10kHz et durée d'impulsion 1 μ s. La caractérisation électrique du jet de plasma a eu lieu en jet libre et en présence d'une cible d'eau ou de DMEM (milieu de culture cellulaire) placée à une distance correspondant aux conditions de l'étude biologique de 2 cm par rapport à l'extrémité du tube (cf. Figure 3-2). Les résultats électriques étant similaires quel que soit le liquide utilisé, les courbes présentées seront celles du jet avec la cible de DMEM à 2 cm.

La figure (Figure 6-1) représente le profil du signal de tension impulsionnelle et le courant mesurés.

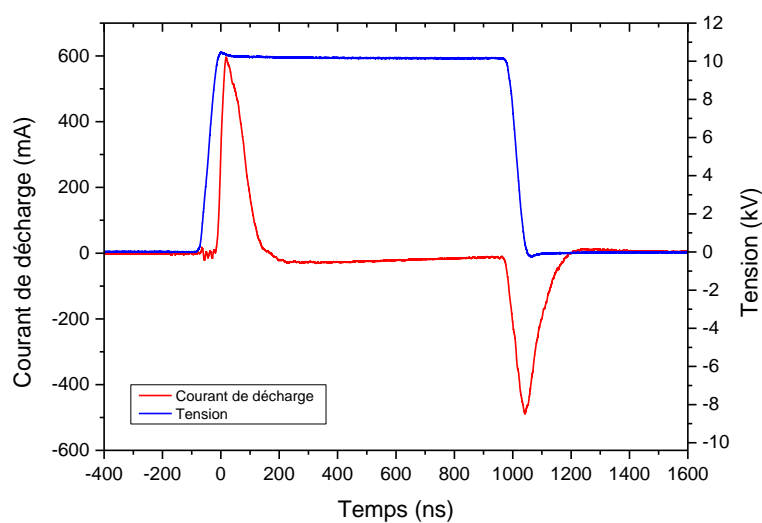


Figure 6-1 Tension et courant de la décharge plasma. Tension appliquée de 10kV, largeur d'impulsion 1 μ s, cible DMEM à 2cm.

Le courant mesuré peut être décomposé en deux parties : le courant de déplacement (courant capacitif) et le courant de décharge plasma. La Figure 6-2 présente les variations de ces deux courants.

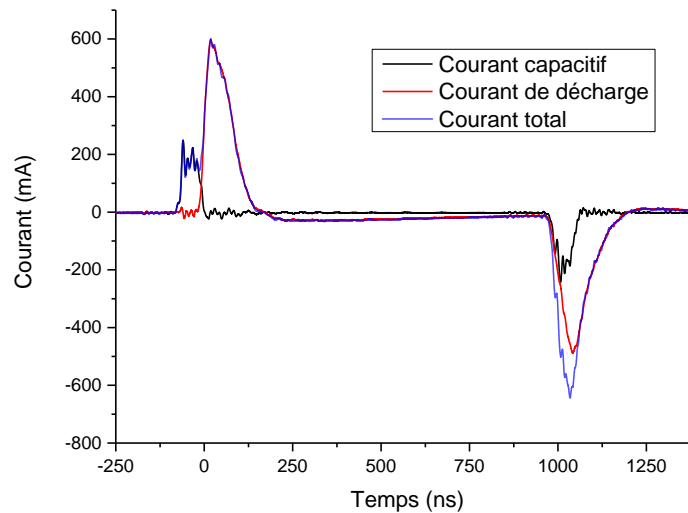


Figure 6-2 Décomposition des différents courants. Le courant total peut être décomposé en deux, le courant capacitif et le courant de décharge. Tension appliquée de 10kV, largeur d'impulsion 1 μ s, cible DMEM à 2cm.

Le courant capacitif induit par la présence du diélectrique entre les électrodes, n'apparaît que lors des variations de tension (front de montée et de descente de la tension). Dans un jet DBD alimenté par une tension pulsée, chaque front de tension produit une décharge plasma. Ce type de comportement est typique des décharges DBD dites capacitives^{109,136–138}.

La puissance électrique moyenne P et l'énergie E consommées lors de la décharge sont des grandeurs caractéristiques pour définir un dispositif plasma. Elles sont définies comme suit :

$$P = \frac{1}{T} \int_0^T i(t)u(t)dt = \frac{E}{T} \quad (\text{Eq 6.1})$$

Avec T la période de l'impulsion. Le Tableau 6-1 présente les résultats de puissance et d'énergie moyennes dans le cas du jet libre et du jet avec une cible de DMEM.

Surface	Jet libre	DMEM
Puissance dissipée (W)	3,86	2,58
Energie dissipée (mJ)	0,38	0,26

Tableau 6-1 Puissance et énergie dissipées par jet sans cible ou avec de l'eau ou du DMEM placé à 2cm. Conditions expérimentales : tension pulsée monopolaire d'amplitude 10 kV, fréquence de répétition 9,69 kHz, durée de l'impulsion 1 μ s, gaz porteur hélium et débit de gaz de 3 L/min.

Cette différence de puissance dissipée en présence du DMEM vient du fait qu'avec une permittivité de 80, ce dernier se comporte comme une électrode dissipant les charges. Ceci est confirmé par l'étude de la dynamique du jet plasma.

6.2 Etude de la dynamique du jet du plasma

La Figure 6-3 est une photographie du jet de plasma soit en jet libre (Figure 6-3 a) soit en interaction avec un liquide (DMEM) (Figure 6-3 b). A la sortie du tube, nous retrouvons la couleur violette caractéristique du plasma d'hélium se propageant dans l'air. En absence de cible l'intensité lumineuse du jet décroît progressivement le long du jet sur une longueur d'environ 60mm. En présence de DMEM à 20 mm de la sortie du jet, nous ne constatons aucun changement significatif sur la couleur du jet. Cependant, due à l'interaction entre le plasma et le liquide nous observons une augmentation de l'intensité lumineuse au voisinage de la surface du DMEM avec l'apparition d'un spot lumineux sur la surface du liquide.

En effet, plusieurs études ont démontré l'influence des matériaux et notamment leur conductivité lors de l'interaction avec un jet plasma^{139,140}. Par exemple, Riès *et al.*¹⁴⁰ observent un étalement du jet sur une surface de faible conductivité et un jet étroit et intense sur une surface de conductivité plus élevée. Ces informations montrent que le comportement du plasma peut être modifié par la nature de la cible avec lequel il interagit.

La dynamique du jet de plasma libre ou avec une cible de DMEM a donc été étudiée plus précisément avec une caméra rapide. Afin d'observer l'amorçage de la décharge entre les deux électrodes ainsi que sa propagation dans le tube en quartz, le jet a été légèrement modifié puisque les électrodes en aluminium ont été remplacées par un fin maillage métallique transparent afin de pouvoir voir à travers. Les paramètres opératoires du jet sont identiques aux études biologiques : tension 10 kV, fréquence 9,69 kHz et largeur d'impulsion 1 μ s.

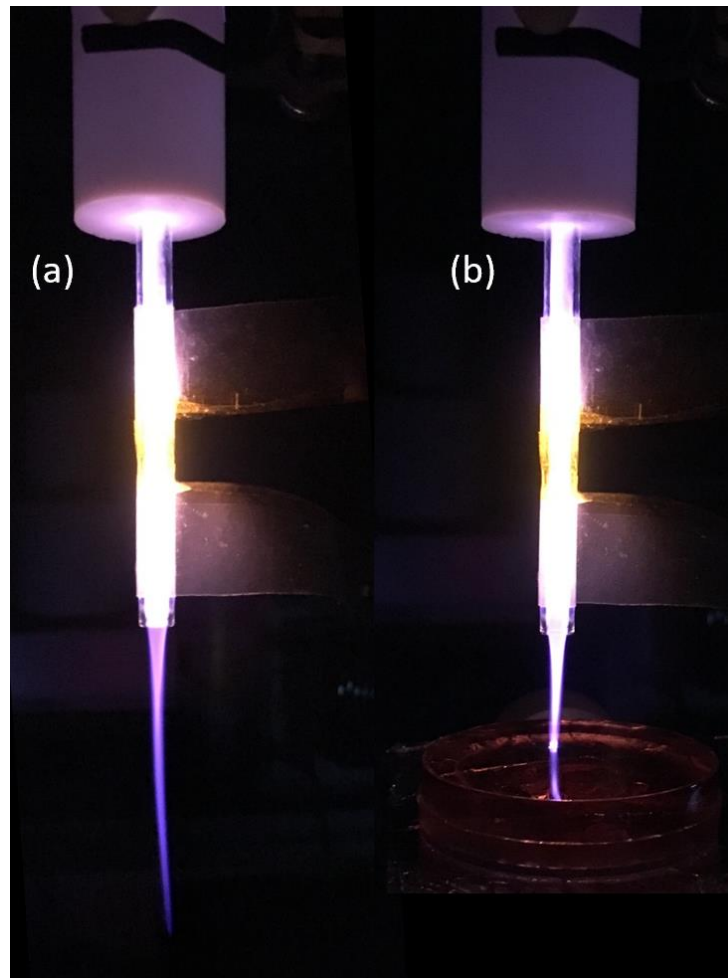


Figure 6-3 Photographie du jet plasma (a) en jet libre ou (b) avec une cible de DMEM placée à 2 cm. Conditions expérimentales : tension pulsée monopolaire d'amplitude 10 kV, fréquence de répétition 9,69 kHz, durée de l'impulsion 1 μ s, gaz porteur hélium et débit de gaz de 3 L/min.

6.2.1 Jet libre

La Figure 6-4 présente les images à différents instants de la décharge. Lors de la première décharge, cette dernière s'allume (image 75ns) en bas de l'électrode haute tension, puis s'étend dans l'espace inter-électrode (85ns) pour se propager dans les deux sens derrière les électrodes (150ns). Ensuite, une "bullet" plasma (boule de plasma ou front d'ionisation) sort du tube et se propage, suivie d'un canal faiblement conducteur (180-480ns). Ensuite, la seconde décharge (à partir de 1080ns) se développe et se propage dans l'espace inter-électrode.

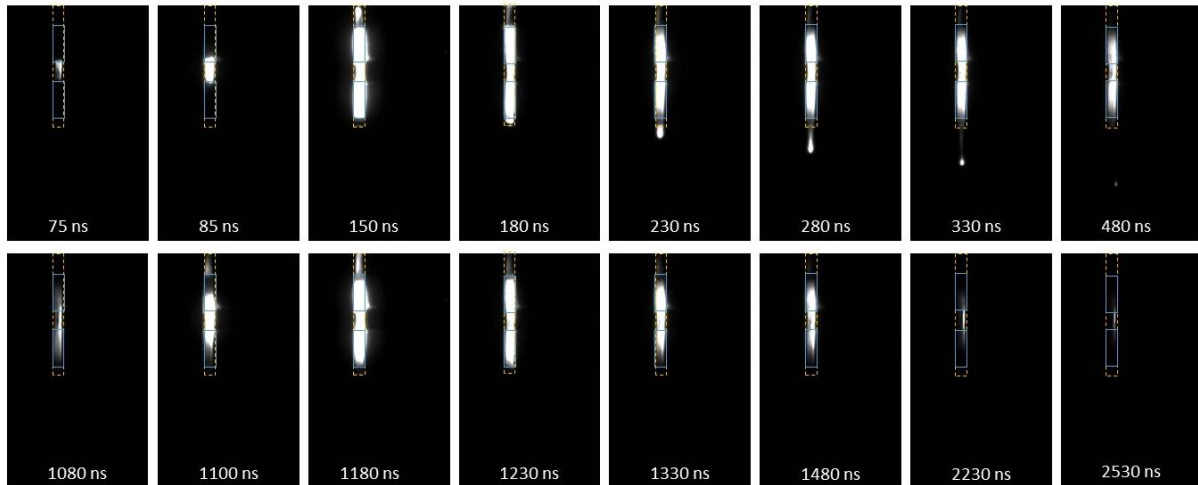


Figure 6-4 Imagerie rapide du jet plasma DBD hélium avec une durée d'exposition de 5 ns (acquisition après instant $t = 75$ ns, après le début du pulse de tension). Conditions expérimentales : tension pulsée monopolaire d'amplitude 10 kV, fréquence de répétition 9,69 kHz, durée de l'impulsion 1 μ s, gaz porteur hélium et débit de gaz de 3 L/min.

Ces résultats sont en accord avec d'autres études de la littérature^{136,141,142}.

6.2.2 Cible de DMEM à 2 cm

La Figure 6-5 présente les images à différents temps de la décharge lorsque le jet est situé à 2 cm d'une cible de DMEM (le DMEM est un milieu conducteur). La première décharge s'initie de la même façon que précédemment en jet libre à savoir en bas de l'électrode haute tension pour se propager dans l'espace inter-électrodes puis aux électrodes. Du fait de la présence de la surface du DMEM la bullet plasma rebondit sur la surface liquide (290-330ns) et se propage dans le sens inverse (du liquide vers le tube en quartz). Comme en jet libre la seconde décharge commence de la même façon mais présente, comme la première décharge, une bullet plasma qui se propage à la sortie du tube.

Zaplotnik *et al.*¹³⁹ ont émis l'hypothèse que les cibles conductrices agiraient au niveau du jet plasma comme une électrode secondaire. Ceci entrainerait donc une augmentation du champ électrique entre l'électrode haute tension et la surface de la cible conductrice. Nous pouvons donc supposer dans notre cas que la cible de DMEM agirait comme une 3^{ème} électrode et modifierait donc les propriétés du jet plasma mais aussi de la décharge plasma dans le jet lui-même.

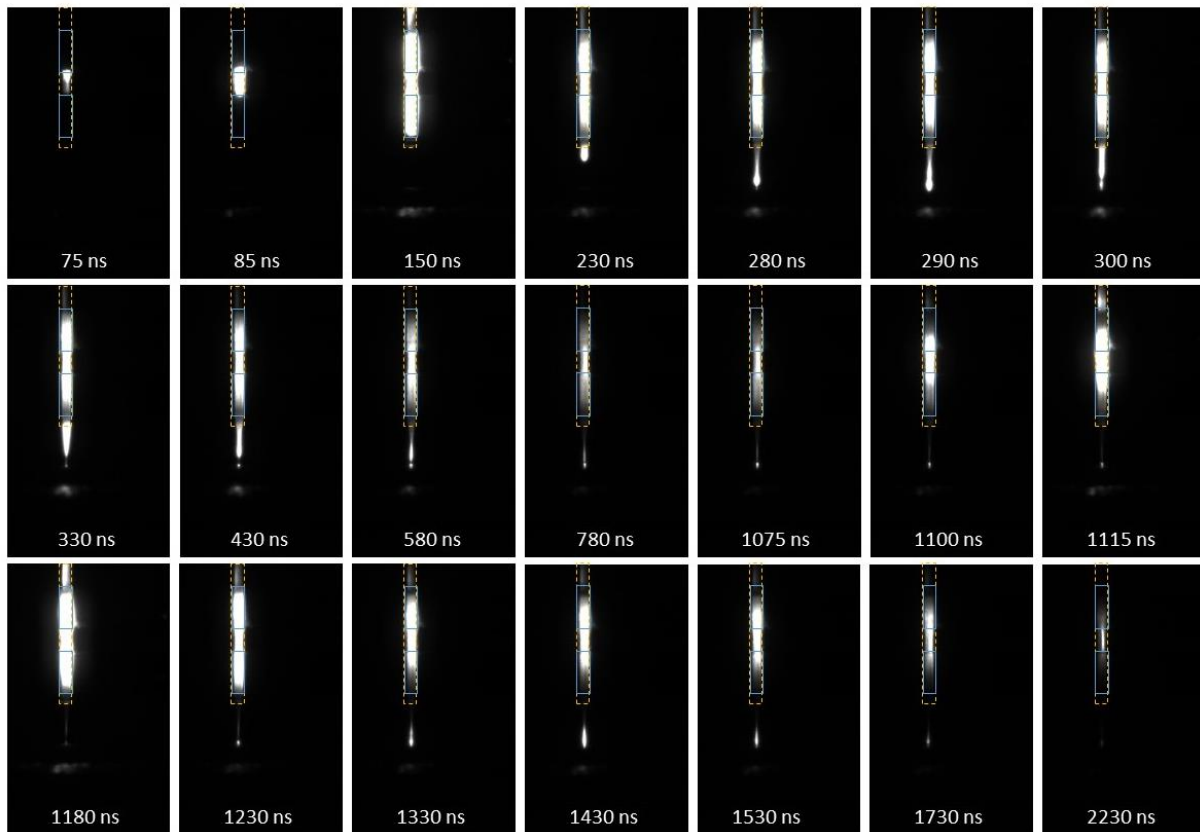


Figure 6-5 Imagerie rapide du jet plasma DBD hélium avec présence de cible DMEM. Durée d'exposition de 5 ns (acquisition après instant $t = 75$ ns, après le début du pulse de tension). Conditions expérimentales : tension pulsée monopolaire d'amplitude 10 kV, fréquence de répétition 9,69 kHz, durée de l'impulsion 1 μ s, gaz porteur hélium et débit de gaz de 3L/min.

Norberg *et al.*¹⁴³ ont dans leur étude numérique sur l'interaction entre un jet plasma et des matériaux à différentes permittivités, identifiés trois types de développement du front d'ionisation après contact avec la cible : le premier est la propagation du front d'ionisation sur la surface des matériaux de faible permittivité (matériaux isolants), le second est une contre propagation axiale du front d'ionisation de la surface cible en direction du jet (telle que nous l'observons avec la cible de DMEM) et le troisième, l'établissement d'un canal conducteur entre la surface de la cible et le jet (pour les cibles avec une permittivité de 80, comme le DMEM¹⁴⁴ et les métaux).

Nos résultats démontrent en effet l'absence de propagation radiale du front d'ionisation, la contre propagation du front d'ionisation et l'établissement du canal conducteur entre le jet et la cible.

6.2.3 Vitesse de propagation

A partir des images enregistrées grâce à la caméra rapide, il est possible d'en déduire la vitesse de propagation de la bullet plasma, générée lors de la première décharge, jusqu'à son impact avec la cible (0 - 300 ns) ou jusqu'à sa disparition en jet libre (0 - 500 ns). La Figure 6-6 présente les vitesses de la bullet plasma en jet libre ou avec une cible de DMEM placée à 2 cm. La bullet démarre au bas de l'électrode haute tension (0 mm), puis se propage dans l'espace inter-électrode à une vitesse décroissante comprise de $16 \cdot 10^7$ à $10 \cdot 10^7$ cm.s⁻¹.

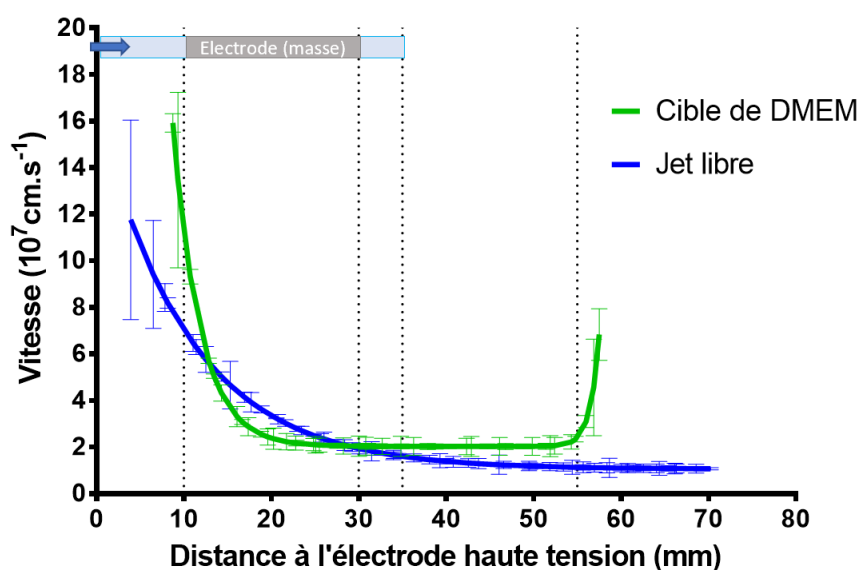


Figure 6-6 Vitesse de propagation de la décharge et de la bullet plasma. Conditions expérimentales : tension pulsée monopolaire d'amplitude 10 kV, fréquence de répétition 9,69 kHz, durée de l'impulsion 1 μ s, gaz porteur hélium et débit de gaz de 3 L/min.

Les vitesses avec ou sans cible sont globalement identiques hormis l'augmentation brusque de la vitesse à l'approche du liquide. Norberg *et al.*¹⁴³ ont en effet obtenu des résultats similaires en présentant la vitesse de propagation de la bullet dépendante et augmentant avec la permittivité de la cible.

6.3 Analyse par spectroscopie d'émission

Dans le but de mieux comprendre l'interaction plasma/milieu, une étude en spectroscopie d'émission a été effectuée. L'étude présentée dans cette partie présente les résultats de spectroscopie avec une cible d'eau placée à 2 cm. Le DMEM n'a pas été utilisé dans cette expérience car après une longue exposition au jet plasma (durée supérieure à 5 minutes), une couche de mousse se forme empêchant ainsi les mesures. La Figure 6-7

présente les résultats dans l'UV (250-450 nm) à la sortie du tube en quartz $z = 0$ mm et au niveau de la surface du liquide à $z = 20$ mm.

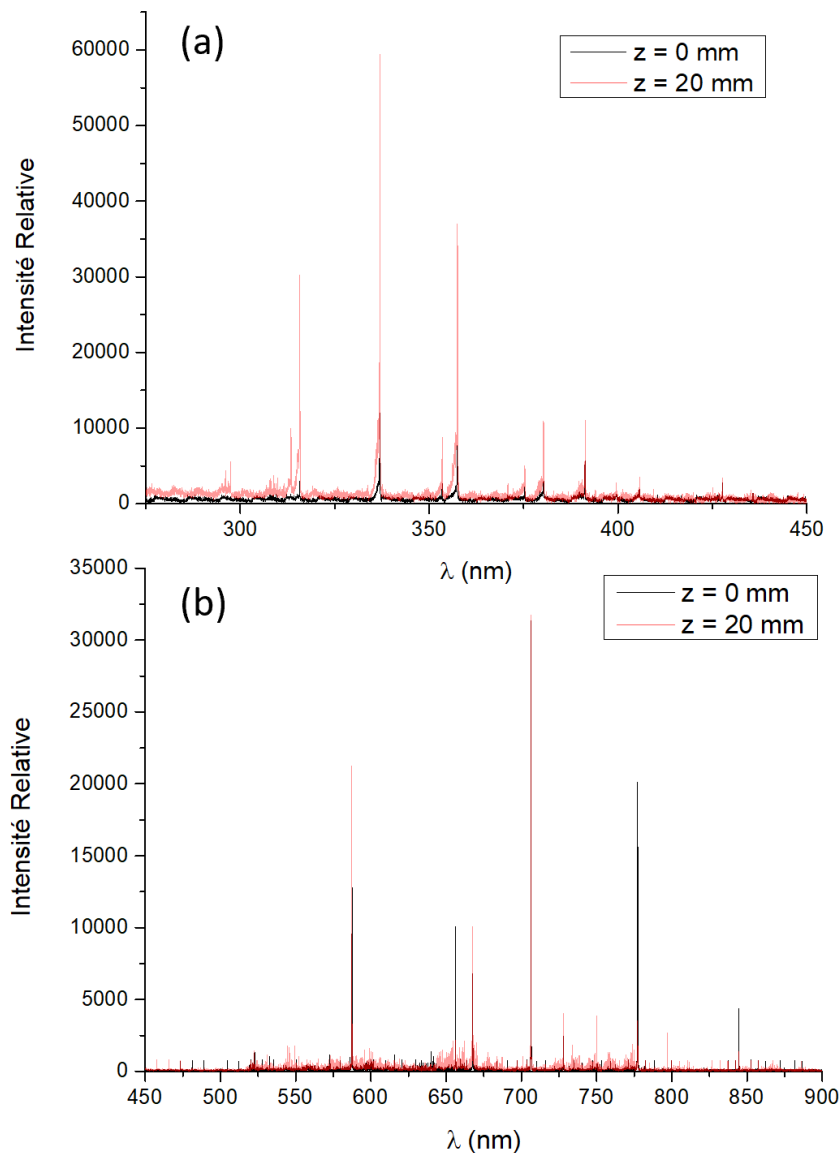


Figure 6-7 Intensité relative des espèces dans l'UV (a) et le visible (b) à $z = 0$ mm (noir) et $z = 20$ mm (rouge). Conditions expérimentales : tension pulsée monopolaire d'amplitude 10 kV, fréquence de répétition 9,69 kHz, durée de l'impulsion 1 μ s, gaz porteur hélium et débit de gaz de 3 L/min.

Plusieurs pics peuvent être remarqués à ces deux distances avec des intensités différentes. Les émissions les plus intenses observées entre 300nm et 400nm correspondent à la bande d'émission du Second Système Positif de l'azote (SPS : $N_2(C^3\pi_u) \rightarrow N_2(B^3\pi_g)$), avec une émission très intense qui correspond à l'émission enregistrée à la longueur d'onde de 336nm, de la bande de transition ($v=0, v'=0$). D'autres émissions lumineuses provenant de la désexcitation radiative de l'hélium, l'azote (l'ion moléculaire et la molécule), l'oxygène,

l'hydrogène et l'hydroxyle (radical OH) sont observées et regroupées dans le Tableau 6-2. La seule différence observée entre la présence ou pas de milieu liquide concerne l'intensité relative des spectres.

Espèces	λ (nm)	Transition	$E_{\text{Haute}} - E_{\text{Basse}}$ (eV)
OH	308	$A^2\Sigma^+ - X^2\Pi(0,0)$	4,0 – 0
O	777	$3p^5P_{1,2,3} - 3p^5S^{\circ}_2$	10,74 – 9,14
N ₂ (SPS)	336	$C^3\Pi_u - B^3\Pi_g(0,0)$	11,0 – 7,4
He	706	$3s^3S_1 - 2p^3P^{\circ}_{0,1,2}$	22,72 – 20,96

Tableau 6-2 Espèces identifiées en fonction des raies observées. Conditions expérimentales : tension pulsée monopolaire d'amplitude 10 kV, fréquence de répétition 9,69 kHz, durée de l'impulsion 1 μ s, gaz porteur hélium et débit de gaz de 3L/min.

Plusieurs espèces ont été investiguées de plus près : l'hélium, le diazote, l'oxygène et l'hydroxyde. La Figure 6-8 présente les résultats pour ces quatre espèces à la sortie du jet ($z = 0$ mm) et à la surface du liquide ($z = 20$ mm).

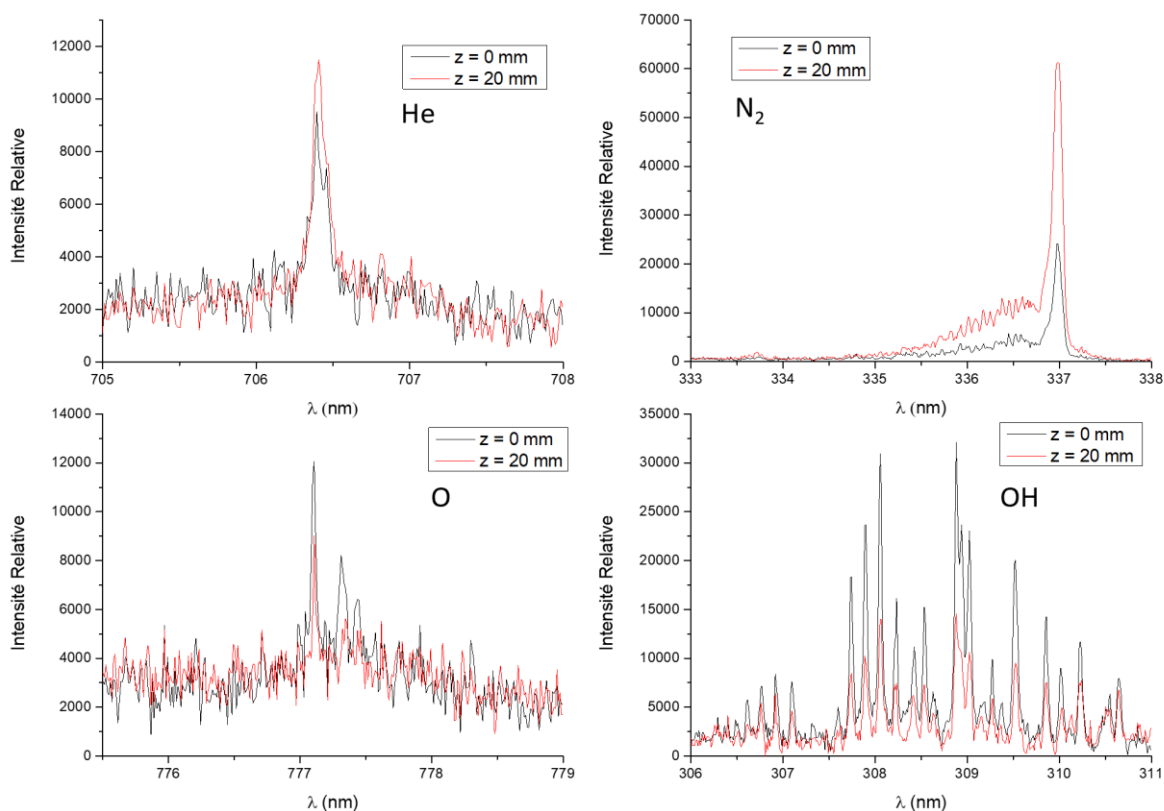


Figure 6-8 Intensité relative à $z = 0$ mm (noir) et $z = 20$ mm (rouge) pour quatre espèces : hélium, diazote, oxygène et hydroxyde.

