



Université de Montréal

Application radio-oncologique d'un plasma jet, l'APGD-t,  
pour le traitement de cancer du sein

par

Ahlem Mahfoudh

Département de Physique  
Faculté des Arts et des Sciences

Mémoire présenté à la Faculté des études supérieures  
en vue de l'obtention du grade de Maître ès Sciences (M.Sc.) en Physique  
*Option Physique médicale*

Présidente : Joëlle Margot  
Directeur : Jean-François Carrier  
Codirecteur : Philip Wong  
Membre du jury : Stéphane Bedwani

Août, 2017

© Ahlem Mahfoudh, 2017

## Résumé

Le travail effectué dans cette étude s'inscrit dans le cadre de la recherche et du développement de nouveaux traitements du cancer utilisant un procédé plasma. Selon de récentes études, le traitement par plasma des cellules cancéreuses semblerait être une technique très prometteuse. Parmi les caractéristiques du plasma non-thermique qui en font un bon candidat pour éradiquer les cellules cancéreuses, on trouve **(a)** la présence d'espèces oxydantes chimiquement très réactives, **(b)** une faible température respectant l'intégrité des tissus biologiques et **(c)** la possibilité d'un traitement localisé tout en préservant les régions avoisinantes... Les résultats très encourageants sur les traitements *in-vivo* et *in-vitro*, ainsi que la possibilité d'un traitement sélectif laisse entrevoir un futur prometteur pour les technologies plasmas en thérapie oncologique.

La source de plasma utilisée dans cette étude est l'APGD-t (*Atmospheric plasma glow discharge-torch*) qui génère un plasma froid à la pression atmosphérique à partir d'un mélange He+O<sub>2</sub>. Après avoir caractérisé la décharge plasma, nous avons testé cette technologie sur plusieurs lignées tumorales (STS117, MCF7, MDA-MB-231). Après avoir optimisé les paramètres d'exposition permettant de maintenir l'adhésion cellulaire et, idéalement, d'induire une perméabilisation des cellules, nous avons constaté que s'il n'y avait pas de sillons durant l'exposition, l'efficacité du traitement était fortement réduite : les taux de mortalité ne dépassaient pas les 20%. Par contre, en présence de sillons, on atteint de hauts taux de mortalité (supérieur à 90%) comme le montre l'utilisation d'un double marquage Dapi/Calcein AM des cellules. Ces sillons générés par l'application du jet de plasma dans le milieu de culture cellulaire (recouvrant les cellules) permettent au plasma de traiter efficacement les cellules tumorales. Toutefois, on découvre que pour des conditions d'opération plasma induisant de sévères modifications de la morphologie de la cellule, la méthode d'analyse FACS (Cytométrie en flux) devient inappropriée puisque les taux de mortalité sont sous-estimés et qu'elle identifie l'apoptose précoce comme le principal mécanisme menant à la mort cellulaire 24h après leur traitement. Les conditions létales pour les cellules cancéreuses ayant été définies, nous avons voulu explorer la possibilité d'observer la sélectivité lors d'un traitement utilisant l'APGD-t. Des résultats prometteurs nous ont permis d'identifier des

conditions d'opération du plasma pour lesquelles le traitement est sélectif. Par contre, durant ces derniers tests, la reproductibilité des résultats s'est complexifiée : des changements observés de la température du gaz d'Hélium pourraient avoir été causés par des modifications opératoires (remplacement de la bonbonne d'Hélium, variation des conditions atmosphériques...). Les résultats in-vitro présentés dans ce mémoire confirment, en utilisant une nouvelle source plasma l'APGD-t, que les jets de plasmas froids peuvent traiter de façon sélective des cellules cancéreuses du sein, ce qui donne un réel espoir quant à leurs futures applications cliniques pour le traitement du cancer du sein.

**Mots-clés** : *plasma froid, APGD-t, cancer, cellules tumorales, cancer du sein, oncologie, physique, biomédicale, FACS, apoptose.*

## Abstract

This study takes place in the context of research and development of new cancer treatments using plasma technology: a recently discovered new application of plasma discharges. The latest scientific studies show that cancer cells (also including breast cancer cells) treatment with plasma has a promising future. Main characteristics that made non-thermal plasma a good candidate to eradicate cancer cells are (a) the production of a variety of reactive oxygen species (ROS), (b) the weak temperature operating conditions which respect biological tissues integrity, and (c) the possibility of a precise local treatment preserving adjacent area... Very good results in *in-vitro* and *in-vivo* treatments and, also, the possibility to have selectivity between healthy and tumoral cells let us see a promising future for clinical applications in oncological therapy.

The plasma source used in this study is the APGD-t (*Atmospheric plasma glow discharge-torch*) which generates a He+O<sub>2</sub> atmospheric non-thermal plasma discharge. This plasma was firstly characterized electrically; after that, this non-thermal plasma was used to treat cancer cells like STS117 (sarcoma) and MCF7, MDA-MB-231 (breast cells). After optimizing experimental parameters to avoid cells detachment and, ideally, inducing permeability in treated cells, we noticed that if no furrow (or track) was observed, treatment efficacy was reduced since mortality rate never exceed 20%. Nevertheless, if furrows (or tracks) are observed during plasma treatment, mortality rate can reach more than 90% as Dapi/Calcein AM staining shows. If damages induced by plasma treatment involve severe morphological changes of cells, FACS analysis become inappropriate since results are underestimated (because of, amongst others, the weak number of cells detected). These furrows generated by application of the plasma jet on the media (which covered cells) allow the plasma to treat cells effectively. As we were able to identify lethal experimental conditions, the existence of selectivity using APGD-t treatment was explored. Result seems very hopeful. Indeed, we found some experimental settings providing us to have selectivity by killing cancer cells (MCF7 and MDA-MB-231) and preserving healthy cells (Arpe). However, during these latest tests, the reproductibility of the results was more complex: the observed changes of the He gas temperature may have been due to changes in the operating conditions (replacing the

He bottle, variation in atmospheric conditions...). The in-vitro results presented in this thesis clearly confirm that the jet of a cold plasma, namely APGD-t, can selectively treated tumoral breast cells, which really give real hope for future clinical applications in the breast cancer treatment.

**Keywords:** *plasma, cold plasma jet, cancer, cancer cells, breast cancer, oncology, physics, biomedical, FACS, apoptosis.*

# Table des matières

Résumé.....	i
Abstract.....	iii
Table des matières.....	v
Liste des tableaux.....	viii
Liste des figures .....	xi
Liste des sigles .....	xv
Liste des abréviations.....	xvii
Remerciements.....	xix
Introduction.....	1
CHAPITRE 1 Généralités et état des lieux.....	3
1.1 Description du plasma.....	3
1.1.1 Plasmas thermiques.....	4
1.1.2 Plasmas non-thermiques .....	4
1.2.3 Particularité des plasmas non-thermiques.....	5
1.2 Plasma: applications.....	5
1.2.1 Aperçu général des applications .....	6
1.2.2 Applications dans les sciences de la vie .....	6
1.3 Différents procédés plasmas .....	8
1.3.1 La DBD.....	8
1.3.2 La FE-DBD.....	9
1.3.3 L'APPJ.....	10
1.4 Volet Biologique : théorie et revue de littérature.....	12
1.4.1 Notions générales de biologie autour de la cellule cancéreuse.....	12
1.4.2 Études sur l'interaction plasma/cellules.....	16
1.5 Cancer du sein.....	29
1.5.1 Quelques statistiques.....	29

1.5.2 Traitement par plasma du cancer du sein: revue de la littérature .....	31
1.5.3 Traitement par une combinaison plasma/élément actif : revue de la littérature .....	32
1.5.4 Solutions prometteuses ?.....	33
CHAPITRE 2 Matériel et Méthodes.....	34
2.1 Volet Physique : Procédé Plasma .....	34
2.1.1 Montage expérimental général et source plasma .....	34
2.1.2 Éléments du montage : description .....	36
2.1.3 Paramètres opératoires .....	41
2.2 Volet Biologique : Étude au niveau cellulaire .....	41
2.2.1 Culture cellulaire : Méthodologie .....	42
2.2.2 Détection de la mort cellulaire.....	46
CHAPITRE 3 Résultats et Interprétation.....	57
3.1 Caractérisation physique du procédé plasma .....	57
3.1.1 Principe et caractérisation expérimentale .....	57
3.1.2 Résultats de la caractérisation du plasma.....	58
3.2 Résultats d'un traitement par plasma 'sans sillon' .....	63
3.2.1 Séries d'expériences d'optimisation des conditions opératoires .....	63
3.2.2 Perméabilisation.....	75
3.2.3 Résultat : quantification de l'efficacité du traitement 'sans sillon' .....	78
3.3 Résultats d'un traitement par plasma 'avec sillons' .....	86
3.3.1 Optimisation des conditions opératoires et quantification de l'efficacité du traitement : conditions 'fortes' d'exposition.....	86
3.3.2 Optimisation des conditions opératoires et quantification de l'efficacité du traitement : conditions d'exposition 'adoucies' .....	101
3.4 Comparaison avec les cellules saines : sélectivité ? .....	128
3.4.1 Cellules saines : Arpe.....	129
3.4.2 Cellules saines/cancéreuses : Arpe/MCF7/MDA-MB-231 .....	132
Synthèse et Conclusion.....	135



Annexe 1 <i>Proposition de mécanisme</i> basée sur l'étude menée par Dobrynin <i>et al.</i> [20].	vii
Annexe 2 : Synthèse bibliographique sur traitement par plasma des cellules cancéreuses du sein	ix
Annexe 3 : Exemples de programmes informatiques codant le balayage (axes X et Y) de l'APGD-t lors du traitement des cellules selon le type de substrat utilisé.	xvi
Annexe 4 Exemple de méthodologie d'optimisation des paramètres expérimentaux pour MCF7.	xvii
Annexe 5 : Données brutes des FACS analysant l'effet de la variation de la vitesse de balayage sur les cellules.	xx
Annexe 6 : Données brutes des FACS analysant des cellules traitées dans des conditions 'fortes' en présence de sillon.	xxiii
Annexe 7: Optimisation des paramètres (débit/voltage) des cellules MDA-MB-231 pour une hauteur de milieu de culture cellulaire 1.1 mm.	xxiv
Annexe 8 : Images MDA-MB-231 marquées après traitement et observées au grossissement (x10) 48h après exposition au plasma.	xxxï
Annexe 9 : Tableau de synthèse sur l'étude de la sélectivité et la reproductibilité des données.	xxxv
Annexe 10 : Schématisation de la séquence expérimentale adoptée dans cette étude.	xliii

## Liste des tableaux

Tableau I. Illustration de quelques résultats expérimentaux <i>in-vivo</i> issus de la littérature....	29
Tableau II. Paramètres opératoires pouvant être fixes ou variables durant l'étude expérimentale .....	41
Tableau III. Informations de base caractéristiques pour chaque lignée cellulaire utilisée dans cette étude. La densité cellulaire de référence a été déterminée expérimentalement pour avoir une confluence cellulaire ~80%.....	43
Tableau IV. Caractéristiques des marqueurs ou colorants utilisés dans cette étude.....	47
Tableau V. Test de sécheresse effectué sur MCF7 et STS117 (pipette Pasteur utilisé pour sécher le substrat).....	65
Tableau VI. Récapitulatif des conditions et résultats suite à l'optimisation de la quantité de milieu pour éviter le détachement cellulaire. Initialement, les hauteurs testées varient de 1mm à 1.7mm. (Notation : permeab = perméabilisation).....	66
Tableau VII. Influence de la hauteur du milieu au dessus des cellules sur l'arrachement et la perméabilisation suite au traitement par plasma (APGD-t) des cellules STS117.....	68
Tableau VIII. Récapitulatif des conditions et résultats visant l'optimisation du débit de gaz pour éviter le détachement cellulaire (en tenant compte de l'optimisation de la quantité de milieu). FBU sont des cellules saines. (Notation : permeab = perméabilisation ; Dx : DC=x%).	70
Tableau IX. Images de STS117 prises au microscope pour visualiser l'effet de la variation de DC dans les conditions d'exposition suivantes : 0.7 slm He, 30sccm O <sub>2</sub> et 850Vpp. ....	71
Tableau X. Résultat sur l'arrachement cellulaire pour deux fortes valeurs de voltage et différents volumes de milieu. Ce tableau représente l'étape finale d'une série d'expériences d'optimisation des paramètres (Notation : Arr=arrachement cellulaire ; D=DC).....	72
Tableau XI. Résultats observés sur le détachement des cellules lorsque la vitesse et les débits de gaz varient. a : MDA-MB-231 et b :MCF7. 400 step=1mm.....	74
Tableau XII. Effet de la vitesse de balayage sur les cellules MCF7 pour deux débits de gaz. Cellulesensemencées dans moule ou insert rectangulaire en silicone (volume=300µL ;	

S=0.9 cm <sup>2</sup> ) dans le but de se mettre dans les mêmes conditions que l'expérience du FACS ; les moules sont placés au centre du Pétri. ....	75
Tableau XIII. Perméabilité induite par le traitement au plasma dépend des conditions de traitements et de la nature de la cellule. ....	77
Tableau XIV. Tableaux (i) regroupant les observations pendant traitement (950V, DC=3%, He+O <sub>2</sub> ) et celles au microscope, et, (ii) représentant les images au microscope de cellules traitées et colorées au Dapi et à la Calcein AM. 400 steps/s= 1mm/s et 2000 steps/s = 5mm/s... ..	89
Tableau XV. Effet de la variation du voltage et de DC sur les cellules, dans 1mm de hauteur de milieu nutritif, traitées au plasma : images au microscope de cellules traitées puis colorées au Dapi et à la Calcein AM. 400 steps/s= 1mm/s et 2000 steps/s = 5mm/s. ....	90
Tableau XVI. Effet de la variation du voltage et de DC sur les cellules, dans 1.1mm de hauteur de milieu nutritif, traitées au plasma : images au microscope de cellules traitées puis colorées au Dapi et à la Calcein AM. 400 steps/s= 1mm/s et 2000 steps/s = 5mm/s. ....	92
Tableau XVII. Effet de la variation du débit sur les cellules traitées au plasma pour 2 hauteurs différentes de milieu nutritif: images au microscope de cellules traitées puis colorées au Dapi et à la Calcein AM. ....	93
Tableau XVIII. Résultat du test de dessiccation effectué sur MDA-MB-231. ....	95
Tableau XIX. Description des conditions opératoires utilisées pour l'analyse FACS des cellules MDA-MB-231 traitées par plasma. ....	97
Tableau XX. Extrait des données du tableau général de résultats FACS présentés à l'Annexe 5. A : Échantillons, B : Comptes, C : Nécrose (%), D : Apoptose tardif (%), E : Apoptose précoce (%), F : Survivants (%). ....	99
Tableau XXI. Effet de la variation du DC(%) pour deux valeurs de voltage sur les cellules traitées au plasma pour une hauteur de milieu de 1.1 mm: images au microscope de cellules traitées puis colorées au Dapi et à la Calcein AM. ....	103
Tableau XXII. Effet de la variation du DC(%) pour deux valeurs de voltage sur les cellules traitées au plasma pour une hauteur de milieu de 1 mm: images au microscope de cellules traitées puis colorées au Dapi et à la Calcein AM. ....	105

Tableau XXIII. prises au microscope pour (a) MCF7 et (b) MDA-MB-231 : conditions expérimentales adoucies permettant d’obtenir un haut taux de mortalité et un haut degré d’adhésion cellulaire. Compte Dapi.....	110
Tableau XXIV. Description des conditions opératoires utilisées pour l’analyse FACS des cellules MDA-MB-231 et MCF7 traitées par plasma en présence de sillons (conditions adoucies). Notations : Tp signifie échantillon témoin (cellulesensemencées sur Pétri sans insert) .....	111
Tableau XXV. Résultats bruts issus de l’analyse par FACS des cellules MCF7 (A) et MDA-MB-231 (B) dans les conditions présentées au tableau X. ....	112
Tableau XXVI. Évaluation du débit de gaz sur la viabilité des cellules saines. Zéro volts (0 Vpp) signifie que les cellules sont traitées uniquement au gaz et, donc, sans plasma.....	130
Tableau XXVII. Tableau récapitulatif et version synthétisée des résultats d’exposition de cellules Arpe au plasma. ....	131

## Liste des figures

Figure 1.	Les 4 états de la matière [60] .....	3
Figure 2.	Formation d'un plasma à partir (A) d'une DBD, et (B) d'une FE-DBD [60] .....	9
Figure 3.	Exemples de plasmas créés par (A) une FE-DBD et (B) un 'plasma gun' (Source Keidar <i>et al.</i> 2015) .....	10
Figure 4.	Formation d'un plasma à partir (A) d'un plasma jet (APPJ), et (B) d'un plasma 'needle'[60] .....	11
Figure 5.	Plasma jet étudié par Joh et al et créé à partir d'Hélium et d'Oxygène (Source Joh <i>et al.</i> 2014). .....	12
Figure 6.	Coupe d'une cellule eucaryote et éléments principaux qui la composent. ....	14
Figure 7.	a) Évolution du nombre de publications concernant les études sur le traitement par plasma de cellules cancéreuses, de 2007 à 2016. Proportions relatives des types de cancer étudiés pour les traitements par plasma [56].....	15
Figure 8.	A gauche, schéma du cycle cellulaire. A droite, schéma représentant l'arrêt du cycle cellulaire induit par des dommages à l'ADN. ....	23
Figure 9.	Schémas représentant le lien entre le niveau de ROS et le cancer (Source Keidar <i>et al.</i> 2015). ....	24
Figure 10.	Différence de sensibilité au traitement plasma entre cellules saines et tumorales : zone optimale de traitement permettant la sélectivité (Source H. Kajiyama <i>et al.</i> , 2016). ....	25
Figure 11.	Schématisation du principe du traitement indirect des cellules par plasma : Exposition du milieu nutritif puis mise en contact avec les cellules (Source Keidar <i>et al.</i> 2015). ....	27
Figure 12.	Rapport statistique effectuée par la Société Canadienne du Cancer sur le pourcentage des décès par cancer ainsi que les nouveaux cas estimés en 2017 chez les femmes. ....	29
Figure 13.	Statistiques canadiennes sur le cancer de sein chez les hommes et les femmes en 2017. ....	30

Figure 14.	Photo prise en laboratoire du système expérimental permettant de générer un plasma à la PA (APGD-t).	34
Figure 15.	Schéma du système (APGD-t) où est généré le plasma à la PA. A droite, la photo montre le jet de plasma en sortie de la source.	35
Figure 16.	Représentation schématique du procédé expérimental ‘physique’ utilisée dans cette étude (équivalent à la photo de la figure 14).	37
Figure 17.	Écran tactile de la boîte d’alimentation du système plasma	38
Figure 18.	Oscilloscope digital et illustration des signaux de courant et tension mesurés avec les valeurs caractéristiques liées aux signaux comme $V_{pp}$ , $V_{rms}$ , $I_{pp}$ , $I_{rms}$ et Phase (à droite de l’écran).	39
Figure 19.	Système plasma maintenu sur un ‘T’ et plateforme mobile (2D) avec un moteur pour chaque direction. Positionnement de la source de plasma par rapport au Pétri lors d’un traitement au plasma des cellules.	40
Figure 20.	Écran de contrôle des débitmètres et du moteur sur l’ordinateur portable.	40
Figure 21.	Hotte à flux laminaire, environnement stérile, contenant le matériel nécessaire pour compter, ensemençer ou faire un passage cellulaire. Exemple d’échantillons préparés pour l’étude quantitative.	45
Figure 22.	Liste des principales applications de la cytométrie en flux.	50
Figure 23.	Représentation schématique d’un cytomètre en flux.	51
Figure 24.	Diffusions possibles du signal lumineux après une interaction laser/cellule.	52
Figure 25.	Réorientation de molécules constituant la bicouche lipidique de la membrane cellulaire [54].	54
Figure 26.	Schéma représentant les 4 populations de cellules possibles : chaque quadrant (Q1-Q2-Q4) est associé au mécanisme responsable de la mort des cellules traitées par un agent anti-cancer tel que Q1= nécrose, Q2= apoptose tardif, Q4= apoptose précoce, Q3= cellules vivantes.	54
Figure 27.	(a) Puissance dissipée, en Watt, en fonction de DC pour différentes valeurs de tension variant de 600V à 1kV ; (b) Puissance dissipée, en Watt, en fonction de la tension appliquée pour différentes valeurs de DC variant de 1% à 5%. Chaque graphique a été obtenu de manière indépendante.	58

Figure 28. Puissance dissipée, en Watt, en fonction du débit d'O<sub>2</sub> variant de 0 à 600 sccm, et ce pour 2 valeurs de DC (1% et 4%) avec un voltage appliqué de (a) 600V, (b) 800V et (c) 900V. (d) Puissance dissipée, en Watt, en fonction de DC pour différents voltage et un débit fixe d'O<sub>2</sub> de 30 sccm..... 60

Figure 29. (a) Puissance dissipée, en Watt, en fonction du débit d'O<sub>2</sub> pour différents voltages appliqués et différentes valeurs de DC (1% et 4%). (b) Superposition des graphiques obtenus pour 1.5 lpm ,1 lpm et 0.5 lpm d'He. .... 60

Figure 30. Puissance dissipée en fonction du voltage et de DC ; comparaison pour DC=1% avec les données antérieures dans le cas d'un plasma d'He avec et sans O<sub>2</sub>..... 62

Figure 31. (a) Puissance dissipée en fonction de DC et du voltage; (b) Puissance dissipée en fonction du voltage pour DC=1% ; les courbes associées à DC=3% et DC= 4% ont été déterminées par calcul à partir de la courbe expérimentale (DC=1%). ..... 62

Figure 32. Images microscopes de cellules tumorales (a) MCF7 et (b) STS117 traitées dans les conditions suivantes : (a) : 900 V, D3, 1slm He, 30 sccm O<sub>2</sub> et hauteur de milieu optimale de 1.35-1.40mm et (b) 900 V, D3, 1slm He, 30 sccm O<sub>2</sub> et hauteur de milieu optimale de 1.30-1.35mm. Photos prises pour une hauteur de milieu commune de 1.35mm .. 76

Figure 33. Résultats d'une analyse par FACS de cellules STS117 traitées au plasma pour différentes valeurs de voltage et de DC (*hauteur du milieu 1.2mm*). ..... 79

Figure 34. Exposition de cellules STS117 et MCF7 dans différentes conditions plasma, pour deux temps d'incubation : les résultats de l'analyse FACS (B et C) et du test clonogénique (A) sont présentés. tm : échantillon témoin..... 81

Figure 35. Conditions expérimentales et résultat de l'analyse FACS de STS117 et MCF7: effet de la vitesse de balayage (expérience exploratoire). \*Espacement entre chaque ligne de traitement; \*\* environ 20 min de traitement; \*\*\* temps d'exposition supérieur à 1h..... 83

Figure 36. Résultat de l'analyse FACS des cellules MDA-MB-231 traitées au plasma (voir conditions opératoires) pour 3 vitesses de balayage. .... 85

Figure 37. Effet de la variation de la vitesse de traitement sur les cellules : images prises au microscope. A) MDA-MB-231 et B) MCF7. 40 stps/s = 0.1mm/s et 20 stps/s= 0.05mm/s (rappel: 400 steps=1mm) ..... 85

Figure 38. Photo de cellulesensemencées/incubées dans des inserts rectangulaires et circulaires. .... 96

Figure 39.	Pourcentage de cellules mortes des échantillons ayant eu un nombre de comptes ‘acceptable’. Notations : TbigG :TG et TbigM :TM.....	98
Figure 40.	Représentation des diagrammes obtenus par la méthode FACS et associés aux données de la figure 39. ....	98
Figure 41.	Représentations graphiques (i) du taux de mortalité et (ii) des proportions relatives des mécanismes menant à la mort cellulaire, impliqués pour chaque condition de traitement des cellules MDA-MB-231 et déterminées à partir (iii) des diagrammes obtenus. Données enregistrées par le FACS. ....	114
Figure 42.	Résultats obtenus à partir du FACS analysant l’effet de la vitesse de balayage... .....	115
Figure 43.	Représentations graphiques (i) du taux de mortalité et (ii) les proportions relatives des mécanismes impliqués pour chaque condition de traitement des cellules MCF7. Données enregistrées par le FACS. ....	116
Figure 44.	Diagrammes obtenus pour chaque condition d’exposition au plasma montrant la proportion de cellules MCF7 vivantes et celles mortes par apoptose (early and late apoptosis) et par nécrose.....	118
Figure 45.	Résultat du FACS explorant l’effet de la vitesse de balayage balayage (1mm/s, 0.5 mm/s et 0.1 mm/s) dans le traitement des cellules MCF7.....	119
Figure 46.	Images des cellules MCF7 24h après leur traitement au plasma et précédent l’analyse FACS.....	120
Figure 47.	Cellules exposées dans les mêmes conditions expérimentales du FACS, présentent les mêmes caractéristiques et semblent capter la molécule de DAPI 24h après traitement quelque soit les conditions de traitement et la lignée cellulaire. ....	127
Figure 48.	Images au microscope des cellules Arpe traitées à un débit de 0.9 lpm He+30scm O <sub>2</sub> et une hauteur de milieu de 1mm (a) à 750V, DC=3%, et (b) 800V, DC=1%.... .....	131
Figure 49.	Photos prises au microscope illustrant la sélectivité d’un traitement des cellules utilisant l’APGD. Les nombres entre parenthèses correspondent aux nombres de cellules perméabilisées comptabilisés sur les photos prises avec le Dapi. ....	134



## Liste des sigles

APGD-t : Décharge plasma ‘lumineuse’ à la pression atmosphérique (torche)	
	<i>Atmospheric plasma glow discharge-torch</i>
RTE : Radiothérapie externe	
RF : Radiofréquence	
AC : Courant alternatif	<i>Alternative current</i>
DC : Courant continu	<i>Direct current</i>
BP : Basse pression	
ETL : Équilibre Thermodynamique Local	
Te : Température électronique	
Tg : Température du gaz	
Tamb : Température ambiante	
PA : Pression atmosphérique	
ROS : Espèces oxygénées/oxydantes réactives	Reactive oxygenated species
RONs : Espèces oxygénées et azotées réactives	Reactive oxygen nitrogen species
°C : Degré Celcius	
DBD : Décharge à barrière diélectrique	
FE-DBD : Décharge à barrière diélectrique avec électrode flottante	<i>Floating-electrode DBD</i>
APPJ : Jet de plasma à la pression atmosphérique	<i>Atmospheric pressure plasma jet</i>
ADN : Acide désoxyribonucléique	
J : Joule	
UV : Ultraviolet	
TRAIL-R1: <i>Tumor necrosis factor relatef apoptosis inducing ligand</i>	
NAC : N-acétyl cystéine	<i>N-acetyl cystein</i>
RT : Radiothérapie	
Vs : Versus	
BW : Largeur spectral	<i>Band width</i>
DC: Duty cycle	
Vpp: Tension sommet à sommet	<i>Voltage peak to peak</i>

Vrms : Tension efficace	<i>root mean square voltage</i>
Ipp : Courant sommet à sommet	<i>Current peak to peak</i>
Irms : Courant efficace	<i>root mean square current</i>
FACS : Cytométrie en flux	<i>Fluorescence-activated cell sorting</i>
PI : Iodure de propidium	<i>Propidium Iodide</i>
PBS : Solution tampon phosphaté	<i>Phosphate buffer solution</i>
CV : Crystal violet	
NEE : Nombre d'évènement enregistré	

## Liste des abréviations

Fig. : Figure

Tab. : Tableau

mW : milliwatt

cm<sup>3</sup> : centimètre cube

sccm : centimètre cube par minute *standard cubic centimeter per minute*

s : seconde

min : minute

ex. : exemple

μs :microseconde

nm : nanomètre

kDa : kilodalton

3D : 3 dimensions

MHz : Méga Hertz

eV : électron-volt

lpm : litre par minute

slm : litre par minute *standard liter per minute*

h :heure

mL : milli-litre

g : accélération de la pesanteur

Gy : Gray

cf. : se conférer à

Etc. : Et cætera

*Pensée profonde aux malades du cancer et à ceux qui nous ont quittés...*

## Remerciements

J'aimerais remercier tout d'abord mon directeur de recherche, le professeur et physicien médical Jean-François Carrier pour m'avoir permis de mener ce sujet de recherche et de m'avoir continuellement offert, dans la mesure du possible, les moyens nécessaires pour conduire à bien mes travaux. Je tiens à le remercier pour ses grandes qualités humaines et scientifiques. J'exprime également mes sincères remerciements aux membres du jury d'avoir accepté d'évaluer mon mémoire de maîtrise. Je vous suis reconnaissante, à l'avance, pour avoir donné de votre temps précieux et pour vos pertinents commentaires apportés sur cette thèse.