Logiquement, l'hélium est aussi présent à la sortie du jet qu'à la surface du liquide. L'émission du SPS en revanche est plus élevée à la surface du liquide qu'à la sortie du tube en quartz. Le triplet de l'oxygène peut se distinguer à $z = 0$ mm mais pas à $z = 20$ mm. Enfin, l'hydroxyde (radical OH) est plus présent à la sortie du jet qu'à la surface du liquide, ce dernier se formant majoritairement grâce à une interaction plasma/air.

L'interaction du jet plasma avec la cible va modifier la production des espèces au voisinage de la surface. Hormis l'hélium, la distribution spatiale de ces espèces n'est pas uniforme le long du jet plasma. Pour l'oxygène et le radical hydroxyle, les intensités sont maximales à la sortie du jet et diminuent le long du jet. En revanche, l'inverse est observé pour l'azote. Ces résultats sont en accord avec ceux de la littérature¹⁴⁵⁻¹⁴⁷.

Le spectre d'OH permet de déduire la température rotationnelle de cette espèce. Grâce à une simulation avec le logiciel LIFBASE (Figure 6-9), il a été possible de déduire la température rotationnelle à 400K (126,85°C).

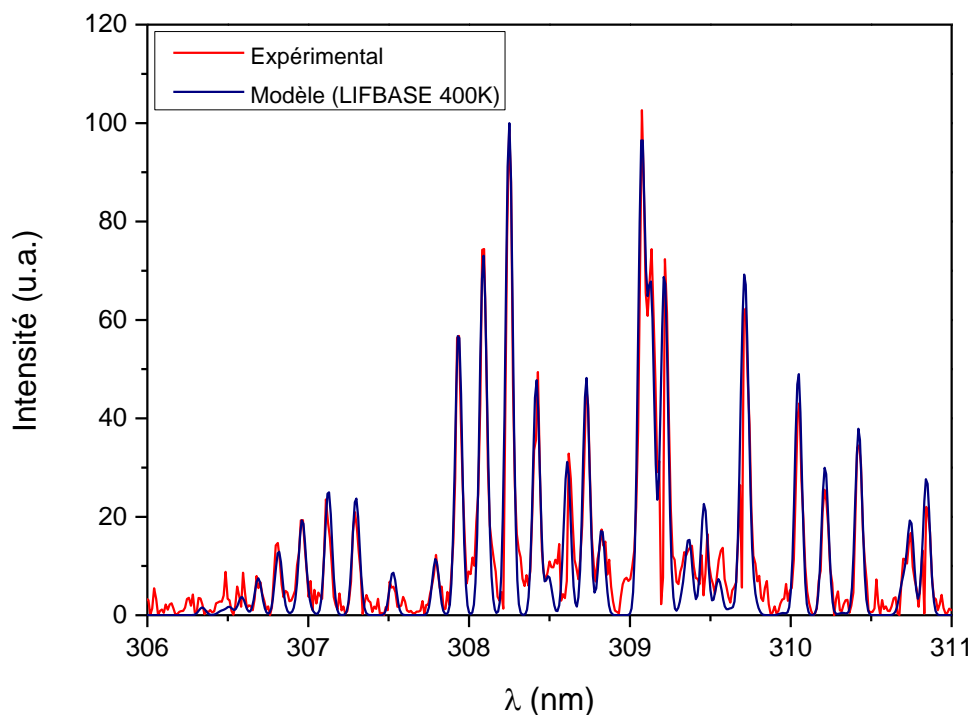


Figure 6-9 Température rotationnelle du OH. Spectre expérimental (rouge) et simulé (bleu).

La température rotationnelle, habituellement considérée comme proche de la température du gaz, peut sembler trop importante pour les applications biomédicales.

Cependant, la température mesurée avec une sonde à la sortie du jet a démontré que le gaz ne dépasse pas la température de 50°C (323K).

6.4 Conclusion

Dans ce chapitre, les caractéristiques électriques du jet plasma ont été exposées. Puis, une observation en imagerie rapide nous a permis de visualiser l'établissement de la décharge plasma entre les deux électrodes ainsi que la propagation de l'onde d'ionisation. Ceci nous a permis de déduire la vitesse de propagation du front d'ionisation. Enfin, l'étude de spectroscopie d'émission nous a permis d'identifier quelques espèces produites à la sortie du jet plasma ainsi qu'au voisinage d'une cible liquide.

L'objectif de cette thèse étant la compréhension des mécanismes d'interaction plasma/milieu et PAM/cellules cancéreuses, cette caractérisation du jet de plasma nous a permis uniquement d'identifier les espèces qui peuvent interagir avec le milieu de culture et il est nécessaire de la compléter. A noter que des études plus poussées de caractérisation et d'optimisation des jets ont déjà été réalisées précédemment au laboratoire lors des travaux de thèse de Florian Judée⁵⁵ et Neil Jomaa¹⁰⁸. Par ailleurs, la continuité de ces recherches, avec entre autres l'étude de l'influence de différentes cibles (liquide, diélectrique et métallique) ainsi que des analyses LIF (Laser Induced Fluorescence), est actuellement le sujet d'une thèse en cours dans le groupe PRHE.

Chapitre 7 - Interaction plasma/milieu : caractérisation physico-chimique

De nombreuses études ont mis en évidence que les plasmas froids à la pression atmosphérique peuvent produire des espèces réactives d'oxygène et d'azote (RONS). En effet, des dérivés réactifs de l'oxygène (ROS) ou de l'azote (RNS) à courtes ou longues durées de vie sont générés en phase gazeuse ou liquide lorsque les principales espèces réactives du plasma (électrons, ions, radicaux et molécules dissociées) interagissent avec une phase liquide^{4,148,149}. Plusieurs études ont montré que les espèces créées lors d'un traitement plasma peuvent inactiver les cellules cancéreuses soit directement¹⁵⁰, soit indirectement en utilisant un milieu précédemment activé par plasma (PAM – Plasma Activated Medium)³⁰ et ce sans affecter les cellules saines^{28,30,93,151}. Il est également intéressant de noter que le PAM permet de traiter des zones difficiles à atteindre avec un jet de plasma qui requiert un endoscope ou cathéter. Il présente une bonne sélectivité cellules saines/cancéreuses et reste stable plusieurs jours après sa préparation si le PAM est stocké dans de bonnes conditions^{30,152,153}. C'est pourquoi l'identification et la quantification des RONS générés apportent des précisions nécessaires sur les mécanismes d'action du PAM.

La nature et la quantité des espèces générées dépendent également de la configuration du jet plasma et du gaz utilisés. Dans ce chapitre, nous étudierons les espèces générées avec le jet d'hélium dans notre configuration classique (comme décrit dans la partie Matériels et Méthodes). Plusieurs techniques d'identification et de quantification sont employées en fonction de la durée de vie de l'espèce ciblée. La fluorescence et colorimétrie conviennent pour les espèces stables, en revanche pour les radicaux à courte durée de vie, la Résonance Paramagnétique Électronique (RPE) est une méthode plus précise^{154–157} car elle tire profit de l'utilisation de piègeurs¹⁵⁸. Afin de mener une étude complète, l'identification et la quantification des espèces se fera dans trois milieux de complexité différente : l'eau Milli-Q, le milieu de culture avec ou celui sans Sérum de Veau Foetal (SVF ou FCS – Fetal Calf Serum) et seront exposés au jet plasma pendant des durées allant de 0s à 240s.

7.1 Analyse du pH et de l'osmolarité après exposition au plasma

La première analyse de l'interaction entre le plasma et les milieux a été la mesure du pH et de l'osmolarité des milieux après exposition plasma. La Figure 7-1 présente les résultats de la variation de pH lorsque les milieux eau Milli-Q, DMEM et DMEM+SVF sont exposés au jet plasma pendant des durées variant de 0 à 150s. Seule l'eau Milli-Q voit son pH diminuer avec l'exposition au jet plasma, avec un pH de 6 avant exposition diminuant jusqu'à 4,5 après 120s d'exposition au plasma. Le pH n'est pas modifié pour le DMEM±SVF, ce dernier étant un milieu tamponné.

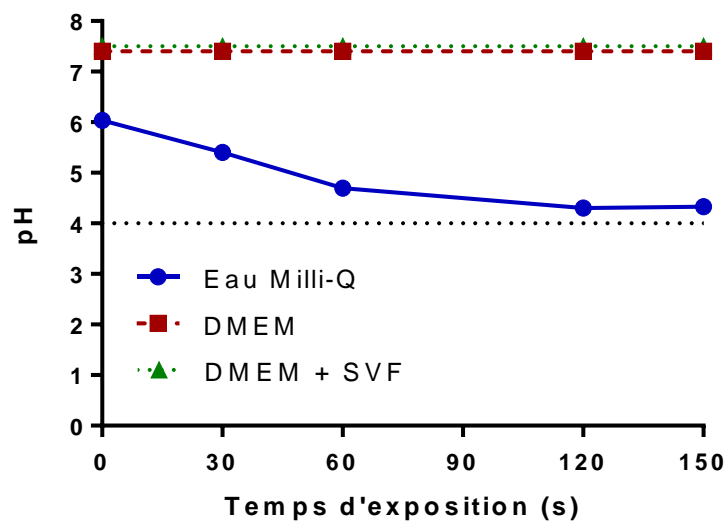


Figure 7-1 Variation du pH dans différents milieux en fonction du temps d'exposition au plasma.

En revanche, une variation significativement statistique de l'osmolarité a été notée (Tableau 7-1).

L'osmolarité est la mesure de concentration d'un composé chimique, exprimée en nombre de particules osmotiquement actives par litre. Ainsi, il est possible de déterminer la pression osmotique d'une solution et déduire la diffusion du solvant à travers une membrane semi-perméable. Dans le plasma sanguin sa valeur est située entre 280-300 mOsmol/kg¹⁵⁹.

L'osmolarité est mesurée seulement pour le DMEM+SVF, ce dernier étant le milieu utilisé pour générer le PAM lors des études biologiques.

Le milieu de culture non traité présente une osmolarité de 295±1,5 mOsmol/kg, alors qu'après 120s d'exposition au plasma elle augmente jusqu'à 358±23 mOsmol/kg. Il est

intéressant de noter que l'osmolarité du milieu exposé seulement à l'hélium pendant 300s atteint une valeur similaire à celle du PAM-120s.

	pH	Osmolarité (mOsmol/kg)	Volume ($\pm 1 \mu\text{L}$)
Milieu	7,5	295 \pm 2	100
Milieu exposé à l'He seul pendant 120s	7,5	319 \pm 3	92
Milieu exposé au plasma pendant 120s (PAM)	7,5	358 \pm 23	80
Milieu exposé à l'He seul pendant 300s	7,5	360 \pm 26	80

Tableau 7-1 Caractérisation de milieux en termes de pH, osmolarité (mOsmol/kg) et évaporation après exposition à l'hélium seul ou au jet plasma. Six expériences indépendantes ont été réalisées. Les données sont présentées comme moyenne \pm SD.

Cependant, l'osmolarité a été significativement augmentée après exposition plasma à cause de l'évaporation du milieu. De manière intéressante, la régulation de l'osmolarité est aussi une piste de recherche prometteuse dans la recherche contre le cancer¹⁶⁰.

7.2 Analyse du radical hydroxyle $\bullet\text{OH}$

Afin de caractériser la formation de l'hydroxyle $\bullet\text{OH}$ dans différents milieux tels que l'eau Milli-Q, le DMEM \pm SVF après exposition au jet plasma d'hélium, des expérimentations de RPE utilisant le DMPO (5,5-diméthyl-1-pyrroline N-oxide) comme piègeur ont été réalisées. La Figure 7-2 présente le spectre RPE enregistré pour un échantillon de DMEM contenant du DMPO et exposé au jet plasma pendant 150s. Quel que soit le milieu, le spectre RPE correspond à la superposition de deux signaux. Le premier et le plus intense (Figure 7-2, #) possède les constantes de couplage hyperfines $a_N = a_H = 15\text{G}$, $g = 2,0056$ et un ratio d'intensité de pic de 1:2:2:1, et est attribué à l'adduit DMPO-OH^{111,149,156,157,161-163}. Le second signal (Figure 7-2, *) est un triplet avec $a_N = a_H = 15\text{G}$, $g = 2,0056$ et un ratio d'intensité de pic de 1:1:1. Ce signal, présent aussi dans les milieux non exposés, a été également observé par *Tresp et al.*¹⁶¹ et a été attribué à l'adduit DMPO-CH₃. L'adduit DMPO-CH₃ ne peut provenir uniquement du piègeur lui-même puisque aucune espèce carbonée n'est présente dans l'eau Milli-Q. Cette

hypothèse semble être vérifiée par l'absence de corrélation entre l'intensité du signal et le temps d'exposition au jet plasma.

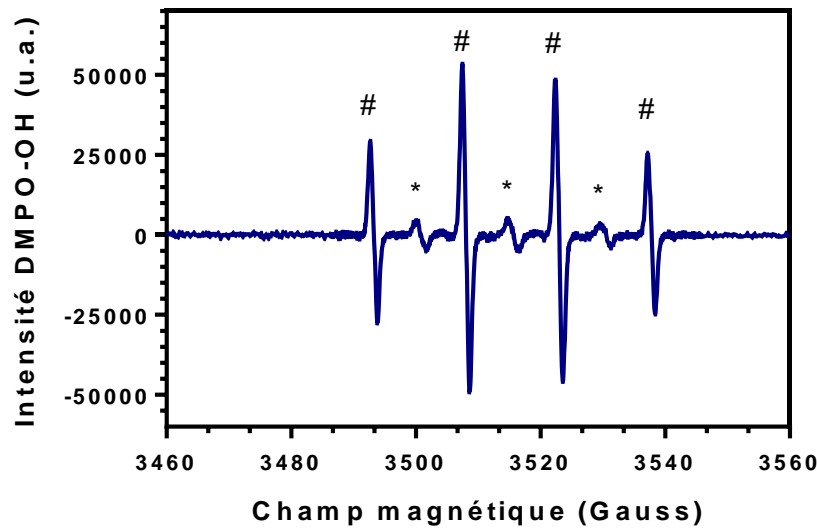


Figure 7-2 Spectre RPE du DMEM exposé 150s au jet plasma d'He en présence de DMPO (#DMPO-OH, *DMPO-CH₃).

Le radical $\bullet\text{OH}$ peut être formé par la réaction d'un atome d'oxygène avec une molécule d' H_2O présente à la surface du liquide^{164,165} ou de la solvation de $\bullet\text{OH}$ gazeux produit en phase gazeuse du plasma. Dans des travaux précédents, la présence de l'atome d'oxygène et d'espèces radicalaires OH a été validée par l'observation de leur raie d'émission en spectroscopie²⁷. Ces résultats indiquent que les deux voies de production de $\bullet\text{OH}$ peuvent être présentes dans nos expériences. Cette déduction est confirmée dans les travaux de *Gorbanev et al.*¹⁶⁶ montrant qu'avec un flux de plasma d'hélium pur, le radical OH peut être produit en phase gazeuse et dans le milieu.

La concentration d' $\bullet\text{OH}$ a été évaluée en exposant au jet plasma différents milieux contenant du DMPO. Comme le présente la Figure 7-3, la concentration de l'adduit DMPO-OH augmente linéairement avec le temps d'exposition au jet plasma ($R^2_{\text{eau}}=0,99$, $R^2_{\text{DMEM}}=0,98$, $R^2_{\text{DMEM+SVF}}=0,92$) indiquant une augmentation de la production de $\bullet\text{OH}$. *Kanazawa et al.*¹⁶⁷ ont également mis en évidence une relation similaire de linéarité entre le temps d'exposition au plasma d'eau et la production de $\bullet\text{OH}$, en utilisant une technique de dosimétrie basée sur la réaction de l'acide téréphtalique avec le radical OH générant une molécule fluorescente.

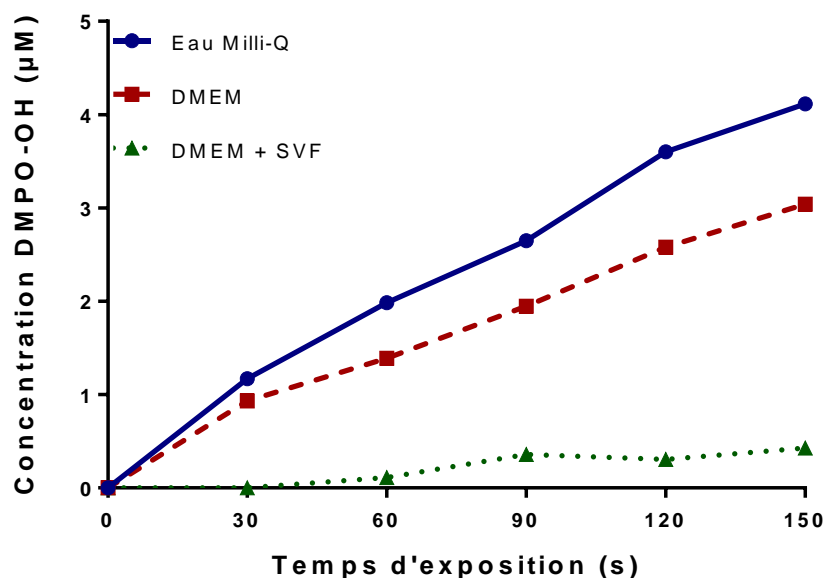


Figure 7-3 Variation de la concentration de DMPO-OH dans de l'eau Milli-Q et dans du DMEM \pm SVF en fonction du temps d'exposition au jet d'He.

La concentration de DMPO-OH est évaluée autour de 4,12 μM , 3 μM et 0,4 μM dans l'eau, le DMEM et le DMEM+SVF respectivement après 150s d'exposition au plasma. Le taux de DMPO-OH dans l'eau est supérieur à celui des milieux biologiques. En effet, les radicaux OH générés dans l'eau sont entourés uniquement de molécules d'eau et d'autres radicaux. Dans les milieux biologiques, plus complexe, $\bullet\text{OH}$ peut oxyder les composants organiques présents tels que les acides aminés, les vitamines et protéines¹⁶⁸. Ces réactions d'oxydation vont réduire les quantités de $\bullet\text{OH}$ piégées par le DMPO. Les réactions chimiques entre les acides aminés et $\bullet\text{OH}$ ont été prédites par des simulations de réactions dynamiques moléculaires classiques¹⁶⁹ et observées au spectromètre de masse haute résolution¹⁷⁰.

L'estimation du temps de demi-vie du DMPO-OH a été évaluée dans les trois milieux et elle est présentée dans le Tableau 7-2. Afin de l'estimer, le déclin du signal DMPO-OH a été étudié de 120s à 2000s après exposition au plasma.

Milieu	Demi-vie adduit DMPO-OH (s)
Eau Milli-Q	820
DMEM	1043
DMEM + SVF	442

Tableau 7-2 Demi-vie de l'adduit DMPO-OH après 150s d'exposition au jet d'He dans les trois milieux.

Ces résultats montrent que le temps de demi-vie du DMPO-OH est dépendent de la composition du milieu. Dans l'eau Milli-Q, la valeur de 820s est proche de celle de 870s trouvée dans la littérature¹⁵⁸. Dans le DMEM ± SVF, le temps de demi-vie est respectivement 1043s et 442s. Ces différences de temps entre les trois milieux peuvent être liées à la stabilité de l'adduit DMPO-OH qui est affectée soit par un changement de pH (Figure 7-1) soit par la présence d'acide nitrique^{155,171}.

Le DMEM étant un milieu tamponné, l'exposition au plasma n'entraîne pas de changement de pH et peut donc ainsi expliquer la stabilité du DMPO-OH. En présence de SVF, le temps de demi-vie du DMPO-OH vaut 442s, démontrant une stabilité 2 et 2,3 fois inférieure à celle dans l'eau et le DMEM respectivement. Dans le SVF, l'adduit peut se lier à des protéines telles que l'albumine qui possède des propriétés anti oxydantes. Également, la présence de quantités plus importantes d'acide nitrique dans le DMEM+SVF (montrée par la suite dans le paragraphe nitrite/nitrate) peut expliquer ce phénomène. De plus, le nitrite peut réagir avec OH pour former du peroxynitrite (ONOO⁻).

7.3 Formation de l'anion superoxyde O₂^{•-}

Le DMPO utilisé comme piègeur peut réagir avec plusieurs ROS selon différents coefficients de réaction et temps de piégeage. Le spectre obtenu Figure 7-2 est bien défini pour être celui du DMPO-OH. Cependant, les mécanismes peuvent être plus complexes. Le DMPO présente une préférence importante pour le •OH ($k_{OH} > 10^9 M^{-1} s^{-1}$) mais peut également piéger l'anion superoxyde pour former DMPO-OOH, qui possède un taux de réaction plus faible ($k_{O_2} < 10^2 M^{-1} s^{-1}$)^{158,161}. La difficulté réside dans le fait que l'adduit DMPO-OOH se décompose rapidement en DMPO-OH, le rendant difficile à détecter.

Afin de mettre en évidence la présence de l'anion superoxyde O₂^{•-} dans les milieux, du superoxyde dismutase (SOD) a été ajouté avant exposition plasma. Cette enzyme est une métalloprotéine qui catalyse la dismutation de l'anion radicalaire superoxyde en molécules d'oxygène et de peroxyde d'hydrogène. La présence de SOD dans le milieu va donc entraîner l'inhibition de la formation de l'adduit DMPO-OOH¹⁵⁸ lors de l'exposition au plasma. Les résultats sont présentés Figure 7-4. Dans l'eau, l'addition de SOD induit une diminution de la formation de l'adduit DMPO de 10,2±3,34%.

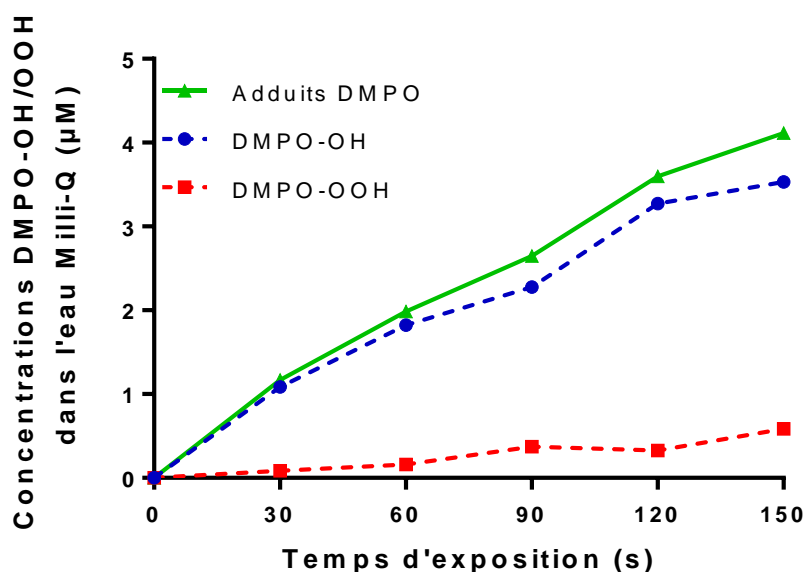


Figure 7-4 Variation de la concentration de DMPO-OH et DMPO-OOH dans l'eau avec et sans 150U de SOD et pour différents temps d'exposition au jet plasma He. La SOD inhibe la formation de DMPO-OOH.

Cela indique qu'une partie du signal DMPO-OH provient de la décomposition du DMPO-OOH en DMPO-OH. Il est intéressant de noter également que la formation de l'anion superoxyde augmente linéairement en fonction du temps d'exposition bien que sa concentration soit beaucoup plus faible que celle du radical OH.

7.4 Quantification de la concentration du peroxyde d'hydrogène H₂O₂

Le peroxyde d'hydrogène est l'un des ROS majoritaires produit par le jet plasma^{30,93,152,157,166,172}. Il est généré dans le plasma puis diffuse dans le milieu¹⁶⁶. Dans les précédents travaux du laboratoire^{30,93}, il a été montré que l'H₂O₂ produit dans le PAM reste stable jusqu'à 7 jours si le PAM est stocké à 4°C. Le peroxyde d'hydrogène est l'un des agents cytotoxiques majeurs du fait de sa capacité à diffuser à travers les membranes cellulaires et de générer •OH via une réaction de Fenton catalysée par les protéines composées de fer. De ce fait, le peroxyde d'hydrogène est connu pour son importante réactivité avec les composants cellulaires, notamment sa forte aptitude à induire des dommages à l'ADN entraînant la mort cellulaire.

La formation de H₂O₂ a été caractérisée et quantifiée via l'utilisation d'un kit fluorescent (détaillé dans la partie Matériel & Méthode). La Figure 7-5 montre la concentration d'H₂O₂ dans l'eau Milli-Q et les milieux de culture. Contrairement au •OH et à

l' $O_2^{\bullet-}$, la quantité de peroxyde d'hydrogène ne dépend pas du milieu traité. La concentration de H_2O_2 augmente de façon linéaire et quasi identique avec le temps d'exposition ($R^2_{eau}=0,93$, $R^2_{DMEM}=0,97$, $R^2_{DMEM+SVF}=0,99$). Dans les trois milieux, la concentration de H_2O_2 atteint $1,60 \pm 0,12$ mM pour 150s d'exposition.

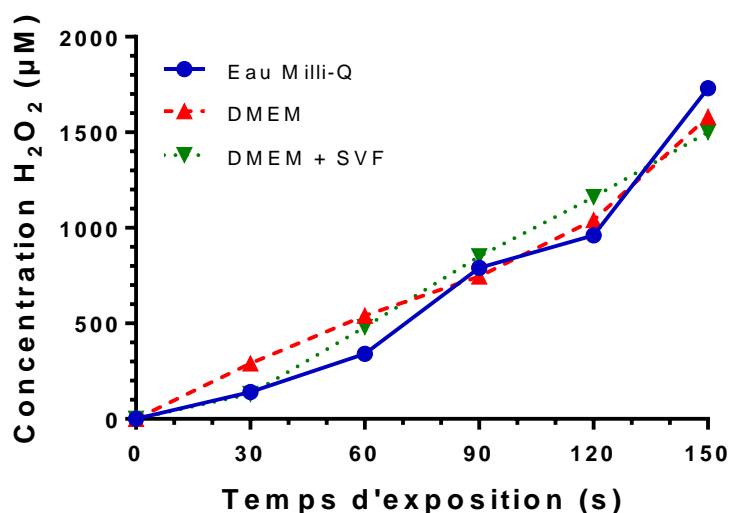


Figure 7-5 Variation de la concentration de peroxyde d'hydrogène dans l'eau Milli-Q et le DMEM \pm SVF pour différents temps d'exposition au jet plasma He.

L'évolution linéaire de la concentration du peroxyde d'hydrogène a aussi été observée par Adachi et al. dans du DMEM avec un jet d'argon¹⁵².

7.5 Production d'oxygène singulet 1O_2

L'oxygène singulet peut être généré soit dans du milieu liquide après traitement de celui-ci par jet d'hélium ou DBD^{149,158,172}, soit produit en phase gazeuse puis diffus dans le milieu liquide¹⁵⁸.

Afin d'étudier la formation d'oxygène singulet dans les différents milieux activés par plasma, des expérimentations RPE en utilisant le TEMP (2,2,6,6-tetramethylpiperidine) comme piègeur ont été effectuées. Comme le montre la Figure 7-6 (a), le spectre RPE de l'eau Milli-Q exposé au jet de plasma durant 150s en présence de TEMP se caractérise par un triplé, d'intensité 1:1:1 et de constantes de couplage hyperfines $a_N=a_H=16G$, $g= 2,0059$. Ce signal, détecté dans les trois milieux est attribué à l'adduit TEMP-O indiquant la formation d'oxygène singulet ou d'ozone après exposition au plasma. La quantité de TEMPO augmente

linéairement avec le temps d'exposition ($R^2_{\text{eau}}=0,98$, $R^2_{\text{DMEM}}=0,95$, $R^2_{\text{DMEM+SVF}}=0,88$) avec une progression nettement plus importante dans l'eau (Figure 7-6 (b)).

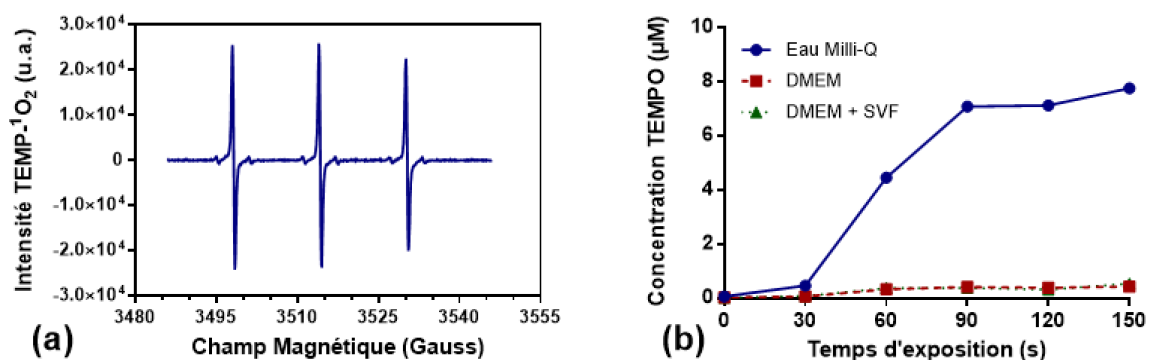


Figure 7-6 (a) Spectre RPE du TEMPO après 150s d'exposition au plasma dans l'eau Milli-Q. (b) Evolution de la concentration du TEMPO dans trois milieux en fonction du temps d'exposition au jet plasma d'He.

L'ajout d'azide de sodium NaN_3 (50mM), un piègeur d'oxygène singulet¹⁷³⁻¹⁷⁵ dans l'eau avant exposition induit une décroissance du signal de 65% après 30s d'exposition.

Ce résultat démontre que la formation de TEMPO résulte de l'oxydation du TEMP par l'oxygène singulet et non par l'ozone. D'autre part, dans notre configuration de jet d'hélium, l'ozone n'a pas été détecté lors de l'utilisation de la méthode d'absorption dans l'UV à 253,7nm par l'ozone, ce qui n'indique pas ou peu de production d'ozone. Cette observation est également confirmée par *Kawasaki et al.*¹⁷⁶.

Dans l'eau, la concentration de TEMPO augmente jusqu'à 13,85μM pour 150s d'exposition. En comparaison, la concentration de TEMPO dans les milieux de culture est négligeable. En effet, l'oxygène singulet étant une espèce très réactive connue pour oxyder les acides aminés méthionine, tryptophane, la cystéine et les protéines¹⁷⁷, il est donc consommé dans le DMEM ± SVF qui sont des milieux biologiques plus complexes que l'eau. Il est important de noter que l'oxygène va ainsi induire une diminution des nutriments cellulaires par la formation de radicaux oxydés, et en conséquence augmenter les effets cytotoxiques de PAM.

7.6 Production du radical hydrogène $\bullet\text{H}$

Le radical hydrogène $\bullet\text{H}$ est détecté grâce au piègeur PBN (α -phenyl-N-tert-butyl-nitrone). Le spectre RPE obtenu lors de l'exposition de DMEM est présenté Figure 7-7 (a).

Ce signal formé de 9 pics avec des ratios d'intensité de 1:2:1:1:2:1:1:2:1 et des constantes de couplage hyperfines $a_N=16,2G$, $a_H=10,3G$, $g= 2,0776$. Ce signal est caractéristique de la présence de l'adduit PBN-H dans le milieu. Ce signal a été observé également dans les deux autres milieux.

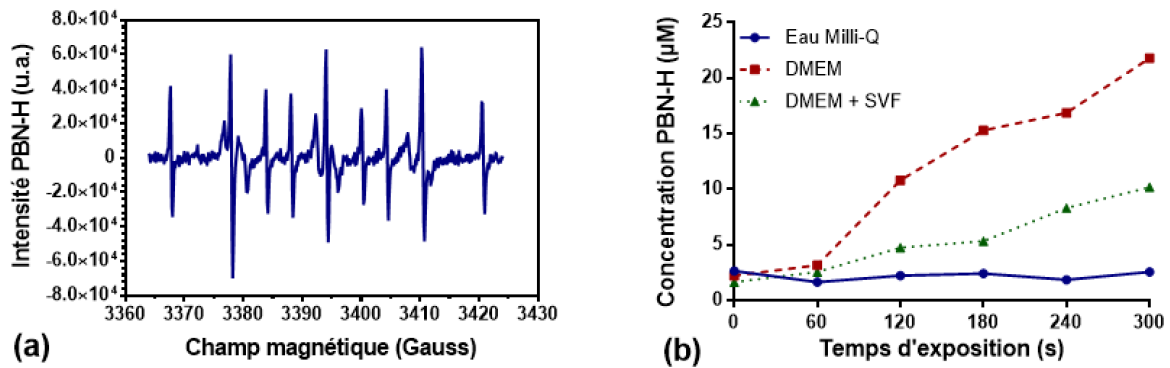


Figure 7-7 (a) Spectre RPE du PBN-H après 150s d'exposition au plasma dans du DMEM. (b) Effet de l'exposition au plasma sur l'intensité du signal PBN-H dans l'eau Milli-Q et le DMEM \pm SVF.

La Figure 7-7 (b) présente l'intensité de l'adduit PBN-H en fonction du temps d'exposition au plasma pour les trois milieux. L'intensité du PBN-H dans l'eau varie peu avec le temps d'exposition. Dans le DMEM \pm SVF, l'intensité du PBN-H augmente linéairement ($R^2_{DMEM}=0,96$, $R^2_{DMEM+SVF}=0,97$) lorsque le temps d'exposition augmente. Il est également notable de remarquer que l'intensité de l'adduit PBN-H n'est pas nulle sans exposition au plasma dans tous les milieux. Ces résultats suggèrent une génération de $\bullet H$ en petite quantité sans exposition au jet plasma. Dans le cas du DMEM \pm SVF, la formation de $\bullet H$ peut également être partiellement attribuée à la réaction des ROS tels que l' $\bullet OH$ avec les acides aminés^{169,178}. Comme le montre la Figure 7-7 (b), la production d' $\bullet H$ est plus importante dans le DMEM que dans le DMEM+SVF. Cette différence vient de la présence d'albumine dans le SVF, protéine connue pour ses propriétés antioxydantes et son habilité à piéger les radicaux libres¹⁷⁹, empêchant le radical $\bullet H$ libre de réagir avec le PBN. La présence de l'adduit PBN du radical hydrogène dans un milieu liquide a également été observée après exposition à un jet d'hélium¹⁶⁶ et un jet d'argon¹⁵⁵.

7.7 Formation d'oxyde nitrique $\bullet NO$

L'oxyde nitrique a été détecté par RPE en utilisant le piègeur C-PTIO (2-(4-Carboxyphenyl)-4,5-dihydro-4,4,5,5-tetramethyl-1H-imidazol-1-yloxy-3-oxyle potassium

salt) qui réagit avec l'oxyde nitrique pour former du C-PTI et du $\bullet\text{NO}_2$ ^{180,181}. Le C-PTIO et le C-PTI sont des radicaux moléculaires stables, détectables grâce à leurs signatures RPE caractéristiques.

Le spectre RPE obtenu lors de l'exposition d'une solution d'eau Milli-Q contenant 166 μM de C-PTIO au jet plasma pendant 150s est présenté Figure 7-8 (a). Ce signal est composé de deux composantes : la composante principale qui est corrélée au produit C-PTI résultant de l'interaction entre le piègeur et l'oxyde nitrique (Figure 7-8 (b)) et la composante secondaire issue des molécules de C-PTIO qui n'ont pas réagi (Figure 7-8 (c)).

Le spectre du C-PTI (Figure 7-8 (b)) est composé de sept pics de ratio 1:1:2:1:2:1:1 et de constantes de couplage hyperfines $a_N = 9,8 \text{ G}$, $a_H = 4,4 \text{ G}$, $g = 2,0068$ et confirme la présence d'oxyde nitrique dans le PAM (Eau)-150s.

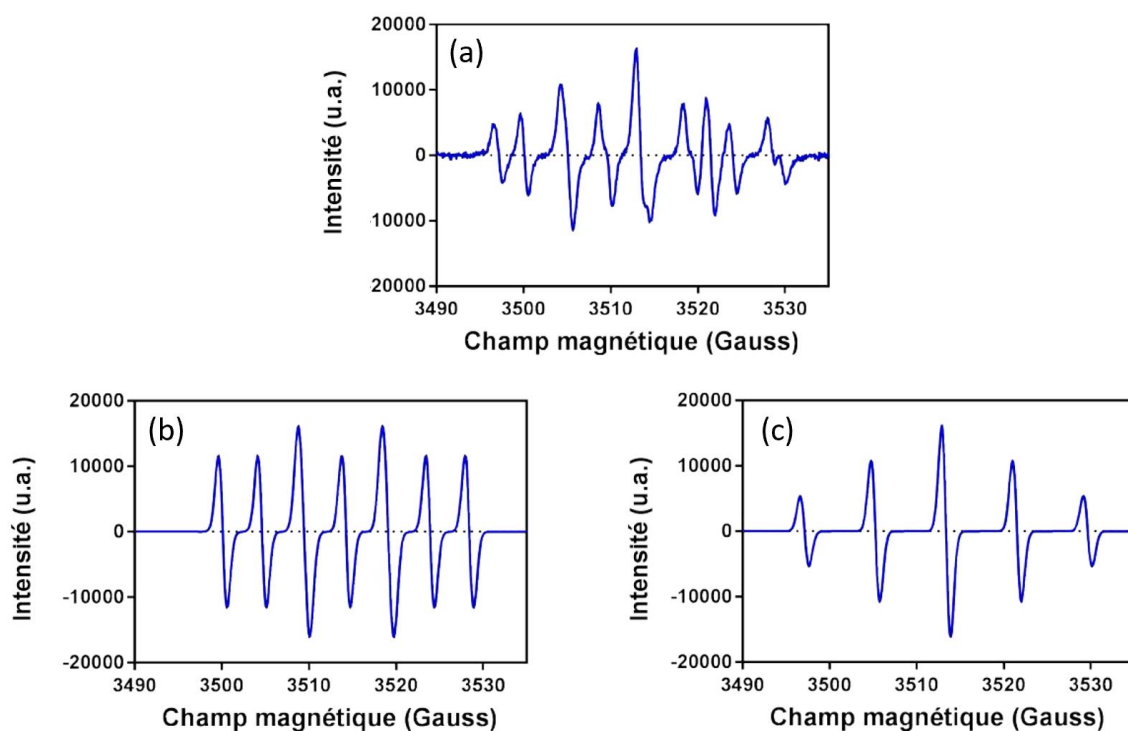


Figure 7-8 Spectre RPE du C-PTIO dans l'eau avec et sans traitement plasma. (a) Spectre expérimental d'une solution d'eau Milli-Q contenant le piègeur CPTIO après 60s de traitement par jet plasma DBD hélium. (b) Simulation RPE du signal C-PTIO. (c) Signal RPE du C-PTI résultant de l'interaction entre le C-PTIO et l'oxyde nitrique.

La détection de l'oxyde nitrique via le spectre CPTI a été réalisée pour l'eau et le DMEM \pm SVF et est illustrée Figure 7-9. Dans l'eau, le signal de C-PTI augmente de façon linéaire ($R^2_{\text{eau}} = 0,98$) avec le temps d'exposition alors qu'il reste faible voire négligeable dans les milieux biologiques. De plus, le taux de $\bullet\text{NO}$ ne peut être estimé précisément du fait que le C-

PTIO peut former le C-PTI par réaction avec le $\bullet\text{NO}$ mais peut également former le radical hydrogène¹⁸².

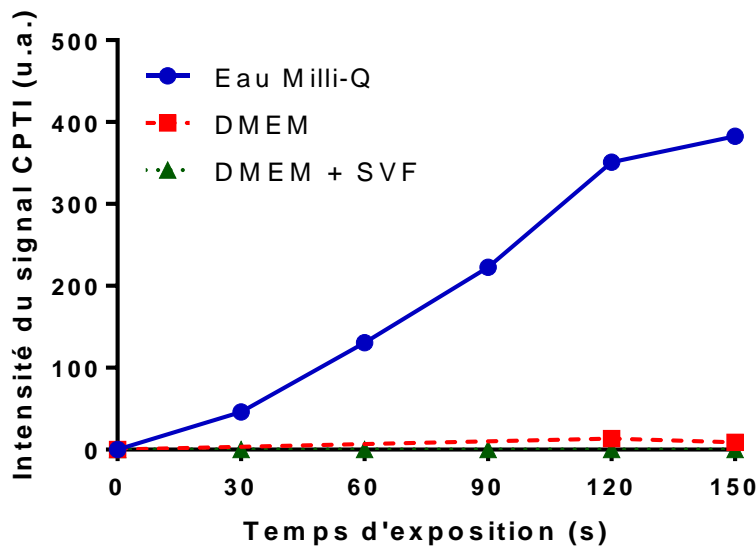
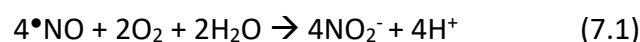


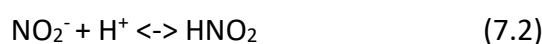
Figure 7-9 Variation de l'intensité du signal CPTI dans l'eau Milli-Q et le DMEM \pm SVF en fonction du temps d'exposition au plasma.

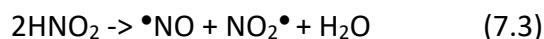
Le $\bullet\text{NO}$ augmente dans les liquides après la solvatation du $\bullet\text{NO}$ gazeux produit dans le jet plasma. Également, la production de $\bullet\text{NO}$ dans les liquides a déjà été observée dans l'eau Milli-Q après exposition au jet d'hélium¹⁸³ et d'argon¹⁶² mais aussi dans du PBS (Phosphate Buffered Solution) traité au plasma d'air^{184,185}.

Dans les solutions aqueuses, le $\bullet\text{NO}$ est une espèce très réactive qui peut réagir avec l'oxygène pour produire du nitrite NO_2^- (Réaction 7.1)¹⁸⁶, entraînant une chute de pH de la solution. En effet, comme l'a montré précédemment la Figure 7-1, une chute de pH importante de 6 à 4,5 se produit dans l'eau après exposition au plasma. Pour les milieux tamponnés biologiques, le pH n'est pas modifié.



Ce résultat suggère la formation de composés réactifs azotés tels que l'acide nitreux (HNO_2), l'acide nitrique (HNO_3) et l'acide peroxyneux (HO_2NO). L'acide nitreux, qui est en équilibre acide avec le nitrite, peut se décomposer dans un milieu acide en oxyde nitrique et en dioxyde d'azote (réactions 7.2 et 7.3)¹⁸⁵.





Dans l'eau, l'oxyde nitrique peut donc être régénéré grâce à la réaction 7.3. En revanche, dans les milieux de culture (DMEM ± SVF) le taux de radical NO est très faible. Ceci est dû à la présence d'un buffer de phosphate à pH 7,4¹⁸⁷ qui implique que le pH des milieux de culture ne va que très peu être modifié après exposition au plasma. Dans ces conditions, le nitrite sera plus stable et les réactions 7.2 et 7.3 n'auront pas lieu ou seront limitées. C'est pourquoi le taux de $\bullet\text{NO}$ dans les milieux de culture est très faible comparé à celui dans l'eau.

Une autre raison possible pour expliquer ce taux faible de $\bullet\text{NO}$ dans les milieux de culture serait la forte réactivité de ce radical avec les bio-macromolécules¹⁸⁸. En effet, les radicaux NO et les espèces apparentées sont capables de modifier les protéines du milieu à travers des réactions chimiques et ce, sans la présence d'enzymes. Les groupements NO peuvent se lier à un métal de transition d'une protéine ou d'un résidu thiol d'un acide aminé, comme la cystéine par exemple¹⁸⁹ ou la tyrosine, cible principale des RONS¹⁹⁰. L'oxyde nitrique peut également fournir de l'azote pour la formation de NO_2 . Ainsi, la présence d'acides aminés dans les milieux de culture peut aussi expliquer le faible taux de $\bullet\text{NO}$ détecté dans le DMEM ± SVF.

7.8 Anions nitrite NO_2^- et nitrate NO_3^-

Les anions nitrites et nitrates ont été étudiés par colorimétrie dans les trois milieux (Eau, DMEM ± SVF) grâce à l'utilisation d'un kit nitrite/nitrate basé sur les réactifs de Griess et détaillée dans le chapitre 4. La Figure 7-10 (a) donne la concentration de nitrite dans les trois milieux étudiés. La concentration de nitrite dans l'eau et dans les milieux biologiques augmente linéairement ($R^2_{\text{eau}}=0,92$, $R^2_{\text{DMEM}}=0,97$, $R^2_{\text{DMEM+SVF}}=0,97$) avec le temps d'exposition bien qu'à des vitesses différentes. La concentration des nitrites après 150s d'exposition dans le DMEM+SVF est $2,87 \pm 0,47$ et $18,77 \pm 2,26$ fois supérieure à celle dans le DMEM et l'eau respectivement.

Il est en revanche plus difficile de quantifier l'anion nitrate. Dans la Figure 7-10 (b) est présentée l'évolution du nitrate uniquement pour l'eau et le DMEM sans sérum. Jusqu'à 60s d'exposition au jet de plasma, la concentration de nitrate est trop faible (voire nulle) pour être détectée avec le kit utilisé, la limite de détection de l'anion nitrite étant 10 μM . Au-delà de 60s, la concentration en nitrate augmente avec le temps d'exposition. Comme observé avec

le nitrite, la concentration en nitrate après 150s d'exposition est supérieure dans le DMEM par rapport à l'eau. Pour le DMEM+SVF, des incertitudes non négligeables ont été observées probablement dues aux interactions entre les espèces du milieu de culture et le réactif de Griess, ce qui nous a empêché de quantifier l'anion nitrate dans ce milieu.

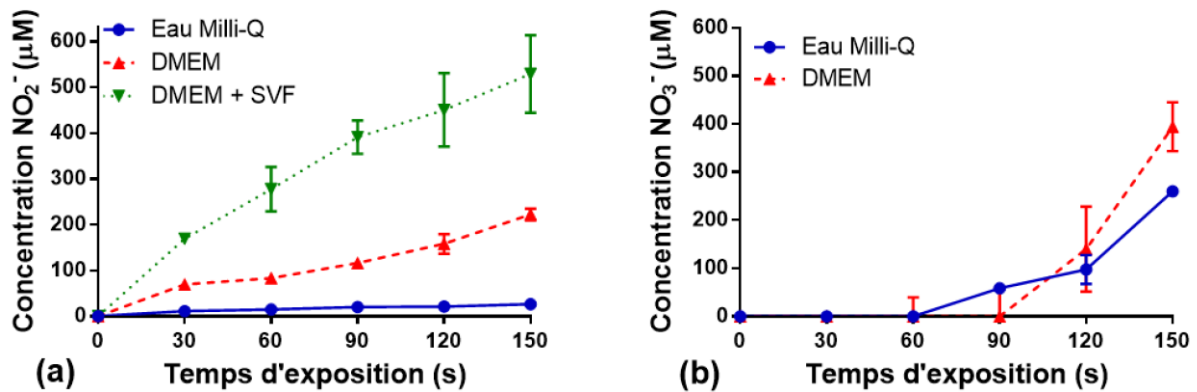


Figure 7-10 Variation de la concentration des ions (a) nitrite et (b) nitrate dans de l'eau Milli-Q et du DMEM ± SVF en fonction du temps d'exposition au plasma.

La concentration des anions nitrite et nitrate dépend de la composition des milieux. Ces deux espèces sont formées dans le milieu par dissolution de l'oxyde nitrique produit dans le jet plasma. Leur formation et leur stabilité dépendent de plusieurs paramètres dont le pH, la présence d'acides aminés, de métalloprotéines et de la production de RONS par le jet plasma. Comme nous l'avons montré précédemment, dans l'eau, le pH décroît avec l'exposition au plasma. Dans ces conditions, l'acide nitreux (qui est une des principales sources de nitrite), n'est pas stable. Il va se décomposer rapidement en dioxyde d'azote, qui va lui-même réagir avec les radicaux hydroxyles produits par le jet. Cette réaction va entraîner la formation d'acide peroxy-nitreux (HO₂NO) qui, n'étant pas stable en milieu acide, va se transformer en nitrate. Lukes *et al.*¹⁸⁶ ont démontré qu'en milieu acide, le nitrite va réagir avec le peroxyde d'hydrogène pour générer du peroxy-nitrite (ONOO⁻, isomère structural instable du nitrate) et par conséquent du nitrate. Girard *et al.*¹⁸⁷ ont également clairement identifié la formation de l'anion peroxy-nitrite à pH physiologique après exposition au plasma. Cette cascade de réactions chimiques peut expliquer d'un côté le taux élevé de •NO dans l'eau et de l'autre la concentration faible de NO₂⁻ dans l'eau comparé aux milieux. A l'opposé, ces réactions seront moins efficaces dans les milieux tamponnés au pH autour de 7, d'où une concentration en nitrite dans les milieux biologiques qui sera plus élevée que dans l'eau. De

plus, les anions nitrite/nitrate peuvent être la cible de ROS tels que le radical hydroxyle¹⁹¹ entraînant la formation de peroxynitrite. Cependant, la production de peroxynitrite de cette manière dans les milieux biologiques reste mineure puisque dans les milieux complexes comme le DMEM ± SVF cette réaction entre en compétition avec l'oxydation des biomolécules par les ROS. Aussi, la concentration plus élevée de nitrite dans le DMEM+SVF comparé au DMEM peut être expliquée par la présence de protéines de fer dans le sérum comme le cytochrome c qui contribue à l'oxydation d'oxyde nitrique en nitrite^{192,193}.

La source majeure d'anions dans l'eau et DMEM est la formation de nitrite et peroxynitrite. Pourtant les anions et notamment le nitrite sont des espèces qui réagissent peu avec les bio-macromolécules et ce sont surtout ONOO^- , NO_2^\bullet et N_2O_3 qui induisent des dommages aux protéines et à l'ADN. En effet, la nitration et nitrosylation d'acides aminés résiduels et acides nucléiques sont en partie responsables des effets cytotoxiques du jet plasma. Dans le DMEM±SVF, ces espèces réactives de l'azote réagissent avec les biomolécules entraînant une chute de la conversion de peroxynitrite en nitrate. En prenant en compte tous ces facteurs qui influencent la génération de ROS en solution, le taux de nitrate doit être supérieur dans l'eau que dans le DMEM que dans le DMEM avec SVF, ce qui confirme nos observations.

D'autre part, les ions nitrites et nitrates peuvent être recyclés en NO dans les cellules¹⁹⁴. Ainsi, ces ions inorganiques produits dans le PAM sont de potentielles sources de radicaux NO. De plus, en fonction de leur concentration, les RNS sont connus pour avoir des effets soit délétères, soit bénéfiques sur la dynamique cellulaire¹⁹⁵. Ces espèces produites par le jet de plasma et leur concentration semblent induire la mort des cellules cancéreuses et offre notamment une sélectivité intéressante en regard des cellules saines comme observé par Judée *et al*⁹³.

7.9 Traitement plasma des acides aminés en milieu aqueux

La dégradation du milieu de culture cellulaire par le plasma peut induire une cytotoxicité. L'oxydation de quatre acides aminés parmi les plus sensibles aux attaques radicalaires (tyrosine, arginine, tryptophane et méthionine) a été évaluée afin de déterminer dans quelle mesure le plasma dégrade le milieu de culture. Afin de mieux percevoir les effets du plasma sur les acides aminés, ces derniers ont été individuellement dissous dans de l'eau Milli-Q (0,20mM) avant exposition au jet de plasma. Les produits oxydés ont été analysés par

chromatographie en phase liquide à haute performance avec un spectromètre de masse haute résolution.

En plus de distinguer une décroissance des pics correspondant à la dégradation des acides aminés, l'apparition de pics correspondant à l'hydroxylation et nitration de la tyrosine (Figure 7-11), du tryptophane (Figure 7-12), à la sulfoxydation de la méthionine (Figure 7-13) et l'hydroxylation de l'arginine (Figure 7-14) a été observée. Les structures moléculaires des produits majeurs de dégradation sont également présentées pour ces quatre acides aminés.

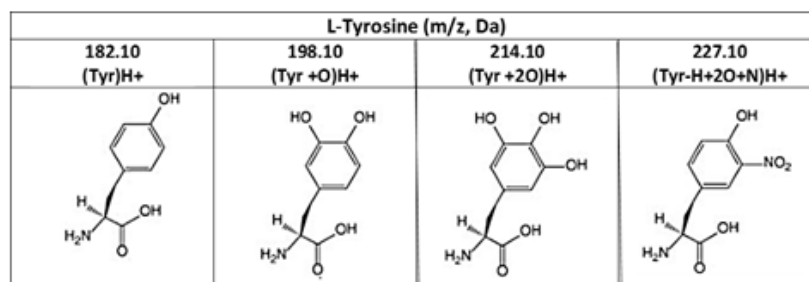
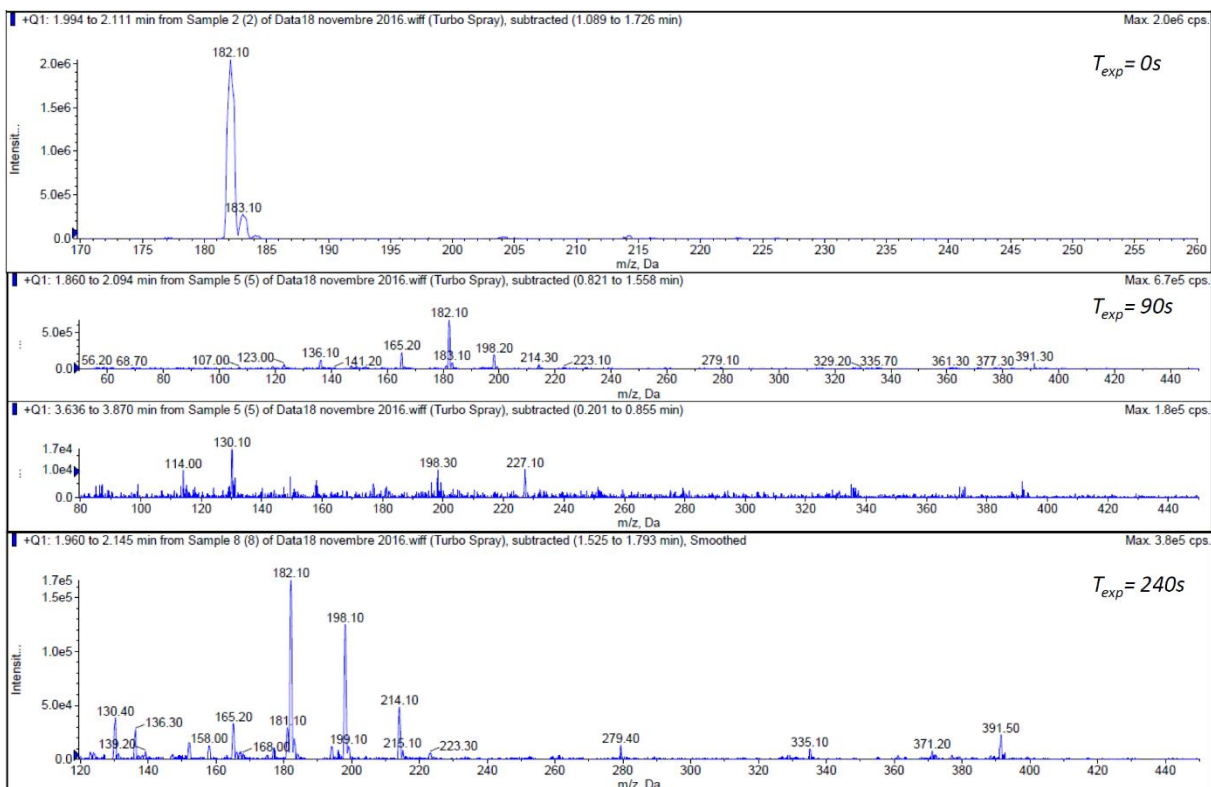
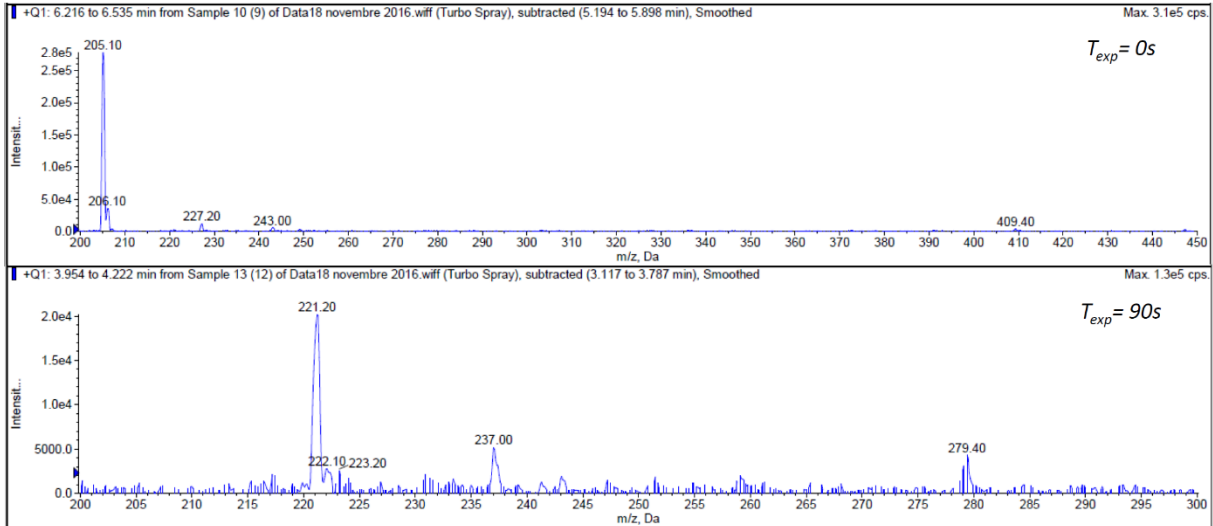
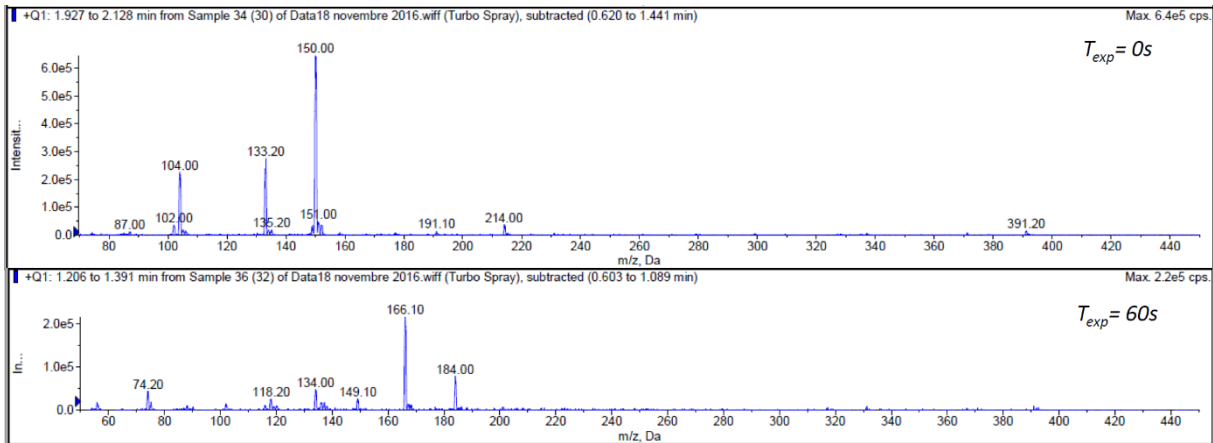


Figure 7-11 Spectre de masse de la tyrosine traitée au plasma pendant 0s, 90s, 240s. Les structures moléculaires des produits majeurs de dégradation sont proposées.