J'aimerais également remercier Valérie Léveillé pour son soutien, son dynamisme, son enthousiasme et sa grande disponibilité. Je remercie aussi Philip Wong pour m'avoir accepté dans son équipe au CR-CHUM et m'avoir offert les moyens permettant de mener au mieux ce travail de recherche. Je tiens particulièrement à le remercier pour sa disponibilité, ses qualités scientifiques et humaines. Au sein de cette équipe, je tiens aussi à remercier Julie Lafontaine pour m'avoir initié à la culture cellulaire. Plus généralement, je remercie les membres de l'équipe Rodier du CR-CHUM et Stéphane Bedwani (HND) pour l'apport scientifique apporté tout au long de cette étude, notamment en apportant des réponses à mes questions dans les conditions les plus agréables. Merci pour votre disponibilité, votre sympathie et votre sourire ☺.

Également j'exprime ma gratitude envers nos techniciens/ingénieurs Sylvain et Tony dont l'apport est toujours très précieux et dont la contribution est fondamentale. Merci pour votre sympathie, votre aide et votre patience. J'exprime aussi ma gratitude envers Danielle Kéroack, assistante de recherche en physique des plasmas, pour sa disponibilité. Merci Dada!

Je remercie les étudiants et résidents du groupe de physique médicale de HND pour leur sympathie et leur présence, notamment Angélique Pirenne qui est toujours présente! Merci d'avoir pris le temps de m'écouter. Je remercie, d'ailleurs, toutes les personnes formidables que j'ai pu rencontrer durant ces deux années et qui ont contribué à mon épanouissement... Un très grand merci à vous tous.

Merci infiniment à mes chers parents pour leur soutien constant, leur patience et leurs encouragements durant cette maîtrise et tout au long de mes études... merci d'avoir toujours été là pour me pousser à aller de l'avant et garder confiance en moi! Merci aussi à mes chers beaux-parents pour leur agréable et permanent support, notamment, dans les périodes difficiles. Un merci aussi à ma meilleure amie qui, par ses précieux conseils et sa gentillesse, m'a toujours été d'un grand réconfort. Enfin, j'exprime ma profonde gratitude à mon très cher mari pour ses encouragements, ses précieux conseils, et surtout pour tous ses efforts à m'aider à réaliser mes objectifs. Aussi, je le remercie sincèrement de m'avoir soutenu et "boosté" lors des moments difficiles traversés durant ces deux années. Et un gros bisou pour ma petite chérie que j'aime!

## Introduction

En dépit des avancées en sciences de la médecine, le cancer reste une des plus importantes maladies du siècle et représente la seconde cause de mortalité après les maladies cardiovasculaires. Selon la Société Canadienne du Cancer, on prévoit que près de 1 Canadien sur 2 recevra un diagnostic de cancer au cours de sa vie, et une personne sur quatre en mourra : ils estiment qu'il y aura 206 200 nouveaux cas de cancer et 80 800 décès causés par cette maladie au Canada en 2017. On estime aussi qu'environ 1 Canadienne sur 8 sera atteinte d'un cancer du sein au cours de sa vie et que 1 sur 31 en mourra. L'augmentation du taux de cancers dans la population est très inquiétante, alors qu'une réduction du taux de mortalité à un stade précoce de la maladie illustre tout l'effort colossal et le travail de recherche et de développement effectué par des équipes scientifiques multidisciplinaires (physiciens, ingénieurs biomédicaux, médecins...).

Les 3 méthodes conventionnelles de traitement du cancer, dont le cancer de sein, sont l'ablation de la tumeur par une chirurgie, la chimiothérapie et la radiothérapie : ces méthodes ont prouvé leur efficacité mais présentent, tout de même, des limitations (ablation incomplète, résistance aux drogues et d'importants effets secondaires, coût excessif des équipements et la non-sélectivité du traitement...).

Plusieurs nouvelles techniques ont vu le jour et donnent de bons résultats. Toutefois, il n'existe pas encore aujourd'hui de traitements cliniques qui évitent ces complications [6,32]. Le grand défi serait de pouvoir trouver une méthode thérapeutique contre le cancer permettant d'attaquer sélectivement les cellules tumorales en préservant les cellules saines. Parmi les études en cours, on remarque que le traitement par plasma des cellules cancéreuses semblerait être une technique très prometteuse puisqu'elle permet un traitement localisé, contrôlé, induisant une mort propre des cellules traitées, sans influencer les cellules au voisinage et, dans certaines conditions, il semblerait possible de traiter sélectivement les cellules malignes sans affecter les cellules saines (études *in-vivo* et *in-vitro*) ; peu coûteux et facile d'utilisation, le traitement par plasma suscite de plus en plus d'intérêt [16, 20, 22,31,32,40]. De plus, seul ou combiné à d'autres méthodes, les résultats semblent satisfaisants et très prometteurs.

L'étude sur l'APGD-t (*Atmospheric Plasma Glow Discharge-torch*) vise, à long terme, le traitement intra-opératoire du cancer du sein : suite à l'ablation de la tumeur, le traitement par plasma du lit tumoral permettrait d'éradiquer les cellules cancéreuses encore présentes, réduisant ainsi la quantité de ces cellules dans la région d'intérêt et, par conséquent, diminuant fortement le risque de récurrence. Un autre grand avantage à ce traitement plasma est l'allègement du traitement par RTE (Radiothérapie Externe, traitement subséquent à la chirurgie) épargnant ainsi le patient d'une dose de radiation inutile, préservant alors les cellules saines et les organes à risque.

C'est dans cette optique que nous étudierons l'effet du plasma (APGD-t) sur les cellules cancéreuses de sein. A titre comparatif, nous traiterons aussi une lignée de sarcome, connu pour sa grande résistance à la radiothérapie. Nous utiliserons quelques méthodes expérimentales simples pour estimer l'effet du traitement sur ces cellules. Puis nous comparerons l'effet du traitement sur des cellules tumorales et saines et tenterons de déterminer des conditions pour lesquelles le plasma agirait, de manière sélective, sur les cellules malignes tout en préservant les cellules saines.

Ce mémoire se compose principalement de trois parties : dans un premier temps, une présentation générale sur la physique des plasmas et une revue de la littérature sur les études antérieures décrivant la possibilité au plasma d'être considéré comme un agent anti-cancer ; dans un second temps, une description du matériel et des méthodes utilisés durant cette étude sera présentée, puis dans un troisième temps, nous exposerons et discuterons les résultats obtenus.



# CHAPITRE 1

## Généralités et état des lieux

### 1.1 Description du plasma

Quatrième état de la matière, le plasma compose plus de 90% de l'univers visible : dans la nature, on retrouve le plasma principalement dans les étoiles ou dans les aurores boréales (Fig.1). En laboratoire, un plasma est généré en ionisant les espèces neutres (atomes/molécules) d'un gaz (non-conducteur) donnant lieu à un mélange de particules ionisées (électrons, ions), neutres, excités (émission de photons) et radicalaires (espèces chimiquement très réactives) : le milieu devient conducteur. Techniquement, la décharge est maintenue tant que la source d'énergie externe ou source d'excitation (généralement, un champ électromagnétique) est appliquée au gaz. L'excitation du gaz peut se faire de différentes manières : on peut citer les sources RF (Radio Fréquence), sources microondes, un haut voltage AC ou DC, dans un mode pulsé ou continu. Classiquement, la décharge peut être générée dans l'air, dans un gaz noble ou un mélange de gaz. Généralement, on classe les plasmas de laboratoire selon leur température : on définit alors les plasmas thermiques et non thermiques ayant chacun des caractéristiques bien spécifiques.

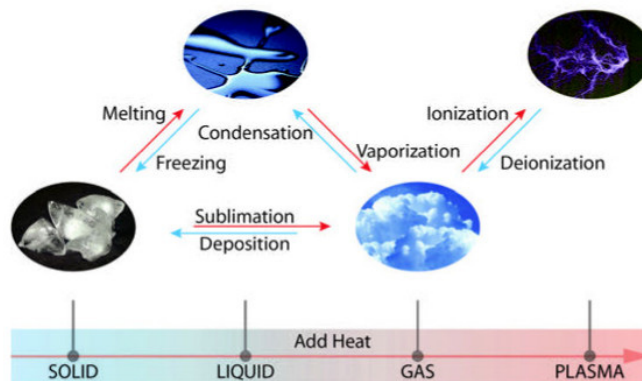


Figure 1. Les 4 états de la matière [60].

### 1.1.1 Plasmas thermiques

Les premières études sur les plasmas de laboratoire concernaient principalement les plasmas BP (basse pression) qui furent utilisés dans l'industrie des semi-conducteurs, et ce, jusqu'à présent. Ces plasmas BP (basses pressions) sont aussi appelés plasmas chauds, thermiques ou encore en équilibre thermodynamique local (ETL) caractérisés par une température électronique de l'ordre de la température du gaz (espèces lourdes) :  $T_e \approx T_g$ . Bon nombre d'applications dans différents domaines ont vu le jour, toutefois, les principales limitations dans l'utilisation de ce type de plasma sont (i) la nécessité de travailler à basse pression, (ii) les températures excessives atteintes (fort dégagement de chaleur), (iii) la difficulté, parfois, à contrôler ce procédé non sélectif [1,2,3]. A la lumière de cela, des études se sont orientées vers le développement de plasmas qui pourraient remédier à ces inconvénients, ce qui a donné le jour aux plasmas non-thermiques.

### 1.1.2 Plasmas non-thermiques

De nouvelles techniques ont été développées pour générer des plasmas à la PA (Pression Atmosphérique). Ces plasmas à la PA, aussi appelés plasmas froids, non-thermiques ou encore hors équilibre thermodynamique, sont caractérisés par une température des espèces 'lourdes' proche de la température ambiante :  $T_e \neq T_g$  et  $T_g \approx T_{amb}$ . Contrairement aux plasmas chauds où le principal effet est thermique, une des principales caractéristiques des plasmas froids est l'induction de réactions chimiques dues aux espèces actives créées et ce, même à faible température. Comme l'utilisation de pompe à vide n'est pas requise, ceci offre donc une plus grande flexibilité quant aux applications [1,4].

### 1.2.3 Particularité des plasmas non-thermiques

Une décharge plasma est composée de particules chargées (ions, électrons), d'espèces électroniquement excitées (atomes ou molécules), de radicaux et de photons UV. Compte tenu (i) de la quantité et de la variété des espèces oxygénées réactives, ROS, (et plus généralement des RONS, les espèces réactives oxydantes et azotée) produites dans le plasma et, (ii) de l'implication des ROS dans les réactions redox en biologie, une application thérapeutique basée sur le plasma pourrait être envisagée. Plus particulièrement, le traitement par plasma expose la surface inerte ou biologique à des espèces neutres de courtes et de longues durées de vie comme  $O_3$ , NO, OH,  $O_2^1\Delta_g$ , les radicaux chargés (radicaux super-oxyde) dont la réactivité (biochimique s'il s'agit de cellules) peut impliquer des modifications importantes. Parmi les outils de diagnostic, la spectroscopie optique d'émission et d'absorption, permettant d'identifier les espèces présentes dans la décharge et d'estimer leurs concentrations relatives, est très utilisée [4,5]. La densité, la température et la composition (nature et concentrations des espèces) de la décharge non-thermique peuvent être contrôlées en variant les paramètres physiques de la décharge [6,7,8]. Beaucoup d'efforts ont été investis dans les études sur les interactions plasma/surface ce qui a permis d'identifier un grand nombre d'applications.

#### *Mode d'utilisation des plasmas froids*

Le mode d'utilisation des plasmas froids peut être soit direct ou indirect. Selon les études, ces termes peuvent avoir des sens différents. Toutefois et de manière générale, on retiendra qu'une surface peut être traitée *directement* par le jet de plasma (contenant des espèces chargées, excitées, radicalaires...), ou *indirectement* par la post-décharge (les espèces chargées ne sont pas impliquées).

## 1.2 Plasma: applications

### **1.2.1 Aperçu général des applications**

Les plasmas sont largement utilisés dans le textile, l'industrie de l'éclairage, l'électronique et bien d'autres applications. Dans le domaine de la biologie/médecine, le plasma est utilisé dans les procédés des matériaux, la stérilisation, le détachement des cellules, l'amélioration de la biocompatibilité, l'ingénierie des tissus, l'augmentation de l'adhésion et de la mouillabilité et autres modifications de surfaces [4, 9, 10, 11].

A l'échelle industrielle, un grand nombre de techniques de modifications de surfaces utilisent le plasma : gravure des semi-conducteurs (industrie de la micro-électronique), déposition de Si amorphe pour les panneaux solaires, production de couches minces protectrices, hydrophobes ou ayant une propriété particulière en vue d'une application spécifique [12]. Globalement, ces procédés se basent sur la possibilité de modifier sélectivement et chimiquement une surface sans l'endommager lui permettant d'acquérir certaines caractéristiques physico-chimiques.

### **1.2.2 Applications dans les sciences de la vie**

L'application des plasmas dans le domaine des sciences de la vie est relativement récente. Ces dernières années, les études portant sur les applications médicales du plasma à la PA concernent principalement le traitement de tissus vivants (humains, animaux) [13]. Toutefois, on distinguera les applications liées aux plasmas thermiques et non-thermiques.

#### **1.2.2.1 Plasmas thermiques**

Les plasmas thermiques utilisés en médecine, en mode 'arc' ou en mode 'jet', sont connus et utilisés en électrochirurgie (rapide coagulation du sang, cautérisation, 'découpage' de tissus...). A titre d'exemple, la technique de coagulation du sang par plasma est utilisée et commercialisée depuis fort longtemps : dans cette technique, le principal rôle du plasma chaud

(généralisé dans l'Argon) est de fournir l'énergie thermique (chaleur) qui dénaturera et asséchera le saignement du tissu à traiter [14,15,16]. Comme la température peut atteindre plusieurs milliers de degrés Kelvin, elles peuvent causer des brûlures, un dessèchement du tissu voire même produire une quantité importante (voire excessive) de fumée pouvant rendre le traitement difficile à contrôler (chaleur transférée intense). De plus, les effets d'un tel plasma sur les tissus sont non-sélectifs.

#### **1.2.2.2 Plasmas non-thermiques**

Toutes ces raisons ont motivé le développement de procédés plasmas non-thermiques dans lesquels la température n'excède pas  $\approx 50-60$  °C. Dans ces conditions, les inconvénients engendrés par un plasma chaud, comme les dommages et le dessèchement des tissus, sont minimisés voire éliminés. De plus, le traitement de matériaux organiques (intolérants aux fortes températures) par plasma devient possible grâce aux décharges non-thermiques : ces matériaux sont largement utilisés dans le domaine de l'ingénierie biomédicale. On citera à titre d'exemple, l'amélioration de l'adhésion cellulaire d'une surface polymérique ou encore la déposition d'un matériau biocompatible sur un implant artificiel pour en éviter le rejet (et le rendre biocompatible). Plusieurs procédés plasmas ont été utilisés dans le domaine de la stérilisation/désinfection tels que la stérilisation d'outils biomédicaux (notamment ceux sensibles à la chaleur), ou encore des filtres à air [4]. En médecine dentaire, le plasma peut être utilisé pour le blanchiment des dents ou encore la désinfection 'locale' à travers les processus de détachement/ablation des cellules et d'inactivation des bactéries sur le site traité [17]. Les plasmas à la PA sont plus avantageux car ils lient grande efficacité à faible coût : en effet, les espèces actives agissent dans un environnement à faible température (proche de l'ambient) et le procédé ne nécessite aucune utilisation de pompes à vide [12].

#### **1.2.2.3 Application à la chirurgie**

L'utilisation d'un plasma froid (non-thermique) dans le domaine de la chirurgie (*in vivo*) ne vise pas à dénaturer les tissus mais à induire une 'modification' chimique, ou plus

généralement, une ‘réponse chimique spécifique’ sans induire des dommages thermiques. Par conséquent, les effets d’un traitement par plasma hors équilibre ne sont pas dus à la chaleur mais aux espèces actives (espèces radicalaires....) générés dans le plasma ou par l’interaction plasma/tissu [15]. En chirurgie, les avantages présentés par l’utilisation d’un plasma sont supérieurs à ceux du laser (‘advanced laser surgery’) : citons, à titre d’exemple, la possibilité d’effectuer des modifications à l’échelle cellulaire ou de retirer les sections ‘malades’ sans induire d’inflammations. Basée sur l’interaction thermique, on reporte que l’utilisation du laser peut mener à la mort cellulaire accidentelle, la nécrose ou produire des dommages permanents aux tissus [14,18].

On retiendra qu’en chirurgie, le plasma offre l’avantage d’être une méthode minimalement invasive, permettant de traiter localement et spécifiquement les cellules en préservant celles avoisinantes.

## **1.3 Différents procédés plasmas**

Comme nous l’avons décrit, les plasmas froids à la PA ont un grand nombre d’applications en nanotechnologie et en biomédecine. Cette diversité a été rendue possible, entre autre, par l’existence de diverses et multiples méthodes physiques permettant de générer un plasma ayant des caractéristiques physiques particulières. Nous en présenterons quelques une dans cette section.

On rapporte dans la littérature que les décharges DBD (et FE-DBD, une variante de la DBD) ainsi que les ‘plasma jet’ (ou APPJ), sous ses différentes variantes, sont les plus utilisées dans le traitement des tissus biologiques/cellules par plasma [3,17,19].

### **1.3.1 La DBD**

La DBD (Décharge à Barrière Diélectrique) a été introduite par Siemens en 1862. La décharge plasma est générée à la PA dans l'air ou dans d'autres gaz lorsque l'on applique un courant alternatif et une haute tension avec des fréquences de l'ordre du kHz (onde sinusoïdale et pulses de courte durée) entre deux électrodes, généralement planes, dont au moins une est recouverte d'un isolant pour éviter l'accumulation de courant entre les électrodes permettant, ainsi, d'empêcher une augmentation de la température du gaz (conditions plus sécuritaires) (Fig. 2). Par conséquent, on peut envisager le traitement de substrats biologiques sans induire de dommages thermiques.

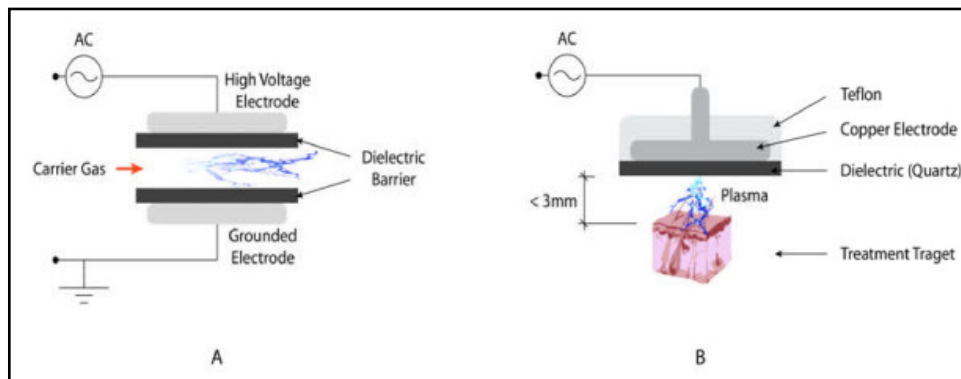


Figure 2. Formation d'un plasma à partir (A) d'une DBD, et (B) d'une FE-DBD [60].

### 1.3.2 La FE-DBD

Basée sur la DBD conventionnelle, la FE-DBD (*Floating-Electrode DBD*) fonctionne à la PA et nécessite un courant alternatif et une haute tension appliquée aux bornes de deux conducteurs (électrodes) dont au moins un est recouvert d'un diélectrique (souvent du quartz) pour éviter la transition vers l'arc électrique (Fig. 2). Souvent, l'électrode polarisée + est recouverte d'un diélectrique alors que l'autre, dites 'électrode active', a un potentiel flottant (i.e., il n'est pas branché à la terre) et correspond au substrat i.e., le tissu ou l'organe animal ou humain (ayant une forte constante diélectrique). Pour générer le plasma, la surface à traiter doit être rapprochée de l'électrode positive à une distance qui dépend de la forme, du temps, et

de la polarité de l'élément qui conduit le courant (en général  $d < 3\text{mm}$ ). Les paramètres physiques importants sont la température des filaments, leur densité d'énergie par filament.

Deux types de fonctionnement sont possibles. La décharge à 'onde continue' qui opère à haute puissance, forte température et peu de filaments, et qui ne présente pas d'intérêt dans le traitement de tissus biologiques en raison des dommages encourus. Par contre la décharge uniforme à ondes pulsées caractérisée par de plus courts temps de pulsation et une plus faible puissance (gamme de densité de puissance :  $0.1$  à  $2\text{W/cm}^2$ ) permet d'atteindre une température tolérée par les tissus biologiques ( $T_g \approx T_{\text{amb}}$ ): l'étude sur le traitement des cellules cancéreuses par plasma devient, par conséquent, envisageable. On rapporte que ce procédé plasma ne crée aucun dommage à la peau, ni de coagulation du sang, et préserve les tissus environnants [13,20, 21].

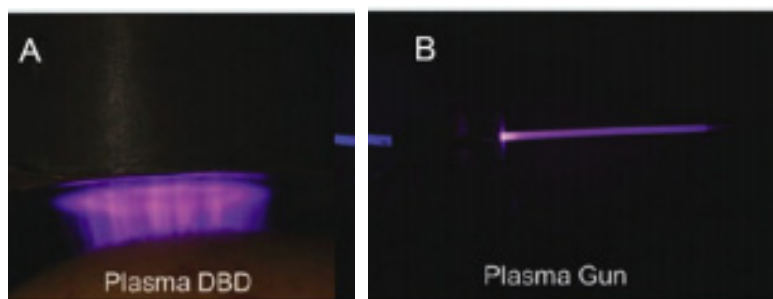


Figure 3. Exemple de plasmas créés par (A) une FE-DBD et (B) un 'plasma gun' (Source Keidar *et al.* 2015).

### 1.3.3 L'APPJ

On retrouve dans la littérature plusieurs études utilisant des jets de plasma ayant des caractéristiques techniques légèrement distinctes mais pouvant avoir une composition chimique complètement différente (selon la nature du gaz principal et les paramètres physiques de la décharge...) [17,18,19,23,24]. Les figures 4 et 3 (B) présentent des exemples de procédés produisant un jet de plasma à la pression atmosphérique (APPJ).