L-Tryptophan (m/z, Da)		
205.10 (Trp)H+	221.10 (Trp+O)H+	237.10 (Trp+2O)H+

Figure 7-12 Spectre de masse du tryptophane traité au plasma pendant 0s, 90s. Les structures moléculaires des produits majeurs de dégradation sont proposées.



L-Méthionine (m/z, Da)		
150.00 (Met)H+	166.10 (Met+O)H+	184.00 (Met-2H+3O-C)H+

Figure 7-13 Spectre de masse de la méthionine traitée au plasma pendant 0s, 60s. Les structures moléculaires des produits majeurs de dégradation sont proposées.

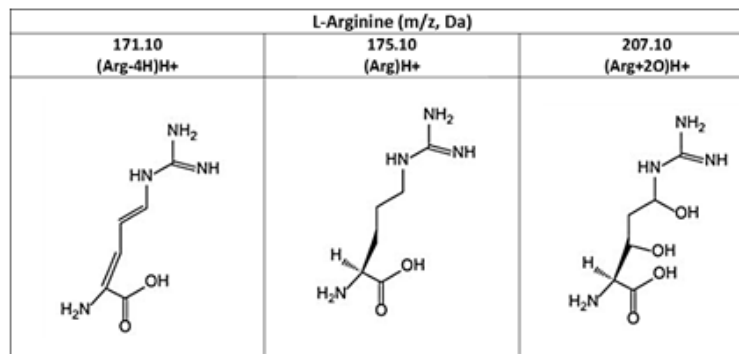
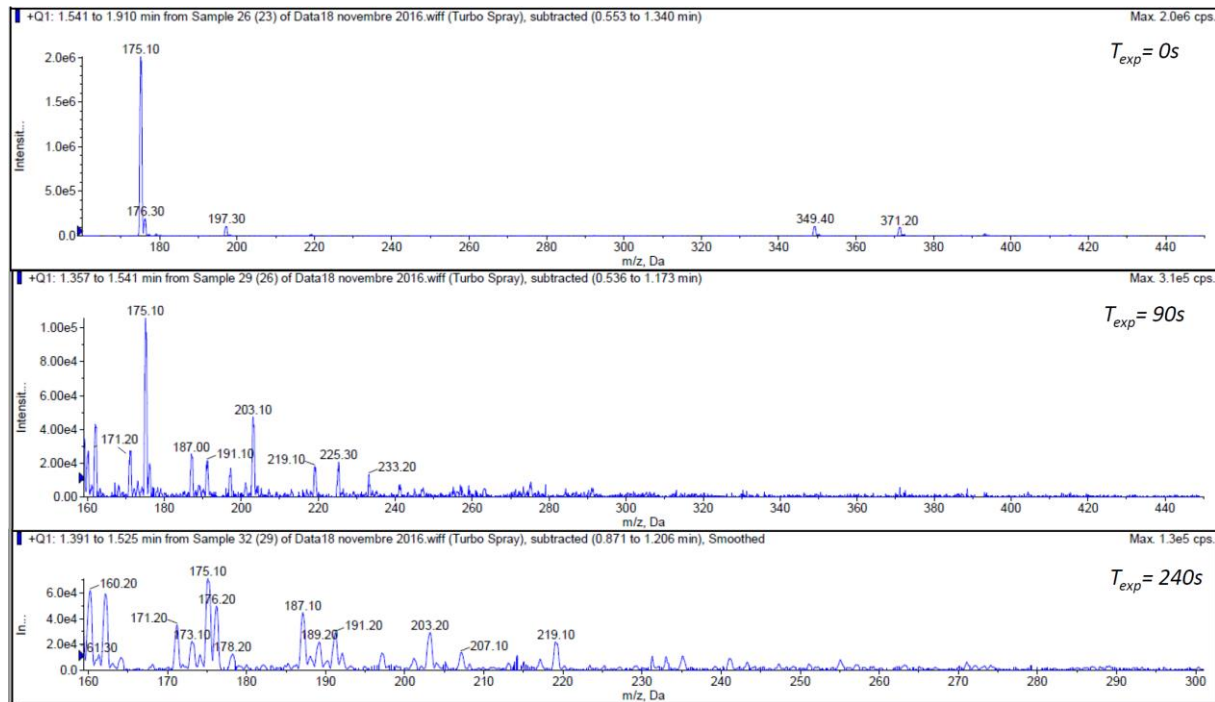


Figure 7-14 Spectre de masse de l'arginine traitée au plasma pendant 0s, 90s, 240s. Les structures moléculaires des produits majeurs de dégradation sont proposées.

Ces résultats ont permis de noter la dégradation des acides aminés en fonction du temps d'exposition au jet plasma (Figure 7-15). La méthionine est l'acide aminé dégradé le plus rapidement (100% dès 30s d'exposition), suivi du tryptophane (49% à 30s), de l'arginine (30% à 30s) et de la tyrosine (0% à 30s d'exposition). Ces résultats expliquent notamment la différence des réactivités observées après exposition plasma entre l'eau et les milieux de culture puisque la présence et la dégradation des espèces présentes dans les milieux de culture vont impacter la réactivité des radicaux générés.

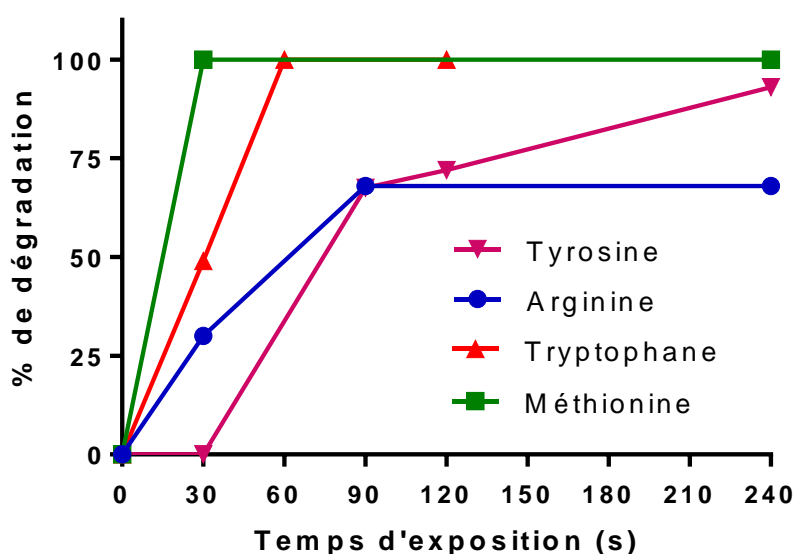


Figure 7-15 Pourcentage de dégradation des acides aminés en solution aqueuse (0,2mM) après différents temps d'exposition au plasma.

Toutes ces données sont en accord avec la littérature sur la réactivité du radical hydroxyle et des RNS avec les acides aminés et protéines¹⁷⁰.

7.10 Conclusion

Dans ce chapitre, nous avons caractérisé et quantifié la formation d'espèces radicalaires comme le radical hydroxyle, l'anion superoxyde, l'oxygène singulet, l'oxyde nitrique, mais également la formation d'espèces plus stables telles que le peroxyde d'hydrogène et les anions nitrites/nitrates. Ces espèces ont été quantifiées dans trois milieux différents que sont l'eau et le DMEM \pm SVF, après avoir été générées par exposition de ces milieux au jet de plasma d'hélium. Nous avons démontré que la composition du milieu joue un rôle important que ce soit sur le pH de la solution pendant l'exposition au jet de plasma, sur la stabilité des différents RONS produits ou sur leur réactivité avec les macromolécules. Cette réactivité des RONS avec le DMEM \pm SVF génère des produits oxydés qui peuvent être toxiques pour les cellules. Nos études indiquent qu'outre la production de RONS, les composés biologiques oxydés formés s'accumulent dans le PAM, entraînant une chute des nutriments essentiels pour la croissance cellulaire.

Ces résultats suggèrent également que la cytotoxicité du radical OH produit par le jet plasma peut être majoritairement due à la production d'espèces chimiques toxiques dans le

DMEM \pm SVF plus qu'à un effet direct sur les constituants cellulaires. Par ailleurs, le peroxyde d'hydrogène et les nitrites/nitrates peuvent pénétrer dans les cellules et devenir des précurseurs de ROS intracellulaires. En effet, ces espèces peuvent chacune induire la formation du radical OH via une réaction de Fenton impliquant la synthèse du peroxyde d'hydrogène et d'oxyde nitrique à travers le recyclage des anions nitrites/nitrates par les cellules¹⁸³. Le radical OH et l'oxyde nitrique sont hautement cytotoxiques et génotoxiques pour les cellules. Par conséquent, avec ces conditions d'exposition plasma, le PAM obtenu va générer de nombreux dérivés potentiellement cytotoxiques et génotoxiques qui possèdent des applications intéressantes, notamment dans la désactivation des cellules cancéreuses.

Partie IV

Résultats expérimentaux

Effets biologiques du PAM sur les cancers :

- côlon (HCT-116)
- tête et du cou (FaDu)

Chapitre 8 - Analyse *in vitro* et *in vivo* de l'activité cytotoxique et génotoxique du PAM sur les cellules de la lignée de cancer colorectal (HCT-116)

En 2012, 1,4 millions de nouveaux cas et 700 000 décès ont été enregistrés pour le cancer du côlon, le plaçant en troisième position des cancers les plus diagnostiqués dans le monde¹⁹⁶. De nos jours, les traitements les plus efficaces contre ce type de cancer sont la chirurgie, associée avec la chimiothérapie et/ou la radiothérapie. Cependant, les effets secondaires et la résistance aux traitements peut induire un manque d'efficacité. Pour contrer ces effets, de nouvelles méthodes de traitement émergent et notamment des modalités thérapeutiques mettant en jeu des espèces réactives de l'oxygène et d'azote (RONS). Dans les conditions normales, un certain niveau de RONS contrôlé par les anti-oxydants est essentiel pour maintenir le fonctionnement des cellules. De nombreuses études ont démontré qu'à partir d'un certain seuil, un taux de ROS élevé favorisait la mort cellulaire des cellules cancéreuse sur les cellules saines^{93,197}. Le chapitre précédent a fait l'état des lieux des ROS produits par le jet plasma dans la fabrication du PAM. Ce chapitre vise à comprendre les mécanismes cellulaires mis en place par les sphéroïdes du côlon HCT-116 en réponse à la mise en contact avec le PAM afin d'en optimiser le traitement en vue d'une étude *in vivo*.

8.1 Le PAM comme traitement anti-tumoral : mécanismes *in vitro* et preuve de concept *in vivo*

Comme nous l'avons vu dans le chapitre précédent avec le Tableau 7-1, l'osmolarité varie avec l'exposition au jet plasma ou à l'hélium seul. Puisque l'osmolarité peut modifier le comportement cellulaire¹⁹⁸, un contrôle d'osmolarité (généralisé par exposition du milieu de culture 300s à l'hélium seul) a été ajouté pour chaque expérience de ce chapitre.

Le contrôle d'osmolarité permettra par la suite de mettre en évidence les effets du PAM via la génération des espèces réactives et non uniquement à cause d'une augmentation de l'osmolarité.

8.1.1 La croissance des sphéroïdes est ralentie avec l'augmentation du temps de contact avec le PAM

L'aspect macroscopique des sphéroïdes a été observé au microscope sur les premières 24h après exposition au milieu de culture (contrôle), à l'hélium seul (contrôle osmotique) ou au contact du PAM pendant 10 minutes, 4h ou 24h (Figure 8-1).

A l'échelle macroscopique, aucune modification n'est observée sur les premières 24h pour les sphéroïdes traités au PAM pendant 10min. Au contraire, lorsque les sphéroïdes sont en contact du PAM plus de 10min (à savoir 4h ou 24h), les abords se disruptent et les sphéroïdes présentent deux parties : un cœur homogène, entouré d'une couronne de cellules détachées. Pour les sphéroïdes en contact du PAM pendant 24h, les effets sont observés entre 4h-8h post traitement alors que ceux en contact 4h présentent des effets seulement à 24h. Ces effets sont donc dépendants du temps de contact.

Le suivi de la croissance du cœur des sphéroïdes pendant trois jours a permis d'estimer les effets du traitement PAM sur une microtumeur 3D (Figure 8-1). Pour les conditions induisant un détachement cellulaire (T_{contact} 4h et 24h) une première phase de détachement cellulaire est observée sur les premières 24h, suivi d'une reprise de croissance dépendante du temps de contact.

C'est ce temps de contact de 24h qui sera choisi pour les expériences suivantes du fait de son effet le plus drastique sur les sphéroïdes. De façon intéressante, le contrôle d'osmolarité avec 300s d'exposition à l'hélium seul n'induit pas d'effet sur les sphéroïdes pendant les premières 24h mais présente une croissance réduite après trois jours comparés aux contrôles, bien que cet effet soit nettement moindre qu'un traitement PAM. Ceci démontre que les modifications du sphéroïde par le PAM sont dues majoritairement aux espèces générées dans le milieu et non dues à l'augmentation de l'osmolarité.

Contrairement aux études en 2D³¹, un seul traitement PAM n'est pas suffisant pour induire une destruction complète des sphéroïdes. Pour mieux comprendre ce détachement cellulaire et optimiser le traitement pour obtenir une destruction complète du sphéroïde, une chronologie des mécanismes a été investiguée.

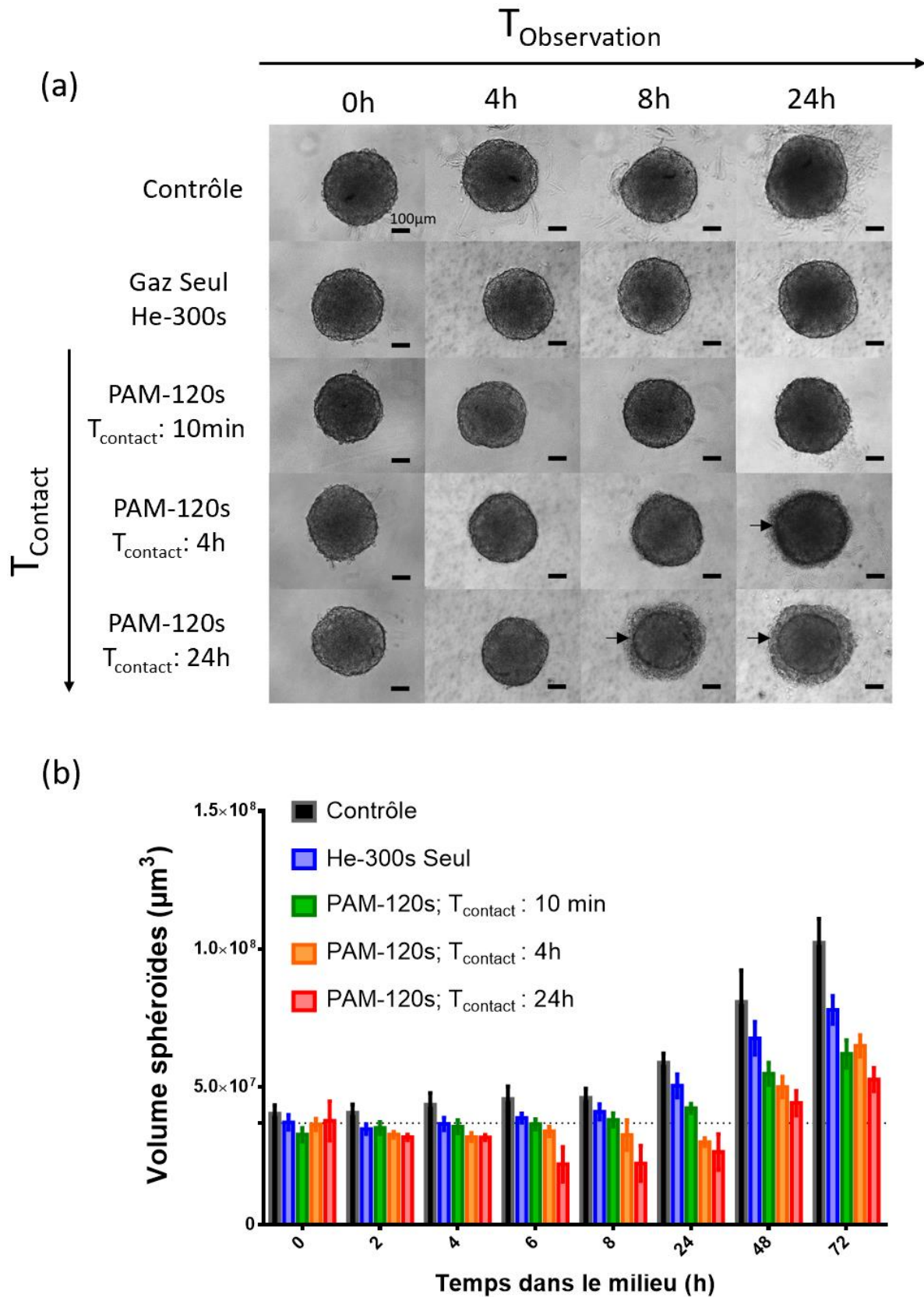


Figure 8-1 (a) Aspect macroscopique des sphéroïdes après traitement PAM-120s, observés au microscope optique. Echelle : 100 μm . Les flèches indiquent le détachement cellulaire. (b) Courbe de croissance sur 3 jours après traitement PAM-120s pour différents temps de contact.

8.1.2 Le PAM altère la viabilité cellulaire et la mitochondrie

L'ATP (Adénosine Triphosphate) est considérée comme bon indicateur de la viabilité cellulaire puisqu'elle fournit l'énergie aux cellules. C'est pourquoi la quantité d'ATP dans les sphéroïdes a été quantifiée par luminescence sur les 24h suivant un traitement PAM (Figure 8-2).

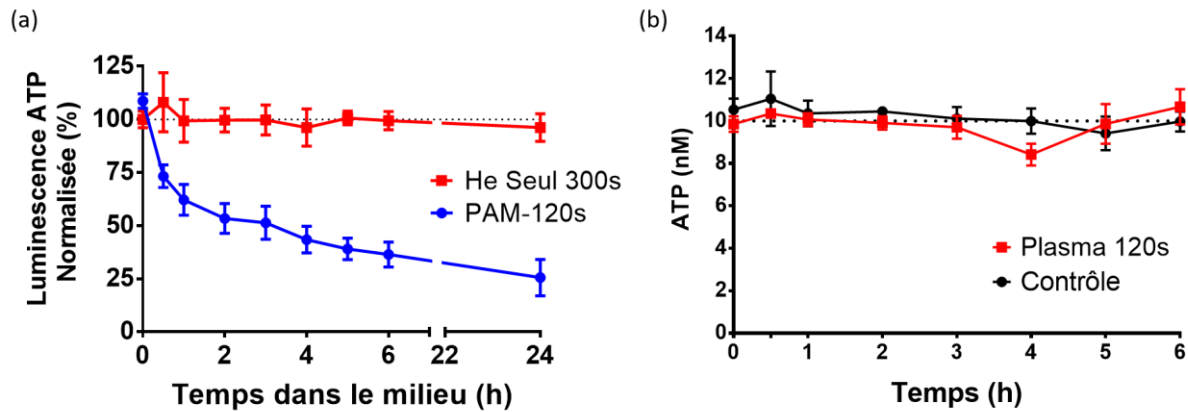


Figure 8-2 Le traitement PAM-120s induit une perte d'ATP. (a) Quantification intracellulaire de l'ATP mesurée sur 24h post traitement PAM. L'ATP est évaluée par rapport aux sphéroïdes contrôles. (b) Stabilité de l'ATP dans le PAM. Une solution de 10nM d'ATP a été exposée au jet plasma et sa concentration mesurée sur 6h.

Alors que le contrôle d'osmolarité n'a pas affecté la quantité d'ATP, le PAM induit une perte d'ATP très rapidement après traitement (Figure 8-2 A). Une première phase de décroissance rapide d'ATP apparaît les 3 premières heures avec une perte de 50% d'ATP, puis une phase plus lente sur les 21h suivantes, diminuant l'ATP à 25% après 24h post traitement.

Puisque le PAM est connu pour générer des RONS, la stabilité de l'ATP dans le PAM a été vérifiée dans le milieu en contexte acellulaire (Figure 8-2 B). Aucun effet n'est observé sur la concentration d'ATP après exposition au plasma et pendant les 6h suivantes. Ceci implique que la décroissance d'ATP observée sur les sphéroïdes est due à un effet cellulaire. Pour déterminer si la chute drastique de l'ATP intracellulaire est due à une fuite ou relargage de l'ATP, l'ATP a également été quantifiée dans le surnageant. Pas d'ATP n'a été détecté dans nos conditions expérimentales, signifiant une consommation interne des cellules et/ou un arrêt de la production par la mitochondrie (Figure 8-3).

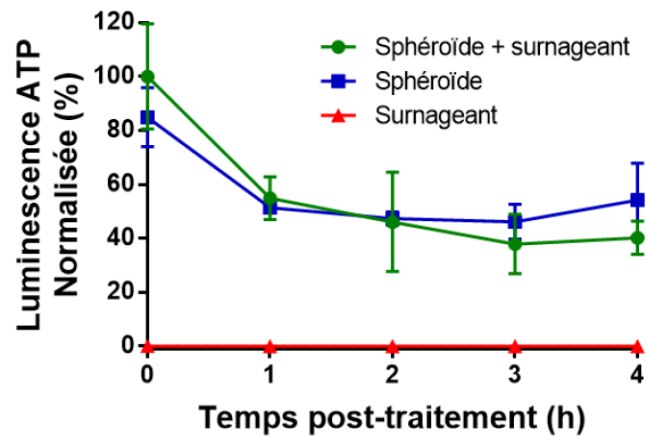


Figure 8-3 Comparaison de la quantité d'ATP dans les sphéroïdes et le surnageant pendant 4h post traitement PAM-120s. Les niveaux d'ATP sont évalués par rapport aux contrôles.

L'altération de la mitochondrie a été évaluée avec la sonde fluorescente MitoSOX. Le MitoSOX détecte de façon sélective le superoxyde dans la mitochondrie.

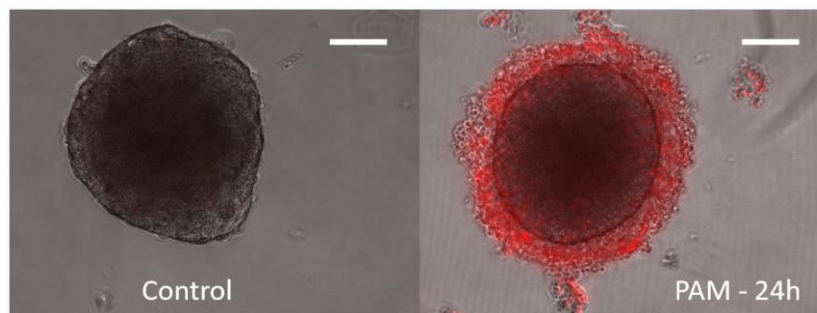


Figure 8-4 Le PAM-120s induit un dysfonctionnement de la mitochondrie grâce au superoxyde. A gauche un sphéroïde contrôle, à droite un sphéroïde traité pendant 24h au PAM. Echelle : 100µm

Les sphéroïdes ont été traités pendant 24h (Figure 8-4). Ce résultat montre que les couches externes ont une concentration à 24h importante de superoxyde dans la mitochondrie. Le superoxyde peut induire un stress oxydatif, des dommages cellulaires puis la mort cellulaire¹⁹⁹.

Judée *et al.*³⁰ ont montré que l'utilisation de SOD (superoxyde dismutase, qui catalyse la dismutation des anions superoxydes en dioxygène et peroxyde d'hydrogène) réduisait les dommages à l'ADN sur la couronne des sphéroïdes, démontrant les effets du superoxyde et l'implication de la mitochondrie dans la mort cellulaire.

8.1.3 Induction de la mort cellulaire par apoptose et nécrose suite à un traitement PAM

La perméabilité membranaire a été évaluée grâce à une sonde fluorescente non-perméable : le propidium iodide (PI). Quand la membrane plasmique est altérée, le PI pénètre dans les cellules et s'intercale dans l'ADN, devenant fluorescent. L'altération de la membrane plasmique est significative des cellules en mort cellulaire.

La figure Figure 8-5A montre que l'intégrité membranaire chute entre 4h-6h de contact avec le PAM. Une analyse de vidéo microscopie a permis de suivre la pénétration en direct (Figure 8-5 B). Ces résultats confirment que le dysfonctionnement de la membrane est un phénomène rapide qui apparaît dès 6h post traitement. Le contrôle d'osmolarité quant à lui n'impacte pas la perméabilité membranaire. La perte de l'intégrité membranaire est liée à la mort cellulaire que ce soit par nécrose ou par apoptose. L'apoptose a été investiguée via l'activation des caspases effectrices 3/7 (Figure 8-5 C). L'activation des caspases est caractéristique d'une mort cellulaire par apoptose. Les caspases initiatrices entraînent l'activation séquentielle des caspases effectrices (que sont les caspases 3 et 7). Le processus d'activation peut être initié par divers types de signaux intra- et extra-cellulaires. Deux voies principales d'activation sont actuellement identifiées : la voie extrinsèque des récepteurs à domaines de mort, et la voie intrinsèque mitochondriale.

Dans notre cas, l'apoptose par l'activation des caspases 3/7 se fait dès 6h post traitement PAM, mais n'apparaît pas pour les contrôles d'osmolarité. Il est à noter que la couronne de cellules détachées est fragile donc seules des observations in situ dans les plaques de culture sont réalisées par microscopie de fluorescence que ce soit pour la perméabilité membranaire ou les caspases. Ceci signifie que la fluorescence observée provient du sphéroïde entier (cœur et couronne). Pour pouvoir suivre l'évolution du cœur, les sphéroïdes ont été doucement pipetés 24h après traitement afin d'enlever la couronne. Le cœur des sphéroïdes a ensuite été observé avec le PI et les caspases (Figure 8-5 D). Les résultats montrent que le cœur des sphéroïdes reste intact et ne présente ni de perméabilisation cellulaire ni d'activation des caspases, mettant en évidence son caractère viable. Seules les cellules se détachant entrent donc en apoptose et nécrose après un traitement PAM. Ce détachement cellulaire correspond à la décroissance de la taille des sphéroïdes observée 24h après traitement PAM sur la courbe de croissance (Figure 8-1 B).

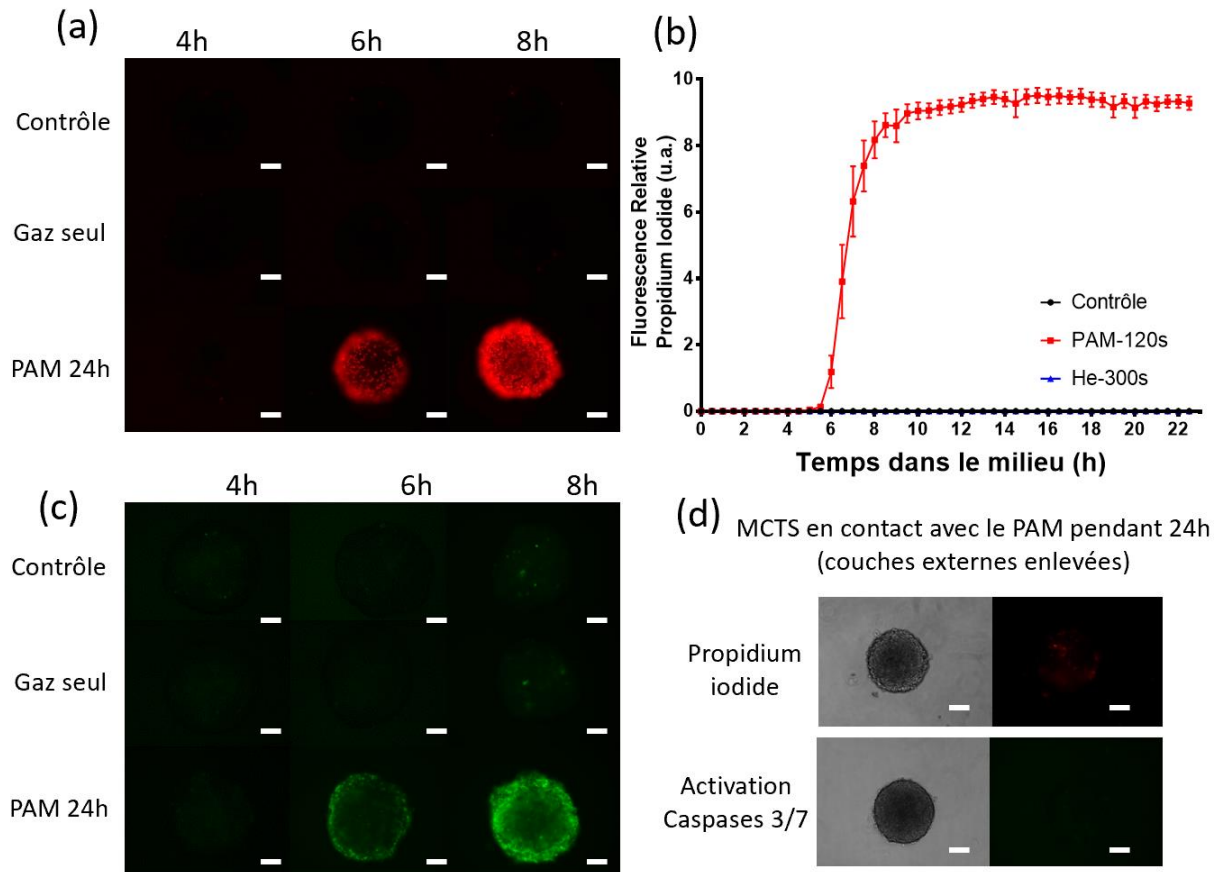


Figure 8-5 Le traitement PAM-120s induit la perméabilisation cellulaire et la mort par apoptose. (A) Intégrité de la membrane plasmique observée sur 8h post traitement. Echelle : 100 μ m. (B) Quantification de la fluorescence du PI sur 24h. (C) Activation des caspases 3/7 observée sur 8h post traitement. Echelle : 100 μ m. (D) Pénétration du PI et activation des caspases 24h post traitement sur le cœur du sphéroïde. La couronne de cellules détachées ayant été détachée par pipetage. Echelle : 100 μ m.

L'apoptose et la perte d'intégrité membranaire intervenant de manière simultanée suggèrent que les sphéroïdes meurent par nécrose et par apoptose. Cependant, la nécrose et apoptose sont limitées sur les cellules en contact avec le PAM, soit en surface des sphéroïdes.

Au lieu d'être une voie indépendante de l'apoptose, la nécrose a été observée en parallèle de l'apoptose⁸³. Ainsi, plusieurs types de mort cellulaire peuvent être observés dans une même cellule^{200,201}. Toutes ces raisons peuvent expliquer l'activation des caspases 3/7 et la perméabilité membranaire observée sur les MCTS traités au PAM.

Afin de pouvoir optimiser le traitement et d'affecter un plus grand nombre de cellules localisées dans les couches profondes du sphéroïde, des traitements successifs ont été réalisés.

8.1.4 Traitements successifs et effet cumulatif anti-cancéreux

Il a été montré précédemment que les sphéroïdes exposés au PAM présentait dans les 24h une couronne de cellules mortes et un cœur encore viable. L'hypothèse est donc que des traitements PAM successifs permettraient de toucher plus de couches externes jusqu'à la totale destruction des sphéroïdes.

Pour ce faire, des sphéroïdes ont été exposés au PAM une fois, deux fois et trois fois et leur croissance a été suivie pendant 9 jours. La Figure 8-6 montre le volume des sphéroïdes traités soit tous les jours (A) soit tous les deux jours (B), pour un nombre total de traitement de 1, 2 ou 3.

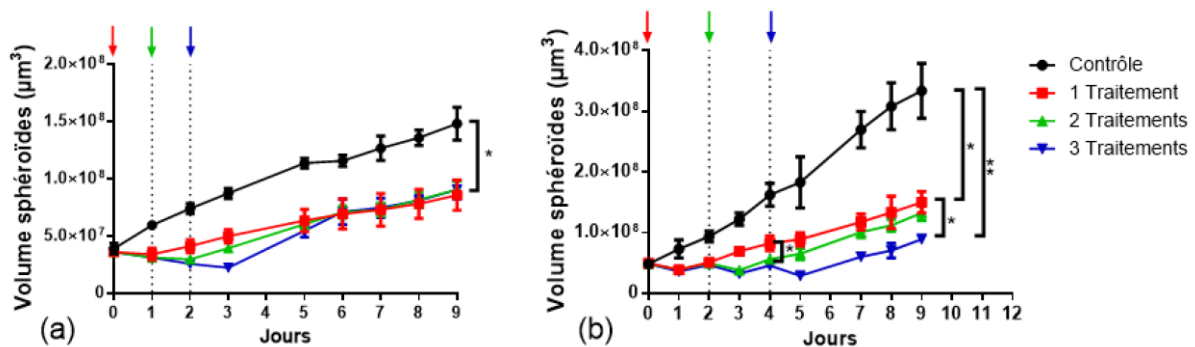


Figure 8-6 Traitement successif au PAM. (a) Traitements réalisés quotidiennement. (b) Traitement réalisés tous les deux jours. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$

Les traitements successifs effectués tous les jours (Figure 8-6A) montrent bien qu'une perte de volume se produit après chaque traitement. Au bout de 9 jours, tous les sphéroïdes, indépendamment du nombre de traitements, atteignent le même volume. Ceci démontre que le traitement successif des sphéroïdes n'est pas plus efficace qu'un traitement unique quand il est réalisé quotidiennement.

Lorsque les traitements se déroulent tous les deux jours (Figure 8-6B), une perte de volume le lendemain du traitement est observée, suivie d'une reprise de croissance. En revanche, de façon encourageante, chaque traitement réduit un peu plus le volume tumoral. Cette expérience montre un effet cumulatif des traitements successifs PAM avec notamment la possibilité de réduire la vitesse de croissance mais également de réduire le volume de la tumeur. Par ailleurs, nous avons démontré l'importance de laisser du temps aux cellules de

compléter les mécanismes de mort cellulaire induits avant de les soumettre à une nouvelle exposition au traitement PAM.

De ces résultats sont tirés le protocole pour l'étude *in vivo*, à savoir la réalisation de traitements successifs tous les deux jours.

8.1.5 Effets anticancéreux d'injections successives de PAM *in vivo* dans un modèle murin

Dans le but de confirmer les résultats prometteurs obtenus en culture *in vitro* 3D, une première étude a été menée sur 19 souris nude. Le protocole est représenté Figure 8-7. Précisément, les souris se sont vues injecter sous la peau du flanc, des cellules HCT-116 du cancer humain du colon. Après environ une semaine, les tumeurs ont atteint un volume de 100mm^3 , et ces dernières ont donc été réparties dans 3 groupes : le groupe contrôle, le groupe appelé DMEM (qui reçoit du milieu de culture non activé) et le groupe PAM (qui reçoit du milieu activé). Le groupe DMEM sert de contrôle pour mettre en évidence les effets d'injections multiples de liquide dans une tumeur. Le volume des injections est adapté au volume de la tumeur, c'est-à-dire qu'au départ de l'étude un volume de $50\mu\text{L}$ est injecté (sur les groupes DMEM et PAM), puis lorsque la tumeur atteint 250mm^3 , le volume injecté est augmenté à $100\mu\text{L}$ de milieu. Les tumeurs sont mesurées quotidiennement au pied à coulisse et les injections réalisées trois fois par semaine. L'étude se termine lorsque les tumeurs atteignent le volume de 1000mm^3 ou dès qu'une souris présente des signes de détresse.

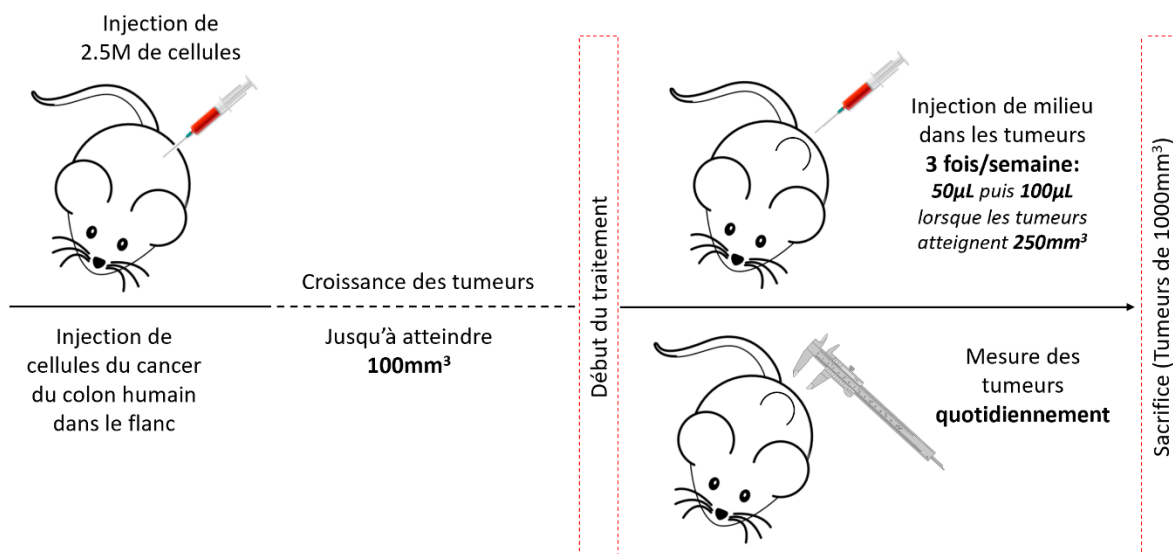


Figure 8-7 Protocole d'expérimentation *in vivo*. Les souris sont injectées avec 2,5 millions de cellules dans le flanc. Après une dizaine de jours, les tumeurs se forment jusqu'à atteindre 100mm^3 et l'étude peut commencer. Les tumeurs sont mesurées

quotidiennement. Les tumeurs sont mesurées quotidiennement et les traitements réalisés tous les deux jours. L'étude se termine dès que les tumeurs atteignent le volume de 1000mm³.

Les courbes de suivi des volumes des tumeurs contrôles, DMEM et PAM résultant des mesures au pied à coulisse sont présentées Figure 8-8. Les courbes de suivi de volume des trois conditions se suivent jusqu'au jour 17. Puis, une baisse de volume des tumeurs des conditions DMEM et PAM par rapport aux contrôles est observée entre les jours 18 et 21. Cependant, la vitesse de croissance des tumeurs DMEM et PAM augmente de façon plus importante à partir du jour 19, rattrapant le volume des tumeurs contrôles au jour 21. Ce résultat ne montre donc pas de différence entre les volumes tumoraux des trois conditions à la fin de l'étude.

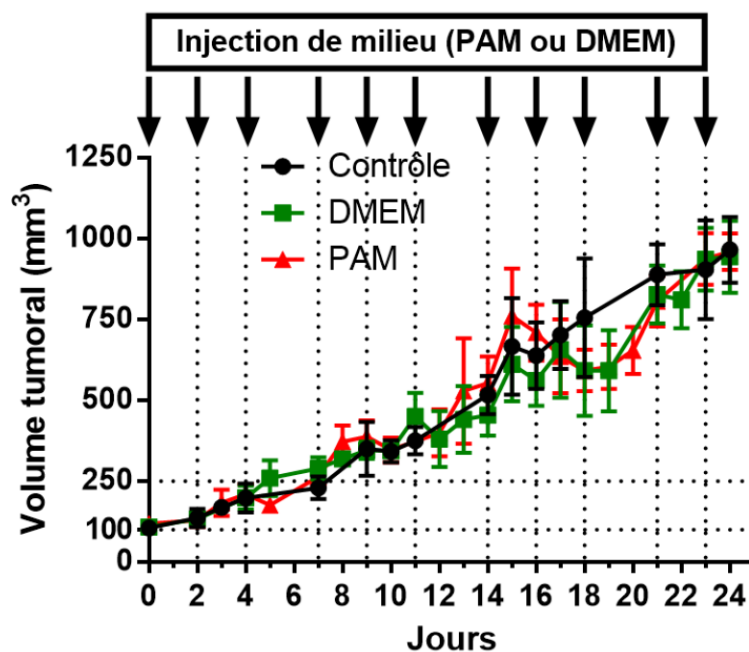


Figure 8-8 Etude in vivo. Volume tumoral en fonction des jours. Pas d'effet notable sur le volume déduit des mesures au pied à coulisse des tumeurs traitées au PAM par rapport aux contrôles.

Cependant, durant l'étude, nous avons remarqué que l'injection de milieu déforme les tumeurs et induit l'apparition de boules de pus. C'est pourquoi nous avons extrait les tumeurs des souris post-sacrifice au jour 24 de l'étude et nous les avons mesurées et pesées. Les résultats sont présentés Figure 8-9.

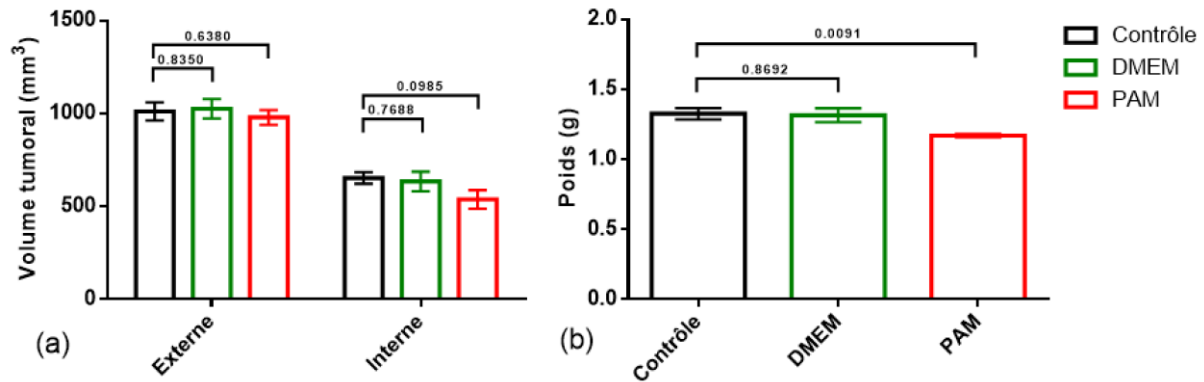


Figure 8-9 Etude *in vivo*. Les tumeurs sont extraites au 24^{ème} et dernier jour de l'étude post sacrificielle. Elles sont ensuite mesurées puis pesées. (a) Volume tumoral moyen externe (mesuré au pied à coulisse par-dessus la peau) et interne (après extraction de la tumeur). (b) Poids des tumeurs extraites. Résultat significatif lorsque $p < 0,05$.

La Figure 8-9 (a) compare les volumes des tumeurs avant extraction, c'est à dire mesurées au pied à coulisse (volume externe) avec le volume tumorale après extraction (volume interne). Il est possible de noter une différence significative entre les volumes externes (semblables entre les conditions) et internes puisque ces derniers sont de l'ordre de 40 à 50% plus petits. En effet, la présence de peau et de la peau a augmenté de façon significative les mesures de taille réalisée sur la peau au pied à coulisse. La mesure de ce volume interne a permis de mettre en évidence que le volume des tumeurs traité par le PAM est plus petit que ceux des tumeurs contrôles et DMEM (bien que la réalisation d'un test de student ne montre pas de différence significative avec $p > 0,05$). Les tumeurs ainsi extraites ont ensuite été pesées (Figure 8-9 (b)). Cette mesure de poids va dans le sens des mesures internes de volume puisque, de façon significative, le poids des tumeurs PAM est plus faible que ceux des tumeurs contrôles ou DMEM (ayant également subi les injections de milieu). En sectionnant les tumeurs, nous avons remarqué que les tumeurs contrôles et DMEM présentaient un aspect compact alors que les tumeurs PAM étaient composées de creux donnant un aspect plus spongieux.

Bien que les résultats de volume de tumeur n'aient pas été significatifs lors de cette étude, la mesure du poids des tumeurs et leur aspect semble prometteurs.

Nous avons donc réalisé une seconde étude *in vivo*. Pour cette étude, 9 souris nude ont été utilisées mais dans ce cas, les souris ont été injectées de cellules cancéreuses dans les deux flancs. Ce protocole est représenté Figure 8-10. Plus en détail, les souris se sont vues injecter sous la peau des deux flancs des cellules HCT-116 du cancer humain du colon. Après

environ une semaine, les tumeurs ont atteint un volume de 100mm^3 dans chaque flanc de chaque souris, et ces dernières ont donc été réparties dans 3 groupes : le groupe contrôle, le groupe DMEM et le groupe PAM. Les souris étant porteuses de deux tumeurs, elles ont porté deux conditions différentes. Afin de mieux évaluer l'impact des traitements, une souris ne porte pas deux tumeurs de la même condition pour limiter le caractère aléatoire induit par comportement propre de la souris (stress, acclimatation, etc.). Pour les injections de milieu, comme la première étude où l'injection de $100\mu\text{L}$ avait fait apparaître des boules de pus dans les tumeurs, une injection de $50\mu\text{L}$ a été effectuée sur les groupes DMEM et PAM (activé ou non en fonction du groupe) sur la totalité de la durée de l'étude. Également, de la même façon que lors de la première étude, les tumeurs sont mesurées quotidiennement au pied à coulisse et les injections réalisées trois fois par semaine. L'étude se termine lorsque les tumeurs atteignent le volume de 1000mm^3 ou dès qu'une souris présente des signes de détresse.

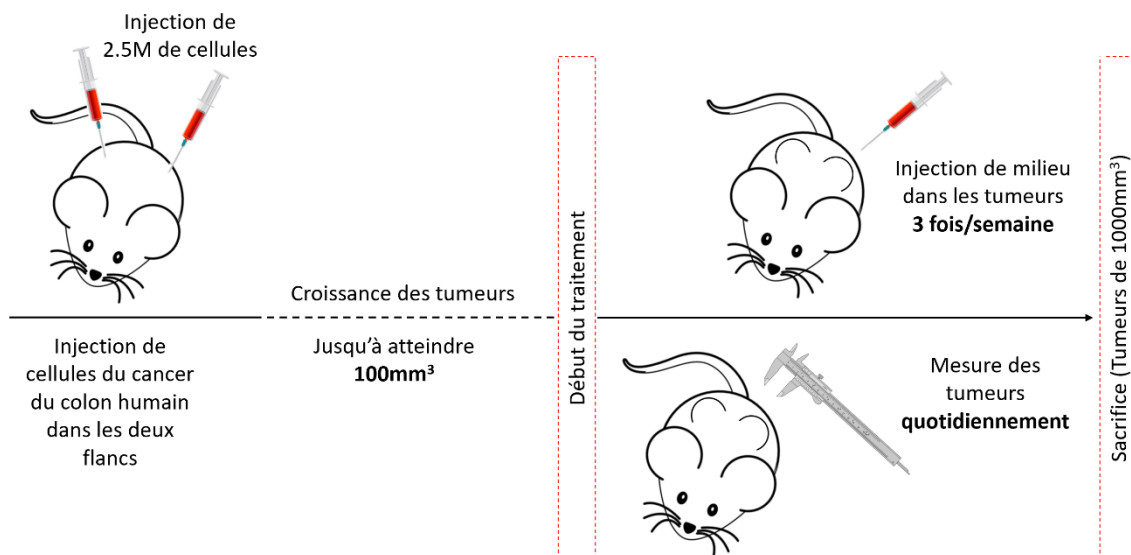


Figure 8-10 Protocole d'expérimentation in vivo. Les souris sont injectées avec 2,5 millions de cellules dans chaque flanc. Après une dizaine de jours, les tumeurs se forment jusqu'à atteindre 100mm^3 et l'étude peut commencer. Les tumeurs sont mesurées quotidiennement et les traitements réalisés tous les deux jours. L'étude se termine dès que les tumeurs atteignent le volume de 1000mm^3 .

Les résultats de cette étude sont présentés Figure 8-11. Nous observons que durant les 13 premiers jours de l'étude, les tumeurs quel que soit leur groupe ont un volume qui augmente linéairement. A partir du 14^{ème} jour, correspondant à 7 injections, les groupes contrôle et DMEM vont voir leur volume augmenter plus rapidement alors que le groupe PAM voit son volume poursuivre sa croissance à la même vitesse.

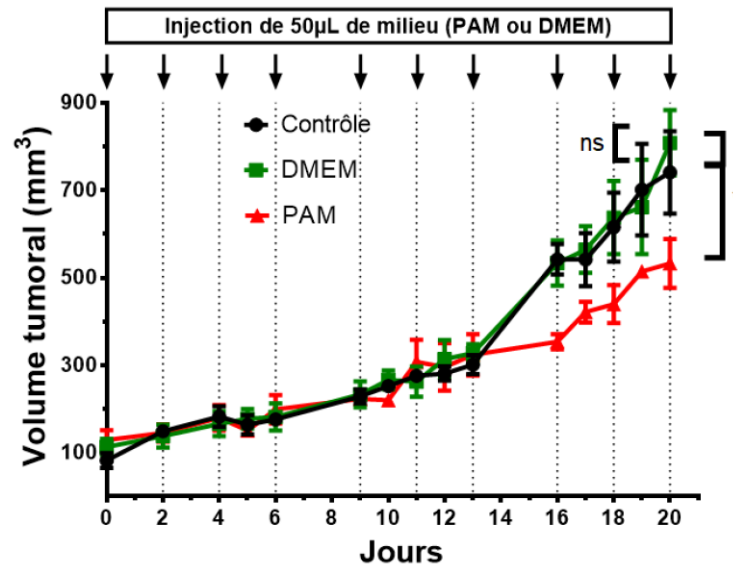


Figure 8-11 Etude *in vivo*. Les injections successives de PAM dans les tumeurs réduit significativement leur volume. * $p < 0,05$, ns : non significatif.

Une divergence de croissance tumorale des groupes PAM vs Contrôle/DMEM est donc observée. Un t-test a permis de démontrer la différence significative entre les groupes contrôle-PAM ($p=0,0449$) et DMEM-PAM ($p=0,0259$). Aucune différence significative n'est observée entre Contrôle-DMEM (ns) démontrant l'absence d'effet des multiples injections de milieu non activé. Ainsi au bout de 20 jours, les tumeurs traitées de manière indirecte par PAM présentent un volume inférieur de 242 mm^3 au volume des micro-tumeurs non traitées et de celles traitées par milieu nutritif non exposé au plasma. Ces résultats correspondent à une inhibition de croissance 20 jours après le début du traitement, ce qui confirme *in vivo* les effets prometteurs du PAM.

8.1.6 Conclusion

L'objectif de ce chapitre était de mieux comprendre les effets du PAM sur des sphéroïdes du cancer humain du côlon en décrivant *in vitro* la cinétique de l'induction et les mécanismes de la mort cellulaire afin d'en améliorer son potentiel thérapeutique *in vivo*. Les étapes principales sont résumées Figure 8-12.

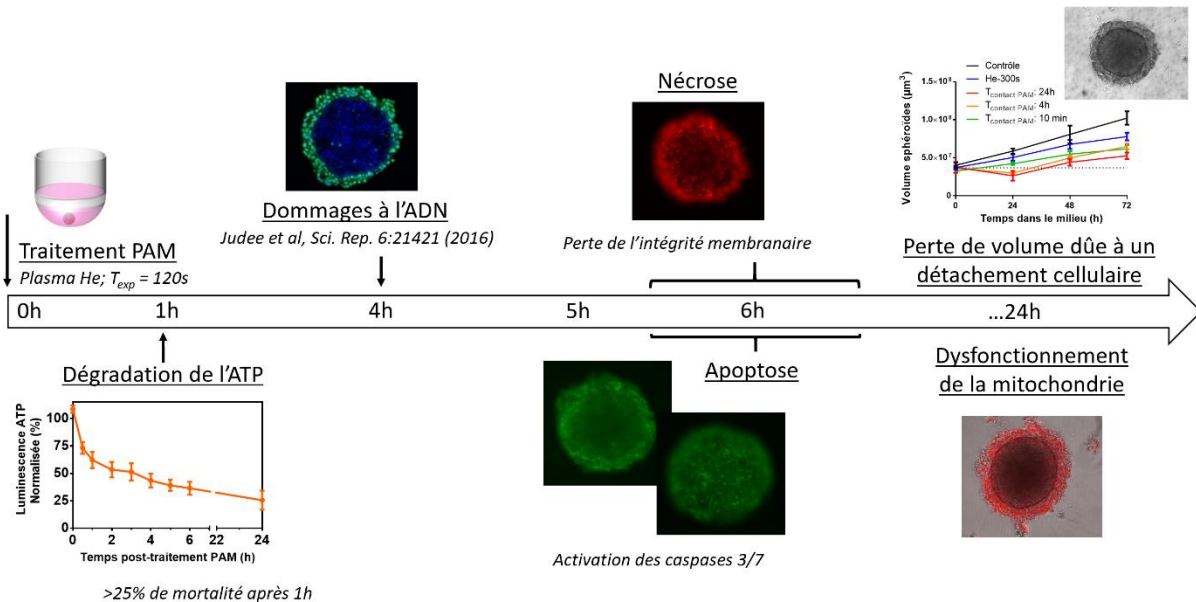


Figure 8-12 Cascade d'événements entraînant la mort cellulaire et le détachement cellulaire post traitement PAM. Les sphéroïdes restent en contact 24h avec le PAM-120s. Les dommages à l'ADN ont été observés par Judee et al.³⁰

Ce chapitre a montré que les effets du PAM n'étaient pas seulement dus à un changement d'osmolarité du milieu. En effet, nous avons démontré précédemment que le PAM présentait un effet génotoxique sur les cellules cancéreuses humaines avec notamment la génération d'espèces réactives telles que le peroxyde d'hydrogène et la génération de RONS^{30,93,104}. Le peroxyde d'hydrogène est une espèce bien connue pour son habilité à casser les doubles brins de l'ADN^{30,93}. Cependant, les études réalisées en traitant les sphéroïdes uniquement au peroxyde d'hydrogène ont montré qu'il ne pouvait pas induire un effet à long terme même en générant des dommages à l'ADN^{31,93}. Bien que l' H_2O_2 soit nécessaire aux propriétés anticancéreuses du PAM, d'autres espèces impliquées ont un rôle majeur dans la mort cellulaire cancéreuse. Effectivement, grâce à une sonde fluorescente mitochondriale sensible seulement au superoxyde et non aux autres ROS et RNS, nous avons prouvé que cette espèce réactive est soit produite dans le PAM, soit générée de façon intracellulaire suite à un stress lié au PAM. Le superoxyde est donc associé à la chute drastique du taux d'ATP

intracellulaire. Son rôle a d'ailleurs été mis en évidence dans une étude précédente qui a montré que l'ajout de superoxyde dismutase (SOD) dans le PAM réduisait les dommages à l'ADN subis par les couches externes des sphéroïdes³⁰.

Nous avons démontré que 6h après exposition au PAM, la nécrose (perte de l'intégrité membranaire) et l'apoptose (mort programmée des cellules) sont induites dans les couches externes des sphéroïdes de façon quasi simultanée. Comme le PAM déclenche les dommages cellulaires exclusivement sur l'extérieur des sphéroïdes sans affecter le cœur, nous avons mis en place des traitements successifs pour en augmenter l'efficacité anti-cancéreuse. Cependant, le temps entre les traitements s'est avéré être d'une importance capitale. En effet, alors que les traitements quotidiens n'ont montré aucun effet intéressant, traiter tous les deux jours a donné lieu à un ralentissement de croissance tumorale. Puisque l'induction de la mort cellulaire est un procédé en plusieurs étapes, il est important de laisser du temps aux cellules de passer par toutes ces étapes avant de réaliser un nouveau traitement.

Dans les études en monocouches, Utsumi *et al.*²⁹ ont présenté que le PAM avait un effet anti-tumoral sur les cellules du cancer des ovaires résistant à la chimiothérapie, en induisant l'activation des caspases effectrices dans les quatre premières heures après traitement. Dans les études 2D, le PAM n'a pas besoin de diffuser dans un volume, qu'est le sphéroïde, c'est -à -dire que toutes les cellules à plat sur une surface sont directement et de façon homogène exposées au PAM. Cette notion de volume explique la différence de cinétique entre leur étude et la nôtre et met en évidence l'importance des traitements successifs sur une cible en 3D. Ils ont également confirmé les effets du PAM *in vivo* sur un modèle murin. Bien que nous obtenions des résultats similaires, les protocoles diffèrent. En effet, Utsumi *et al.*²⁹ traitent les souris avant même l'apparition d'une tumeur et ce, en injectant 200µL de PAM contrairement à nous qui attendons que la tumeur atteigne un volume de 100mm³ avant de la traiter avec 50µL de PAM. Dans le but de mettre en évidence les effets d'une injection régulière de liquide, nous avons ajouté un groupe contrôle où seul du milieu non activé est injecté. Ensemble, tous ces résultats *in vitro* et *in vivo*, indiquent le rôle primordial d'une exposition successive au PAM pour favoriser un ralentissement de croissance tumorale. Ainsi, toutes les études PAM *in vivo* ont démontré des effets prometteurs^{29,202,203}.

Enfin, les perspectives pour nos études *in vivo* seraient de travailler avec des souris possédant un système immunitaire fonctionnel. Il a en effet été démontré que la mort cellulaire immunogène et les macrophages peuvent augmenter l'effet du PAM^{204,205}.

Chapitre 9 - Analyse *in vitro* de l'activité cytotoxique et génotoxique du PAM sur les cellules de la lignée de cancer tête/cou (FaDu)

Afin de pouvoir confirmer les propriétés anti-tumorales du PAM, nous avons choisi d'étudier la réponse d'un autre type cellulaire cancéreux : la lignée des FaDu issue d'un cancer tête/cou humain a été choisie.

Ce chapitre présente tout d'abord les résultats obtenus sur des cellules cultivées en 2D avant de passer aux résultats obtenus avec les cellules cultivées en modèle 3D sphéroïde. L'intérêt de ce dernier sera alors mis en évidence. Ensuite, comme le rôle du peroxyde d'hydrogène a été montré précédemment, une étude comparative entre traitements à l' H_2O_2 et au PAM a été investiguée. Enfin plusieurs traitements successifs ont été effectués afin d'accentuer les effets du PAM et d'élucider s'ils peuvent aboutir à une régression complète du modèle tumoral.