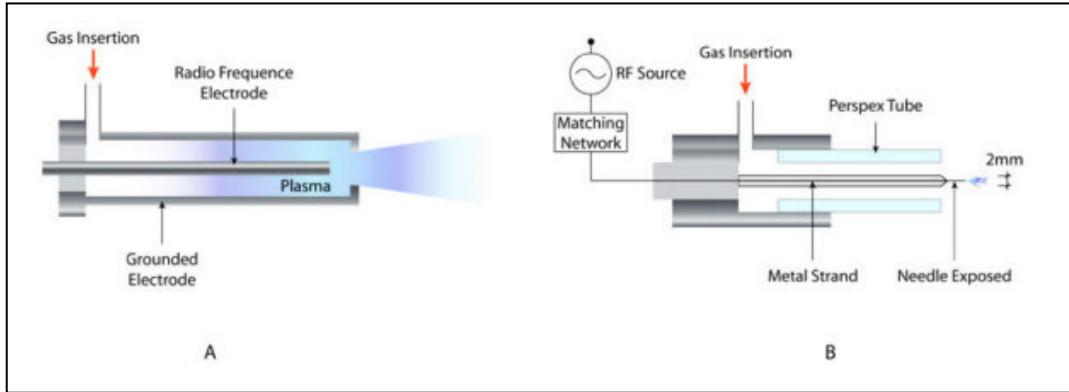


Figure 4. Formation d'un plasma à partir (A) d'un '*plasma jet*' (APPJ), et (B) d'un plasma '*needle*' [60].

Parmi les techniques générant un jet de plasma et utilisé dans le traitement des tissus/cellules tumorales, on rapporte **(i)** le '*plasma pencil*' composé d'un tube diélectrique cylindrique, de 2 disques diélectriques de diamètres identiques au tube et placés à l'intérieur du tube [25]; **(ii)** le '*plasma needle*' pouvant être utilisé dans le détachement cellulaire sélectif correspond à une décharge couronne créée au bout d'une pointe en imposant une onde électromagnétique RF ( $\sim 13\text{MHz}$ ) pour exciter le gaz (Fig. 4) [3]. Cette décharge opérant à une température proche de  $T_{\text{amb}}$  et dissipant une densité de puissance de l'ordre du  $\text{mW}/\text{cm}^3$  peut être utilisée pour le traitement localisé de la peau (cellules) et des cavités dentaires (destruction des bactéries) [13]; **(iii)** Le '*plasma gun*', un autre type de plasma jet, présente deux spécificités (Fig. 3B) : **(a)** le plasma généré à travers un capillaire flexible (de différents diamètres) peut atteindre jusqu'à une dizaine de centimètres ; **(b)** le débit du gaz porteur (gaz rare) est relativement modéré (quelques sccm) [26]. Techniquement, une électrode de tungstène (de diamètre de l'ordre du mm) connecté à une source RF ( $f=13.56\text{MHz}$ ) se trouve dans un tube en quartz connecté à la seconde électrode.

Toutefois, il est intéressant de noter que, techniquement, le jet de plasma utilisé par Joh *et al.* (Fig. 1-5) créé à partir d'un mélange d'hélium (gaz principal) et d'oxygène (5 à 500 sccm) est très similaire à celui que nous utiliserons dans notre étude [27,28]. Dans la seconde partie de ce mémoire, nous décrirons en détail la source plasma utilisée dans notre étude l'APGD-t, une technologie hybride entre la décharge DBD et l'APPJ.

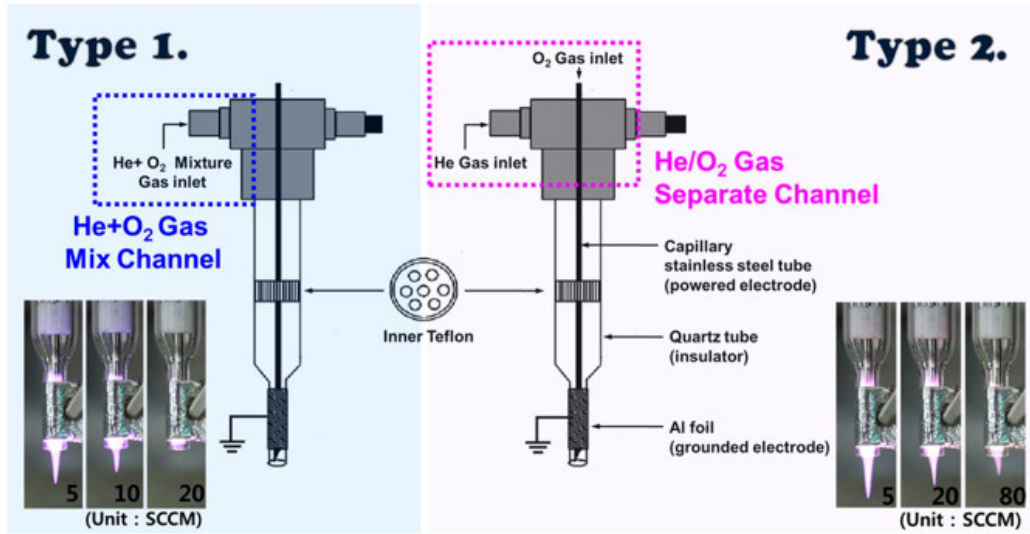


Figure 5. Plasma jet étudié par Joh et al et créé à partir d'Hélium et d'Oxygène (Source Joh *et al.* 2014).

## 1.4 Volet Biologique : théorie et revue de littérature

### 1.4.1 Notions générales de biologie autour de la cellule cancéreuse

Jusqu'à nos jours, nous ne connaissons pas rigoureusement les causes du cancer. Les investigations menées à ce sujet ont permis de définir essentiellement deux principales voies pouvant conduire au développement d'un cancer : **(i)** lorsque les gènes suppresseurs de tumeur ne fonctionnent plus, ou, **(ii)** lorsque a lieu une surexpression des protéines anti-apoptose [29].

#### 1.4.1.1 Définitions

Avant d'aller plus loin, certaines notions essentielles à la compréhension des phénomènes impliqués dans l'interaction plasma/cellules doivent être définies.

*L'apoptose*, encore appelée mort cellulaire programmée, est par définition un processus biochimique complexe impliqué dans l'autodestruction contrôlée d'une cellule dans un organisme multicellulaire. On associe l'apoptose à une mort 'propre' c'est-à-dire qu'aucune réaction inflammatoire n'est engendrée [2]. En effet, durant le processus d'apoptose, les macromolécules cellulaires sont digérées et, finalement, la cellule se retrouve divisée en de petits fragments intacts qui peuvent être éliminés par la phagocytose sans causer d'inflammation ou endommager les cellules avoisinantes [13].

*La nécrose*, encore appelée mort cellulaire accidentelle, correspond au processus dans lequel la cellule éclate et le contenu intracellulaire est déversé dans le milieu extracellulaire causant une inflammation [13].

#### **1.4.1.2 Quelques propriétés des cellules cancéreuses**

Malgré les similitudes entre les cellules cancéreuses et les cellules saines, elles diffèrent tout de même par quelques propriétés primordiales et décisives quant au devenir de la cellule. A titre d'exemple, la prolifération des cellules cancéreuses est beaucoup plus rapide que celle des cellules saines et, d'après la littérature, l'adhésion des cellules tumorales serait moins forte que celle des cellules saines [13]. Aussi, les cellules cancéreuses présentent des mécanismes antioxydants particulièrement plus faibles que ceux présents dans les cellules saines. Dans la plupart des cas, la cellule cancéreuse 'apprend' à empêcher l'apoptose (*'turn off'*) comme un moyen d'éviter le système immunitaire et pouvoir survivre dans des conditions normalement non favorables. Ce phénomène explique pourquoi le traitement des cellules tumorales de sein, colon ou encore du poumon par chimiothérapie a un succès limité.

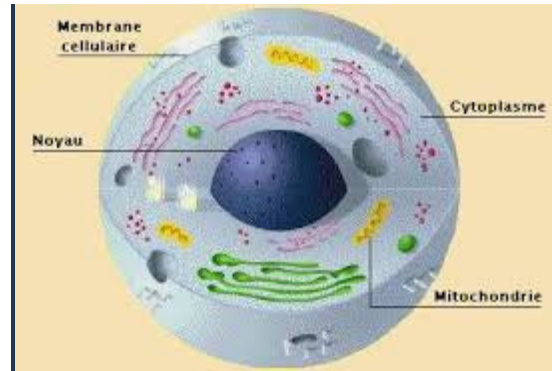


Figure 6. Coupe d'une cellule eucaryote et éléments principaux qui la composent.

La figure 6 illustre une cellule eucaryote (similaire aux cellules humaines) : sous la forme d'un coupe, cette figure montre simplement quelques éléments clés qui composent les cellules saine et cancéreuse, et qui seront utilisés dans la suite de ce travail.

### 1.4.1.3 Les méthodes thérapeutiques

#### ◆ *Traitements conventionnels*

Mis à part l'ablation de la tumeur par un acte chirurgical, les cellules cancéreuses peuvent généralement être détruites par un traitement utilisant des substances chimiques (chimiothérapie) ou des radiations ionisantes (radiothérapie). Plusieurs programmes de recherche tentent de développer des médicaments (chimiothérapie) pouvant cibler les composants intracellulaires qui déclencheraient l'apoptose dans les cellules tumorales, ou qui arrêteraient leur croissance ; Néanmoins, ces traitements conventionnels de chimiothérapie et de radiothérapie affectent aussi les cellules saines pouvant détériorer leur bon fonctionnement, voire même les 'détruire' : on parle de traitements non spécifiques. L'optimisation de ces méthodes a permis d'obtenir de légères améliorations tout en se heurtant soit au manque d'efficacité (par exemple, si, pour préserver les cellules saines, la dose radio-thérapeutique devient trop faible) soit à la résistance de certaines drogues (qui, en s'ajoutant à la lourdeur des effets secondaires, limitent leurs applications en milieu clinique).

◆ ‘Plasmathérapie’, une solution ?

De nombreuses études ont été investies dans le développement de nouvelles méthodes pour tenter de remédier à ces inconvénients. Parmi elles, le développement récent de procédés plasmas (froid) appliqués au domaine biomédical et plus précisément dans le traitement du cancer (Fig. 7): les études montrent que le plasma est capable (1) de traiter les cellules dans une zone bien précise (surface, profondeur) sans agir sur les cellules avoisinantes, (2) de causer, généralement, une ‘mort propre’ des cellules en induisant l’apoptose et (3) d’avoir une action spécifique en différenciant, jusqu’à un certain degré, les cellules tumorales des cellules saines [2]. Nous reviendrons sur chacun des points dans la section traitant de l’effet du plasma sur les cellules tumorales (§1.4.2).

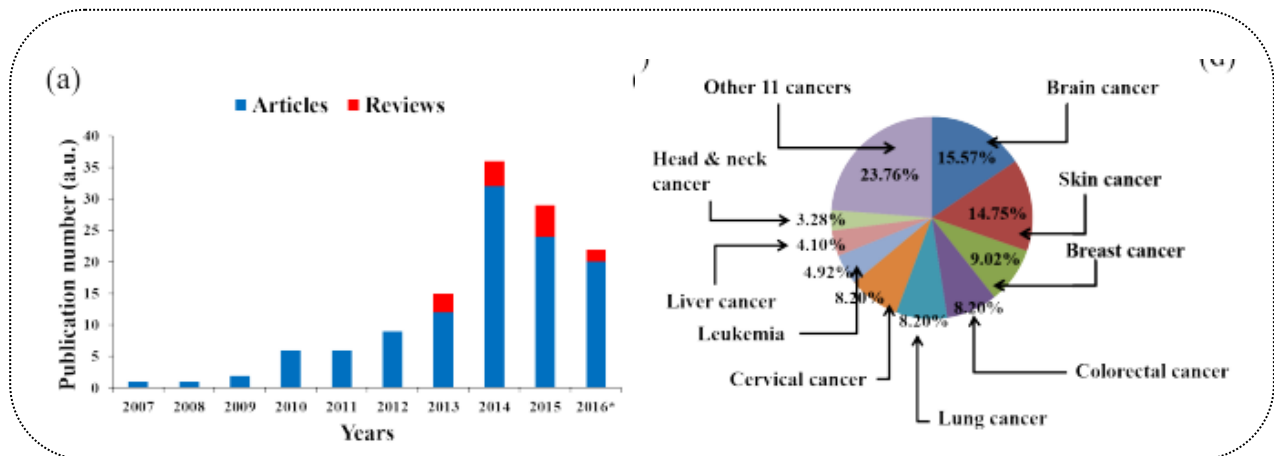


Figure 7. a) Évolution du nombre de publications concernant les études sur le traitement par plasma de cellules cancéreuses, de 2007 à 2016. b) Proportions relatives des types de cancer étudiés pour les traitements par plasma [56].

La majorité des études scientifiques conclut que le traitement par un plasma non thermique est une méthode qui permettrait d’induire l’apoptose, et ce, uniquement dans la zone d’intérêt [2,13]. Toutefois, on rapporte quelques rares études, comme celle de Guerrero *et al.*, où on clame que la principale voie menant à la mort des cellules cancéreuses n’est pas l’apoptose [30]. Selon la littérature, on rapporte une grande variété de cellules cancéreuses utilisées dans les études sur leur interaction avec le plasma : cellules du colon, du poumon, du

foie, du sein, du cerveau (glioblastome), de la thyroïde, du pancréas, de la peau (mélanome), tête et cou, des ovaires, de la prostate, de l'œil... [15,31]. Plusieurs études montrent que l'induction de l'apoptose par le plasma dépend des conditions de la décharge contrôlées par les paramètres physiques tels que le voltage appliqué, le courant, la fréquence, le débit et la nature du gaz, le temps de traitement/puissance plasma (dose)...[7,9,24,27]. Dans certaines conditions extrêmes d'exposition (puissance et temps d'exposition), les cellules peuvent mourir par nécrose [13,32]. Nous reviendrons, par la suite, plus en détail sur ces points (§1.4.2).

## **1.4.2 Études sur l'interaction plasma/cellules**

### **1.4.2.1 Réactivité plasma : Comparaison avec la radiobiologie**

La radiobiologie s'intéresse à l'effet biologique des radiations ionisantes et non-ionisantes. Concernant la radiation ionisante pénétrante résultant de la radioactivité et des rayons X, le principal mécanisme d'action sur la cellule se fait à travers la formation de ROS à l'intérieur du noyau cellulaire, proche de la molécule d'ADN. Parmi les ROS, on citera principalement les radicaux hydroxyles (OH), le peroxyde d'hydrogène (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) et les espèces de charge négative. Des tests simples similaires à ceux utilisés en radiobiologie pour déterminer la nature des bris dans l'ADN, ont été opérés sur des cellules traitées au plasma : des dommages à l'ADN ont été observés [20]. Certaines études s'accordent à dire que le mécanisme d'action se ferait apparemment avec le même type de ROS qu'en radiobiologie [20]. Toutefois, dans le cas de la radiobiologie, les ROS sont créés au voisinage de l'ADN alors que dans le cas du plasma, il est possible que ces ROS ne soient pas nécessairement générés à proximité de la molécule d'ADN mais peuvent y avoir été transportés via des mécanismes présents dans la cellule : des mesures quantitatives exhibent l'accumulation de ROS dans le milieu intracellulaire [20].

◇ *Proposition de mécanisme* basée sur l'étude menée par Dobrynin *et al.* [20].

L'annexe 1 présente une des premières propositions de mécanismes effectuée avec beaucoup de rigueur et de manière très particulière mêlant biologie, chimie et une comparaison avec la radiothérapie.

Ce résultat est important car il montre **(i)** qu'avec un procédé plasma des cellules tumorales peuvent subir des dommages à l'ADN comparables à celles induites par des rayonnements ionisants ; **(ii)** que certains mécanismes d'action sont proches de la radiothérapie, et, **(iii)** l'importance du rôle des ROS dans 'l'inactivation' des cellules pour les deux types de traitement [20,29].

#### **1.4.2.2 Effets biologiques du plasma sur les cellules: Revue de la littérature**

Tous s'accordent à reconnaître le potentiel du plasma à traiter les cellules, ce qui explique la recherche et le développement de nouvelles sources plasmas facilement utilisables en clinique. Un grand nombre de lignées de cellules cancéreuses a été testé tels que celles des poumons, du foie, de la peau, du cerveau, tête et cou, sein, pancréas... pour explorer les possibilités offertes par un tel traitement et en optimiser les effets anti-cancer.

La variété et les multiples effets biologiques du plasma s'expliquent par la variété des cellules, la complexité de la composition chimique du plasma (qui dépend de la nature des gaz et des paramètres physiques de la décharge), et de la manière avec laquelle est générée la décharge, ce qui rend la comparaison entre les résultats très difficiles. Toutefois, nous tenterons dans les sous-sections qui suivent de présenter les modifications générées par un traitement par plasma sur les cellules, en se basant sur les publications scientifiques.

##### **◆ *Dose plasma***

La grande majorité des études confirme et démontre la dépendance de la dose plasma sur l'efficacité du traitement [1,30]. Malgré que la notion de 'dose plasma' peut avoir différents sens selon les groupes de recherche, les études récentes s'entendent généralement à

définir la dose plasma ( $J/cm^2$ ) comme le produit de la densité de puissance avec le temps d'exposition.

Kim *et al.* montrent la dépendance de la dose d'un plasma jet d'Hélium dans l'induction de l'apoptose sur des cellules de cancer de sein (MCF7) [33]. Kalghatgi *et al.* a comparé l'effet d'une décharge DBD sur des cellules saines et malignes de sein. Cette étude montre l'effet de la dose sur l'efficacité du traitement et détecte les dommages à l'ADN en excluant l'action des UVs et des ions générés par le plasma. L'étude postule que l'interaction plasma/milieu de culture (peroxydation des acides aminés présents dans le milieu de culture) donnerait des espèces chimiques qui agiraient au niveau des protéines de la cellule [8,21,34]. On trouve dans la littérature quelques études qui, en utilisant une microdécharge de surface, obtiennent des résultats très encourageants lors du traitement des cellules cancéreuses de la tête et du cou: induction de l'apoptose selon la dose appliquée passant de moins de 2% à ~8% en 90s, et dans certaines conditions, ils constatent la fragmentation de l'ADN et une induction de la sénescence des cellules cancéreuses [35].

La littérature montre aussi que pour de faibles doses de plasma, les dommages à l'ADN sont réversibles et les antioxydants présents dans la cellule neutralisent les ROS générées par le traitement plasma ("réparation"). On reporte aussi dans les publications qu'un traitement plasma à faible dose peut induire une augmentation de la prolifération cellulaire ("régénération") [20,36]. Plus généralement, la quantité de lésions double brins dépend de la dose de plasma de sorte que plus la dose est élevée, plus les dommages sont importants et irréversibles, à tel point que l'accumulation des lésions double brin à l'ADN force la cellule à rentrer en apoptose ; autrement dit, un fort stress oxydatif (dû aux ROS) peut forcer la cellule à rentrer en apoptose et mener à sa mort [20,37].

#### ◆ *ROS/Apoptose*

Les espèces actives issues du plasma peuvent diffuser puis pénétrer dans la cellule induisant des dommages dont certains sont réversibles et d'autres irréversibles; ces espèces actives peuvent aussi provenir de l'interaction plasma/milieu ou plasma/cellules. Plus récemment, on rapporte que les ROS (espèces actives oxydantes) de courte durée de vie issus



du plasma réagiraient avec les composants du milieu (acides aminés) pour former des ROS de plus longue durée de vie qui interagiraient avec la membrane cellulaire et l'endommageraient (peroxydation des lipides...) ou activeraient des signaux intracellulaires qui engendreraient l'apoptose ; A l'inverse, les ROS de longue durée de vie créées dans le plasma pourraient directement réagir avec la cellule. Les ROS présentes dans le milieu extracellulaire et intracellulaire, peuvent être identifiés et quantifiés par des techniques chimiques, biochimiques (marqueurs) ou physiques telles que la spectroscopie d'émission ou d'absorption [24,27].

La majorité des chercheurs s'accordent sur le rôle essentiel des ROS dans l'inactivation des cellules tumorales (arrêt du cycle cellulaire, apoptose...) [13,20,22,29]. Toutefois, les auteurs ne sont pas unanimes sur les mécanismes d'interaction plasma/cellules. Certains auteurs tels que Fridman pensent que les espèces ioniques jouent un rôle clé dans l'inactivation (argument de plus en plus délaissé) alors que d'autres suggèrent que les espèces neutres sont principalement impliquées [20].

Parmi les ROS, Yan *et al.* montrent que H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, généré suite à l'exposition au plasma, n'est pas le seul oxydant menant à la mort cellulaire [5,34]. Une étude intéressante menée sur 5 lignées cellulaires cancéreuses par Kaushik *et al.* vise, entre autres, l'identification de ou des espèces oxydantes, présentes dans le milieu extracellulaire, qui serait un joueur clé dans les mécanismes menant à la mort cellulaire. Leur intérêt s'est porté, en particulier sur la comparaison des effets de O<sub>2</sub><sup>-</sup>, HO<sup>-</sup> et H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> avec celles du plasma (avec et sans *scavenger* de ces ROS), en la corrélant à une mesure de ces ROS dans le milieu intracellulaire. Pour conclure, ils proposent un mécanisme moléculaire qui serait induit dans la cellule cancéreuse, suite à un traitement par un plasma jet, impliquant le phénomène d'apoptose via l'altération des mitochondries [5]. Arpitha *et al.* propose un modèle moléculaire un peu plus complet en considérant le rôle important des TRAIL-R1 (*tumor necrosis factor related apoptosis inducing ligand*) : le plasma accélérerait sélectivement l'expression du TRAIL-R1 ce qui induirait l'apoptose dans les cellules tumorales et non dans les cellules saines (laissant entrevoir l'espoir de diminuer la dose de drogues en chimiothérapie grâce à l'action du plasma) [21]. Plusieurs études ont lié l'existence de l'apoptose à l'action des espèces oxydantes radicalaires intracellulaires, notamment, en utilisant des '*scavengers*' qui neutralisent ces espèces et

empêchent, ainsi, leur action : les études montrent que le taux d'apoptose diminue lorsque ces *scavengers* (NAC, N-acetyl cysteine) sont utilisés [5,8].

D'un point de vue des mécanismes impliqués, les études in-vitro et in-vivo illustrent généralement que la mort cellulaire est due à l'apoptose et que les ROS jouent un rôle clé dans l'action létale du plasma lors de ces traitements [2]. On rapporte que le dysfonctionnement des mitochondries de la cellule, dû à l'action des ROS, induirait l'apoptose [3,5]. Selon les études considérées, l'arrêt du cycle cellulaire (en phase G2/M et S) induit par le traitement jouerait un rôle plus ou moins important dans le déclenchement de l'apoptose [3,22,33].

#### ◆ *Perméabilisation*

##### ◇ *Réactivité plasma/membrane cellulaire*

La première cible des espèces actives est la membrane cellulaire composée d'une bicouche de phospholipides. Plusieurs études considèrent que le principal mécanisme altérant la membrane externe est la peroxydation de ces lipides. Globalement l'effet sur la membrane cellulaire dépend de la nature des espèces contenues dans le plasma (leur concentration et leur répartition spatiale) et de la composition chimique du milieu entourant la cellule qui peut avoir une action inhibitrice ou additionnelle à l'effet du plasma [22,35,37].

De manière générale, les conséquences biologiques d'un traitement par plasma est l'enclenchement ou la catalyse de réactions biochimiques complexes telles que : **(i)** le changement de la structure membranaire (ex. : peroxydation) accompagné ou non d'un changement des protéines/enzymes liées à la membrane (ex : protéines des canaux ioniques) pouvant, par exemple, influencer les cellules avoisinantes si ces changements affectent les 'signaux' inter-cellules [20]; **(ii)** l'exposition au plasma peut activer des 'signaux' intracellulaires permettant de transporter et d'amplifier 'l'effet du plasma' à l'intérieur de la cellule (effet d'avalanche) ; **(iii)** la formation d'espèces issues de la peroxydation des lipides et participant aux dommages à l'ADN (pouvant, dans certains cas être réparé) [20]. D'ailleurs,

dans le passé, on pensait que la quantité d'espèces actives créées par le plasma n'était pas assez importante pour pénétrer dans la cellule et affecter l'ADN. Comme nous le présenterons dans la suite, il s'est avéré que, comme la radiothérapie, la formation intracellulaire de ROS cause des dommages à l'ADN (simple et double brins). En effet, rappelons que la radiothérapie (RT) se base sur l'induction de dommages à l'ADN par les radiations ionisantes, ce qui initie **(i)** des changements dans le cycle cellulaire et **(ii)** des cascades de signaux menant, au final, à la mort cellulaire.

#### ◇ *Formation de pores*

Comme nous l'avons présenté précédemment, la première barrière protectrice de la cellule est la membrane cellulaire. Plusieurs études ont montré la formation de pores suite au traitement par plasma : ces pores sont une porte d'entrée aux espèces 'toxiques' pouvant mener à la mort cellulaire. En effet, selon leur taille, les pores peuvent soit **(i)** se refermer rapidement et induire, ou non, des dommages permanents pouvant provoquer la mort cellulaire (temps d'ouverture de l'ordre de la  $\mu$ s) ou **(ii)** demeurer ouverts et mener à une fuite du milieu intracellulaire vers le milieu environnant [7,31]. La perméabilisation de la cellule s'explique, donc, par la présence de ces pores réversibles et irréversibles. Certaines études ont estimé la taille des pores induits par le plasma (perméabilisation irréversible) : dans l'étude effectuée par Leduc *et al.*, la dimension des pores induits sur des cellules Hela, suite au traitement par un plasma jet d'hélium, a été estimée en détectant l'absorption de molécules de Dextran de différentes tailles (3-70 kDa) : ils concluent que le diamètre maximal des pores induits par le traitement sur la membrane cellulaire est de 13 nm [10]. Il est intéressant de noter que des molécules telles que  $H_2O_2$  peuvent diffuser à travers la membrane alors que des anions tels que  $O_2^-$  ou  $OH^-$  ne le peuvent pas à cause de la charge négative et de leur forte réactivité [31,34]. Notons aussi que la formation avantageuse de pores, qu'ils soient réversibles ou irréversibles, a donné lieu à des études sur un traitement combinant plasma et médicaments (application dans l'administration de médicaments) [35,38,39].