9.1 Effets biologiques du PAM sur des FaDu cultivées en monocouche, 24h après exposition

Afin de pouvoir comparer ensuite les résultats avec les sphéroïdes, les cultures cellulaires 2D ont été réalisées avec le même nombre de cellules que celui d'un sphéroïde de 400 μ m de diamètre ; nombre que nous avons évalué à 15000 cellules. Dans ces conditions, des plaques 96 puits à fond plat ont étéensemencées avec 15000 cellules par puits, 24h avant traitement PAM. Également, une culture 2D standard a été étudiée : dans ce cas 5000 cellules FaDu par puits ont été mises en culture jusqu'à atteindre une confluence de 75% (c'est à dire que le fond du puits est recouvert de cellule à 75%). A ce taux de confluence, le nombre de cellules a été estimé à 64000. L'utilisation de deux cultures 2D permet d'évaluer l'impact du nombre de cellules sur l'efficacité du traitement PAM.

La Figure 9-1 expose la viabilité des cellules FaDu 24h après exposition à des PAM générés avec différents temps d'exposition (de PAM-30s à PAM-240s) au plasma sur les deux cultures 2D (15000, équivalent au nombre de cellules dans un sphéroïde de 450 μ m de diamètre et 64000 cellules, recouvrant 75% de la surface du puits au moment du traitement).

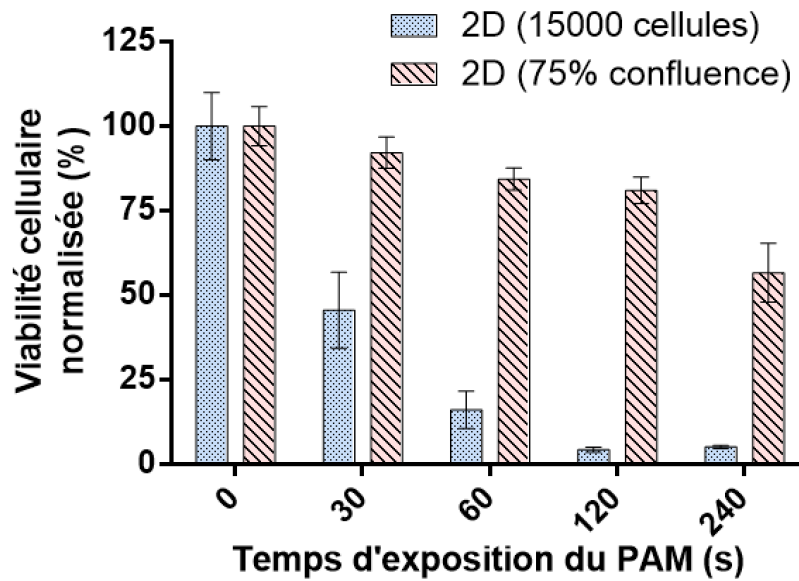


Figure 9-1 Viabilité des FaDu cultivées en 2D, à deux confluences différentes, 24h après traitement avec des PAM générés avec différents temps d'exposition au plasma.

La cytotoxicité du PAM augmente avec le temps d'exposition au plasma. La viabilité des 15 000 cellules FaDu diminue très rapidement dès le PAM-30s. Dans cette condition, moins de 50% des cellules sont encore viables alors que la viabilité des 64000 cellules (75% confluence) est peu, voire pas affectée par le PAM-30s. Cette différence de viabilité entre les deux cultures est plus visible pour un PAM-240s, où la quasi-totalité des 15000 cellules sont mortes alors les cellules à 75% de confluence présentent encore un taux de viabilité supérieur à 50%.

Ces résultats démontrent que la viabilité cellulaire dans les cultures 2D dépend non seulement du temps d'exposition utilisé pour générer le PAM mais aussi de la confluence cellulaire. En effet, il semble qu'une forte densité cellulaire protège les cellules FaDu des effets anticancéreux du PAM.

9.2 Étude en 3D, 24h après traitement

L'étude précédente a montré qu'une confluence importante protégeait les cellules contre les effets du PAM. Dans cette étude, l'utilisation du modèle 3D permet de mettre en regard une étude 2D et une étude 3D avec un nombre identique de cellule et mettre en évidence l'effet de l'organisation des cellules sur l'efficacité du traitement PAM. Leur volume

est mesuré 24h après traitement et les résultats qui sont ajoutés à la figure précédente sont présentés Figure 9-2.

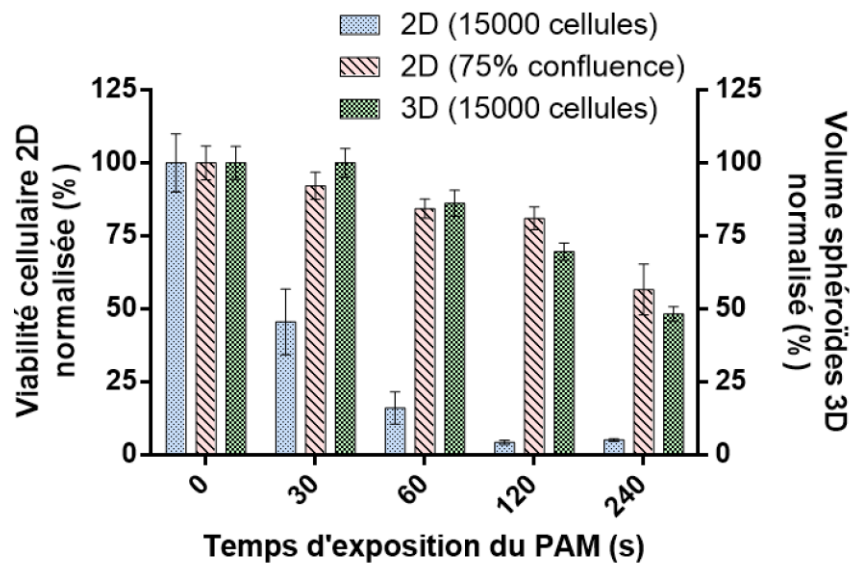


Figure 9-2 Viabilité des FaDu cultivées en 3D versus en 2D, à deux confluences différentes, 24h après traitement avec des PAM générés avec différents temps d'exposition au plasma.

Les cellules à 75% de confluence montrent une réponse proche de celle des sphéroïdes (3D). En effet, ces deux cas ont une viabilité d'environ 50% pour le PAM-240s contrairement aux 15000 cellules qui sont quasiment toutes mortes à cette condition.

9.3 Effet du PAM sur les sphéroïdes

Après 5 jours de croissance, les sphéroïdes ont été transférés dans 100µL de PAM dans lequel ils sont restés pendant 9 jours. L'efficacité du traitement au PAM a été évaluée par l'estimation du volume des sphéroïdes, mesurés quotidiennement.

L'évolution des volumes des sphéroïdes traités avec différents PAM est présenté Figure 9-3.

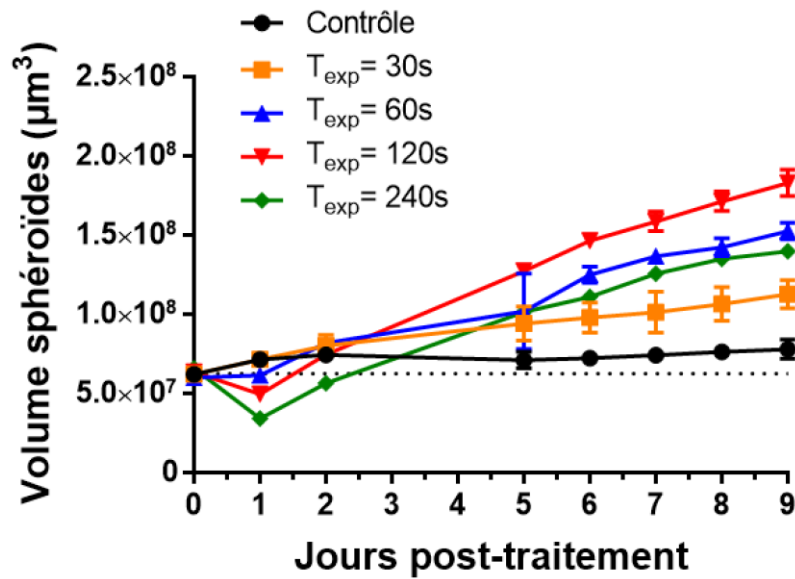


Figure 9-3 Effets de différents PAM sur la croissance relative des sphéroïdes FaDu.

Jusqu'aux premières 24h de traitement, ces résultats indiquent une perte de volume proportionnelle au temps d'exposition. Cette perte de volume est associée à un détachement cellulaire (Tableau 9-1).

Temps d'exposition (s)	Détachement Cellulaire (%)	P-value	
0	0 ± 5.64	0.9738	0.0064
30	0.11 ± 4.93		
60	13.73 ± 4.47	0.0008	<0.0001
120	30.33 ± 2.95		
240	51.67 ± 2.53		

Tableau 9-1 Pourcentage de détachement cellulaire à 24h en fonction des différents PAM. Le détachement cellulaire est calculé à partir des mesures du volume du cœur des sphéroïdes entre J0 et J1.

En revanche, cette perte de volume est rapidement suivie dès le 2^{ème} jour post-traitement d'une reprise de croissance fulgurante. De façon surprenante, la vitesse de croissance observée est bien supérieure à celle du contrôle. Au jour 9, les sphéroïdes traités ont un volume jusqu'à 2,4 fois supérieur à celui des contrôles pour le PAM-120s. Jusqu'à 120s d'exposition, plus le temps d'exposition augmente, plus la prolifération augmente. Le taux de prolifération augmente donc avec le temps d'exposition jusqu'à atteindre un plateau à PAM-120s avec une vitesse de $1,5 \times 10^7 \mu\text{m}^3/\text{jour}$ (Tableau 9-2).

Temps d'exposition (s)	Taux de prolifération post détachement cellulaire ($\times 10^7 \mu\text{m}^3/\text{Day}$)	P-value	
0	0.09 ± 0.03	<0.0001	
30	0.48 ± 0.04		<0.0001
60	1.19 ± 0.08	0.0008	
120	1.52 ± 0.07		0.6436
240	1.49 ± 0.08		

Tableau 9-2 Taux de prolifération des MCTS post-détachement à 24h pour différents PAM. Le taux de prolifération est déduit de la pente des courbes de volumes des sphéroïdes.

Ces résultats révèlent l'inefficacité du PAM, voire un effet délétère pour la santé, lorsque les FaDu subissent un traitement unique avec n'importe quel temps d'exposition.

Plusieurs hypothèses peuvent être proposées pour expliquer ces résultats. Par exemple, il est possible que le PAM induise des dommages sévères sur les jonctions intercellulaires au sein des sphéroïdes. Ces structures jouent en effet un rôle dans la cohésion cellulaire et l'intégrité des MCTS induisant après un traitement PAM une auto-organisation des sphéroïdes moins compacte. De plus, les cellules FaDu peuvent produire des exosomes qui vont encourager la prolifération des cellules du cœur du sphéroïde non touchées par le PAM²⁰⁶. Ces deux phénomènes peuvent participer à une augmentation du volume du sphéroïde, même si elle est extrêmement rapide.

9.4 Comparaison entre les études 2D et 3D : Effets à 48h

Afin de montrer la pertinence du modèle des sphéroïdes 3D par rapport au modèle monocouche 2D, une étude à plus long terme a été conduite (sur 48h).

Pour analyser l'effet à 48h du PAM sur les cellules 2D, la viabilité a été analysée au deuxième jour post-traitement au PAM. Cette étude n'a pas pu être menée plus longtemps du fait que les puits de cellules contrôles sont arrivés à confluence, empêchant de pouvoir comparer les résultats avec ceux des sphéroïdes. Dans ces conditions, le PAM a donc été remplacé après 24h de traitement PAM par du milieu de culture frais puis laissé à l'incubateur pendant 24h.

A cause de la haute toxicité du PAM sur les cultures 2D, cette étude au jour 2 n'a pas pu être réalisée pour la culture 2D à 15000 cellules, car le nombre de cellules viables après 24h dans le PAM est insuffisant. Les expériences ont donc été réalisées au jour 2 uniquement pour des cultures à 75% de confluence (64000 cellules).

Comme le présente la Figure 9-4, pour des PAM générés à courts temps d'exposition (PAM-30s, PAM-60s) la viabilité cellulaire reste relativement constante au jour 2. En revanche, pour des PAM-120s, PAM-240s, une décroissance de viabilité est observée dépendamment du temps d'exposition. En effet, au jour 2, le PAM-240s induit 97% de mort cellulaire.

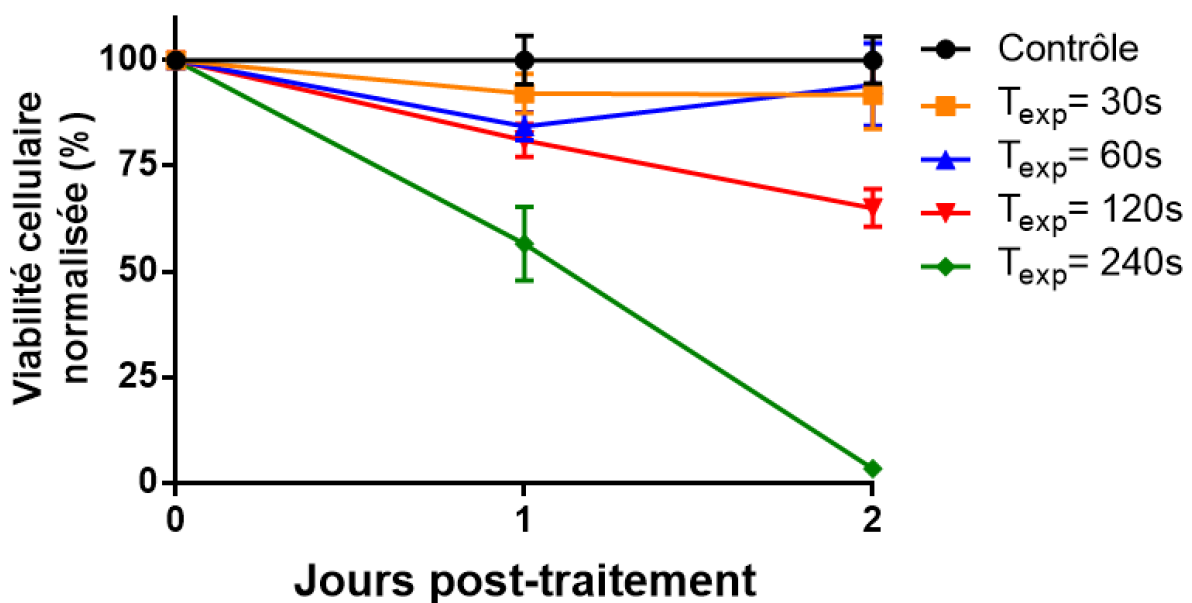


Figure 9-4 Viabilité Cellulaire après 2 jours pour des cellules en monocouche à 75% de confluence pour différents PAM.

En comparaison, la culture 3D (Figure 9-3) montre une rapide reprise de croissance au jour 2.

Pour le même nombre de cellules, les PAMs sont plus cytotoxiques pour les cultures 2D que pour les MCTS en 3D. L'efficacité du PAM dépend du temps d'exposition pour le générer mais aussi de l'organisation cellulaire. La divergence de réponse entre les cultures 2D et les sphéroïdes peut être expliquée par le fait que le PAM doit diffuser à l'intérieur du sphéroïde afin de pouvoir l'endommager alors que pour les cultures 2D le PAM est en contact direct avec toutes les cellules. Ces résultats démontrent clairement les différences d'effet du PAM sur des cultures 2D ou 3D et prouve encore l'intérêt de travailler avec le modèle du sphéroïde qui est plus proche de la réalité *in vivo*.

9.5 Le PAM augmente la viabilité cellulaire des micro-tumeurs FaDu

Lors de nos mises au point de la fabrication des sphéroïdes FaDu, nous avons remarqué que les sphéroïdes étaient compacts. De plus, les cellules FaDu sont connues pour générer des résistances aux radicaux via la production d'exosomes²⁰⁶ qui stimulent une réaction de défense. Afin de déterminer si la reprise de croissance des sphéroïdes observée au microscope optique est due à une reprise de prolifération ou simplement qu'après la mort des cellules en périphéries le sphéroïde devient moins compact, la quantité d'ATP a été évaluée sur les sphéroïdes FaDu à 0h, 24h, 36h, 48h après traitement au PAM-120s. La Figure 9-5 présente les résultats.

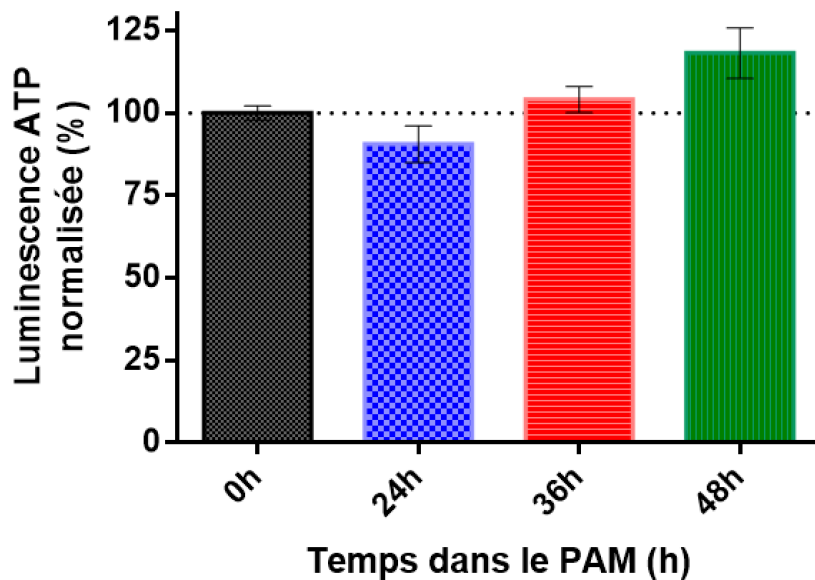


Figure 9-5 Viabilité cellulaire des sphéroïdes FaDu 0h, 24h, 36h et 48h après un traitement PAM-120s. Les niveaux d'ATP des sphéroïdes traités sont normalisés par rapport à ceux des sphéroïdes contrôles aux mêmes timepoints.

A 24h après traitement, une perte de viabilité cellulaire est observée et peut être liée à la perte de volume des sphéroïdes (détachement cellulaire) montrée précédemment. Dès 36h après traitement, le taux d'ATP augmente dans les sphéroïdes traités aux PAM par rapport aux contrôles. La quantité d'ATP intracellulaire des sphéroïdes traités augmente encore à 48h pour atteindre 18% de plus que dans les contrôles. Ce résultat démontre que l'effet observé sur les deux premiers jours de traitement n'est pas dû à un gonflement des sphéroïdes. Cette augmentation de viabilité est donc due à une reprise de prolifération des cellules.

9.6 Effet du peroxyde d'hydrogène

Il a été démontré précédemment sur les HCT-116 que le peroxyde d'hydrogène est majoritairement responsable du détachement cellulaire observé après un traitement PAM³⁰. La concentration de peroxyde d'hydrogène a été évaluée dans le PAM comme l'indique le Tableau 9-3 et augmente avec le temps d'exposition au jet plasma.

T _{exp} (s)	0	30	60	120	240
Concentration H ₂ O ₂ (mM)	0	0,130	0,480	1,160	2,500

Tableau 9-3 Concentration de peroxyde d'hydrogène dans le PAM à différents temps d'exposition.

Afin de pouvoir évaluer le rôle de l'H₂O₂ dans le PAM et son effet sur les sphéroïdes FaDu, ces derniers ont été traités avec un milieu de culture contenant une concentration croissante de peroxyde d'hydrogène allant de 0 à 20mM et sans exposition au jet. La Figure 9-6 présente les variations de volume des sphéroïdes par rapport aux contrôles.

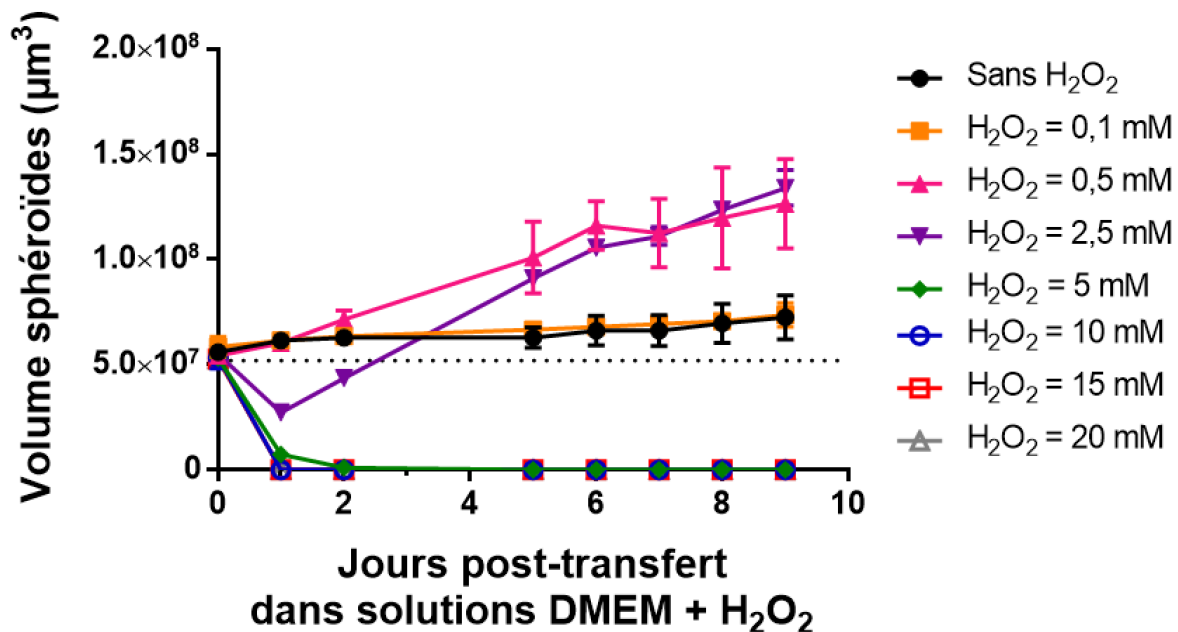


Figure 9-6 Effets du peroxyde d'hydrogène ajouté en concentrations croissantes dans les milieux de culture des sphéroïdes FaDu.

Dans les cas où la concentration en peroxyde d'hydrogène est faible (inférieure à 0,1mM), aucun effet significatif n'a été observé. Lorsque la concentration de peroxyde d'hydrogène augmente (0,5mM et 2,5mM, équivalent à la quantité d'H₂O₂ produite dans le PAM lors d'expositions de 60 secondes et 240 secondes respectivement), un détachement

cellulaire avec une perte de volume apparait au jour 1. Une réponse de prolifération rapide (plus rapide que les contrôles) est constatée ensuite dès le jour 2 jusqu'à atteindre une taille 1,8 fois celle des contrôles au jour 9.

Dans une étude précédente, nous avons montré sur les HCT-116 qu'une concentration de 2,5mM d' H_2O_2 pouvait induire la mort cellulaire et des dommages à l'ADN³⁰. La Figure 9-7 illustre que la réponse des MCTS cultivés avec 2,5mM d' H_2O_2 est semblable à celle des sphéroïdes traités avec du PAM-240s. En effet, en présentant les résultats en ratio du volume des sphéroïdes traités sur les non-traités et donc en mettant en évidence la vitesse de croissance des sphéroïdes, la même évolution est constatée pour les deux cas. Plus précisément, un détachement cellulaire à J1 est observé suivi d'une reprise de prolifération identique, que ce soit pour les sphéroïdes traités au PAM-240s ou uniquement au peroxyde d'hydrogène à 2,5mM. Ces résultats confirment le lien étroit, voire exclusif, entre détachement cellulaire et peroxyde d'hydrogène et soulignent le rôle du peroxyde d'hydrogène dans la réponse des FaDu au traitement PAM.

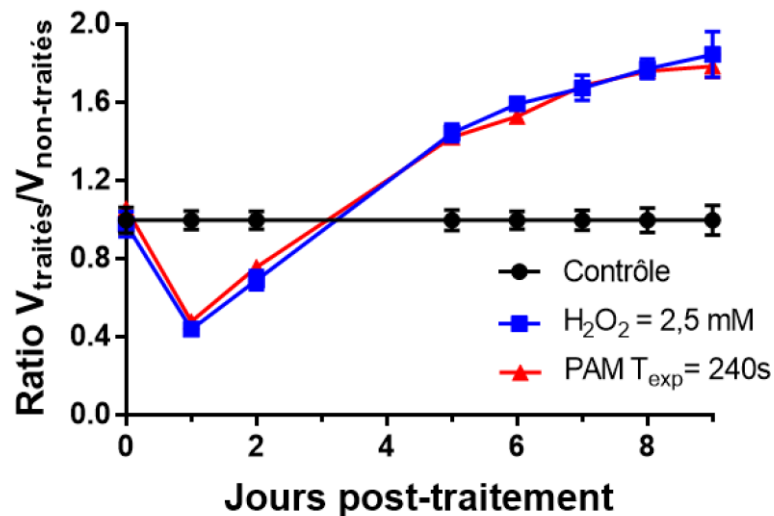


Figure 9-7 Comparaison entre des sphéroïdes traités au PAM-240s vs 2,5mM de peroxyde d'hydrogène.

Enfin, pour des hautes concentrations d' H_2O_2 (5mM et plus), les sphéroïdes ont été détruits et ce, dès le premier jour post-traitement et sans constat de reprise de prolifération sur le long terme. Un moyen d'atteindre ce seuil de concentration en H_2O_2 serait d'augmenter le temps d'exposition du milieu de culture au jet plasma ou alors de diminuer la distance jet/milieu. Bien que le PAM dans cette étude ne soit pas plus efficace qu'un simple traitement

au peroxyde d'hydrogène, il présente l'avantage d'être sélectif puisqu'il n'affecte pas les cellules saines^{93,197}.

Comme le présente le Tableau 9-4 l'évolution de la concentration de H₂O₂ est donnée en fonction de la distance milieu/jet pour une exposition de 60s. Pour 60s, la distance milieu/jet a été augmentée de 1 à 6 cm et ceci illustre que plus la distance est faible, plus la concentration d'H₂O₂ est élevée dans le PAM. En revanche, une distance de 1 cm induit un haut niveau d'évaporation.

Distance (cm)	1	2	3	4	5	6
Concentration (mM)	0,785	0,480	0,208	0,107	0,0297	0

Tableau 9-4 Concentration de peroxyde d'hydrogène dans du DMEM+SVF+P/S en fonction de la distance jet/milieu pour un temps d'exposition de 60s.

C'est pourquoi une distance de 2 cm entre le milieu/jet et un temps d'exposition de 120s semblent un bon compromis entre concentration d'H₂O₂ et évaporation.

9.7 Traitements successifs des sphéroïdes FaDu par du PAM ou de l'H₂O₂

Afin d'augmenter l'efficacité cytotoxique du PAM, les sphéroïdes ont été soumis à des traitements successifs au PAM-120s (1.16mM de H₂O₂). Ce temps d'exposition a été choisi car il est un bon compromis entre concentration d'H₂O₂ et évaporation du milieu mais également puisque dans nos travaux précédents, le PAM-120s n'affectait pas les cellules saines montrant donc une bonne sélectivité⁹³. A chaque traitement, le milieu des puits a été enlevé pour remettre du PAM fraîchement produit.

La Figure 9-8 donne l'évolution du volume des sphéroïdes FaDu ayant subi des traitements successifs au PAM-120s comparé aux contrôles. Les traitements ont été faits aux jours 0, 2, 4 et 7.

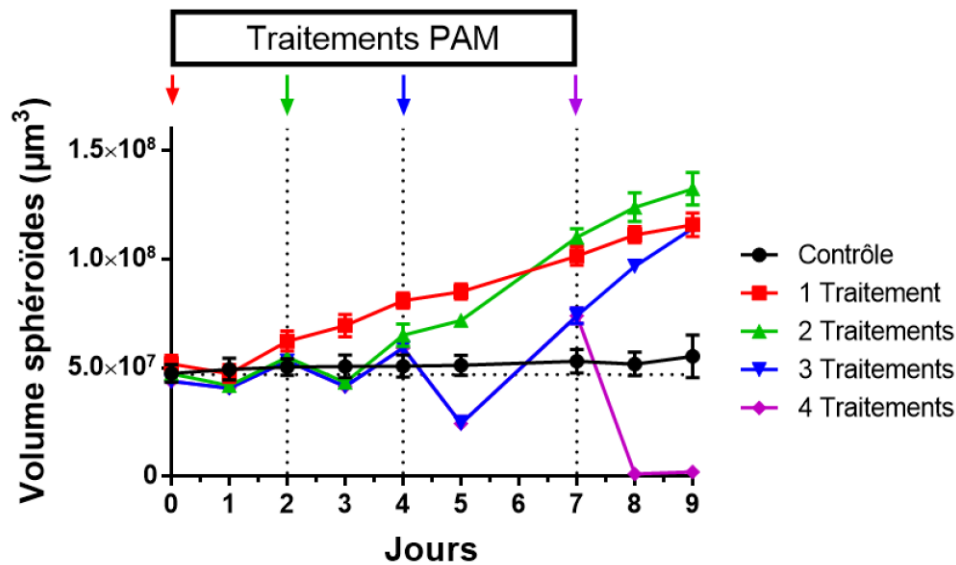


Figure 9-8 Traitements successifs au PAM-120s de sphéroïdes FaDu.