### ◆ *Profondeur de traitement et efficacité*

Une des caractéristiques du plasma est qu'il permet une action contrôlée et localisée dans un espace bien défini en termes de surface et de profondeur traitées. Certaines études se sont intéressées à estimer la profondeur de l'effet du plasma in-vitro en prévision d'applications cliniques (*in-vivo*) [2]. D'après l'étude menée par Partecke *et al.*, les changements au niveau cellulaire, suite à un traitement par un plasma jet d'argon d'une tumeur du pancréas, ont été observés jusqu'à 5 couches cellulaires ce qui correspond à ~60µm [2,24,40] ; au-delà de cette profondeur, les cellules demeurent intactes (similaires au témoin).

Pour compenser l'action limitée en profondeur, plusieurs solutions ont été envisagées telles que le traitement du milieu nutritif (propriété anti-cancer jusqu'à 7 jours après traitement et possibilité de stockage), l'utilisation d'endoscope pour 'mener' le plasma en profondeur ou encore la combinaison avantageuse de thérapies (plasma/ drogue, plasma nanoparticules, plasma/chimiothérapie, plasma/radiothérapie). [34,38,39].

### ◆ *Sélectivité*

La différence de nature ou de l'état métabolique des cellules (saines et tumorales, par exemple) peut mener à une différence dans l'absorption des sous produits 'toxiques' issus du plasma ou de l'interaction plasma/composés intracellulaires. Plusieurs études ont observé une sélectivité du plasma dans le traitement des cellules saines et tumorales, et ce, indépendamment du procédé utilisé pour générer la décharge :les études montrent que les cellules cancéreuses ont une plus grande sensibilité au plasma.

#### ◇ *Sélectivité : revue de la littérature*

La sélectivité du plasma a été observée lors du *processus de détachement* des cellules : on rapporte que 60-70% des cellules cancéreuses de poumon (SW900) se sont détachées alors qu'aucune cellule saine de poumon (NHBE) ne l'a été suite à un traitement par plasma dans les mêmes conditions opératoires [32,33,41,42].

Certaines études montrent que des cellules dans des *cycles cellulaires* différents peuvent montrer des différences de sensibilité au traitement plasma (d'ailleurs cette observation existe aussi en radiothérapie) : une grande proportion des cellules cancéreuses seraient dans la phase S ce qui les rendrait plus sensibles aux effets du plasma [21,43]. Une des conclusions de cette étude est que le plasma affecte toutes les étapes du cycle cellulaire, néanmoins, dépendamment de la phase dans laquelle se trouve la cellule au moment du traitement, la réponse cellulaire sera différente. Cette réponse peut aller jusqu'à l'arrêt du cycle cellulaire des cellules tumorales tel que illustré sur la figure 8 [32,43].

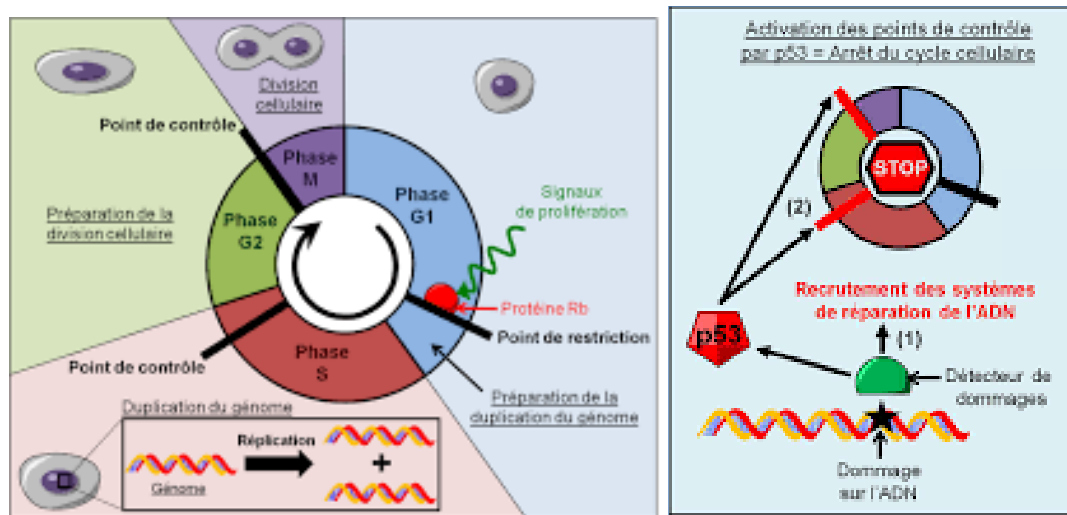


Figure 8. A gauche, schéma du cycle cellulaire. A droite, schéma représentant l'arrêt du cycle cellulaire induit par des dommages à l'ADN.

La sélectivité quant à l'*efficacité* d'un traitement plasma à 'inactiver' préférentiellement les cellules tumorales (viabilité/mortalité) est un point crucial. Le premier à détecter cette sélectivité est Keidar *et al.* lors d'un traitement des cellules tumorales de souris (mélanome) par un plasma jet d'Hélium [33]. A titre d'illustration, ~80% des cellules saines de fibroblastes humains sont vivantes 48h après un traitement par plasma de 120s alors qu'un peu moins de 50% des cellules tumorales (neuroblastome) demeurent en vie [33,42]. Plusieurs études ont montré une forte réduction de la viabilité des cellules cancéreuses relativement aux cellules saines, et ce, pour plusieurs types de cancer : peau, colon, ovaires, neuroblastome,

seins, cerveau, pancréas, prostate... [1,7,15,21,30,32,37,43]. La sensibilité au traitement par plasma est aussi relative à la nature de la cellule tumorale: les cellules cancéreuses de sein (MCF7 et MDA) sont plus vulnérables que les cellules tumorales du cerveau (glioblastome) [34] du colon ou encore des poumons [37] lorsqu'elles sont traitées par un plasma à la PA. Il est intéressant de noter que la sensibilité des cellules saines face au plasma diffère selon le type de cellules : dans des conditions optimales de traitement, on observe une réduction de la viabilité des cellules saines variant de ~0% à ~20%.

◇ *Sélectivité : Origines possibles de la différence de sensibilité*

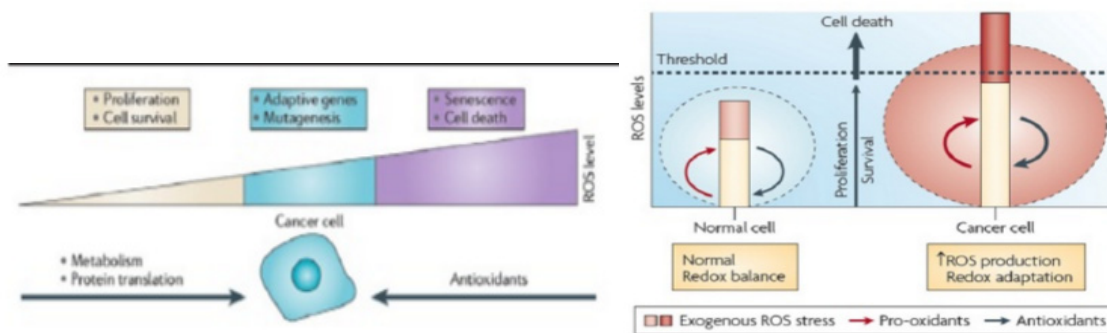


Figure 9. Schémas représentant le lien entre le niveau de ROS et le cancer (Source Keidar *et al.* 2015).

La différence de sensibilité des cellules cancéreuses et saines suite à leur exposition au plasma est un phénomène observé en laboratoire mais dont l'origine n'est pas totalement maîtrisée. Toutefois, une meilleure compréhension à ce sujet a été obtenue à partir d'études plus récentes (2015-2017) [22,40].

Le niveau d'espèces oxydantes contenues dans une cellule tumorale est non seulement supérieur à celui d'une cellule saine, mais aussi proche de la limite au-delà de laquelle la cellule meurt. La figure 9 illustre le destin de la cellule en fonction du niveau de ROS intracellulaire : pour de faibles niveaux de ROS, la cellule est non seulement capable de survivre mais une prolifération cellulaire peut avoir lieu; pour un niveau excessivement haut

de ROS, le stress oxydatif induit mène à la mort cellulaire. Or, par essence, les cellules (saines et tumorales) contiennent des antioxydants pour éviter de cumuler un taux de ROS pouvant mener à sa mort. Toutefois, les aberrations métaboliques et les mutations présentes dans la cellule cancéreuse lui permettent de survivre à de hauts taux de ROS, et d'empêcher le déclenchement de l'apoptose relatif à ce taux de ROS. La figure 9 illustre bien l'état 'critique' de la cellule cancéreuse : **(a)** malgré sa résistance, elle se trouve dans un état métabolique limite et proche de la mort cellulaire et **(b)** la cellule cancéreuse présente des mécanismes antioxydants particulièrement plus faibles que ceux présents dans les cellules saines.

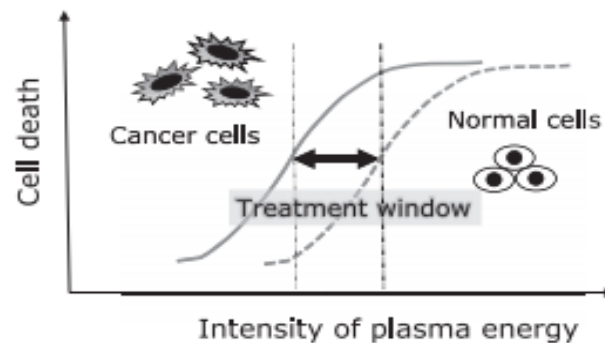


Figure 10. Différence de sensibilité au traitement plasma entre cellules saines et tumorales : zone optimale de traitement permettant la sélectivité (Source H. Kajiyama *et al.* 2016).

Dans une approche thérapeutique, il faudrait exploiter l'existence du *seuil* pour lequel **(i)** la cellule tumorale contiendrait une quantité de ROS supérieure à celle des cellules saines et proche du seuil de mortalité, et **(ii)** la cellule saine serait capable de survivre en enclenchant des mécanismes antioxydants: le défi consiste donc à trouver les conditions opératoires optimales permettant de respecter ces points. Autrement dit, le niveau de ROS atteint par la cellule cancéreuse serait dans une zone (appelée '*treatment window*' sur la Fig. 1-10) pour laquelle la sélectivité sera permise/préservée.

### ◆ *Effet d'un traitement indirect*

Quelques études, comme celle de Tanaka *et al.*, se sont penchées sur un *traitement indirect* des cellules en traitant par plasma le *milieu nutritif* qui sera, par la suite, mis en contact avec les cellules tumorales et saines du cerveau tel que illustré sur la figure 11 [40,44]. Initialement, l'étude du traitement du milieu nutritif seul avait pour but de comprendre les mécanismes impliqués dans l'action létale du plasma en étudiant et comparant (i) les ROS générés dans le milieu nutritif seul (*acidification du milieu et quantification des espèces*) et dans l'ensemble milieu+cellules, et (ii) leur effet sur la cellule [34,44]. Certaines études ont approfondi leurs investigations montrant que cette méthode est prometteuse car elle combine efficacité et possibilité d'injecter la solution traitée en 'profondeur' dans les tissus (traitement *in-vivo*) pour compenser l'action limitée en profondeur d'un traitement par plasma des cellules cancéreuses. Ils montrent que le milieu nutritif traité garde ses propriétés anti-cancer jusqu'à 7 jours après traitement et peut être stocké durant cette période [34,38,39]. L'efficacité dépend du temps de traitement du milieu nutritif et de la quantité de cellules de sorte que plus le temps d'exposition du milieu est important, plus la quantité d'espèces générées ayant une action anti-tumorale est importante et, par conséquent, plus grand sera le nombre de cellules mortes : d'après Tanaka *et al.*, ils observent des changements morphologiques de la cellule et une induction de l'apoptose. L'efficacité dépendrait aussi de la nature de la solution traitée [55]. Parallèlement, d'autres études montrent une efficacité très limitée de cette méthode [44]. Yan *et al.* ont étudié l'effet des paramètres physiques (temps de traitement, taille du puits, volume du milieu, espace entre la source du plasma et le liquide) sur l'efficacité d'un traitement indirect sur 2 lignées de cancer de sein (MDA-MB-231 et MCF7) et une lignée tumorale du cerveau. Notons que les résultats obtenus dans le traitement indirect peuvent aider l'interprétation des résultats dans le cas où le traitement plasma a lieu dans un Pétri contenant milieu et cellules de sorte qu'ils ne reçoivent pas directement le jet de plasma [36].



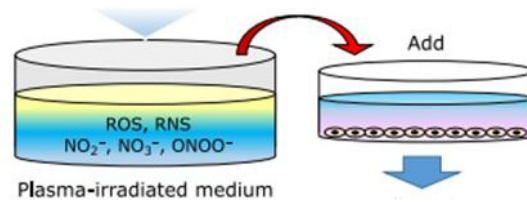


Figure 11. Schématisation du principe du traitement indirect des cellules par plasma : Exposition du milieu nutritif puis mise en contact avec les cellules (Source : Keidar *et al.* 2015).

### ◆ *Récapitulation générale*

D'autres effets du plasma froid sur les cellules ont été rapportés tels que (1) la diminution de la vitesse de migration/mobilité (réduction de ~50% après exposition de 5 min sur des fibroblastes [15]), (2) l'absence ou la diminution de la vitesse de prolifération [7,33], (3) la perméabilisation membranaire [10], (4) le détachement cellulaire [42,45]. (5) Des changements dans l'expression de certaines protéines comme l'activation des protéines p53 ; l'activité enzymatique/catalytique de certaines protéines varie en fonction de la dose de plasma : certaines études ont constaté une réduction de 50% de l'activité de la trypsine après un traitement équivalent à une dose de  $1\text{J}/\text{cm}^2$ . Il est intéressant de noter que l'activité de la protéine peut atteindre zéro sans que celle-ci n'ait perdu son intégrité : un changement de la structure complexe 3D est possible sans complètement couper les liaisons peptidiques [20]. Et enfin, (6) des changements dans la progression du cycle cellulaire et (7) dans l'état des mitochondrie et (8) l'induction de la sénescence, sont les principaux effets du plasma sur les cellules d'après la littérature scientifique [3,7,17,18,19,46,47].

L'étude effectuée par Partecke *et al.* montre que l'effet sur la viabilité des cellules augmente avec 1) le temps de traitement et/ou le voltage (dose) et, 2) le temps après traitement par un plasma jet d'Ar (agit jusqu'à 72h après traitement), et 3) pour des couches cellulaires moins profondes [2,24]. Il est intéressant de noter que certaines récentes études montrent que l'efficacité de traitement des cellules cancéreuses est accrue lorsque l'on ajoute de l'oxygène au gaz principal (tel que He ou Ar) alors que, parmi les premières études dans ce domaine, il a été observé aucune amélioration suite à l'ajout d'oxygène. Enfin, la sélectivité du traitement

par plasma sur les cellules tumorales et saines est un résultat important et très prometteur pour les applications cliniques (viabilité, détachement, cycle cellulaire...).

#### ◆ *Études in-vivo*

Les premières études *in-vitro* montrant un effet anti-cancer du plasma concernent les cellules de peau [3,12,15,23] alors que la première étude *in-vivo* présentant l'action anti-tumorale du plasma fut effectuée par Vandamme *et al.* en 2010 [26,48] sur des cellules humaines de glioblastome injectées sous la peau d'une souris. Les premiers traitements localisés de tumeurs *in-vivo* se sont généralement effectués en quelques minutes voire quelques secondes et ont montré une réduction importante de la taille de la tumeur [1,2,23,32,48].

Nous présenterons dans ce paragraphe quelques résultats et observations expérimentales provenant de récentes études effectuées sur ce sujet. Selon Keidar *et al.*, (i) l'ablation d'une tumeur de la vessie en un unique traitement par plasma de 5min, (ii) la destruction d'une tumeur de 5mm et moins après un traitement de 2min et (iii) la réduction de la taille de la tumeur (mélanome) après exposition de 5 min sur une souris ont été observés avec leur procédé expérimental [32]. Selon Vandamme *et al.*, un traitement de 6min pendant 5 jours consécutifs d'une tumeur de 155 mm<sup>3</sup> entraîne une diminution de 56% à 58% de sa taille initiale. Selon Kim *et al.*, le traitement d'une tumeur de 40 mm<sup>3</sup> pendant 5s durant 4 jours consécutifs mène à une inhibition de la croissance. D'après Partecke *et al.*, les cellules en surface de la tumeur entrent en apoptose et l'action du plasma a été mesurée jusqu'à une profondeur de ~60µm ; ils observent aucun dommage à la peau et une inhibition de croissance, i.e., aucune croissance des tumeurs 'ablatées' (croissance possible pour les tumeurs partiellement traités, sans toutefois atteindre sa taille initiale). Par contre, aucun changement n'a été induit dans le voisinage de la zone traitée et le temps de survie des souris traitées s'est allongé.

Le tableau I rappelle quelques résultats tirés de la littérature et obtenus dans un traitement *in-vivo* (cellules humaines injectées ou de souris).

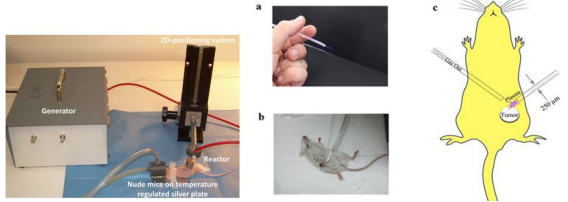
<p><b>Étude 1 :</b> Vandamme et al. (2010/2012)</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Plasma DBD</li> <li>- 6 min pdt 5 jours</li> <li>-Taille initiale tumeur: 200 mm<sup>2</sup></li> <li>- Résultats: ↓ 56% taille tumeur.</li> </ul>	<p><b>Étude 2 :</b> Keidar et al. (2011)</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Plasma Jet</li> <li>- Un traitement de 2 min</li> <li>- Taille initiale tumeur: 5 mm et plus</li> <li>- Résultats: Ablation de la tumeur 5mm <ul style="list-style-type: none"> <li>• ↓ Taille tumeur (si tumeur &gt; 5mm)</li> <li>• Croissance ralentie</li> <li>• taille initiale jamais atteinte</li> </ul> </li> </ul>
<p><b>Étude 3 :</b> Mirpour et al. (2016)</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Microplasma (He)</li> <li>-Traitement 1min à d=1cm/1.5cm</li> <li>-Taille tumeur (4T1) : 5mm</li> <li>- Résultats: - jusque 16j: efficacité plasma/drogue équivalente <ul style="list-style-type: none"> <li>- a 24j: 40% et 60% survie souris</li> <li>- Apoptose: 80% (plasma) vs 3% (drogue)</li> </ul> </li> </ul>	

Tableau I. Illustration de quelques résultats expérimentaux *in-vivo* issus de la littérature

## 1.5 Cancer du sein

### 1.5.1 Quelques statistiques

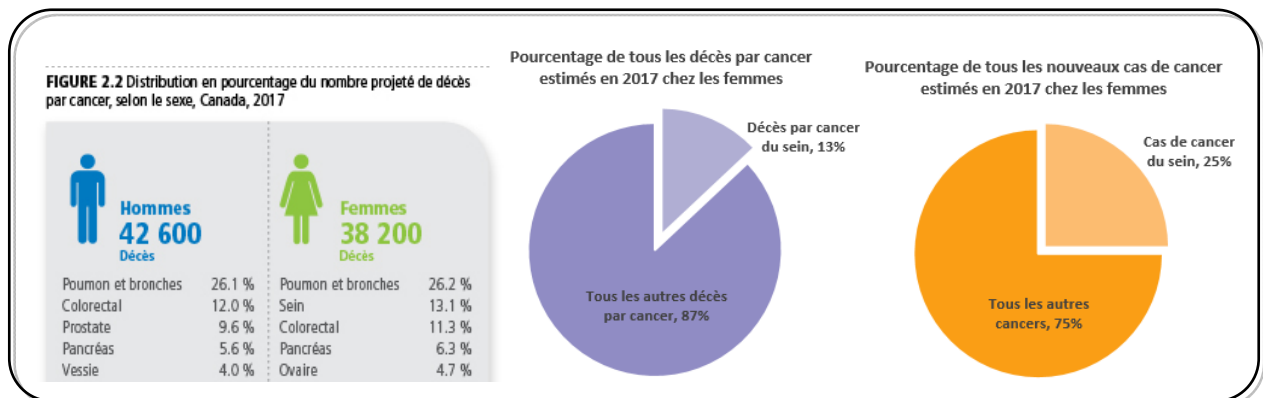
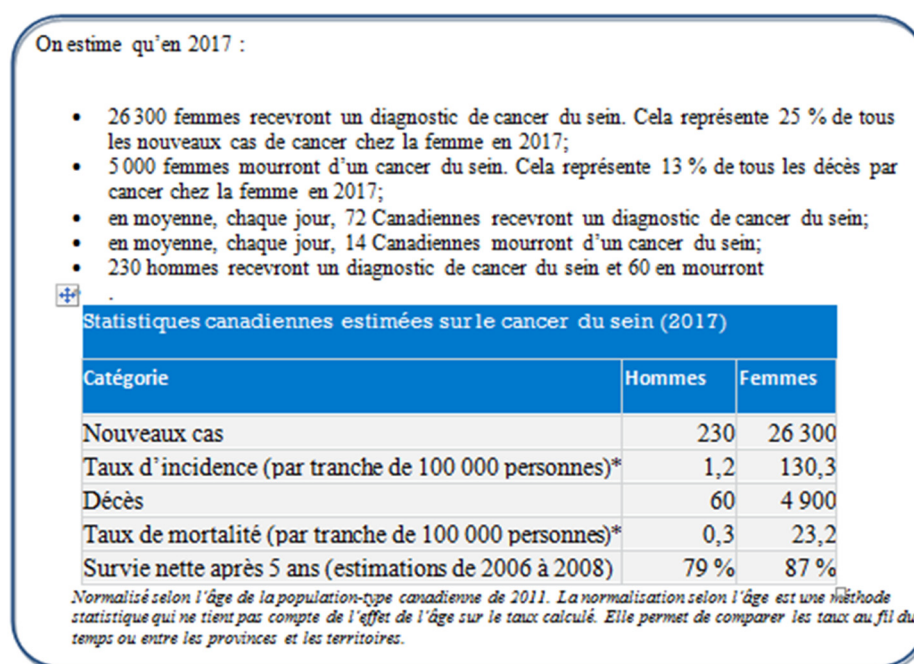


Figure 12. Rapport statistique effectuée par la Société Canadienne du Cancer sur le pourcentage des décès par cancer ainsi que les nouveaux cas estimés en 2017 chez les femmes.

D'après les statistiques, le cancer de seins est la 2<sup>ème</sup> cause de décès par cancer chez les femmes au Canada avec ~5000 décès prévu en 2017 (Fig.12). D'après les statistiques, 72 femmes reçoivent chaque jour un diagnostic de cancer de sein (Fig.13). Les hommes tout comme les femmes sont concernés par cette maladie même si à moindre mesure : une comparaison des statistiques canadiennes sur le cancer du sein est illustré dans la figure 13.



Source: société canadienne du cancer.

Figure 13. Statistiques canadiennes sur le cancer de sein chez les hommes et les femmes en 2017.

Au Québec, le cancer du sein est le type de cancer le plus souvent diagnostiqué chez les femmes. En 2017, on estime que 6 500 femmes recevront un diagnostic de cancer du sein alors qu'à l'échelle nationale, 26 300 femmes recevront ce diagnostic (25 % de tous les nouveaux cas de cancer chez la femme en 2017).

Les options qui s'offrent généralement au traitement du cancer du sein sont la chimiothérapie, la chirurgie et la radiothérapie malgré leurs limitations (effets secondaires, méthode non sélective et ablation incomplète de la tumeur...). Les progrès récemment réalisés en radio-oncologie (améliorations techniques des appareils de traitement, précision de la zone traitée, vitesse de traitement accrue...) ont permis d'optimiser les traitements de radiothérapie externe (RTE) en prescrivant, typiquement, **(1)** 50 Gy en 25 fractions (1 fraction/j, 5j/sem), **(2)** 40 Gy en 15 fractions si la tumeur est peu envahissante, et **(3)** un *boost* en électrons de 10 Gy en 4 fractions (à la plaie) après une chirurgie.

### **1.5.2 Traitement par plasma du cancer du sein: revue de la littérature**

Stimulées par la possibilité d'exploiter la sélectivité [32,37,57], des recherches sur une thérapie basée sur le plasma ont récemment été développées pour le traitement du cancer du sein. A titre d'exemple, les études menées par Mirpour *et al.* montrent que, suite à un traitement par un plasma jet He/O<sub>2</sub> pendant 300s, ~80% des cellules saines sont viables alors que seulement ~30% des cellules cancéreuses (MCF7) résistent au traitement. D'après les investigations menées par Wang *et al.* et Volotskova *et al.*, l'ajustement des paramètres tels que la résistance et le voltage du plasma ainsi que la puissance permettent d'identifier des conditions où l'exposition au plasma tue les cellules de cancer de sein métastatique en préservant les cellules saines. Certaines études montrent que l'ajout d'oxygène à un plasma d'Hélium ou d'Argon améliore l'efficacité du traitement en terme de viabilité et de l'activité apoptotique mesurée, pouvant même atteindre celle des médicaments (notamment la Doxorubicine, utilisée en chimiothérapie pour traiter les cancers du sein) [27,28,57]. Il est intéressant de noter qu'ils ont corrélé ces résultats avec la spectroscopie optique d'émission permettant l'identification des espèces présentes dans le plasma [24]. Park *et al.* comparent l'effet du plasma (DBD) sur 2 lignées de cellules cancéreuses de sein (MCF7 et MDA-MB-231), 2 lignées de cellules de sein saines ainsi qu'une lignée tumorale de poumon et du colon : l'augmentation du taux d'apoptose est plus importante pour MDA-MB-231 que pour MCF7

passant respectivement de 7.67% à 13.8% et de 10.7% à 13.5%, alors que le taux de ROS mesuré dans chacune des cellules suit la tendance inverse (le niveau de ROS mesuré est plus important dans les cellules MCF7 que MDA) ce qui expliquerait que les modifications épigénétiques soient plus importantes dans les cellules MCF7 (les gènes affectés sont ceux liés à la mobilité cellulaire, au développement tissulaire, à la motilité, à la communication, à l'interaction cellule-cellule et à la viabilité/mortalité cellulaire). Par ailleurs, on retiendra aussi de cette étude (i) la sélectivité dans le traitement et (ii) une vitesse de prolifération des cellules traitées vivantes bien inférieure à celle associée aux cellules saines illustrant que les cellules cancéreuses survivantes au traitement sont tout de même endommagées (croissance fortement ralentie). L'Annexe 2 présente un tableau récapitulatif sur les conditions de traitements et les résultats obtenus dans le cadre du traitement de cellules de sein par plasma.

### **1.5.3 Traitement par une combinaison plasma/élément actif : revue de la littérature**

Des études préliminaires combinant plasma et drogue (doxorubicine) montrent non seulement que cette combinaison est avantageuse mais aussi que, à faible dose de doxorubicine, les traitements ont un effet additif ; davantage d'études seront nécessaires pour savoir s'il existe un effet synergétique et, si oui, dans quelles conditions opératoires [18]. Les expériences menées par Zhu *et al.* sur les cellules de cancer de sein (MDA-MB-231 et MCF7) par une combinaison plasma/nanoparticules montrent clairement un effet synergétique entre les multiples signaux induits dans la cellule tumorale par ces deux procédés atteignant, respectivement, une réduction de ~ 50% et ~40% pour MCF7 et MDA-MB-231: ce traitement permet d'inhiber (i) la croissance des cellules cancéreuses et (ii) l'expression des gènes métastatiques [31,38,39,43]. Jalili *et al.* ont étudié l'effet combiné du plasma jet (He/O<sub>2</sub>) avec des nanoparticules de fer sur des cellules de sein MCF7 et HF (cellules saines). Dans certaines conditions, ils observent une réduction de plus de 60% de la viabilité de MCF7 après 30s de traitement ainsi qu'une fragmentation de l'ADN, une diminution de l'activité métabolique et une induction sélective de l'apoptose. De plus, pour de plus faibles doses, aucun effet toxique

n'est observé sur les cellules saines alors que sur MCF7, ils observent une induction de la prolifération [49].

#### **1.5.4 Solutions prometteuses ?**

Plusieurs études ont montré que la privation d'oxygène est une des principales raisons pour laquelle les cellules tumorales résistent à la radiothérapie [50]. Or, comme nous l'avons exposé précédemment, plusieurs études ont estimé la production de ROS dans les milieux intra et extracellulaire suite à un traitement par plasma. Selon Collet et *al.*, le traitement par plasma induit une rapide augmentation du niveau d'oxygène,  $pO_2$ , jusqu'à 4 fois sa valeur initiale (accompagnée d'une augmentation du flux sanguin). Ainsi, l'amélioration de l'oxygénation et de la perfusion nous permet de considérer sérieusement les possibilités prometteuses de *combiner la radiothérapie avec le plasma* comme thérapie anti-cancer.

Dans le cas du cancer du sein, une application intra-opératoire du plasma pourrait s'avérer très avantageuse : en effet, seul *le plasma* serait utilisé pour traiter le lit tumoral suite à une ablation de la tumeur. Il est important de noter qu'aucune résistance (des cellules cancéreuses) au plasma n'a été reportée dans la littérature jusqu'à présent. En conclusion, on retiendra qu'en chirurgie, le plasma offre l'avantage d'être une méthode minimalement invasive, permettant de traiter localement et spécifiquement les cellules de cancer du sein en préservant celles avoisinantes.

# CHAPITRE 2

## Matériel et Méthodes

### 2.1 Volet Physique : Procédé Plasma

Dans cette section, sera présenté et décrit le montage expérimental utilisé dans le cadre de l'étude sur le traitement des cellules cancéreuses par plasma ainsi que les éléments qui le composent.

#### 2.1.1 Montage expérimental général et source plasma

La figure 14 permet de visualiser globalement les éléments qui composent le procédé permettant de générer un jet de plasma à la PA. La source de plasma est générée dans un système appelé APGD-t, que nous décrivons par la suite.



Figure 14. Photo prise en laboratoire du système expérimental permettant de générer un plasma à la PA (APGD-t).



### 2.1.1.1 Source plasma : description technique

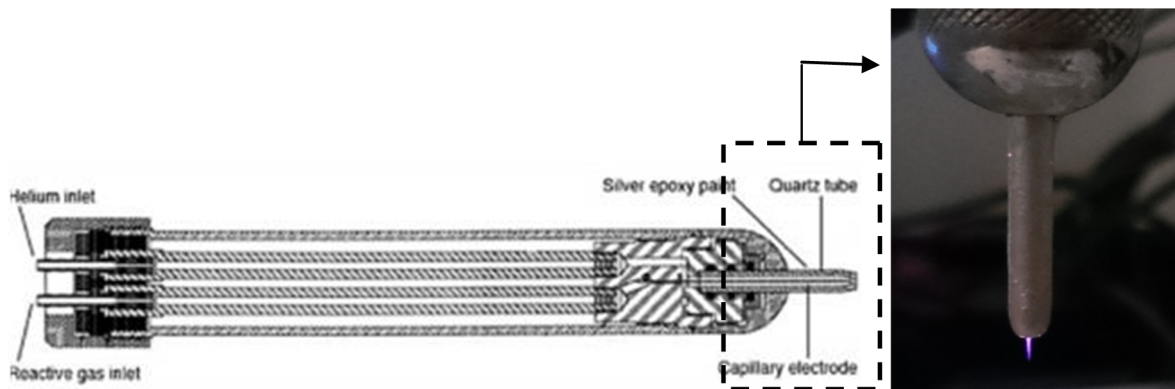


Figure 15. Schéma du système (APGD-t) où est généré le plasma à la PA. A droite, la photo montre le jet de plasma en sortie de la source.

Le plasma est formé à partir d'un gaz (He) à l'intérieur de l'espace entre le capillaire central et le tube de confinement en quartz (diélectrique) lui-même recouvert d'une couche conductrice d'oxyde d'argent (*Pelco<sup>R</sup> Colloidal Silver Liquid*) relié électriquement à la terre (Fig. 15). Le capillaire, qui joue aussi le rôle d'électrode, consiste en un tube en acier inoxydable de 0.3556 mm de diamètre externe et 0.1778 mm de diamètre interne. Le tube cylindrique en quartz, de diamètre interne 2 mm et de diamètre externe 4 mm, se termine en forme d'une pointe ou 'bec' (dans le sens de l'écoulement du gaz) dont le diamètre interne est de 500 $\mu$ m. Il est important de noter que l'extrémité du capillaire se trouve à 1 mm, vers l'intérieur, de la sortie du tube en quartz. On applique au système une onde modulée en amplitude de 13.56 MHz qui représente la fréquence d'excitation du gaz. On initie, donc, le plasma à partir de l'Hélium injecté dans l'espace inter-électrode (822 $\mu$ m), puis l'oxygène est apporté via le capillaire central lorsque le plasma d'He est formé. De par la géométrie du système, le champ électrique dans la zone autour des extrémités du capillaire et du tube de quartz est très intense, essentiel au maintien de la décharge. Le jet de plasma a un diamètre de 500 $\mu$ m et une longueur visible de quelques mm. Durant les expérimentations, la puissance du plasma peut être modulée en variant certains paramètres comme le voltage ou le DC (%). L'utilisateur peut facilement changer la puissance du plasma en variant la valeur de DC pour un voltage fixe [10,51].

### 2.1.1.2 Source plasma : quelques éléments clés

Les décharges créées dans l'Hélium présentent plusieurs avantages représentant de réels atouts pour des applications biomédicales. Ces décharges ont l'avantage d'opérer à un faible voltage à la PA et avec un signal d'excitation de type AC ; le système utilisé permet de faire varier la fréquence de modulation. On tire profit de l'existence des métastables d'He de hautes énergies ( $\approx 20$  eV) et ayant une longue durée de vie ( $\approx$  ns), pour le maintien de la décharge. Un autre avantage à l'utilisation d'une décharge d'Hélium est qu'un rapide transport des espèces radicalaires et excitées créées dans la décharge sur la surface à traiter est favorisé [52].

L'ajout du gaz moléculaire O<sub>2</sub> au plasma d'He représente une source importante d'espèces réactives puisque ce mélange génère la formation d'espèces chimiques très oxydantes (notamment l'oxygène atomique). L'efficacité des décharges contenant de l'oxygène est connue : elles sont utilisées dans différentes applications comme la stérilisation ou la gravure de substrats (électronique ou polymérique). Dans l'intérêt de cette étude, le débit d'O<sub>2</sub> variera de 0 à  $\sim 100$  sccm sachant que 10 sccm d'O<sub>2</sub> correspondent à une vitesse de gaz de  $7\text{ms}^{-1}$ . L'importante différence de débit entre He ( $\sim 11\text{pm litre par minute}$ ) et O<sub>2</sub> (0 à 100 sccm) et donc de vitesse des particules entre ces deux gaz ( $85\text{ms}^{-1}$  vs  $7\text{ms}^{-1}$ ) cause un important phénomène de cisaillement au point d'injection, ce qui favorise un mélange efficace entre ces '2 milieux'. De plus, la forme rétrécie du tube de quartz (électrode +) et la faible valeur du diamètre externe du capillaire (électrode -) permet de fortement augmenter le champ électrique local, ce qui permet de considérablement réduire la tension de claquage du gaz (autour de  $\sim 500\text{Vpp}$ ) pour former le plasma et la température du gaz [52,53]. Le système utilisé dans cette étude permet de faire varier les débits d'O<sub>2</sub> et d'He indépendamment l'un de l'autre,

### 2.1.2 Éléments du montage : description

Une brève description des équipements qui entourent l'APGD-t sera présentée dans cette section (Fig. 16).

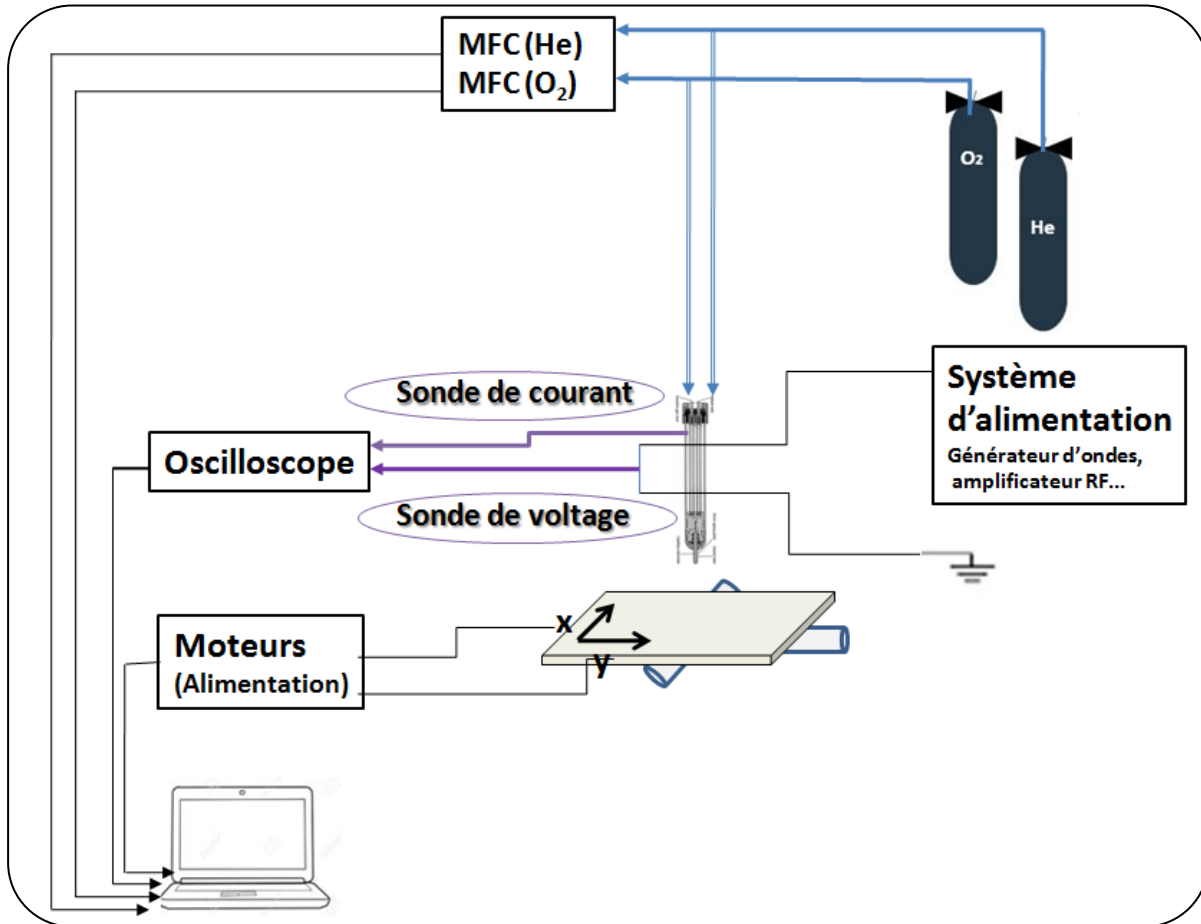


Figure 16. Représentation schématique du procédé expérimental ‘physique’ utilisée dans cette étude (équivalent à la photo de la figure 14).

◆ La boîte d’alimentation (fournie par NexPlasmaGen, Montréal) comprend tous les éléments électroniques et le système d’alimentation des gaz requis pour générer le plasma. Le signal RF modulé en amplitude avec une fréquence d’excitation de 13.56 MHz est fourni par un générateur d’onde. Les caractéristiques techniques détaillées des éléments composant la boîte d’alimentation ont été rapportées dans différentes publications [42, 51-53]. Le panneau de contrôle, un écran tactile, permet d’entrer et d’afficher en continu les valeurs de duty-cycle (DC (%)), des débits des gaz utilisés et la fréquence de répétition du pulse (ici, 100 Hz). Dans nos expérimentations, la valeur du duty-cycle (DC) varie de 1% à 5% (Fig. 17). Durant les expérimentations, un ventilateur permettant de refroidir les composants du circuit électrique a été rajouté afin de prévenir tout sur-chauffage des composants électroniques.



Figure 17. Écran tactile de la boîte d'alimentation du système plasma.

◆ Les gaz utilisés sont l'Hélium ultra haute pureté (UHP 5.0) et oxygène moléculaire extra-sec (grade médical, ED 2.6) avec une pureté respective de 99.999% et 99%. Le gaz initiant la décharge est l'Hélium ; quant à O<sub>2</sub>, il est injecté dans la décharge via le capillaire et représente la source principale d'espèces hautement réactives créées dans le plasma. Les débits de gaz sont contrôlés par des débitmètres (SmartTrack50 de Sierra pour O<sub>2</sub> et Axetris MFC série 2000 pour He) reliés à un ordinateur de contrôle : ainsi, les paramètres de contrôle (ouverture de la valve, température, débit minimal...) et la valeur du débit sont ajustés sur leur interface graphique respective (logiciels *Axetris MFX serie2000 v2.4* et *Software 50 Series*).

◆ Le courant de circuit et le voltage sont mesurés par, respectivement, une sonde de courant (Tektronix, Tek CT-2 *current transmitter*, 1mV/mA, 50Ω) et une sonde de tension (Tektronix P 5100A).

◆ L'oscilloscope digital (Tektronix TDS2012C) relié aux sondes permet de (i) mesurer les valeurs de V<sub>pp</sub>, V<sub>rms</sub>, I<sub>pp</sub>, I<sub>rms</sub><sup>1</sup> et la phase, et, de (ii) visualiser la forme des signaux de courant et de tension mesurés (Fig. 18).

---

<sup>1</sup> V<sub>pp</sub> : Tension sommet à sommet; V<sub>rms</sub>: Tension efficace; I<sub>pp</sub>: Courant sommet à sommet; I<sub>rms</sub>: Courant efficace .

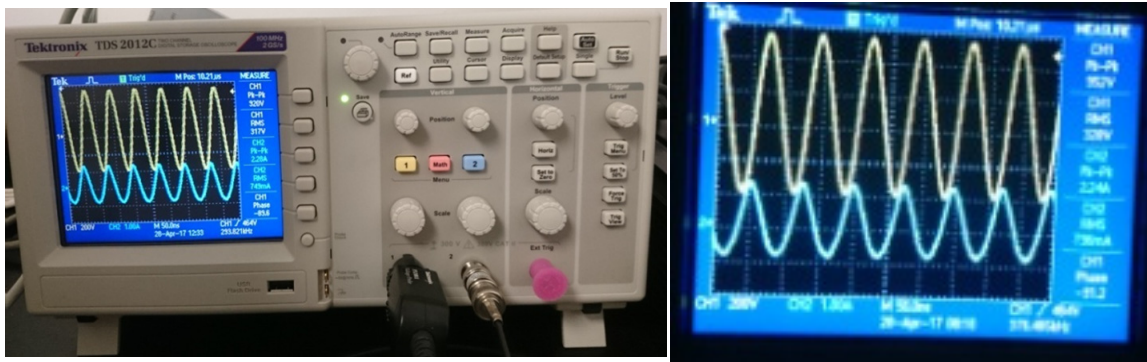


Figure 18. Oscilloscope digital et illustration des signaux de courant et tension mesurés avec les valeurs caractéristiques liées aux signaux comme  $V_{pp}$ ,  $V_{rms}$ ,  $I_{pp}$ ,  $I_{rms}$  et Phase (à droite de l'écran).

◆ Une plateforme motorisée (Velmex, moteur Vexta PK245-01AA) donne la possibilité de déplacer les échantillons selon un mouvement de translation en x et y pendant leur traitement par plasma sachant que z est fixé par l'utilisateur (Fig. 19). Les moteurs de déplacement de la plateforme peuvent être contrôlés manuellement ou par le biais de l'ordinateur (logiciel Cosmos version 3.1.6). La forme et la vitesse de déplacement sont déterminées par l'utilisateur via le logiciel : pour chaque modèle de déplacement, l'utilisateur doit écrire un petit programme informatique (Annexe 2). L'avantage de ce système est qu'il permet d'explorer un grand nombre de conditions puisqu'il s'adapte à différentes géométries du substrat à traiter et que la vitesse de déplacement est variable (dans les études antérieures faites avec ce système sur le détachement cellulaire, la vitesse choisie était de 5mm/s) [10,51].

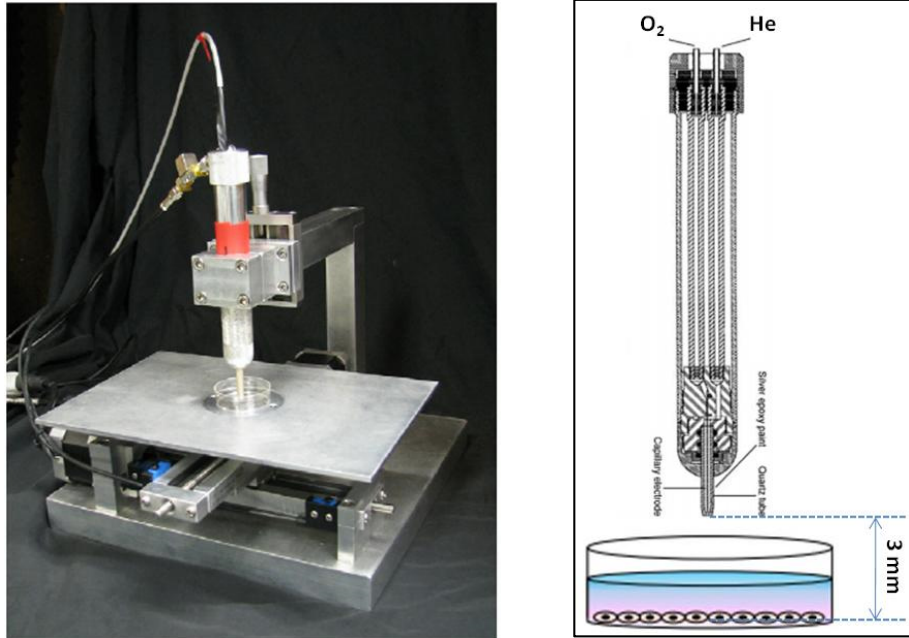


Figure 19. Système plasma maintenu sur un ‘T’ et plateforme mobile (2D) avec un moteur pour chaque direction. Positionnement de la source de plasma par rapport au Pétri lors d’un traitement au plasma des cellules.

◆ Un ordinateur portable (*Dell, Inspiron 14*) permet de contrôler les débitmètres et le déplacement de la plateforme (forme et vitesse) tel que présenté dans la figure 20.



Figure 20. Écran de contrôle des débitmètres et du moteur sur l’ordinateur portable.

### 2.1.3 Paramètres opératoires

Lors de notre étude, nous allons être amenés à explorer et à améliorer des conditions d'opération dans le but de comprendre et d'optimiser le traitement des cellules cancéreuses. Pour ce faire, un jeu d'alternance entre les paramètres fixes et variables sera nécessaire afin d'optimiser les conditions expérimentales (Tab. II). Néanmoins, l'extrémité du tube de quartz se trouvera à une position *fixe* de 3mm du substrat (Fig. 19) c'est-à-dire de la surface où sont déposées les cellules. A cette distance, 3mm, les cellules reçoivent principalement des espèces réactives neutres.

Paramètres physiques et biologiques de système de traitement par plasma							
Voltage	DC (%)	Débit He	Débit O2	Distance (extrémité/cells)	Vitesse de balayage	Hauteur du milieu	Lignée cellulaire

Tableau II. Paramètres opératoires pouvant être fixes ou variables durant l'étude expérimentale.

## 2.2 Volet Biologique : Étude au niveau cellulaire

Il existe, dans le domaine de la biologie cellulaire, une grande variété de protocoles expérimentaux pour vérifier une propriété, un mécanisme ou identifier une molécule biologique. Nous présenterons dans cette section les principaux protocoles suivis en biologie cellulaire nécessaires à notre étude.

## 2.2.1 Culture cellulaire : Méthodologie

Afin d'utiliser adéquatement les cellules et éviter les contaminations, il est essentiel de travailler dans la salle de culture cellulaire sous une hotte à flux laminaire (lampes UV, flux d'air stérile en continu). Plusieurs précautions sont à prendre à chaque étape avant, pendant et à la fin de tout protocole effectué en salle de culture pour éviter les contaminations telles que le nettoyage à l'alcool de la surface de travail et des bouteilles utilisées, le port d'un sarrau et de gants, des gestes soignés et précis de la part de l'opérateur...

### 2.2.1.1 Lignées cellulaires

Parmi les cellules tumorales utilisées, on compte (1) les cellules tumorales de patientes atteintes de cancer de sein métastatique MDA-MB-231 et MCF7, (2) les sarcomes ou cellules tumorales des tissus mous STS 117. Parmi les cellules saines utilisées, on utilisera les cellules épithéliales fibroblastes (BJ-u) et les Arpe. Les cellules MDA-MB-231, MCF7 et BJ-u sont mises en culture dans un milieu complet comprenant (i) du DMEM (*Dulbecco's Modification Eagle's Medium 1X*), (ii) du serum fœtal bovine (*FBS, Lot.1869517*) et (iii) 1% d'une solution antibiotique, la pénicilline streptomycine (*Multicell, Wisent inc.*). Les cellules STS117 et Arpe sont mises en culture dans un milieu complet DMEM-F12 (*Dulbecco's Modification Eagle's Medium/Ham's F12 50/50 Mix, 1X*), auquel on ajoute le même sérum et le même antibiotique, dans les mêmes proportions que lors de la préparation de DMEM. Ces cellules sont mises en culture dans des flacons ou *flasks* (T75 ou T175) dans des conditions standards soit un environnement contenant de l'air humidifié (5% CO<sub>2</sub> et 95% air) à 37C produit par un incubateur (*Fisher Scientific*). Pour l'étude du traitement des cellules de cancer de sein, il est intéressant de noter que les cellules MDA-MB-231 ont des récepteurs à estrogènes négatives et sont fortement invasives (croissance très rapide) alors que les MCF7 ont des récepteurs à œstrogènes positives et sont faiblement invasives (croissance lente). La confluence cellulaire (densité surfacique de cellules) recherchée peut varier d'environ 70% à 90%.



Chaque lignée cellulaire doit être caractérisée avant son utilisation dans une étude (Tab. III) : on détermine la quantité de cellules à déposer selon la confluence souhaitée et la vitesse de croissance. Pour ce faire, après avoir compté les cellules (§*Méthode de comptage des cellules*), on effectue plusieurs dilutions de sorte que l'on dépose dans chaque puits (d'une plaque à 6 puits) un nombre différent et connu de cellules. Les plaques sont placées dans l'incubateur et demeurent sous surveillance : observation sous microscope de 4h à 48h environ selon les besoins et la vitesse de prolifération de la cellule. Le tableau ci-dessous présente le nombre de cellules à déposer pour chaque lignée cellulaire dans un puits d'une plaque à 6 puits pour avoir une confluence de  $\sim(80\pm 10)\%$ . Si le substrat change, un simple rapport entre les surfaces permet d'estimer le nombre de cellules à ensemercer pour garder une même densité cellulaire ou confluence.