Un seul traitement donne sensiblement le même résultat que précédemment avec le PAM-120s (Figure 9-3). Dans le cas de deux ou trois traitements, le volume des sphéroïdes décroît le lendemain de chaque traitement, cependant une reprise de croissance est toujours présente ensuite. Dans ces conditions, chaque traitement entraîne une perte de volume dans les premières 24h puis une reprise de croissance dans les 24h suivantes. Que ce soit pour deux ou trois traitements, les sphéroïdes atteignent le même volume au jour 10, bien supérieur à celui des sphéroïdes traités une seule fois qui lui-même atteint un volume deux fois supérieur à celui des sphéroïdes contrôles. Ce processus de reprise de croissance est une cause importante de l'échec du traitement PAM sur les FaDu contrairement au HCT-116^{27,30}. Enfin dans le cas de quatre traitements, l'effet cytotoxique du PAM conduit à une totale déstructuration des sphéroïdes sans reprise de croissance, suggérant la mort des cellules.

Il est intéressant de noter que le pourcentage de perte de volume croît avec chaque traitement, passant de 12% après le premier à une totale disruption au quatrième. Le Tableau 9-5 présente les pourcentages de perte de volume et de reprise de croissance après chaque traitement. Dans ce tableau le pourcentage de perte de volume n'est pas calculé par rapport à 100% mais par rapport au jour de traitement précédent (soit à partir d'un pourcentage >100% après les reprises de croissance importantes). Il faut compter, par exemple pour le 3ème traitement 125% (à J4) – 47% (à J5) = 78% de perte de volume total.

Nombre de traitements	1	2	3	4
Détachement cellulaire (%)	12 ±2,0	32 ±3,0	78 ±6,0	143 ±9,0
Prolifération (%)	16 ±1,0	27 ±2,0	40 ±4,0	1± 0,3

Tableau 9-5 Pourcentages de détachement et prolifération cellulaire pour différents nombres de traitements successifs.

Ces résultats démontrent que les traitements successifs permettent d'endommager les sphéroïdes jusqu'à destruction totale sans pour autant augmenter la concentration d' H_2O_2 dans le PAM.

Des photos des sphéroïdes FaDu sont présentées Figure 9-9. Il y est possible de discerner le cœur des sphéroïdes ainsi que la couronne de cellules détachées autour.

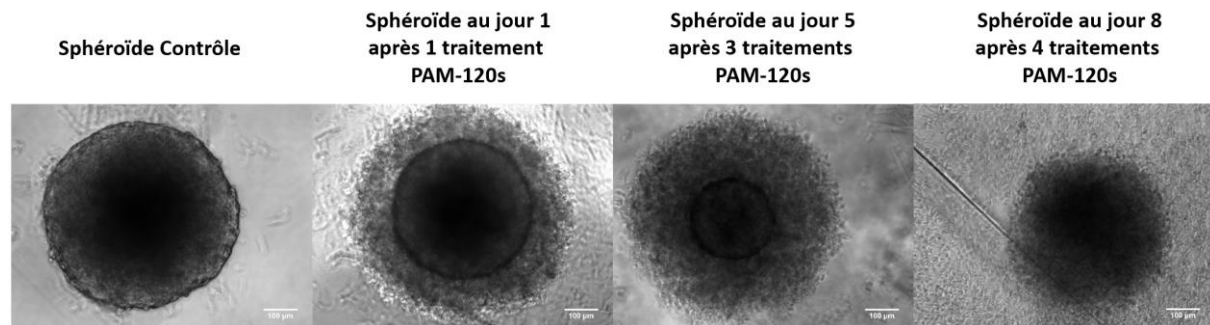


Figure 9-9 Images microscope des sphéroïdes à divers moments des traitements successifs. Echelle : 100µm

En vue de clarifier l'implication de l' H_2O_2 dans le PAM, les sphéroïdes ont été soumis à des traitements successifs de milieu de culture contenant 1,160mM de peroxyde d'hydrogène. Cette concentration correspond à celle produite par une exposition de milieu de culture 120s au jet plasma (PAM-120s) (Tableau 9-3). La Figure 9-10 montre que le peroxyde d'hydrogène seul ne conduit pas à la destructuration totale des sphéroïdes FaDu. En effet, même après le quatrième traitement une reprise de croissance est observée. Cette différence avec les traitements successifs PAM-120s suggère que l' H_2O_2 n'est pas suffisant pour expliquer l'effet à long terme du PAM. Cela met une nouvelle fois en évidence la présence dans le PAM d'autres agents cytotoxiques.

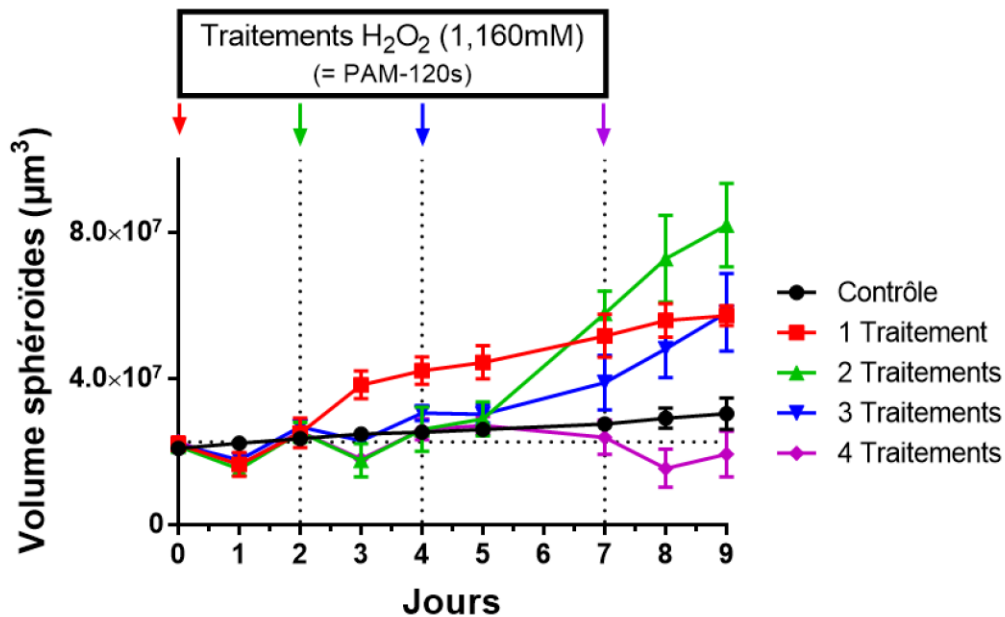


Figure 9-10 Traitements successifs de sphéroïdes FaDu traités avec une concentration de 1,160mM de peroxyde d'hydrogène.

Ces traitements successifs sont une bonne stratégie pour surmonter la prolifération rapide des sphéroïdes induite après un stress au PAM observé lors d'un traitement unique. Il faut cependant rester très prudent avec ces résultats car on voit clairement que si le nombre de traitement PAM n'est pas suffisant, la tumeur croît encore plus que sans traitement.

9.8 Conclusion

Ces travaux sur les cellules cancéreuses tête et cou FaDu ont permis d'étudier dans un premier temps la réponse des modèles 2D et 3D à divers traitements PAM. Cette étude a permis notamment de redémontrer l'intérêt du modèle sphéroïde en mettant l'accent sur l'organisation des cellules. En effet, après un traitement PAM, les deux cultures en monocouche avec un nombre de cellules différent présentent une réponse différente. Plus le nombre de cellules est important (cellules à 75% de confluence), moins les effets du PAM sont importants. Ensuite, lors d'une comparaison avec le volume d'un sphéroïde à 24h, les effets entre la monocouche à 75% de confluence et le sphéroïde 3D présentent une réponse similaire. En revanche, sur une plus longue durée, alors que les cellules 2D sont majoritairement mortes ou ne prolifèrent plus après 48h, laissant penser à une bonne efficacité du PAM, les sphéroïdes dévoilent une reprise de croissance plus importante que celle de la condition contrôle. Ces études montrent que l'organisation des cellules en micro-

tumeur influe sur l'efficacité du traitement, probablement à cause des gradients de pénétration induits par cette organisation en 3D¹²⁰.

Pour le modèle 3D, le premier effet observé après un traitement unique est une perte de volume associée à un détachement cellulaire 24h après le traitement. Les expériences réalisées avec du PAM ou un milieu riche en H₂O₂ ont montré que ce détachement cellulaire est lié à la présence de peroxyde d'hydrogène. Le deuxième effet du PAM correspond à une réponse hyper-proliférative des sphéroïdes FaDu les 8 jours après traitement par PAM (de J1 à J9 post-traitement). Cette reprise de croissance serait probablement liée aux mécanismes de défense induits face à un stress externe. En effet, les cellules FaDu sont connues pour produire des exosomes, responsables de mécanismes de résistance. Mutschelknaus *et al.*²⁰⁶ ont montré que les FaDu exposés à des radiations ionisantes peuvent produire des exosomes qui vont favoriser la prolifération des cellules non-exposées. Ainsi, une hypothèse qui reste à démontrer est que le PAM induit un stress oxydatif pouvant mener à la production d'exosomes par les cellules de la couronne du sphéroïde. Dans un deuxième temps, ces exosomes entrent en contact avec les cellules de couches plus profondes du sphéroïde et induisent leur prolifération.

Afin de multiplier les effets du PAM, des traitements successifs ont été menés. Après chaque traitement, le volume des sphéroïdes a significativement diminué avant de repartir en phase hyper-proliférative. Seuls les sphéroïdes traités 4 fois sont détruits et ne présentent plus de croissance. Cette inhibition de croissance peut être attribuée en partie au peroxyde d'hydrogène mais aussi à d'autres espèces du PAM puisque 4 traitements successifs uniquement au peroxyde d'hydrogène ne détruisent pas les sphéroïdes qui reprennent leur croissance.

Notre étude a donc démontré que des espèces réactives présentes dans le PAM, en plus du peroxyde d'hydrogène, jouent un rôle important dans les effets du traitement, et que des traitements successifs viennent à bout de la reprise de croissance des sphéroïdes en les détruisant.

Conclusions & Perspectives

Cette thèse pluridisciplinaire a été consacrée à la compréhension des traitements indirects au plasma froid sur des cellules cancéreuses. Afin de comprendre et optimiser les effets du milieu activé par plasma sur les tumeurs cancéreuses *in vivo*, il convient d'étudier l'interaction plasma/milieu puis celle du milieu activé par plasma sur des modèles pertinents *in vitro*.

Tout d'abord une première étude sur l'analyse du PAM a démontré que la complexité du milieu ainsi que son pH influent sur la quantité et la nature des espèces produites. Cette réactivité des espèces génère des produits oxydés qui peuvent être toxiques pour les cellules telles que le radical hydroxyle ou l'oxyde nitrique qui sont connus pour leurs effets cytotoxiques et génotoxiques. En effet, le détachement des cellules en périphérie du sphéroïde est induit par la formation de peroxyde d'hydrogène qui, via une réaction de Fenton, forme le radical hydroxyle à l'intérieur des cellules. La génération de ces espèces va également influencer sur les composants du milieu déjà présents avant exposition. Ainsi, la toxicité du PAM est due à plusieurs facteurs : d'un côté la génération de ROS et RNS mais aussi à la dégradation des nutriments pour les cellules contenues dans le milieu, via par exemple l'oxydation et nitrosylation des acides aminés.

Les expériences *in vitro* ont d'abord été réalisées sur des sphéroïdes issus de la lignée HCT-116 du cancer du côlon. Nous nous sommes intéressés à la cascade des mécanismes cellulaires mis en jeu et conduisant à la perte de volume du sphéroïde et à la mort des cellules en périphérie durant les premières 24h. Après une étude de viabilité par dosage de l'ATP intracellulaire, il a été révélé que la mortalité du sphéroïde atteignait 50% 2h après traitement au PAM. Les travaux réalisés précédemment sur les dommages à l'ADN permettent de mieux comprendre les raisons de cette perte de viabilité. En effet, les dommages à l'ADN ont été examinés sur des sphéroïdes en coupe, 4h après traitement, et ont montré une couronne de cellules présentant des dommages à l'ADN de type cassure double brin à la périphérie du

sphéroïde correspondant à la couronne de cellules détachées. Ces dommages à l'ADN sont dus à la présence d'H₂O₂³⁰.

L'étude de la perméabilité membranaire par fluorescence et le suivi de l'expression des caspases, marqueurs d'une mort par apoptose ont confirmé la mort par apoptose mais aussi nécrose des cellules détachées de la couronne du sphéroïde. En se penchant sur les voies d'activation, nous avons mis en évidence que la mitochondrie était un composant cellulaire touché par les effets du superoxyde du PAM. Il a également été démontré ces dernières années que la nécrose n'est plus forcément une mort cellulaire indépendante de l'apoptose⁸³. Puisque différents types de mort cellulaire peuvent être constatés dans une seule cellule^{200,201}, la mort cellulaire devrait donc être considérée comme un complexe de voies interconnectées des différentes procédures de mort cellulaire²⁰⁷.

Afin d'évaluer les effets du PAM sur un système plus complexe, c'est à dire *in vivo*, les traitements *in vitro* ont été réalisés plusieurs fois sur les sphéroïdes. L'optimisation des traitements successifs a permis de mettre en place un protocole *in vivo*. Bien que menée sur des souris nude sans système immunitaire, l'étude *in vivo* a démontré le potentiel du PAM puisqu'à partir de 14 jours, une réduction de la vitesse de croissance des tumeurs est notée. Il serait donc envisageable de tester le traitement PAM sur un modèle murin possédant un système immunitaire, puisqu'un système immunitaire compétent permet entre autre le nettoyage des cellules mortes, une augmentation de l'efficacité du traitement²⁰⁵.

Dans le but de généraliser ce traitement à tous les cancers, une seconde lignée cancéreuse a été étudiée. Le cancer de la tête et du cou est un cancer agressif dont les chances de rémission sont faibles et les traitements lourds. Le modèle *in vitro* 3D a en effet confirmé une réponse plus agressive au traitement PAM que le cancer du côlon puisqu'une reprise de prolifération importante et dépendante du temps d'exposition du PAM est observée. Seuls quatre traitements successifs permettent d'enrayer cette reprise.

Tous ces résultats démontrent que les différentes espèces produites dans le PAM jouent un rôle complémentaire dans le comportement cellulaire. D'autres études sont allées plus loin dans la compréhension des mécanismes à l'échelle cellulaire. Ainsi, il a été montré que le stress oxydatif induisait le relargage du zinc intracellulaire qui provoquait

dépendamment une mort cellulaire dans les cellules de neuroblastome humain²⁰⁸. En revanche, les fibroblastes humains sains étaient moins affectés par le PAM puisque les cellules présentant un faible taux de zinc intracellulaire sont moins sensibles à la cytotoxicité¹⁰⁶. En effet, plusieurs études récentes vont dans le sens encourageant que le PAM affecte les cellules cancéreuses en épargnant les cellules saines. Ainsi, une quantité optimale de PAM est capable d'induire de façon sélective l'apoptose sur des cellules d'hépatocarcinome tout en gardant des dommages minimums aux cellules saines hépatiques en coculture⁹⁵. Ceci confirme les résultats obtenus précédemment sur deux lignées de cancer de l'ovaire et les fibroblastes sains; quand ils sont traités avec du PAM, les deux lignées du cancer de l'ovaire ont été tuées via l'induction de l'apoptose alors que les fibroblastes n'ont pas été endommagés²⁰⁹.

Le milieu activé par plasma peut donc être une thérapie efficace dans le traitement du cancer. En vue d'en améliorer encore les effets, ce traitement pourrait également être associé à d'autres types de stratégies anticancéreuses telles que l'électroporation, ou l'immunothérapie.

Cette nouvelle stratégie thérapeutique a montré des résultats encourageant lors des phases d'expérimentation. Dans le futur, il sera nécessaire de poursuivre ces études pour d'une part optimiser l'interaction jet plasma/ milieu liquide en utilisant d'autres sources de plasma et ou d'autres milieux liquides, ceci dans le but d'augmenter les effets cytotoxiques et génotoxiques des PAM.

D'autre part, en *in vitro*, l'analyse des mécanismes de reprise de croissance des FaDu vis à vis du stress oxydatif induit par PAM doit être complétée pour adapter les traitements pour cette lignée cellulaire. D'autres lignées cellulaires peuvent être utilisées pour étudier leurs réponses vis à vis du stress oxydatif du PAM.

Des études *in vivo* sont aussi nécessaires pour valider l'étude pilote menée durant ce travail de thèse afin d'étudier l'influence du volume tumoral sur la réponse aux traitements, la prise en compte de la toxicité des espèces réactives anticancéreuses sur les cellules saines et utiliser d'autres milieux activés par plasma moins complexes. Pour cela deux modèles de greffes peuvent être utilisés : le modèle ectopique et le modèle orthotopique en utilisant des souris possédant un système immunitaire fonctionnel. Le premier modèle, déjà expérimenté

durant l'étude pilote, permettra le suivi de croissance et la morphologie des tumeurs. Le modèle orthotopique sera utile pour une meilleure reproduction des conditions cliniques et aussi une meilleure prédiction de l'efficacité des stratégies de traitement. Ces tests précliniques permettront l'évaluation des potentialités des milieux liquides activés par des plasmas froids à la pression atmosphérique comme nouvelle stratégie thérapeutique anti cancéreuse.

Bibliographie

1. Fact Sheets by Cancer. Available at: http://globocan.iarc.fr/Pages/fact_sheets_cancer.aspx. (Accessed: 30th August 2018)
2. Girard, F. *Analyse physico-chimique de milieux liquides d'intérêt biologique exposés à des plasmas froids produits à pression atmosphérique et température ambiante*. (Pau, 2017).
3. Lu, X., Laroussi, M. & Puech, V. On atmospheric-pressure non-equilibrium plasma jets and plasma bullets. *Plasma Sources Sci. Technol.* **21**, 034005 (2012).
4. Fridman, A. *Plasma chemistry*. (Cambridge university press, 2008).
5. Pietryk, G. *Panorama de la physique*. (Éditions Belin, 2015).
6. Fridman, A. & Friedman, G. *Plasma Medicine*. (John Wiley & Sons, 2012).
7. Douat, C. *Etude d'un micro-jet de plasma à pression atmosphérique*. (Paris 11, 2014).
8. Gazeli, K. *Étude expérimentale de micro-plasmas froids à la pression atmosphérique générés par des hautes tensions de formes différentes*. (Pau, 2015).
9. Plasma Technology Overview. *Henniker Plasma Treatment* Available at: <https://plasmatrement.co.uk/henniker-plasma-technology/plasma-surface-technology/plasma-technology-what-is-plasma-treatment/overview/>. (Accessed: 31st August 2018)
10. Judée, F., Wattieaux, G., Merbahi, N., Mansour, M. & Castanié-Cornet, M. P. The antibacterial activity of a microwave argon plasma jet at atmospheric pressure relies mainly on UV-C radiations. *J. Phys. Appl. Phys.* **47**, 405201 (2014).
11. Kim, D., Shim, Y., Park, J., Kim, H. & Han, J. Demonstration of organic volatile decomposition and bacterial sterilization by miniature dielectric barrier discharges on low-temperature cofired ceramic electrodes. *Jpn. J. Appl. Phys.* **55**, 040302 (2016).
12. Lin, Z.-H. *et al.* Development and characterization of a portable atmospheric-pressure argon plasma jet for sterilization. in *ASME 2015 International Mechanical Engineering Congress and Exposition V003T03A075–V003T03A075* (American Society of Mechanical Engineers, 2015).
13. Zhang, Q. *et al.* Combination of pulsed electric fields and non-thermal plasma jet for more effective bacterial decontamination. in *Plasma Sciences (ICOPS), 2015 IEEE International Conference on 1–1* (IEEE, 2015).
14. Hung, Y.-W. *et al.* Effect of a nonthermal-atmospheric pressure plasma jet on wound healing: An animal study. *J. Chin. Med. Assoc.* **79**, 320–328 (2016).
15. Fathollah, S. *et al.* Investigation on the effects of the atmospheric pressure plasma on wound healing in diabetic rats. *Sci. Rep.* **6**, 19144 (2016).
16. Bekeschus, S., Schmidt, A., Weltmann, K.-D. & von Woedtke, T. The plasma jet kINPen—a powerful tool for wound healing. *Clin. Plasma Med.* **4**, 19–28 (2016).

17. Xu, G.-M. *et al.* Dual effects of atmospheric pressure plasma jet on skin wound healing of mice. *Wound Repair Regen.* **23**, 878–884 (2015).
18. Fridman, G. *et al.* Blood coagulation and living tissue sterilization by floating-electrode dielectric barrier discharge in air. *Plasma Chem. Plasma Process.* **26**, 425–442 (2006).
19. Carus, T. & Rackebrandt, K. Collateral tissue damage by several types of coagulation (monopolar, bipolar, cold plasma and ultrasonic) in a minimally invasive, perfused liver model. *ISRN Surg.* **2011**, (2011).
20. Hoffmann, M., Bruch, H.-P., Kujath, P. & Limmer, S. Cold-plasma coagulation in the treatment of malignant pleural mesothelioma: results of a combined approach. *Interact. Cardiovasc. Thorac. Surg.* **10**, 502–505 (2010).
21. Kalghatgi, S. U. *et al.* Mechanism of blood coagulation by nonthermal atmospheric pressure dielectric barrier discharge plasma. *IEEE Trans. Plasma Sci.* **35**, 1559–1566 (2007).
22. Wu, S., Cao, Y. & Lu, X. The state of the art of applications of atmospheric-pressure nonequilibrium plasma jets in dentistry. *IEEE Trans. Plasma Sci.* **44**, 134–151 (2016).
23. Lee, J.-H., Choi, E.-H., Kim, K.-M. & Kim, K.-N. Effect of non-thermal air atmospheric pressure plasma jet treatment on gingival wound healing. *J. Phys. Appl. Phys.* **49**, 075402 (2016).
24. Zhou, X., Xiong, Z., Cao, Y., Lu, X. & Liu, D. The antimicrobial activity of an atmospheric-pressure room-temperature plasma in a simulated root-canal model infected with *Enterococcus faecalis*. *IEEE Trans. Plasma Sci.* **38**, 3370–3374 (2010).
25. Jiang, C. *et al.* Nanosecond pulsed plasma dental probe. *Plasma Process. Polym.* **6**, 479–483 (2009).
26. Pan, J. *et al.* Cold plasma therapy of a tooth root canal infected with *Enterococcus faecalis* biofilms in vitro. *J. Endod.* **39**, 105–110 (2013).
27. Plewa, J.-M. *et al.* Low-temperature plasma-induced antiproliferative effects on multicellular tumor spheroids. *New J. Phys.* **16**, 043027 (2014).
28. Keidar, M. *et al.* Cold atmospheric plasma in cancer therapy. *Phys. Plasmas* **20**, 057101 (2013).
29. Utsumi, F. *et al.* Effect of indirect nonequilibrium atmospheric pressure plasma on antiproliferative activity against chronic chemo-resistant ovarian cancer cells in vitro and in vivo. *PLoS One* **8**, e81576 (2013).
30. Judée, F. *et al.* Short and long time effects of low temperature Plasma Activated Media on 3D multicellular tumor spheroids. *Sci. Rep.* **6**, 21421 (2016).
31. Chauvin, J., Judée, F., Merbahi, N. & Vicendo, P. Effects of Plasma Activated Medium on Head and Neck FaDu Cancerous Cells: comparison of 3D and 2D response. *Anticancer Agents Med. Chem.* **18**, (2018).
32. Bhat, R. & Stamminger, R. Preserving strawberry quality by employing novel food preservation and processing techniques—Recent updates and future scope—An overview. *J. Food Process Eng.* **38**, 536–554 (2015).
33. Machala, Z., Hensel, K. & Akishev, Y. *Plasma for bio-decontamination, medicine and food security.* (Springer Science & Business Media, 2012).

34. Wan, J., Coventry, J., Swiergon, P., Sanguansri, P. & Versteeg, C. Advances in innovative processing technologies for microbial inactivation and enhancement of food safety—pulsed electric field and low-temperature plasma. *Trends Food Sci. Technol.* **20**, 414–424 (2009).
35. Bafoil, M. *et al.* Effects of low temperature plasmas and plasma activated waters on *Arabidopsis thaliana* germination and growth. *PLOS ONE* **13**, e0195512 (2018).
36. Randeniya, L. K. & de Groot, G. J. Non-Thermal Plasma Treatment of Agricultural Seeds for Stimulation of Germination, Removal of Surface Contamination and Other Benefits: A Review. *Plasma Process. Polym.* **12**, 608–623 (2015).
37. Matra, K. Non-thermal plasma for germination enhancement of radish seeds. *Procedia Comput. Sci.* **86**, 132–135 (2016).
38. Sookwong, P. *et al.* Application of oxygen-argon plasma as a potential approach of improving the nutrition value of pre-germinated brown rice. *J. Food Nutr. Res.* **2**, 946–951 (2014).
39. Laroussi, M. & Akan, T. Arc-Free Atmospheric Pressure Cold Plasma Jets: A Review. *Plasma Process. Polym.* **4**, 777–788 (2007).
40. Yousfi, M. *et al.* Non Thermal Plasma Sources of Production of Active Species for Biomedical Uses: Analyses, Optimization and Prospect. *Biomed. Eng. - Front. Chall.* (2011). doi:10.5772/19129
41. Eden, J. G. *et al.* Microplasma devices fabricated in silicon, ceramic, and metal/polymer structures: arrays, emitters and photodetectors. *J. Phys. Appl. Phys.* **36**, 2869 (2003).
42. El-Habachi, A. & Schoenbach, K. H. Emission of excimer radiation from direct current, high-pressure hollow cathode discharges. *Appl. Phys. Lett.* **72**, 22–24 (1998).
43. Laroussi, M. Nonthermal decontamination of biological media by atmospheric-pressure plasmas: review, analysis, and prospects. *IEEE Trans. Plasma Sci.* **30**, 1409–1415 (2002).
44. Meyer, C. *et al.* Development of a novel dielectric barrier microhollow cathode discharge for gaseous atomic emission spectroscopy. *J. Anal. At. Spectrom.* **27**, 677–681 (2012).
45. Kanazawa, S., Kogoma, M., Moriwaki, T. & Okazaki, S. Stable glow plasma at atmospheric pressure. *J. Phys. Appl. Phys.* **21**, 838 (1988).
46. Kogelschatz, U. Silent discharges for the generation of ultraviolet and vacuum ultraviolet excimer radiation. *Pure Appl. Chem.* **62**, 1667–1674 (1990).
47. Massines, F. *et al.* Experimental and theoretical study of a glow discharge at atmospheric pressure controlled by dielectric barrier. *J. Appl. Phys.* **83**, 2950–2957 (1998).
48. Kogelschatz, U., Eliasson, B. & Egli, W. Dielectric-barrier discharges. Principle and applications. *J. Phys. IV* **7**, 47–66 (1997).
49. Shi, J. J. & Kong, M. G. Mode characteristics of radio-frequency atmospheric glow discharges. *Ieee Trans. Plasma Sci.* **33**, 624–630 (2005).
50. Oh, J.-S., Furuta, H., Hatta, A. & Bradley, J. W. Investigating the effect of additional gases in an atmospheric-pressure helium plasma jet using ambient mass spectrometry. *Jpn. J. Appl. Phys.* **54**, 01AA03 (2014).

51. Teschke, M., Kedzierski, J., Finantu-Dinu, E. G., Korzec, D. & Engemann, J. High-speed photographs of a dielectric barrier atmospheric pressure plasma jet. *IEEE Trans. Plasma Sci.* **33**, 310–311 (2005).
52. Chauvet, L., Thérèse, L., Caillier, B. & Guillot, P. Characterization of an asymmetric DBD plasma jet source at atmospheric pressure. *J. Anal. At. Spectrom.* **29**, 2050–2057 (2014).
53. Yambe, K., Taka, S. & Ogura, K. Relation between plasma plume density and gas flow velocity in atmospheric pressure plasma. *Phys. Plasmas* **21**, 043511 (2014).
54. Lu, X. *et al.* An 11 cm long atmospheric pressure cold plasma plume for applications of plasma medicine. *Appl. Phys. Lett.* **92**, 081502 (2008).
55. Judée, F. 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. (Paul Sabatier - Toulouse 3, 2016).
56. Cancers : les chiffres clés - Qu'est-ce qu'un cancer ? Available at: <http://www.e-cancer.fr/Comprendre-prevenir-depister/Qu-est-ce-qu-un-cancer/Chiffres-cles>. (Accessed: 30th August 2018)
57. What does myPlan Lung Cancer measure? *Myriad myPlan*®
58. Tiainen, M. *et al.* Terminally differentiated skeletal myotubes are not confined to G0 but can enter G1 upon growth factor stimulation. *Cell Growth Differ. Mol. Biol. J. Am. Assoc. Cancer Res.* **7**, 1039–1050 (1996).
59. Elledge, S. J. Cell cycle checkpoints: preventing an identity crisis. *Science* **274**, 1664–1672 (1996).
60. Giuriato, S. & Felsher, D. W. How cancers escape their oncogene habit. *Cell Cycle Georget. Tex* **2**, 329–332 (2003).
61. Siddiqui, I., Sanna, V., Ahmad, N., Sechi, M. & Mukhtar, H. *Resveratrol nanoformulation for cancer prevention and therapy.* **1348**, (2015).
62. Hanahan, D. & Weinberg, R. A. The hallmarks of cancer. *Cell* **100**, 57–70 (2000).
63. Hanahan, D. & Weinberg, R. A. Hallmarks of Cancer: The Next Generation. *Cell* **144**, 646–674 (2011).
64. May, P. & May, E. Twenty years of p53 research: structural and functional aspects of the p53 protein. *Oncogene* **18**, 7621–7636 (1999).
65. Leblanc, V. & May, P. Activation et modifications post-traductionnelles de p53 après dommage de l'ADN. *médecine/sciences* **18**, 577–584 (2002).
66. Olotu, F. A. & Soliman, M. E. S. Dynamic perspectives into the mechanisms of mutation-induced p53-DNA binding loss and inactivation using active perturbation theory: Structural and molecular insights toward the design of potent reactivators in cancer therapy. *J. Cell. Biochem.* (2018). doi:10.1002/jcb.27458
67. Abraham, A. G. & O'Neill, E. PI3K/Akt-mediated regulation of p53 in cancer. *Biochem. Soc. Trans.* **42**, 798–803 (2014).
68. Vici, P. *et al.* p53 status as effect modifier of the association between pre-treatment fasting glucose and breast cancer outcomes in non diabetic, HER2 positive patients treated with trastuzumab. *Oncotarget* **5**, 10382–10392 (2014).