<b>Lignée cellulaire</b>	<b>Milieu de culture</b>	<b>Croissance</b>	<b>Densité de référence* (Cell/puits)</b>	<b>Autres Commentaires</b>
<i>STS 117</i>	DMEM-F12 (10%)	Rapide	110 000 à 120 000	
<i>MDA-MB-231</i>	DMEM (5%)	Rapide	150 000	Prolifération très rapide !
<i>MCF7</i>	DMEM (5%)	Lent	300 000	Pousse en 'amas'
<i>BJ-u (saines)</i>		Intermédiaire	180 000	Pousse en 'amas'
<i>Arpe (saines)</i>	DMEM-F12	Intermédiaire	180 000	

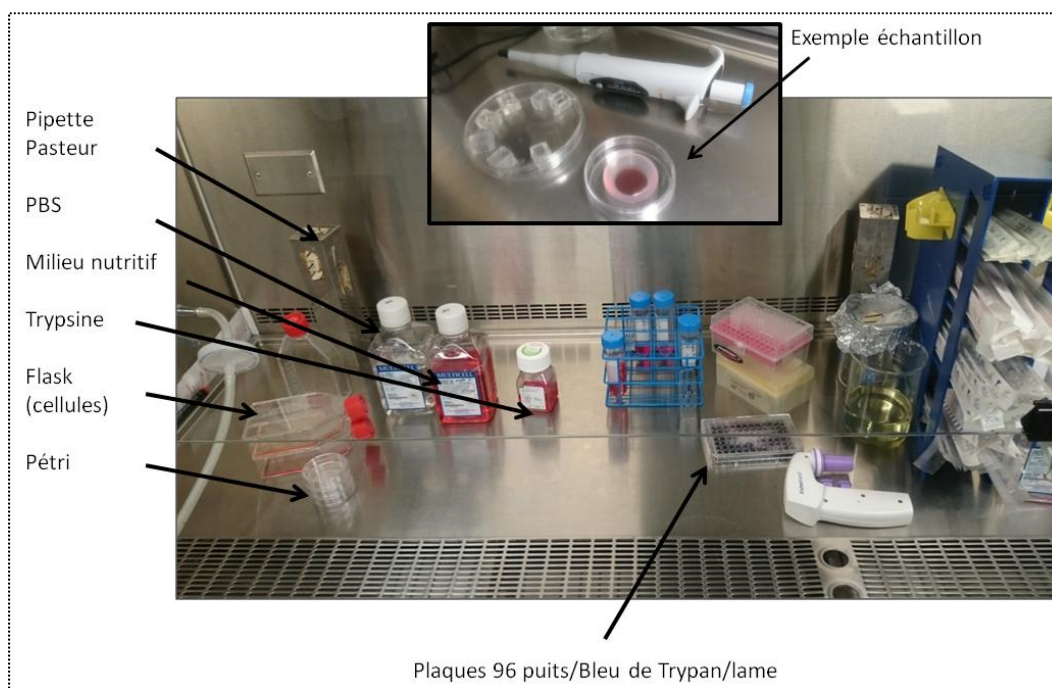
\* plaque à 6 puits (S= 9.6 cm<sup>2</sup>)

Tableau III. Informations de base caractéristiques pour chaque lignée cellulaire utilisée dans cette étude. La densité cellulaire de référence a été déterminée expérimentalement pour avoir une confluence cellulaire  $\sim 80\%$ .

### 2.2.1.2 Méthode de passage

Pour maintenir en vie les cellules et leur permettre une croissance dans les ‘meilleures’ conditions, nous effectuons régulièrement des passages cellulaires qui consistent à détacher les cellules de la surface du flacon (en utilisant une enzyme, la trypsine, qui rompt les protéines responsables des liens cellule/cellule et cellule /substrat), à diluer la quantité de cellule et les remettre dans un nouveau flacon contenant un milieu de culture.

Les étapes décrivant cette méthode sont : **(1)** à l’aide d’une pipette Pasteur, l’ancien milieu de culture est retiré, puis, le flacon est rincé avec 5 mL d’une solution tampon de PBS (*Multicell, Dulbecco’s Phosphate Buffered Saline 1X (DPBS)*), **(2)** après avoir ajouté 1 mL de trypsine (*Gibco, 0.25% Trypsin-EDTA (1X)*), le flask mis dans l’incubateur pendant le temps nécessaire pour que les liens cellules/surface et cellules/cellules soient rompus par les enzymes, **(3)** dès la sortie du flacon de l’incubateur, 4mL de milieu y sont ajoutés; après homogénéisation, une certaine proportion du volume est prélevée (selon la dilution désirée), **(4)** ce volume est déposé dans un nouveau flacon qui contient 10 mL de milieu nutritif. Après uniformisation, il est identifié puis soigneusement déposé dans l’incubateur où les cellules vont pouvoir adhérer sur la surface et croître dans des conditions favorables.



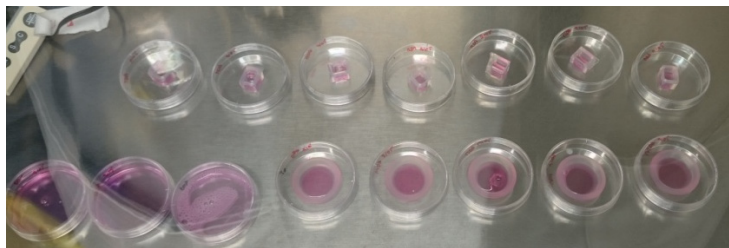


Figure 21. Hotte à flux laminaire, environnement stérile, contenant le matériel nécessaire pour compter, ensemer ou faire un passage cellulaire. Exemple d'échantillons préparés pour l'étude quantitative.

### 2.2.1.3 Méthode de comptage et d'ensemencement des cellules

Afin de préparer les échantillons qui seront exposés au plasma (Fig. 21), il faut d'une part compter les cellules présentes dans le flacon (ou déterminer leur concentration) et, d'autre part, déposer le bon nombre de cellules à ensemer pour obtenir une confluence convenable après avoir prélevé le volume nécessaire (déterminé par calcul) ; on tiendra compte de la superficie de la surface à ensemer si, pour une même confluence, on change de substrat. Quelque soit le substrat choisi (Pétri, plaques à 6 puits, à 12 puits...) il est possible de connaître ou de calculer sa surface.

#### ◆ *Comptage*

Les étapes à suivre pour compter les cellules sont : (1) on 'trypsinise' c'est-à-dire on effectue les étapes 1 à 3 décrites dans la méthode de passage cellulaire, (2) dans un puits d'une plaque à 96 puits, on dépose 50  $\mu\text{L}$  de bleu de Trypan (Sigma, 0.4%) et 50  $\mu\text{L}$  de solution contenant les cellules (dilution 1:2), (3) après avoir uniformisé la répartition des cellules dans ce volume, on prélève 10  $\mu\text{L}$  que l'on dépose sur une lame spécifique pour en faire une lecture à l'hémocytomètre ou compteur de cellules (*Bio-Rad, TC20, Automated cell counter*), (4) cette lame est disposée dans le compteur de cellules et nous permet de connaître la densité de cellules total (en cell/mL), le densité de cellules vivantes (et sa proportion en pourcentage) et une estimation de la répartition de la dimension de cellules détectées.

### ◆ *Ensemencement des cellules*

A partir de la densité de cellules vivantes obtenue et de la quantité de cellules souhaitée dans le substrat choisi (Pétri, par exemple), on calcule le volume à prélever pour l'ensemble des Pétris ou plaques à ensemer (C<sub>1</sub>V<sub>1</sub>=C<sub>2</sub>V<sub>2</sub>, avec C, la concentration, V, le volume, 1, initial et 2, final). Ces substrats sont ensuite déposés dans l'incubateur pour, en général, 24 h : ce temps dépend de la vitesse de croissance de la cellule et de la densité désirée.

Pour l'ensemble des expériences menées, les substrats utilisés sont les Pétris (60mm, Corning, 430196), les plaques (Corning, Nunc ou Costar) à x puits (x=6,12,24) et des inserts en silicones de formes circulaires et rectangulaires ont été utilisées (Sarstedt, FlexiPerm).

## **2.2.2 Détection de la mort cellulaire**

Pour tester l'efficacité du traitement par plasma sur les cellules, nous avons besoin de détecter si la mortalité a été induite. Pour ce faire, nous utiliserons différentes méthodes de types qualitatives et quantitatives.

### **2.2.2.1 Coloration**

Dans le domaine de la biologie cellulaire, la coloration est une méthode largement utilisée car elle combine simplicité et rapidité. Chaque colorant a une fonction bien précise : par exemple, il permet de caractériser un état métabolique de la cellule, ou encore la présence (ou absence) d'un 'élément' biologique (biomolécules...) dans ou sur la cellule. L'utilisation d'un microscope adéquat est nécessaire puisqu'il doit contenir les filtres indispensables permettant de visualiser la couleur (fluorescence). Ainsi, si la cellule retient le colorant, la couleur devient visible au microscope sinon, aucune coloration ne sera observée.

Après l'exposition des cellules au plasma, un volume de colorant (dilué dans du milieu de culture) est ajouté dans chaque puits contenant les cellules traitées. Placés dans la noirceur, les échantillons sont laissés un court moment pour favoriser l'interaction du colorant avec les cellules. Les cellules sont ensuite observées au microscope (EVOS, Life Technologies).

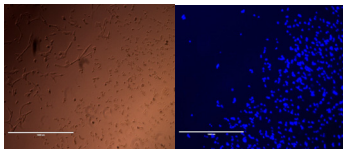
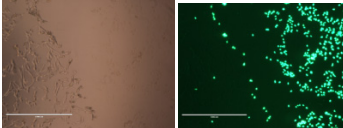
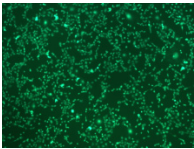
<b>Colorant</b>	<b>Marque</b>	<b>cible</b>	<b>Information au microscope</b>	<b>Information recherchée</b>	<b>Photos</b>
<b>DAPI</b> (1 :5000)	Life technologies Molecular probes	ADN	Noyau de la cellule	Perméabilité	 <p>STS 117 traitées</p>
Le Dapi, colorant de couleur bleue, se lie aux bases Adénine et Thymine de l'ADN. Le noyau devient alors visible au microscope.					
<b>SytoxGreen</b> (1:10000)	Life technologies Molecular probes	ADN	Noyau de la cellule	Perméabilité	 <p>STS117 traitées</p>
Le SytoxGreen (un agent intercalant, colorant de couleur verte) se lie facilement et rapidement à l'ADN. Il présente l'avantage d'avoir un très bon rapport signal sur bruit et un faible taux de 'photobleaching' (perte de couleur dû à la lumière) [58].					
<b>Calcein, AM</b> (1:5000)	Life technologies Molecular probes	Enzyme (Estérase)	Colore les cellules vivantes	Viabilité	 <p>MDA-MB-231 traitées</p>
La Calcein AM : l'estérase, une enzyme présente dans les cellules vivantes, élimine le groupement AM et la calcein reste piégée dans la cellule donnant lieu à une intense couleur verte. Les cellules mortes n'auront aucune coloration.					

Tableau IV. Caractéristiques des marqueurs ou colorants utilisés dans cette étude.

Cette méthode est qualitative et permet d'estimer rapidement l'état métabolique des cellules suite à leur exposition au plasma (Tab. IV) ainsi que leur proportion : Dapi et

SytoxGreen ont été utilisés pour vérifier si le traitement induisait une perméabilité des cellules (dans ce cas, le colorant s'introduit à l'intérieur des cellules perméabilisées qui le retiennent et prennent une couleur bleue ou verte selon le type de marquage utilisé (Tab. IV)). Le double marquage, Calcein AM et Dapi, permet de déterminer si les cellules sont vivantes ou mortes; autrement dit, si la perméabilisation (bleu /Dapi) mène à la mort des cellules, le marquage avec la Calcein AM n'induirait aucune coloration (Tab. IV). Notons que des comptes de cellules colorées/non colorées effectués sur des images prises au microscope permet d'estimer l'ampleur du phénomène observé (perméabilisation et/ou mortalité induite par le traitement par plasma). Au final, comme cette méthode donne un résultat qualitatif, il est donc intéressant de la combiner avec une méthode quantitative pour confirmer ces observations et en mesurer l'ampleur.

#### **2.2.2.2 Test clonogénique**

Ce test représente pour beaucoup de biologistes le '*gold standard*' même si cette méthode est très peu utilisée dans les articles scientifiques (probablement car l'obtention du résultat nécessite un temps relativement long). Cette méthode quantitative se base sur le principe que chaque cellule vivante sera capable de croître et de donner une colonie 'visible' (d'au moins 50 cellules).

Les étapes constituant cette méthode sont : (1) On effectue toutes les étapes de la méthode de comptage des cellules (hémacytomètre), (2) On procède à plusieurs dilutions de la solution contenant les cellules de sorte que dans chaque puits (d'une plaque à 6 puits) on dépose 100, 200, 400, 600, 1000, voire 1500 cellules dans un volume de 2 mL. Chaque dilution doit être effectuée, au minimum, en duplicata. La manière dont la dilution est faite affecte la précision et la reproductibilité du résultat obtenu : (i) dépôt de la 'goutte' (volume calculée) contenant les cellules puis ajout de 2mL de milieu nutritif, ou, (ii) préparation des solutions diluées et dépôt de 2 mL dans chaque puits. Après homogénéisation de la solution dans chaque puits, les plaques sont mises dans l'incubateur pour 24 h avant d'être utilisées.

Après leur traitement (plasma), les plaques sont disposées dans l'incubateur pendant un temps pouvant varier, généralement, de 7-8 jours à 15 jours selon les cellules. Lorsque les

colonies atteignent une taille visible à l'œil nu et que ces dernières sont bien séparées les unes des autres, ces cellules sont alors fixées et colorées avec une solution de Crystal Violet (CV à 5% et méthanol à 95%). Après un certains temps (~20-35 min), les plaques sont rincées et mises à sécher pendant 24 h. Les colonies (de couleur violette) seront finalement comptabilisées et l'efficacité du traitement sera estimée : l'estimation sera d'autant meilleure que les comptes en triplicata sont consistants entre eux et que l'évolution en fonction du nombre de cellules, initialement déposées, est respectée (ce qui fait la force de la fiabilité de cette méthode).

### **2.2.2.3 FACS**

L'apoptose (défini dans la section §1.4) peut être détectée de plusieurs manières, comme l'observation visuelle de la forme de la cellule, ou en 'colorant' l'ADN de la cellule avec du PI (Propidium Iodide), ou encore en effectuant le test Tunnel.

Nous décrirons dans cette section, le FACS (*fluorescence-activated cell sorting*) ou cytométrie en flux : on prendra connaissance des nombreuses applications du FACS suivi d'une description du fonctionnement de l'appareil et du principe de détection de la mort cellulaire.

#### **◆ *Applications***

Le FACS ou cytométrie en flux est une technique d'analyse des cellules qui permet de générer rapidement un ensemble de données complexes (Fig. 22).

### La cytométrie en flux et ses applications

- Analyse ADN/Cycle Cellulaire
- Prolifération cellulaire
- Phénotypage multicolore (surface cellulaire)
- Oxidation de monocytes
- Oxidation de neutrophiles
- Analyse Microbiologique
- Cytotoxicité cellulaire et des anticorps ou à médiation complémentaire
- Viabilité cellulaire
- Flux intracellulaire ionique (ex.  $\text{Ca}^{2+}$ )
- Phénotypage multicolore (intracellulaire)
- Phagocytose de monocytes
- Phagocytose de neutrophiles
- Trafic cellulaire
- Triage par morphologie (DLF et DLL) et/ou caractéristiques fluorescents.

Grace au cytomètre en flux, il est possible d'analyser des solutions cellulaires à un rythme extrêmement soutenu (jusqu'à des dizaines de milliers de cellules par seconde) tout en permettant jusqu'à 500 molécules par cellule d'être enregistrées. La rapidité et sensibilité de la cytométrie en flux en fait donc une méthode d'analyse de choix pour des populations cellulaires secondaires.

Figure 22. Liste des principales applications de la cytométrie en flux<sup>2</sup>.

#### ◆ *Principe Technique*

La cytométrie en flux permet d'effectuer une analyse multiparamétrique de cellules individualisées. Pour ce faire, les cellules seront dissociées les unes des autres et utilisées sous forme d'une suspension (gouttelettes). Une fois l'échantillon préparé, les cellules doivent défiler l'une après l'autre pour être analysées individuellement. Cela est possible grâce à un principe de la mécanique de fluides appelé hydrofocalisation.

---

<sup>2</sup> Source: [http://www.interchim.com/blog\\_fr/cytometrie-flux-analyse-cellulaire/](http://www.interchim.com/blog_fr/cytometrie-flux-analyse-cellulaire/)



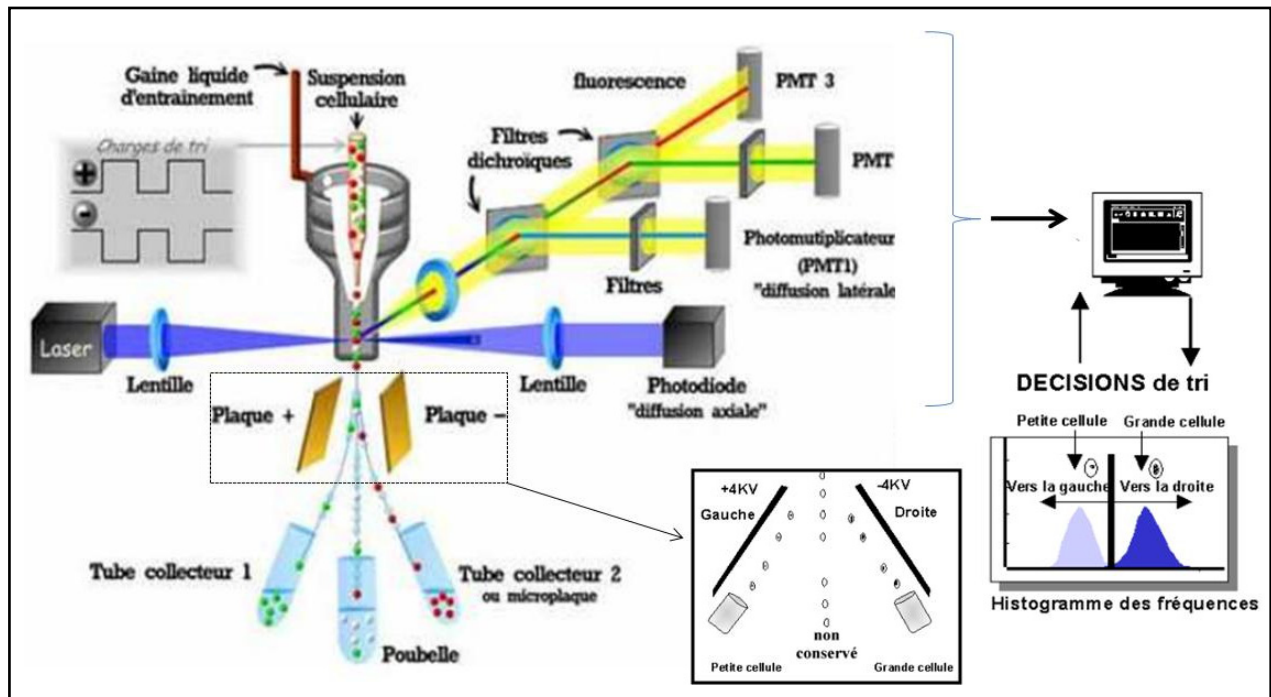


Figure 23. Représentation schématique d'un cytomètre en flux.<sup>3</sup>

La solution contenant la suspension cellulaire est amenée par le biais d'un injecteur au centre d'une buse dans laquelle un liquide dit « de gaine » est poussé avec une vitesse plus ou moins élevée (Fig. 23). L'architecture de la buse est conçue pour obtenir un flux laminaire au centre duquel les cellules seront transportées ; la sortie de cette buse est un orifice réduit et parfaitement calibré. Cette sortie réduite va provoquer une accélération du liquide et la formation d'un jet (une gaine liquide) d'un diamètre équivalent à celui de l'orifice de sortie. L'accélération induit un défilement rapide et régulier des cellules qui, ainsi séparées les unes des autres, peuvent faire l'objet d'une analyse individuelle.

En aval de la focalisation hydrodynamique, l'analyse des cellules est rendue possible par le biais d'une source d'excitation lumineuse (lasers) qui vient frapper chaque cellule induisant ainsi l'émission de fluorescence des fluorochromes utilisés pour le marquage. La source lumineuse utilisée est un faisceau laser qui présente l'avantage d'être

<sup>3</sup> Source : <http://www.ifr87.cnrs-gif.fr/pbc/images/photos/cytometre.jpg> et (<http://acces.ens-lyon.fr/acces/thematiques/immunité-et-vaccination/thematiques/cellules-immunes-et-organes-lymphoïdes/la-cytométrie-en-flux>)

monochromatique, facile à diriger et à focaliser. Un jeu de prismes et de lentilles permet de positionner avec précision le point d'intersection entre le laser et le flux. L'interaction des cellules avec les photons laser permet de caractériser et de classifier les cellules selon différents critères tels que la taille, la forme, la complexité ou la présence d'une molécule révélée par un composé fluorescent. L'utilisation de molécules fluorescentes (fluorochromes) couplées à des protéines ou molécules permettent la détection spécifique des composants cellulaires ou leur intégration. Les fluorochromes absorbent l'énergie lumineuse à une longueur d'onde donnée (excitation) et émettent à une longueur d'onde plus élevée. L'émission de fluorescence est dirigée par fibre optique jusqu'à une série de détecteurs (photomultiplicateurs) placés en aval de filtres (sélection chromatique).

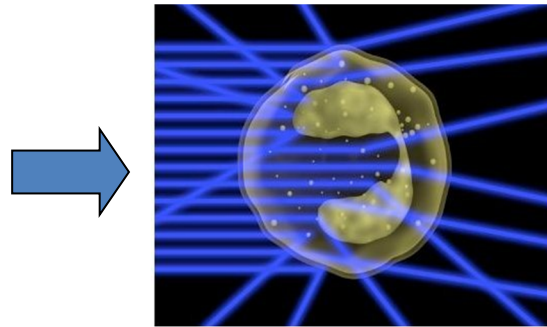


Figure 24. Diffusions possibles du signal lumineux après une interaction laser/cellule<sup>4</sup>.

Les signaux lumineux résultant de l'interaction laser/particules, sont de plusieurs natures (Fig. 24) : **(1)** La diffusion aux petits angles (*forward scatter* ou diffusion axiale) collectée dans l'axe du faisceau laser et correspondant à la diffraction, donne une indication sur la taille des particules à analyser ; **(2)** La diffusion aux grands angles (*side scatter*), collectée à 90° par rapport au faisceau lumineux incident, est un mélange de diffusion, réflexion et réfraction ; elle donne des indications sur la structure interne des cellules ; **(3)** La fluorescence est collectée à 90° par rapport au faisceau lumineux.

---

<sup>4</sup> Source: <http://accs.ens-lyon.fr/accs/thematiques/immunité-et-vaccination/thematiques/cellules-immunes-et-organes-lymphoïdes/la-cytométrie-en-flux>

Les signaux sont collectés et dirigés vers un banc optique équipé d'une lentille de collection, de miroirs dichroïques et de filtres (passe-haut, passe-bas ou passe-bande) qui permettent de filtrer selon les longueurs d'onde la lumière collectée, et la diriger vers les détecteurs appropriés (photomultiplicateurs ou détecteurs photovoltaïques) : l'intensité électrique est directement proportionnelle à la quantité de molécules fluorescentes émettrices. Ces informations pourront donc être digitalisées, enregistrées puis traitées par un ordinateur (Fig. 24) [54].

**◆ *Principe appliqué à la détection de la mort cellulaire causée par un agent anti-tumoral***

Par cette méthode, il est donc possible d'identifier des sous-types cellulaires en fonction de leurs propriétés physiques et leurs caractéristiques fluorescentes puis de les isoler et, éventuellement, de les trier. Sa capacité à réaliser une analyse quantitative multiparamétrique en fait une *méthode de référence* dans la recherche contre le cancer.

Dans les études sur le développement de nouveaux traitements contre le cancer, la cytométrie en flux est avantageuse car elle permet de réaliser des *études dose-réponse rapidement et très précisément* en analysant plusieurs marqueurs de façon *simultanée* : ainsi, il est possible en une seule expérience de tester l'efficacité d'un traitement sur la viabilité, les mécanismes de mort cellulaire, le potentiel mitochondrial, les dommages à l'ADN ou encore la prolifération, et de croiser ces paramètres avec la détection de marqueurs moléculaires membranaires (véritables signatures de sous-types cellulaires) ou de molécules intracellulaires.

La membrane cellulaire est formée d'une bicouche lipidique généralement localisée sur la face interne. Lorsqu'une cellule entre en apoptose, les résidus phosphatidylsérine (PS) normalement localisés sur la face interne sont réorientés sur le versant extracellulaire, aboutissant à une perte d'asymétrie de la membrane (Fig. 25).

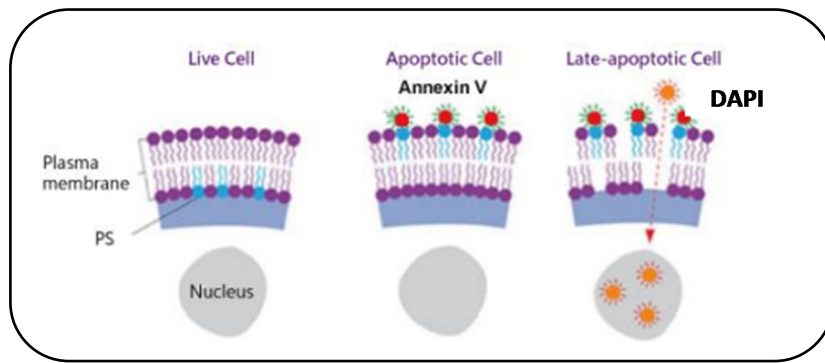


Figure 25. Réorientation de molécules constituant la bicouche lipidique de la membrane cellulaire [54].

L'AnnexinV, possédant une forte affinité pour ces résidus, colore la phosphatidyl sérine extériorisée : elle permet de détecter la phase précoce d'entrée en apoptose ('*early apoptose*'). Le Dapi, un composé chimique fluorescent, a aussi une forte affinité pour l'ADN (il se lie fortement aux bases Adénine et Thymines) : seules les cellules dont l'intégrité de la membrane est compromise seront marquées au Dapi. Cela permet ainsi la détection des cellules mortes ou en phase tardive d'apoptose ('*late apoptose*'). La combinaison de ces deux marqueurs permet de différencier les cellules vivantes (AnnexinV et Dapi négatifs) des cellules en phase précoce d'apoptose (AnnexinV positif, Dapi négatif) ou en phase tardive d'apoptose (AnnexinV positif, Dapi positif) : on représente ce résultat sous forme d'un graphique à 4 quadrants comme illustré schématiquement dans la figure 26.

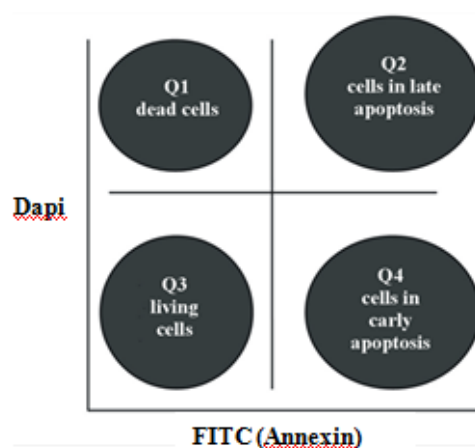


Figure 26. Schéma représentant les 4 populations de cellules possibles : chaque quadrant (Q1-Q2-Q4) est associé au mécanisme responsable de la mort des cellules

traitées par un agent anti-cancer tel que Q1= nécrose, Q2= apoptose tardif, Q4= apoptose précoce, Q3= cellules vivantes [59].

#### ◆ *Protocole expérimental (mort/vivant et apoptose)*

Ce protocole est *spécifique* à l'utilisation du FACS dans le but de déterminer la mortalité/viabilité des cellules et le mécanisme impliqué (Fig. 26). Il décrit la préparation des suspensions cellulaires (dans des tubes spécifiques) qui seront analysées au FACS.

Les cellules traitées sont incubées pendant un temps défini (généralement 24h). Le milieu nutritif et les cellules sont récoltés par 'trypsinisation' dans du PBS (solution tampon), puis, le tout est porté à la centrifugeuse (1400 g pendant 5 mins à 4 C). Le surnageant de chaque tube échantillon est aspiré, puis, la solution (PBS+ cellules) est transférée dans un tube spécifique au FACS qui sera de nouveau centrifugé et dont le surnageant sera aspiré.

Le second volet consiste à rajouter les marqueurs (fluorochromes) en effectuant un double marquage: un volume d'Annexin FITC dilué 1:20 dans une solution tampon 'AnnexinV buffer' est ajouté dans chaque tube. Les tubes sont mis à la noirceur pendant 15 min. On ajoute à chaque tube un volume de solution DAPI dilué 1:5000 dans le tampon AnnexinV. Avant de porter un tube au cytomètre (*BD LSRFortessa<sup>TM</sup>*) pour en faire l'analyse, la suspension cellulaire est vortexée pendant quelques secondes.

◆◆ Apport des diverses méthodes biologiques d'évaluation de l'efficacité du traitement par plasma utilisées dans cette étude.

De manière simple et concise, la méthode de 'coloration' permet d'une part de connaître l'état métabolique de la cellule suite au traitement par plasma, à savoir, l'induction ou non (i) d'une perméabilisation de la cellule (simple marquage) et (ii) de la mort cellulaire (double marquage). Une estimation à haut niveau est possible avec cette méthode en dénombrant les cellules colorées au microscope (pourcentage des cellules perméabilisées/mortes). La simplicité et le faible coût de cette méthode associés aux

informations apportées démontrent l'intérêt à utiliser la technique de coloration dans une première étape de l'étude.

Le recours au test clonogénique permet d'affirmer les observations qualitatives faites au microscope (double marquage) par la méthode de coloration en apportant un résultat quantitatif fiable (une cellule vivante donne une colonie) et sans ambiguïté (comparaison avec les différentes dilutions) sur le taux de mortalité cellulaire atteint suite au traitement des cellules par plasma.

Et enfin, l'utilisation de la méthode FACS nous permet d'obtenir plus d'informations sur l'état métabolique de la cellule. Dans notre étude, on s'intéressera par cette méthode **(i)** à connaître l'efficacité du traitement sur les cellules en déterminant le taux de mortalité induit (mort/vivant) , et, confirmer ainsi les résultats observés par la méthode de 'coloration'; ainsi que **(ii)** à approcher les mécanismes d'inactivation des cellules en s'intéressant à l'état métabolique de la cellule induit suite au traitement par un jet de plasma (nécrose, apoptose précoce ou tardif...).

Ainsi, la méthodologie utilisée permet, à chaque étape, de confirmer et d'affiner les résultats obtenus par la technique précédente de détection de la mort cellulaire.

# CHAPITRE 3

## Résultats et Interprétation

### 3.1 Caractérisation physique du procédé plasma

#### 3.1.1 Principe et caractérisation expérimentale

Comme il a été indiqué dans le chapitre 2, la comparaison d'un traitement par plasma relativement à un autre est difficile car, d'un procédé à l'autre, la nature du plasma et les conditions d'opération diffèrent énormément (méthode de génération du plasma, composition et densité des espèces, nature et débit de gaz, puissance plasma...). Il est possible, dans un premier temps, de considérer la tension comme une référence dans l'interprétation des résultats (en liant l'évolution d'un phénomène à la variation de la tension) ou à des fins de comparaisons avec la littérature. Toutefois, la puissance dissipée par le plasma représente un meilleur critère de comparaison puisque, d'une part, elle est directement reliée à l'énergie déposée sur le substrat lors du traitement, et, d'autre part, elle tient compte des conditions de courant et de tension appliquée au système. Le calcul de la puissance pour un plasma capacitif généré par un courant alternatif s'effectue à partir de la mesure du courant et de la tension en tenant compte de la phase entre ces deux signaux : ces mesures expérimentales sont obtenues par l'ensemble sonde HV/sonde CT-2/oscilloscope (cf. chap.2).

$$P = V_{rms} \times I_{rms} \times DC \times \cos \phi$$

avec

$$V_{rms} = \frac{V_{pp}}{\sqrt{2}}$$

et

$$I_{rms} = \frac{I_{pp}}{\sqrt{2}}$$

Avec,  $P$  : puissance (W) ;  $V$  et  $I$  : tension (V) et courant (A) ;  $\phi$  : phase ( $^{\circ}$ ) entre les deux signaux sinusoïdaux ;  $DC$  : Duty Cycle (%); rms et pp : root mean square et peak to peak.

L'équation implique le calcul de  $V_{rms}$  et  $I_{rms}$  (à partir de  $V_{pp}$  et  $I_{pp}$ ), or comme l'oscilloscope utilisé fournit ces 4 paramètres, ces données seront directement lues sur l'appareil de mesure.

Avant d'être exploité, le procédé plasma doit être caractérisé dans les conditions prévues de travail. Comme notre étude est exploratoire, nous serons amenés à faire varier la tension, le DC (%) ainsi que les débits d'He et d'O<sub>2</sub>. La caractérisation aura pour principal objectif de déterminer la puissance dissipée par le jet de plasma (i.e., celle déposée sur les cellules lors des expositions) lorsque ces paramètres varient. Finalement pour chaque condition explorée dans notre étude, la puissance plasma correspondante sera connue. Certains groupes de recherche utilisent 'la dose' comme critère de comparaison : bien que la définition de cette dose puisse varier d'un groupe à l'autre, elle est généralement définie par le produit de la densité de puissance par le temps d'exposition (dose en J/cm<sup>2</sup>).

### 3.1.2 Résultats de la caractérisation du plasma

#### 3.1.2.1 Caractérisation d'un plasma d'Hélium pur à un débit de 1lpm

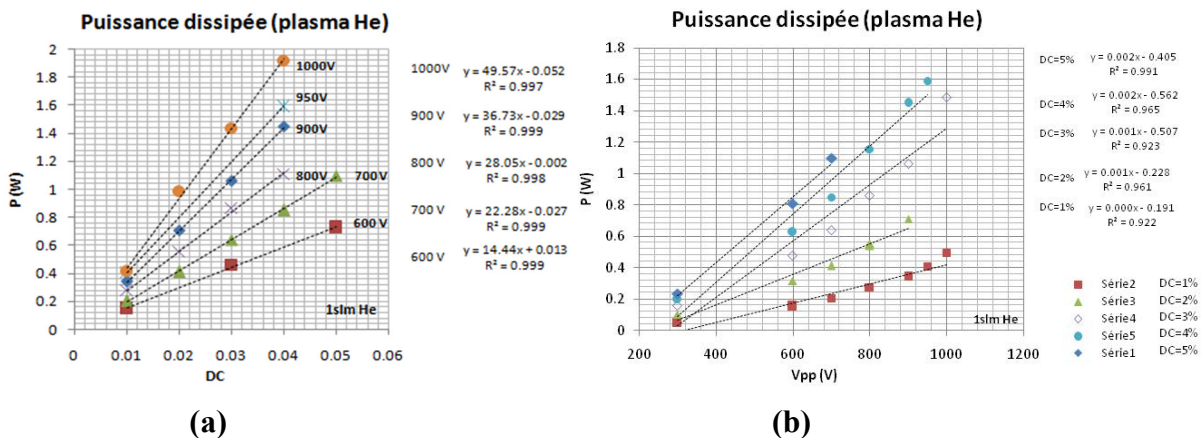


Figure 27. (a) Puissance dissipée, en Watt, en fonction de DC pour différentes valeurs de tension variant de 600V à 1kV ; (b) Puissance dissipée, en Watt, en fonction de la tension appliquée pour différentes valeurs de DC variant de 1% à 5%. Chaque graphique a été obtenu de manière indépendante.

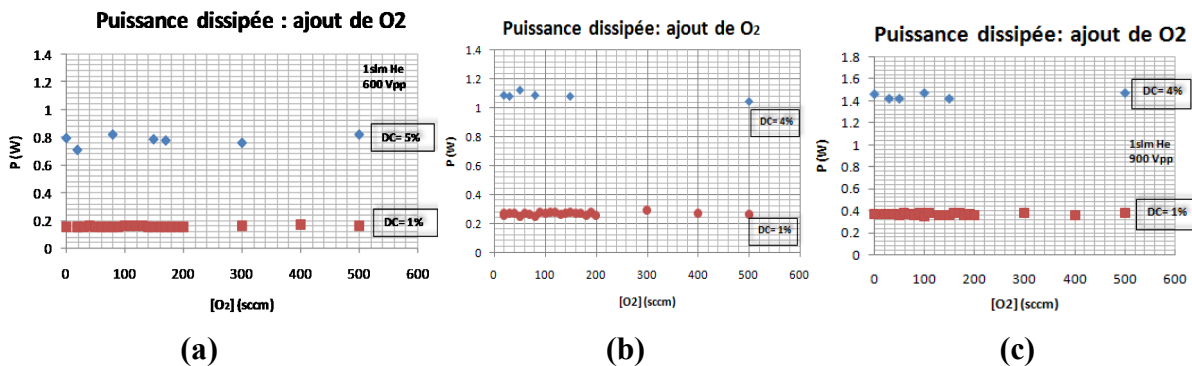


La figure 27 illustre l'évolution de la puissance délivrée par l'APGD-t en fonction de DC (Fig.27a) ou de  $V_{pp}$  (Fig.27b) : ces courbes expérimentales ont été obtenues en mesurant le courant et la tension efficaces ainsi que la phase pour chaque tension ou valeur de DC considérée.

Le calcul de la puissance dissipée dans le plasma nous permettra, en première approximation, de connaître la puissance déposée sur les cellules (les pertes de puissance par rayonnement et par conduction thermique sont négligées). Très brièvement, on observe bien une tendance linéaire entre la puissance dissipée ( $P$ ) dans le plasma et la variation de DC (%) ou celle du voltage appliquée ( $V_{pp}$ ), de sorte que  $P$  augmente linéairement (i) avec le voltage (quelque soit la valeur de DC) et (ii) avec DC (quelque soit la tension appliquée). Les valeurs sont reproductibles même si de légers écarts sont observés pour les hautes et très faibles valeurs de tension (écart inférieur à 2%).

### 3.1.2.2 Caractérisation d'un plasma dans un mélange (He+O<sub>2</sub>) : variation du débit d'O<sub>2</sub>

On observe que l'effet dû à l'ajout d'O<sub>2</sub>, pour un DC fixe, n'entraîne qu'une très faible variation de la valeur de la puissance dissipée : la puissance dissipée par le plasma demeure quasiment constante entre 0 et 500 sccm d'O<sub>2</sub> (Fig. 28). La variation estimée à 1-2% peut atteindre 5% pour de plus fortes valeurs de DC (~5%). En première approximation, on peut donc considérer constante la puissance, pour un débit d'O<sub>2</sub> variant de 0 à 100 sccm dans la gamme de DC exploitée. Les valeurs sont reproductibles et les écarts demeurent tout aussi faibles (inférieurs à 5%).



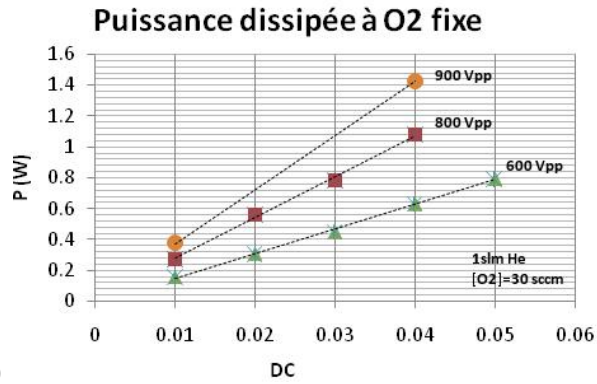


Figure 28. Puissance dissipée, en Watt, en fonction du débit d'O<sub>2</sub> variant de 0 à 600 sccm, et ce pour 2 valeurs de DC (1% et 4%) avec un voltage appliqué de (a) 600V, (b) 800V et (c) 900V. (d) Puissance dissipée, en Watt, en fonction de DC pour différents voltage et un débit fixe d'O<sub>2</sub> de 30 sccm.

### 3.1.2.3 Caractérisation d'un plasma dans un mélange (He+O<sub>2</sub>) : variation du débit d'He

La puissance plasma a été déterminée pour 3 valeurs différentes du débit d'He (0.5, 1 et 1.5 lpm) : pour chaque débit, la tension appliquée, le débit d'O<sub>2</sub> et la valeur de DC varient. La figure 29a présente les résultats pour un débit de 1.5 lpm d'He : les graphiques correspondant aux débits de 1 et 0.5 lpm d'He ne sont pas illustrés, mais la figure 29b montre la superposition de ces 3 graphiques obtenus pour 3 différentes valeurs de voltage.

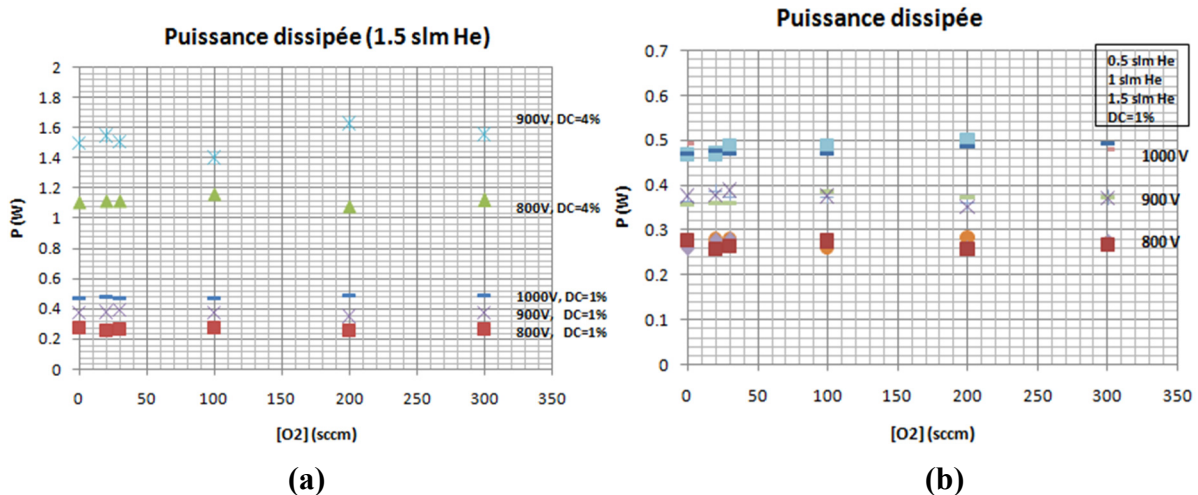
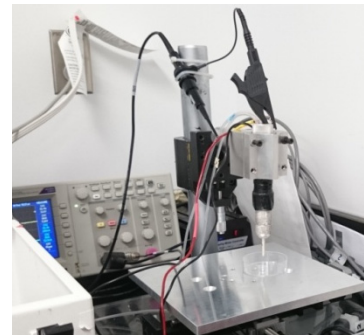


Figure 29. (a) Puissance dissipée, en Watt, en fonction du débit d'O<sub>2</sub> pour différents voltages appliqués et différentes valeurs de DC (1% et 4%). (b) Superposition des graphiques obtenus pour 1.5 lpm, 1 lpm et 0.5 lpm d'He.

D'après la figure 29b, l'ajout d'O<sub>2</sub> (0 à 300 sccm) interfère très peu sur la valeur de la puissance quelque soit le voltage (800-1000V) et le débit d'He dans une gamme de 0.5 lpm à 1.5 lpm. Il est intéressant de remarquer que multiplier la puissance par 2, 3, 4, ou 5 % à partir des valeurs obtenues à 1% est une approximation acceptable (cf valeurs associées aux Fig. 27 a et b).

### ***3.1.2.4 Effet de modifications expérimentales sur la caractérisation du plasma***

L'expérience a subi des modifications ayant permis d'améliorer la qualité du signal observé sur l'oscilloscope et préserver les éléments composant le circuit électronique du réchauffement. Un changement d'oscilloscope a été effectué en cours de parcours passant du modèle Tektronix TDS 3032C au modèle Tektronix TDS 2012C : le modèle TDS 2012C nécessite un adaptateur pour connecter la sonde de courant. Cette dernière



modification pouvant influencer les mesures, une expérience de caractérisation du plasma a été menée sur quelques conditions expérimentales pour estimer l'effet d'éventuels changements sur la caractérisation effectuée auparavant (Fig.27 à 29).

Comparativement aux anciens résultats, la mesure du courant diffère très peu (pas de modifications significatives sur les courbes de puissance) alors que celle de la phase diffère beaucoup plus. Or, l'équation permettant le calcul de la puissance est très sensible aux variations de la valeur de la phase ce qui explique la différence entre les courbes de caractérisations comme l'illustre la figure 30.

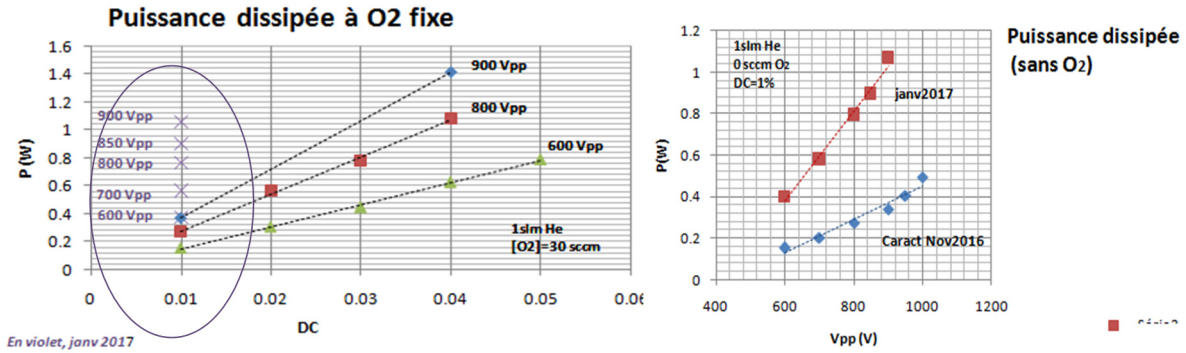


Figure 30. Puissance dissipée en fonction du voltage et de DC ; comparaison pour DC=1% avec les données antérieures dans le cas d'un plasma d'He avec et sans O<sub>2</sub>.

Par conséquent, de nouvelles prises de mesure ont été faites autour des conditions expérimentales de travail (Fig. 31a). Dans l'étude antérieure, nous avons montré qu'à partir de la courbe obtenue à DC=1% (pour différents voltages), il était possible de déduire, avec une bonne approximation, les courbes de puissance correspondantes aux autres valeurs de DC (en multipliant par la valeur de DC recherchée) comme le suggère l'équation du calcul de la puissance (§3.1.1) (Fig. 31b).

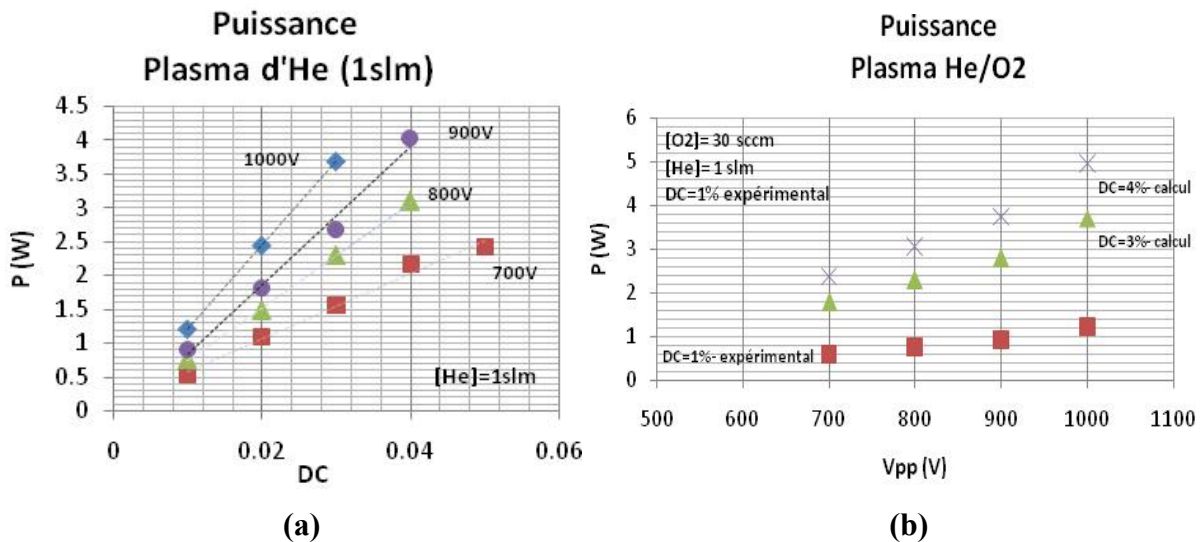


Figure 31. (a) Puissance dissipée en fonction de DC et du voltage; (b) Puissance dissipée en fonction du voltage pour DC=1% ; les courbes associées à DC=3% et DC=4% ont été déterminées par calcul à partir de la courbe expérimentale (DC=1%).

### 3.2 Résultats d'un traitement par plasma 'sans sillon'.

Sauf indication contraire, toutes les expériences 'quantitatives' qui auront lieu utiliseront des inserts en silicone circulaire ( $S=3.1\text{cm}^2$ ) ou rectangulaire de petite taille ( $S=0.9\text{cm}^2$ ) déposés dans un Pétri ( $S=21.3\text{cm}^2$ ) pour avoir une hauteur constante du milieu nutritif sur toute la surfaceensemencée. On traitera, par cette méthode (Fig. 32), 100% des cellulesensemencées : en effet, le modèle couvre toute la surface contenant les cellules.

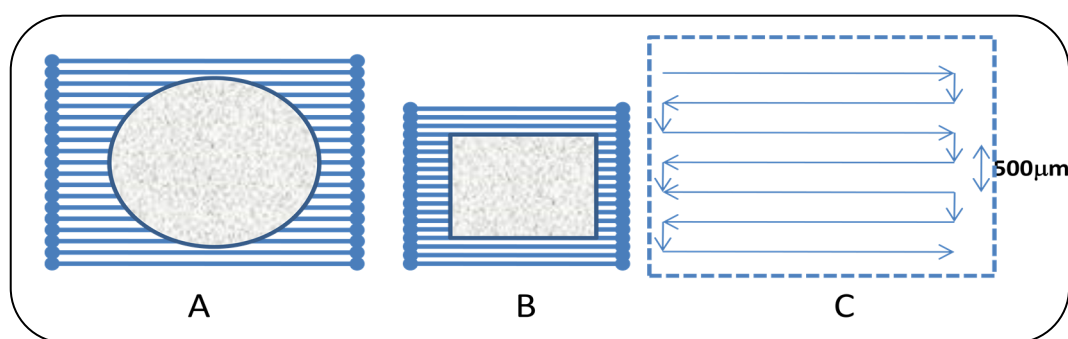


Figure 32 : modèle de balayage du jet de plasma en 2D permettant de traiter 100% des cellules : (A) utilisation de l'insert circulaire ( $S=3.1\text{cm}^2$ ), (B) utilisation de l'insert rectangulaire ( $S=0.9\text{cm}^2$ ) et (C) zoom du balayage du jet de plasma en 2D sur l'échantillon traité.