69. Li, X.-L., Zhou, J., Chen, Z.-R. & Chng, W.-J. P53 mutations in colorectal cancer - molecular pathogenesis and pharmacological reactivation. *World J. Gastroenterol.* **21**, 84–93 (2015).
70. Blasco, M. A. Telomeres and human disease: ageing, cancer and beyond. *Nat. Rev. Genet.* **6**, 611–622 (2005).
71. Shay, J. W. & Wright, W. E. Hayflick, his limit, and cellular ageing. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **1**, 72–76 (2000).
72. Hayflick, L. Myth-busting about first mass-produced human cell line. *Nature* (2010). doi:10.1038/464030d
73. Blasco, M. A. Telomere length, stem cells and aging. *Nat. Chem. Biol.* **3**, 640–649 (2007).
74. Newbold, R. F. The significance of telomerase activation and cellular immortalization in human cancer. *Mutagenesis* **17**, 539–550 (2002).
75. Kroemer, G. *et al.* Classification of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2009. *Cell Death Differ.* **16**, 3–11 (2009).
76. Hotchkiss, R. S., Strasser, A., McDunn, J. E. & Swanson, P. E. Cell Death in Disease: Mechanisms and Emerging Therapeutic Concepts. *N. Engl. J. Med.* **361**, 1570–1583 (2009).
77. Elmore, S. Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicol. Pathol.* **35**, 495–516 (2007).
78. Rock, K. L. & Kono, H. The inflammatory response to cell death. *Annu. Rev. Pathol.* **3**, 99–126 (2008).
79. Puyal, J., Ginet, V., Vaslin, A., Truttmann, A. C. & Clarke, P. G. H. Les deux visages de l'autophagie dans le système nerveux. *médecine/sciences* **25**, 383–390 (2009).
80. Green, D. R., Galluzzi, L. & Kroemer, G. Mitochondria and the autophagy-inflammation-cell death axis in organismal aging. *Science* **333**, 1109–1112 (2011).
81. Lamb, C. A., Yoshimori, T. & Tooze, S. A. The autophagosome: origins unknown, biogenesis complex. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **14**, 759–774 (2013).
82. Efeyan, A., Comb, W. C. & Sabatini, D. M. Nutrient-sensing mechanisms and pathways. *Nature* **517**, 302–310 (2015).
83. Henriquez, M., Armisén, R., Stutzin, A. & Quest, A. F. G. Cell death by necrosis, a regulated way to go. *Curr. Mol. Med.* **8**, 187–206 (2008).
84. Davidovich, P., Kearney, C. J. & Martin, S. J. Inflammatory outcomes of apoptosis, necrosis and necroptosis. *Biol. Chem.* **395**, 1163–1171 (2014).
85. Folkman, J. Fundamental concepts of the angiogenic process. *Curr. Mol. Med.* **3**, 643–651 (2003).
86. Warburg, O. On the origin of cancer cells. *Science* **123**, 309–314 (1956).
87. House, S. W., Warburg, O., Burk, D. & Schade, A. L. On respiratory impairment in cancer cells. *Science* **124**, 267–272 (1956).
88. Keating, E. & Martel, F. Antimetabolic Effects of Polyphenols in Breast Cancer Cells: Focus on Glucose Uptake and Metabolism. *Front. Nutr.* **5**, (2018).

89. Potter, V. R. The biochemical approach to the cancer problem. *Fed. Proc.* **17**, 691–697 (1958).
90. Vander Heiden, M. G., Cantley, L. C. & Thompson, C. B. Understanding the Warburg effect: the metabolic requirements of cell proliferation. *Science* **324**, 1029–1033 (2009).
91. Vajdic, C. M. & Leeuwen, M. T. van. Cancer incidence and risk factors after solid organ transplantation. *Int. J. Cancer* **125**, 1747–1754 (2009).
92. Keidar, M. *et al.* Cold plasma selectivity and the possibility of a paradigm shift in cancer therapy. *Br. J. Cancer* **105**, 1295 (2011).
93. Judée, F., Merbahi, N. & Yousfi, M. Genotoxic and Cytotoxic Effects of Plasma-Activated Media on Multicellular Tumor Spheroids. *Plasma Med.* **6**, (2016).
94. Bauer, G. & Graves, D. B. Mechanisms of Selective Antitumor Action of Cold Atmospheric Plasma-Derived Reactive Oxygen and Nitrogen Species: Mechanisms of Selective Antitumor Action.... *Plasma Process. Polym.* **13**, 1157–1178 (2016).
95. Duan, J., Lu, X. & He, G. The selective effect of plasma activated medium in an in vitro co-culture of liver cancer and normal cells. *J. Appl. Phys.* **121**, 013302 (2017).
96. Guerrero-Preston, R. *et al.* Cold atmospheric plasma treatment selectively targets head and neck squamous cell carcinoma cells. *Int. J. Mol. Med.* **34**, 941–946 (2014).
97. Zhang, X., Li, M., Zhou, R., Feng, K. & Yang, S. Ablation of liver cancer cells in vitro by a plasma needle. *Appl. Phys. Lett.* **93**, 021502 (2008).
98. Partecke, L. I. *et al.* Tissue tolerable plasma (TTP) induces apoptosis in pancreatic cancer cells in vitro and in vivo. *BMC Cancer* **12**, 473 (2012).
99. Ishaq, M., Evans, M. D. M. & Ostrikov, K. (Ken). Atmospheric pressure gas plasma-induced colorectal cancer cell death is mediated by Nox2–ASK1 apoptosis pathways and oxidative stress is mitigated by Srx–Nrf2 anti-oxidant system. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Mol. Cell Res.* **1843**, 2827–2837 (2014).
100. Hirst, A. M. *et al.* Low-temperature plasma treatment induces DNA damage leading to necrotic cell death in primary prostate epithelial cells. *Br. J. Cancer* **112**, 1536–1545 (2015).
101. Brullé, L. *et al.* Effects of a Non Thermal Plasma Treatment Alone or in Combination with Gemcitabine in a MIA PaCa2-luc Orthotopic Pancreatic Carcinoma Model. *PLoS ONE* **7**, e52653 (2012).
102. Kos, S. *et al.* Safety aspects of atmospheric pressure helium plasma jet operation on skin: In vivo study on mouse skin. *PLOS ONE* **12**, e0174966 (2017).
103. Babaeva, N. Y. & Kushner, M. J. Intracellular electric fields produced by dielectric barrier discharge treatment of skin. *J. Phys. Appl. Phys.* **43**, 185206 (2010).
104. Chauvin, J., Judée, F., Yousfi, M., Vicendo, P. & Merbahi, N. Analysis of reactive oxygen and nitrogen species generated in three liquid media by low temperature helium plasma jet. *Sci. Rep.* **7**, 4562 (2017).
105. Bauer, G. Signal amplification by tumor cells: Clue to the understanding of the antitumor effects of cold atmospheric plasma and plasma-activated medium. *IEEE Trans. Radiat. Plasma Med. Sci.* **2**, 87–98 (2018).

106. Hara, H., Sueyoshi, S., Taniguchi, M., Kamiya, T. & Adachi, T. Differences in intracellular mobile zinc levels affect susceptibility to plasma-activated medium-induced cytotoxicity. *Free Radic. Res.* **51**, 306–315 (2017).
107. Judée, F., Merbahi, N., Wattieaux, G. & Yousfi, M. Analysis of Ar plasma jets induced by single and double dielectric barrier discharges at atmospheric pressure. *J. Appl. Phys.* **120**, 114901 (2016).
108. Jomaa, N. Modélisations multi-physiques avec validations expérimentales des jets de plasmas froids d'hélium à la pression atmosphérique. (Toulouse 3, 2014).
109. Yousfi, M., Eichwald, O., Merbahi, N. & Jomaa, N. Analysis of ionization wave dynamics in low-temperature plasma jets from fluid modeling supported by experimental investigations. *Plasma Sources Sci. Technol.* **21**, 045003 (2012).
110. Zavoisky, E. Spin-magnetic resonance in paramagnetics. *J Phys USSR* **9**, 211–245 (1945).
111. Buettner, G. R. Spin Trapping: ESR parameters of spin adducts 1474 1528V. *Free Radic. Biol. Med.* **3**, 259–303 (1987).
112. Damian, G., Petrisor, D. & Miclaus, V. Free radicals detection by ESR PBN spin-trap technique. *J. Optoelectron. Adv. Mater.* **9**, 1010–1013 (2007).
113. Pitt, J. J. Principles and Applications of Liquid Chromatography- Mass Spectrometry in Clinical Biochemistry. *Liq. Chromatogr.* **16**
114. HCT 116 ATCC ® CCL-247™ Homo sapiens colon colorectal carcin. Available at: https://www.lgcstandards-atcc.org/products/all/CCL-247.aspx?geo_country=fr. (Accessed: 27th May 2018)
115. Pampaloni, F., Reynaud, E. G. & Stelzer, E. H. K. The third dimension bridges the gap between cell culture and live tissue. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **8**, 839–845 (2007).
116. Ghajar, C. M. & Bissell, M. J. Tumor engineering: the other face of tissue engineering. *Tissue Eng. Part A* **16**, 2153–2156 (2010).
117. Nyga, A., Cheema, U. & Loizidou, M. 3D tumour models: novel in vitro approaches to cancer studies. *J. Cell Commun. Signal.* **5**, 239–248 (2011).
118. Kadletz, L. *et al.* Evaluation of spheroid head and neck squamous cell carcinoma cell models in comparison to monolayer cultures. *Oncol. Lett.* **10**, 1281–1286 (2015).
119. Hirschhaeuser, F. *et al.* Multicellular tumor spheroids: an underestimated tool is catching up again. *J. Biotechnol.* **148**, 3–15 (2010).
120. Costa, E. C. *et al.* 3D tumor spheroids: an overview on the tools and techniques used for their analysis. *Biotechnol. Adv.* **34**, 1427–1441 (2016).
121. Sutherland, M. R., Ryan, D., Dahl, M. J., Albertine, K. H. & Black, M. J. Effects of preterm birth and ventilation on glomerular capillary growth in the neonatal lamb kidney. *J. Hypertens.* **34**, 1988–1997 (2016).
122. Friedrich, J., Ebner, R. & Kunz-Schughart, L. A. Experimental anti-tumor therapy in 3-D: spheroids--old hat or new challenge? *Int. J. Radiat. Biol.* **83**, 849–871 (2007).
123. Mazzoleni, G., Di Lorenzo, D. & Steimberg, N. Modelling tissues in 3D: the next future of pharmaco-toxicology and food research? *Genes Nutr.* **4**, 13–22 (2009).

124. Oloumi, A., MacPhail, S. H., Johnston, P. J., Banáth, J. P. & Olive, P. L. Changes in subcellular distribution of topoisomerase II α correlate with etoposide resistance in multicell spheroids and xenograft tumors. *Cancer Res.* **60**, 5747–5753 (2000).
125. West, C. M. & Sutherland, R. M. The radiation response of a human colon adenocarcinoma grown in monolayer, as spheroids, and in nude mice. *Radiat. Res.* **112**, 105–115 (1987).
126. Antoni, D., Burckel, H., Josset, E. & Noel, G. Three-dimensional cell culture: a breakthrough in vivo. *Int. J. Mol. Sci.* **16**, 5517–5527 (2015).
127. Gibot, L. & Rols, M.-P. 3D spheroids' sensitivity to electric field pulses depends on their size. *J. Membr. Biol.* **246**, 745–750 (2013).
128. Frandsen, S. K., Gibot, L., Madi, M., Gehl, J. & Rols, M.-P. Calcium electroporation: evidence for differential effects in normal and malignant cell lines, evaluated in a 3D spheroid model. *PLoS One* **10**, e0144028 (2015).
129. Arnold, S. & Kadenbach, B. Cell Respiration is Controlled by ATP, an Allosteric Inhibitor of Cytochrome-c Oxidase. *Eur. J. Biochem.* **249**, 350–354 (1997).
130. Beltrán, B., Mathur, A., Duchen, M. R., Erusalimsky, J. D. & Moncada, S. The effect of nitric oxide on cell respiration: A key to understanding its role in cell survival or death. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **97**, 14602–14607 (2000).
131. Tiwari, B. S., Belenghi, B. & Levine, A. Oxidative Stress Increased Respiration and Generation of Reactive Oxygen Species, Resulting in ATP Depletion, Opening of Mitochondrial Permeability Transition, and Programmed Cell Death. *Plant Physiol.* **128**, 1271–1281 (2002).
132. Gibot, L., Wasungu, L., Teissié, J. & Rols, M.-P. Antitumor drug delivery in multicellular spheroids by electropermeabilization. *J. Controlled Release* **167**, 138–147 (2013).
133. Martin, D. S. *et al.* Role of murine tumor models in cancer treatment research. *Cancer Res.* **46**, 2189–2192 (1986).
134. Schuh, J. C. Trials, tribulations, and trends in tumor modeling in mice. *Toxicol. Pathol.* **32**, 53–66 (2004).
135. Faustino-Rocha, A. *et al.* Estimation of rat mammary tumor volume using caliper and ultrasonography measurements. *Lab Anim.* **42**, 217 (2013).
136. Jarrige, J., Laroussi, M. & Karakas, E. Formation and dynamics of plasma bullets in a non-thermal plasma jet: influence of the high-voltage parameters on the plume characteristics. *Plasma Sources Sci. Technol.* **19**, 065005 (2010).
137. Walsh, J. L. & Kong, M. G. Room-temperature atmospheric argon plasma jet sustained with submicrosecond high-voltage pulses. *Appl. Phys. Lett.* **91**, 221502 (2007).
138. Xiong, Q., Nikiforov, A. Y., Lu, X. P. & Leys, C. High-speed dispersed photographing of an open-air argon plasma plume by a grating-ICCD camera system. *J. Phys. Appl. Phys.* **43**, 415201 (2010).
139. Zaplotnik, R. *et al.* Influence of a sample surface on single electrode atmospheric plasma jet parameters. *Spectrochim. Acta Part B At. Spectrosc.* **103–104**, 124–130 (2015).

140. Riès, D. *et al.* LIF and fast imaging plasma jet characterization relevant for NTP biomedical applications. *J. Phys. Appl. Phys.* **47**, 275401 (2014).
141. Mericam-Bourdet, N., Laroussi, M., Begum, A. & Karakas, E. Experimental investigations of plasma bullets. *J. Phys. Appl. Phys.* **42**, 055207 (2009).
142. Lu, X., Naidis, G. V., Laroussi, M. & Ostrikov, K. Guided ionization waves: Theory and experiments. *Phys. Rep.* **540**, 123–166 (2014).
143. Norberg, S. A., Johnsen, E. & Kushner, M. J. Helium atmospheric pressure plasma jets touching dielectric and metal surfaces. *J. Appl. Phys.* **118**, 013301 (2015).
144. Chen, M.-T., Jiang, C., Vernier, P. T., Wu, Y.-H. & Gundersen, M. A. Two-dimensional nanosecond electric field mapping based on cell electropermeabilization. *PMC Biophys.* **2**, 9 (2009).
145. Olenici-Craciunescu, S. B. *et al.* Spatially resolved spectroscopic measurements of a dielectric barrier discharge plasma jet applicable for soft ionization. *Spectrochim. Acta Part B At. Spectrosc.* **66**, 268–273 (2011).
146. Gazeli, K. *et al.* A study of helium atmospheric-pressure guided streamers for potential biological applications. *Plasma Sources Sci. Technol.* **22**, 025020 (2013).
147. Müller, S. *et al.* Operation modes of the helium dielectric barrier discharge for soft ionization. *Spectrochim. Acta Part B At. Spectrosc.* **85**, 104–111 (2013).
148. Cooper, M. *et al.* Decontamination of surfaces from extremophile organisms using nonthermal atmospheric-pressure plasmas. *IEEE Trans. Plasma Sci.* **37**, 866–871 (2009).
149. Sun, P. *et al.* Tooth whitening with hydrogen peroxide assisted by a direct-current cold atmospheric-pressure air plasma microjet. *IEEE Trans. Plasma Sci.* **38**, 1892–1896 (2010).
150. Vandamme, M. *et al.* ROS implication in a new antitumor strategy based on non-thermal plasma. *Int. J. Cancer* **130**, 2185–2194 (2012).
151. Kaushik, N., Kumar, N., Kim, C. H., Kaushik, N. K. & Choi, E. H. Dielectric Barrier Discharge Plasma Efficiently Delivers an Apoptotic Response in Human Monocytic Lymphoma. *Plasma Process. Polym.* **11**, 1175–1187
152. Adachi, T. *et al.* Plasma-activated medium induces A549 cell injury via a spiral apoptotic cascade involving the mitochondrial–nuclear network. *Free Radic. Biol. Med.* **79**, 28–44 (2015).
153. Yan, D. *et al.* Stabilizing the cold plasma-stimulated medium by regulating medium's composition. *Sci. Rep.* **6**, 26016 (2016).
154. Tani, A., Ono, Y., Fukui, S., Ikawa, S. & Kitano, K. Free radicals induced in aqueous solution by non-contact atmospheric-pressure cold plasma. *Appl. Phys. Lett.* **100**, 254103 (2012).
155. Uchiyama, H. *et al.* EPR-Spin Trapping and Flow Cytometric Studies of Free Radicals Generated Using Cold Atmospheric Argon Plasma and X-Ray Irradiation in Aqueous Solutions and Intracellular Milieu. *PLOS ONE* **10**, e0136956 (2015).
156. Tahara, M. & Okubo, M. Detection of free radicals produced by a pulsed electrohydraulic discharge using electron spin resonance. *J. Electrostat.* **72**, 222–227 (2014).

157. Tresp, H., Hammer, M. U., Winter, J., Weltmann, K.-D. & Reuter, S. Quantitative detection of plasma-generated radicals in liquids by electron paramagnetic resonance spectroscopy. *J. Phys. Appl. Phys.* **46**, 435401 (2013).
158. Wu, H. *et al.* 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 Process. Polym.* **9**, 417–424 (2012).
159. Meiselman, H. J., Merrill, E. W., Gilliland, E. R., Pelletier, G. A. & Salzman, E. W. Influence of plasma osmolarity on the rheology of human blood. *J. Appl. Physiol.* **22**, 772–781 (1967).
160. Shiozaki, A., Ichikawa, D., Kosuga, T., Marunaka, Y. & Otsuji, E. Regulation of osmolality for cancer treatment. *J. Physiol. Sci.* **67**, 353–360 (2017).
161. Tresp, H., Hammer, M. U., Weltmann, K.-D. & Reuter, S. Effects of Atmosphere Composition and Liquid Type on Plasma-Generated Reactive Species in Biologically Relevant Solutions. *Plasma Med.* **3**, (2013).
162. Zhang, Q. *et al.* Assessment of the roles of various inactivation agents in an argon-based direct current atmospheric pressure cold plasma jet. *J. Appl. Phys.* **111**, 123305 (2012).
163. Feng, H. *et al.* A study of eukaryotic response mechanisms to atmospheric pressure cold plasma by using *Saccharomyces cerevisiae* single gene mutants. *Appl. Phys. Lett.* **97**, 131501 (2010).
164. Yusupov, M. *et al.* Reactive molecular dynamics simulations of oxygen species in a liquid water layer of interest for plasma medicine. *J. Phys. Appl. Phys.* **47**, 025205 (2014).
165. Tian, W. & Kushner, M. J. Atmospheric pressure dielectric barrier discharges interacting with liquid covered tissue. *J. Phys. Appl. Phys.* **47**, 165201 (2014).
166. Gorbanev, Y., O'Connell, D. & Chechik, V. Non-Thermal Plasma in Contact with Water: The Origin of Species. *Chem. – Eur. J.* **22**, 3496–3505
167. Kanazawa, S., Furuki, T., Nakaji, T., Akamine, S. & Ichiki, R. Measurement of OH Radicals in Aqueous Solution Produced by Atmospheric-pressure LF Plasma Jet. *Int. J. Plasma Environ. Sci. Technol.* **6**, (2012).
168. Xu, G. & Chance, M. R. Hydroxyl Radical-Mediated Modification of Proteins as Probes for Structural Proteomics. *Chem. Rev.* **107**, 3514–3543 (2007).
169. Neyts, E. C., Yusupov, M., Verlaet, C. C. & Bogaerts, A. Computer simulations of plasma–biomolecule and plasma–tissue interactions for a better insight in plasma medicine. *J. Phys. Appl. Phys.* **47**, 293001 (2014).
170. Takai, E. *et al.* Chemical modification of amino acids by atmospheric-pressure cold plasma in aqueous solution. *J. Phys. Appl. Phys.* **47**, 285403 (2014).
171. Reszka, K. J., McCormick, M. L., Buettner, G. R., Michael Hart, C. & Britigan, B. E. Nitric oxide decreases the stability of DMPO spin adducts. *Nitric Oxide* **15**, 133–141 (2006).
172. Priya Arjunan, K. & Morss Clyne, A. Hydroxyl Radical and Hydrogen Peroxide are Primarily Responsible for Dielectric Barrier Discharge Plasma-Induced Angiogenesis. *Plasma Process. Polym.* **8**, 1154–1164 (2011).

173. Bancirova, M. Sodium azide as a specific quencher of singlet oxygen during chemiluminescent detection by luminol and Cypridina luciferin analogues. *Luminescence* **26**, 685–688
174. Zang, L. Y., Zhang, Z. Y. & Misra, H. P. EPR studies of trapped singlet oxygen (1O₂) generated during photoirradiation of hypocrellin A. *Photochem. Photobiol.* **52**, 677–683 (1990).
175. Foote, C. S. *Singlet Oxygen*, eds. HH Wasserman and RW Murray. (Academic Press, New York, 1979).
176. Kawasaki, T. *et al.* Detection of reactive oxygen species supplied into the water bottom by atmospheric non-thermal plasma jet using iodine-starch reaction. *Jpn. J. Appl. Phys.* **54**, 086201 (2015).
177. Gracanin, M., Hawkins, C. L., Pattison, D. I. & Davies, M. J. Singlet-oxygen-mediated amino acid and protein oxidation: Formation of tryptophan peroxides and decomposition products. *Free Radic. Biol. Med.* **47**, 92–102 (2009).
178. Zhou, R. *et al.* Interaction of Atmospheric-Pressure Air Microplasmas with Amino Acids as Fundamental Processes in Aqueous Solution. *PLOS ONE* **11**, e0155584 (2016).
179. Roche, M., Rondeau, P., Singh, N. R., Tarnus, E. & Bourdon, E. The antioxidant properties of serum albumin. *FEBS Lett.* **582**, 1783–1787
180. Az-ma, T., Fujii, K. & Yuge, O. Reaction between imidazolineoxil N-oxide (carboxy-PTIO) and nitric oxide released from cultured endothelial cells: quantitative measurement of nitric oxide by ESR spectrometry. *Life Sci.* **54**, PL185-190 (1994).
181. Akaike, T. *et al.* Antagonistic action of imidazolineoxyl N-oxides against endothelium-derived relaxing factor/.bul.NO (nitric oxide) through a radical reaction. *Biochemistry* **32**, 827–832 (1993).
182. Gorbanev, Y., Stehling, N., O'Connell, D. & Chechik, V. Reactions of nitroxide radicals in aqueous solutions exposed to non-thermal plasma: limitations of spin trapping of the plasma induced species. *Plasma Sources Sci. Technol.* **25**, 055017 (2016).
183. Puač, N. *et al.* Sterilization of bacteria suspensions and identification of radicals deposited during plasma treatment. *Open Chem.* **13**, (2014).
184. Dobrynin, D., Fridman, A. & Starikovskiy, A. Y. Reactive Oxygen and Nitrogen Species Production and Delivery Into Liquid Media by Microsecond Thermal Spark-Discharge Plasma Jet. *IEEE Trans. Plasma Sci.* **40**, 2163–2171 (2012).
185. Takamatsu, T. *et al.* Bacterial Inactivation in Liquids Using Multi-Gas Plasmas. *Plasma Med.* **2**, (2012).
186. Lukes, P., Dolezalova, E., Sisrova, I. & Clupek, M. Aqueous-phase chemistry and bactericidal effects from an air discharge plasma in contact with water: evidence for the formation of peroxyxynitrite through a pseudo-second-order post-discharge reaction of H₂O₂ and HNO₂. *Plasma Sources Sci. Technol.* **23**, 015019 (2014).
187. Girard, F. *et al.* Formation of reactive nitrogen species including peroxyxynitrite in physiological buffer exposed to cold atmospheric plasma. *RSC Adv.* **6**, 78457–78467 (2016).

188. Toledo, J. C. & Augusto, O. Connecting the Chemical and Biological Properties of Nitric Oxide. *Chem. Res. Toxicol.* **25**, 975–989 (2012).
189. Mannick, J. B. & Schonhoff, C. M. Nitrosylation: the next phosphorylation? *Arch. Biochem. Biophys.* **408**, 1–6 (2002).
190. Ischiropoulos, H. Biological selectivity and functional aspects of protein tyrosine nitration. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **305**, 776–783 (2003).
191. Liu, D. X. *et al.* Aqueous reactive species induced by a surface air discharge: Heterogeneous mass transfer and liquid chemistry pathways. *Sci. Rep.* **6**, 23737 (2016).
192. Baret, A. & Emerit, I. Variation of superoxide dismutase levels in fetal calf serum. *Mutat. Res. Lett.* **121**, 293–297 (1983).
193. Torres, J. & Wilson, M. T. The reactions of copper proteins with nitric oxide. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Bioenerg.* **1411**, 310–322 (1999).
194. Lundberg, J. O., Weitzberg, E. & Gladwin, M. T. The nitrate–nitrite–nitric oxide pathway in physiology and therapeutics. *Nat. Rev. Drug Discov.* **7**, 156–167 (2008).
195. Kim, S. J. & Chung, T. H. Cold atmospheric plasma jet-generated RONS and their selective effects on normal and carcinoma cells. *Sci. Rep.* **6**, 20332 (2016).
196. Arnold, M. *et al.* Global patterns and trends in colorectal cancer incidence and mortality. *Gut* **66**, 683–691 (2017).
197. Wang, M. *et al.* Cold atmospheric plasma for selectively ablating metastatic breast cancer cells. *PLoS One* **8**, e73741 (2013).
198. Fugelli, K. Regulation of cell volume in flounder (*Pleuronectes flesus*) erythrocytes accompanying a decrease in plasma osmolarity. *Comp. Biochem. Physiol.* **22**, 253–260 (1967).
199. Mailloux, R. J. Teaching the fundamentals of electron transfer reactions in mitochondria and the production and detection of reactive oxygen species. *Redox Biol.* **4**, 381–398 (2015).
200. Gozuacik, D. *et al.* DAP-kinase is a mediator of endoplasmic reticulum stress-induced caspase activation and autophagic cell death. *Cell Death Differ.* **15**, 1875–1886 (2008).
201. Zalckvar, E. *et al.* A systems level strategy for analyzing the cell death network: implication in exploring the apoptosis/autophagy connection. *Cell Death Differ.* **17**, 1244–1253 (2010).
202. Tanaka, H. *et al.* Non-thermal atmospheric pressure plasma activates lactate in Ringer's solution for anti-tumor effects. *Sci. Rep.* **6**, 36282 (2016).
203. Sato, Y. *et al.* Effect of Plasma-Activated Lactated Ringer's Solution on Pancreatic Cancer Cells In Vitro and In Vivo. *Ann. Surg. Oncol.* **25**, 299–307 (2018).
204. Lin, A. *et al.* Uniform Nanosecond Pulsed Dielectric Barrier Discharge Plasma Enhances Anti-Tumor Effects by Induction of Immunogenic Cell Death in Tumors and Stimulation of Macrophages. *Plasma Process. Polym.* **12**, 1392–1399 (2015).
205. Miller, V., Lin, A. & Fridman, A. Why Target Immune Cells for Plasma Treatment of Cancer. *Plasma Chem. Plasma Process.* **36**, 259–268 (2016).

206. Mutschelknaus, L. *et al.* Exosomes Derived from Squamous Head and Neck Cancer Promote Cell Survival after Ionizing Radiation. *PLoS One* **11**, e0152213 (2016).
207. Bialik, S., Zalckvar, E., Ber, Y., Rubinstein, A. D. & Kimchi, A. Systems biology analysis of programmed cell death. *Trends Biochem. Sci.* **35**, 556–564 (2010).
208. Hara, H., Taniguchi, M., Kobayashi, M., Kamiya, T. & Adachi, T. Plasma-activated medium-induced intracellular zinc liberation causes death of SH-SY5Y cells. *Arch. Biochem. Biophys.* **584**, 51–60 (2015).
209. Iseki, S. *et al.* Selective killing of ovarian cancer cells through induction of apoptosis by nonequilibrium atmospheric pressure plasma. *Appl. Phys. Lett.* **100**, 113702 (2012).