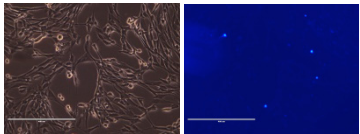
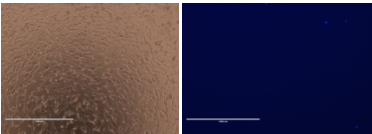
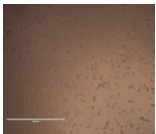
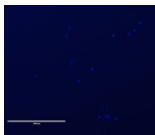


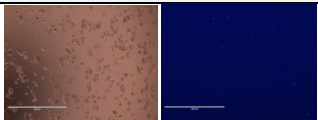
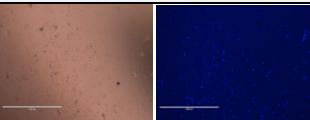
#### 3.2.1 Séries d'expériences d'optimisation des conditions opératoires

Afin d'étudier les effets d'une exposition au plasma sur les cellules, il est essentiel qu'elles ne soient pas détachées du substrat lors du traitement. C'est pourquoi il sera toujours nécessaire d'effectuer des expériences préliminaires d'optimisation permettant de vérifier que les cellules adhèrent à la surface lors des expériences d'optimisation du traitement 'anti-cancer' par plasma.

### 3.2.1.1 Test préliminaire sur la Sécheresse

Ce test préliminaire est essentiel car il permet de vérifier que le protocole opératoire lors des expositions (manipulation des cellules) n’interfère pas avec les résultats obtenus. De manière pratique, le but de ce test est de vérifier combien de temps les cellules peuvent se maintenir en vie sans milieu et, par conséquent, connaître la ‘signature’ de la cellule ayant séchée pour, éventuellement, éliminer la possibilité que le traitement mène au dessèchement cellulaire (ce qui induirait leur mort). Dans une plaque à 24 puits, on sèche les puits à l’aide d’une pipette Pasteur, puis une solution contenant du Dapi est ajoutée à des temps précis (variant de 0 à 2-3 min) ; Les puits sont ensuite observés au microscope (Tab.V).

D’après les résultats obtenus, on note que la ‘signature de la dessiccation’ est une augmentation de la perméabilité selon le degré d’assèchement de l’échantillon et qu’il n’implique aucun changement morphologique. En conclusion, le protocole expérimental d’exposition des cellules n’induit pas de mortalité due à la dessiccation pour les cellules STS 117 et MCF7 (Tab. V).

STS117	De <u>0 à 1 min</u> : globalement, pas de changement au niveau de la perméabilité des cellules. A <u>2min</u> : légère augmentation de la perméabilité, estimée à environ 3% (sur 500 cellules)
	<div style="display: flex; justify-content: space-around; align-items: center;">    </div> <div style="display: flex; justify-content: space-around; margin-top: 10px;"> <div style="text-align: center;"> <b>Témoin (Dapi :~ 0 à 6)</b></div> <div style="text-align: center;"> <b>65s (~6)</b></div> <div style="text-align: center;"> <b>120 s (~17)</b></div> </div>
MCF7	De <u>0 à 2 min</u> : globalement, pas de changement de la perméabilité des cellules (Dapi:~50). A <u>3 min</u> : légère augmentation de la perméabilité
	<div style="display: flex; justify-content: space-around; align-items: center;">   </div>

	5s (~50)	3min (~100)
<b>Conclusion</b>	<p>*Augmentation relative de la perméabilité des cellules lorsqu'elles sont asséchées mais aucun changement morphologique (sauf pour des temps plus longs) : '<i>signature de la dessiccation</i>'.</p> <p>*Notons que l'utilisation de la pipette Pasteur 'surestime' l'assèchement du milieu or en laboratoire, on travaille avec une pipette traditionnelle (Pétri est donc <u>moins sec</u>) et des temps <u>plus courts</u> où les cellules sont 'sans milieu'. <b>Donc le <i>protocole expérimental ne devrait pas induire la mort par dessiccation.</i></b></p>	

Tableau V. Test de sécheresse effectué sur MCF7 et STS117 (pipette Pasteur utilisé pour sécher le substrat).

Parmi les paramètres pouvant influencer le détachement cellulaire, on compte principalement le débit de gaz, la quantité de milieu et la vitesse de balayage (nature de la confluence, type de substrat i.e., type de plaques...). Chaque cellule étant différente, cette étape sera effectuée et répétée pour chaque cellule participant à l'étude du traitement 'anti-cancer' par plasma.

### 3.2.1.2 Détermination de la quantité optimale de milieu

On définit la quantité 'optimale' de milieu dans le Pétri lorsque, pour des conditions 'fortes' d'exposition, (1) pas ou extrêmement peu de détachement cellulaire est observé et (2) une perméabilisation des cellules est, idéalement, induite post-traitement (Dapi). Le tableau VI illustre les observations au microscope résultantes de l'exposition au plasma de cellules dont la hauteur de milieu les recouvrant varie de 1mm à environ 1.6 mm. Les images démontrent l'effet de la variation de la hauteur du milieu sur ces cellules. Il apparaît clairement que la hauteur du milieu nutritif a un effet sur l'efficacité du traitement par plasma (les prochaines expériences confirmeront ce point essentiel). De plus, la hauteur de milieu 'optimale' déterminée pour chacune des lignées est différente mais demeure, toutefois, très proche. Dans

l'optique d'homogénéiser les conditions opératoires, 1.55mm serait la hauteur optimale de milieu commune aux cellules tumorales testées.

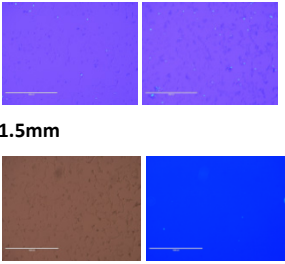
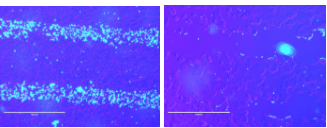
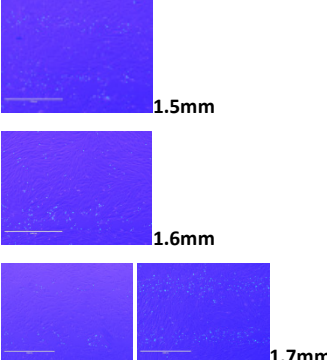
	STS 117	MCF7	FBu (fibroblast)
<b>Nombres cellules 'seedées' (plaque puits) 6</b>	1.3x10 <sup>5</sup> cells/Puits (confluence:80%)	3 x10 <sup>5</sup> cells/Puits (confluence:75%)	1.8 x10 <sup>5</sup> cells/Puits (confluence:+90%)*
<b>Temps d'incubation</b>	1 jour	2 jours	2 jours
<b>Conditions d'exposition</b>	1slm He, 30 sccm O <sub>2</sub> et ~ 950 Vpp, DC=3%,		
<b>**Hauteurs de milieu testées (mm)</b>	1.2 ; 1.3 ; 1.4 ; 1.5 ;1.6 ; 1.25 ; 1.35 ; 1.55	1.2 ; 1.3 ; 1.4 ;1.5 ;1.6	1.2 ; 1.3 ;1.4 ;1.5 ;1.6 ;1.65 , 1.7 ;
<b>Commentaires</b>	<b>1.5mm</b> : léger arrachement <b>1.6mm</b> : pas arrachement + pas perméabilisation <b>1.55mm</b> :pas arrachement + très légère perméabilisation	<b>1.5 et 1.6mm</b> : pas arrachement mais existe qqs zones où il y a un peu d'arrachement. Perméabilisation	<b>1.6mm</b> : pas arrachement sauf qqs endroits. Permeab <b>1.7mm</b> : pas arrachement et très peu de perméabilisation. <b>1.65mm</b> : pas arrachement (sauf en 'bas' puit : légers arrachement)  <b>Rem : le diamètre arraché diminue clairement avec l'augmentation de la quantité de milieu.</b>
<b>Observations</b>	 1.5mm 1.55mm	 1.6mm	 1.5mm 1.6mm 1.7mm
<b>Quantité de milieu 'optimale'</b>	Entre 1.5 et 1.6 mm  Si on veut déterminer une quantité optimale et commune aux cellules tumorales testées, on choisira <b>1.55mm.</b>	Entre 1.5 et 1.6 mm	Entre 1.6 et 1.7mm

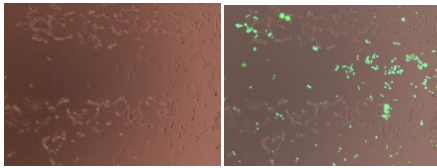
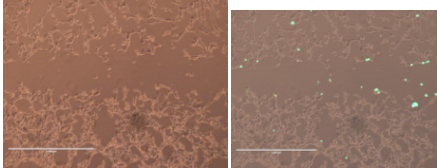
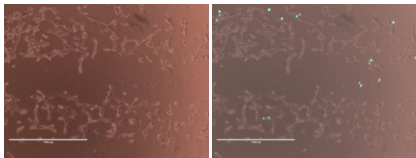
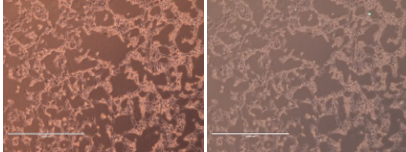
Tableau VI. Récapitulatif des conditions et résultats suite à l'optimisation de la quantité de milieu pour éviter le détachement cellulaire. Initialement, les hauteurs testées varient de 1mm à 1.7mm (Notation : permeab = perméabilisation).



La hauteur du milieu est un paramètre crucial. En effet, comme il a été rapporté dans la littérature, la présence du milieu nutritif peut inhiber le détachement cellulaire [19] mais aussi influencer l'efficacité du traitement [18,20] comme l'illustre le tableau VII ci-dessous.

### ***Effet protecteur du milieu***

La quantité de milieu recouvrant les cellules doit être limitée pour ne pas privilégier l'effet protecteur du milieu de culture [18,20]. Le tableau VII est un exemple illustrant l'effet de la quantité de milieu sur le détachement cellulaire et la perméabilité de cellules STS117 suite à leur exposition au plasma. De plus, on constate pour FB-u que la quantité de cellules arrachées diminue lorsque la hauteur du milieu augmente (Tab.VI).

Quantité milieu (mm)	STS117	Quantité milieu (mm)	STS117
Condition s	<b>Cellules ensemencées dans une plaque à 6 puits.</b> <b>Conditions : 950V, DC=4%, 1slm He +30 sccm O<sub>2</sub></b>		
<b>1mm *</b> (960 µL)	 Trace du jet visible /Perméabilité (+++)	<b>1.1mm</b>	 Trace du jet visible/Perméabilité (++)
<b>1.2mm*</b> (1155µL),	 Trace du jet visible; /Perméabilité (+) <i>estimation : ≈500µm en moyenne</i>	<b>1.317m m</b> (1265µL, article condition)	 Aucune trace visible/ Aucune Perméabilité

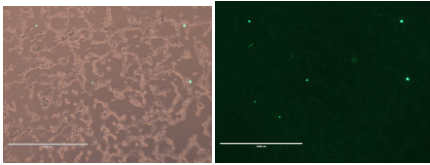
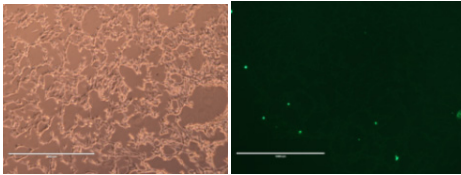
<b>1.4mm</b> (1345 $\mu$ L),	 Aucune trace/ Aucune perméabilité	<u><b>Témoin</b></u>	
<b>Observations</b>	<b>Le volume optimal correspond à une hauteur autour de 1.3 mm (1.2-1.4). Reste donc à affiner l'optimisation du volume et corrélérer avec les autres cellules...</b>		

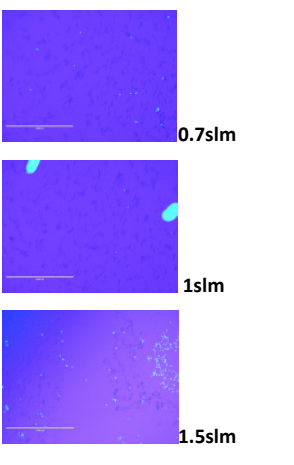
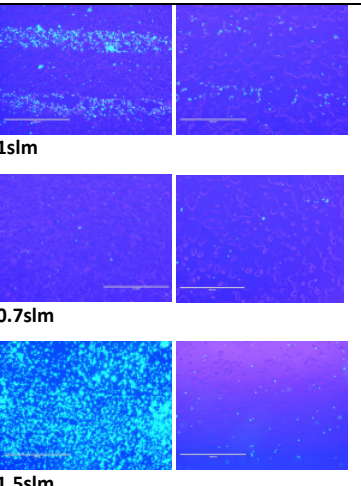
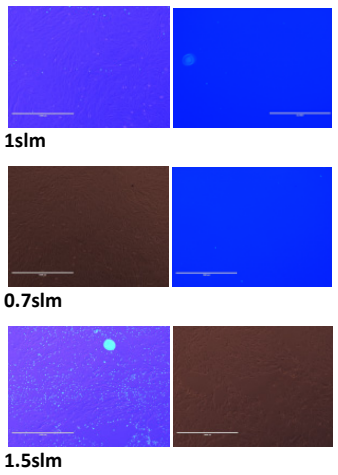
Tableau VII. Influence de la hauteur du milieu au dessus des cellules sur l'arrachement et la perméabilisation suite au traitement par plasma (APGD-t) des cellules STS117.

À la lumière de ces éléments, on comprend l'importance de caractériser, dans l'étude *in-vitro*, l'effet d'un milieu recouvrant les cellules sur l'efficacité du traitement par un jet de plasma. Effet, en vue d'une application clinique, l'étude *in-vivo* aura pour point de départ l'étude *in-vitro* : les cellules humaines (saines et tumorales) étant naturellement recouvertes d'un 'liquide' (sang...), il sera important d'estimer l'effet d'une certaine hauteur de ce milieu recouvrant ces cellules et d'optimiser cette hauteur pour maximiser l'efficacité du traitement (fort taux de mortalité des cellules tumorales tout en préservant au maximum les cellules saines).

### 3.2.1.3 Effet du débit

L'effet du débit sur les cellules STS117, MCF7 et les fibroblastes (FBu) déterminé à partir des images au microscope des cellules marquées au Dapi est présenté dans le tableau VIII. On recherche à observer l'effet du débit sur l'adhésion des cellules et leur perméabilité. Notons que les effets de la variation du débit peuvent légèrement varier d'une cellule à l'autre : phénomène que nous tenterons d'éliminer en 'homogénéisant' les paramètres d'exposition (en vue d'une application clinique). Si l'homogénéisation n'est pas possible, il faudra définir une valeur fixe et optimale du débit pour chaque lignée cellulaire.

D'après les observations décrites dans le tableau et souhaitant, dans l'idéal, homogénéiser les conditions de traitement, on choisira une hauteur de milieu de 1.55mm et un débit de 1lpm pour l'ensemble des cellules.

	STS 117	MCF7	FBu
<b>Nombres cellules 'seedées' (plaques 6 puits)</b>	1.3x10 <sup>5</sup> cells/Puits (confluence:80% et +)	3 x10 <sup>5</sup> cells/Puits (confluence:75%)	1.8 x10 <sup>5</sup> cells/Puits (confluence:+90%)
<b>Conditions d'exposition</b>	~850 Vpp, DC=3-4%, 30 sccm O2. <i>Hauteur du milieu : 1.55mm pour sts117 et mcf7 et 1.65mm pour FBu.</i>		
<b>Temps incubation</b>	1 jour	2 jours	2 jours
<b>**Débits testés (slm) D=DC (%)</b>	0.7 (D3 et D4) ; 1 (D3 et D4) ; 1.5 (D3 et D4)		
<b>Observations</b>	<p><b>0.7slm et 1 slm</b> : pas arrachement (existe perméabilisation pour D4)</p> <p><b>1.5slm</b> : fort arrachement + cells en mauvais état !</p>	<p><b>0.7slm</b> : pas arrachement, permeab légèrement &gt;témoin.</p> <p><b>1slm</b> : à D4, très léger arrachement par endroit (D3: aucun arrachement)</p> <p><b>1.5slm</b> : violent arrachement : très peu de cells restent intacts (débris)</p>	<p><b>1slm</b> : pas arrachement ; pas permeab pour D3 et permeab pour D4</p> <p><b>0.7 slm</b> : pas arrachement qq soit densité des cells ; très légère permeab pour D4</p> <p><b>1.5 slm</b> : observe plus de cells pulvérisées que arrachées ! (photos).</p>
<b>Aperçu Microscope</b>	 <p>0.7slm</p> <p>1slm</p> <p>1.5slm</p>	 <p>1slm</p> <p>0.7slm</p> <p>1.5slm</p>	 <p>1slm</p> <p>0.7slm</p> <p>1.5slm</p>
<b>Commentaires</b>	* Une seconde confirmation que 1.55 mm de milieu pour ces cellules tumorales est une 'bonne' condition pour ne pas avoir d'arrachement (un peu moins optimale pour		

	<p>la perméabilisation : une valeur plus proche de 1.5 mm serait mieux pour sts117 et autour de 1.6mm pour mcf7.... Or le but est d'homogénéiser le traitement d'où le choix de <u>1.55mm</u>.</p> <p>*Le débit choisi sera <u>1 slm</u> pour les prochaines expositions</p>
--	--

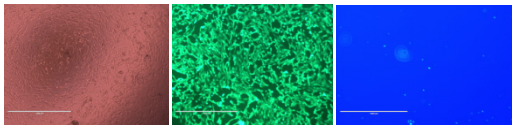
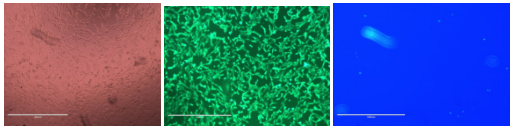
Tableau VIII. Récapitulatif des conditions et résultats visant l'optimisation du débit de gaz pour éviter le détachement cellulaire (en tenant compte de l'optimisation de la quantité de milieu). FBU sont des cellules saines. (Notation : permeab = perméabilisation ; Dx : DC=x%).

### 3.2.1.4 Effet du DC (voltage fixe)

D'après la littérature (§1.4.2), l'augmentation de la puissance plasma (dans des conditions raisonnables de travail évitant la nécrose) améliore l'efficacité du traitement. Or il faut vérifier que cette augmentation n'impliquera aucun détachement cellulaire pendant notre étude.

A titre indicatif, le tableau IX illustre la sensibilité des cellules à être détachées du substrat lorsque DC varie (débit faible). Il en résulte des observations décrites dans le tableau IX qu'il existe une limite dans l'augmentation de la puissance plasma pour éviter le détachement. Par conséquent, ce fait *imposera une limite dans l'exploration des conditions recherchées pour lesquelles l'APGD-t tue les cellules cancéreuses.*

#### STS117

 <p><i>Témoin</i></p>	Cellules vivantes (Calcein AM)
 <p><i>0.7 slm He, 30sccm O<sub>2</sub>, 850Vpp, DC=1% (P≈0.25W)</i></p>	Cellules vivantes et pratiquement pas de perméabilité induite (Dapi)


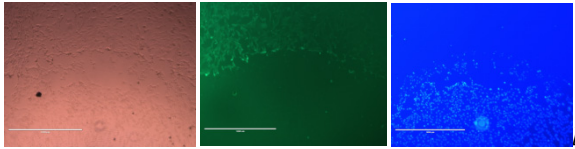
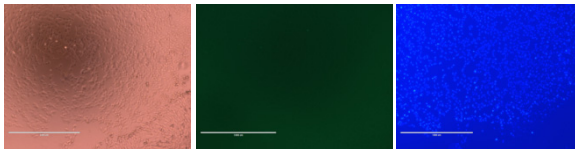
 <p><i>ligne de coté</i></p>	<p>3 zones visibles sur les lignes extérieures de traitement :</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>-Cellules vivantes (<u>non traitées</u>)</li> </ul>
 <p><i>ligne du haut</i></p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>-petite zone de détachement (vide)</li> <li>-Cellules fortement endommagées (mortes et perméabilisées)</li> </ul>
 <p><i>centre</i></p>	<p>Au centre, pas de détachement visible.</p> <p>Cellules mortes et perméabilisées.</p>
<p><b>0.7 slm He, 30sccm O<sub>2</sub>, 850Vpp, DC=4% (P≈1.20W)</b></p>	

Tableau IX. Images de STS117 prises au microscope pour visualiser l'effet de la variation de DC dans les conditions d'exposition suivantes : 0.7 slm He, 30sccm O<sub>2</sub> et 850Vpp.

Remarquons que les conditions décrites dans le tableau ne seront pas intéressantes à considérer pour un traitement anti-cancer puisque l'augmentation de puissance se traduit par du détachement cellulaire et n'induit aucune perméabilisation des cellules.

### 3.2.1.5 Effet du voltage (DC fixe)

Comme l'optimisation est liée au détachement cellulaire et parce qu'il y a un intérêt à ce que le traitement des cellules aient lieu à haut voltage/haut DC, nous avons voulu valider les observations faites à 950V-D3 en testant avec une puissance plus importante soit 1.1kV-D3. D'après le tableau X, les résultats diffèrent selon le type de cellules : l'adhésion des cellules MDA-MB-231 serait plus sensible à l'augmentation du voltage appliqué ou, plus généralement, à la puissance du plasma comparativement à STS117 et MCF7.

<b>MDA</b>	<b>950V, D3, 1slm He +30sccm O<sub>2</sub></b>	<b>1.1 kV, D3, 1slm He +30sccm O<sub>2</sub></b>
1.55mm (1.488 mL)	Arrachement faible ( <i>estim 100μm</i> )	Arrachement ( <i>≤500μm</i> )
1.66 mm (1.600 mL)	Pas Arrachement	Arrachement
1.6 mm (1.536mL)	Pas Arrachement	Pas Arrachement
<b>STS117</b>		
1.60mm (1.536 mL)	Pas Arr.	Pas Arr.
1.66 mm (1.600 mL)	Pas Arr.	Pas Arr.
<b>MCF7</b>		
1.60mm (1.536 mL)	Pas Arr. visible	Pas Arr
1.66 mm (1.600 mL)	Pas Arr	Pas Arr

Tableau X. Résultat sur l'arrachement cellulaire pour deux fortes valeurs de voltage et différents volumes de milieu. Ce tableau représente l'étape finale d'une série d'expériences d'optimisation des paramètres (*Notation : Arr=arrachement cellulaire ; D=DC*).

### 3.2.1.6 Nature du substrat

Après de nombreux essais sur des plaques à 24 et 12 puits, il s'est avéré que l'optimisation des conditions opératoires ne devraient plus se faire sur ce type de plaques car l'effet de ménisque (ou 'effet de bord') peut nous induire en erreur si on ne prend pas soin de comparer l'effet du traitement au bord et au centre du puits (Tab. IX). Par la suite, nous travaillerons uniquement sur des plaques à 6 puits ou des Pétris (60mm) dans les expériences d'optimisation (sachant que toutes les expériences de quantification ont lieu dans des Pétris (60mm)).

Un exemple illustrant la *méthodologie* suivie lors des expériences d'optimisation des conditions de travail (débit, quantité de milieu et reproductibilité...), nécessaires avant de commencer l'étude sur l'effet anti-cancer du traitement par plasma, est présenté dans l'Annexe 4. Les données illustrées dans cette annexe ne seront pas utilisées car il est apparu par la suite qu'il y avait un léger problème de connexion de la source plasma avec la mise à la terre (ce qui sous-estimait les effets observés...).

### 3.2.1.7 Effet de la vitesse de balayage

Pendant notre étude, la vitesse de balayage a, dans un premier temps, toujours été fixée à 5mm/s. Comme, nous l’expliquerons par la suite, il y a eu un intérêt à vouloir varier cette vitesse. Par conséquent, il a fallu prévoir une étape supplémentaire dans la phase d’optimisation (éviter le détachement cellulaire) avant de rechercher l’effet ‘anti-cancer’ du plasma sur les cellules tumorales.

Les tableaux XI.a et XI.b présentent une expérience visant à optimiser l’intervalle de vitesse et de débit pour lesquels les cellules ne sont pas détachées du substrat. Le tableau XII illustre en images l’effet de ces paramètres sur les cellules MCF7. Afin d’alléger le contenu de cette section, nous ne présenterons pas (i) les expériences où on explore l’effet de la zone de traitement dans le substrat (effet ménisque) montrant la sensibilité à la variation de la hauteur du milieu, ainsi que (ii) les expériences sur l’espacement des lignes de traitement (du ‘modèle’ défini dans le programme du moteur).

<b>MDA-MB-231</b>	1L/min He + 30 sccm O <sub>2</sub>	0.95 L/min, 30 sccm O <sub>2</sub>	0.9L/min He + 30 sccm O <sub>2</sub>
<b>Conditions opératoires</b>	30 sccm O <sub>2</sub> , 950V, DC=3%, 1.55 mm (1.488 mL pour plaque 6puits), paramètres de balayage (espacement 0.5mm M200 ; LA3, M4000 (largeur)).		
V= 40 steps/s	Trop d’arrachement. Reste qqs cells par ligne traitée.	Arr. ‘limite acceptable’	P.A.
V=100 steps/s	Arr.	Arr. ‘limite acceptable’	P.A.
V=200 steps/s	Arr. ‘Limite acceptable’	-	P.A.
V=400 steps/s	Arr. Léger	-	P.A.

Avec, P.A. : pas d’arrachement. Et Arr. : arrachement des cellules. Qqs cells : quelques cellules.

<b>MCF7</b>	1L/min He + 30 sccm O <sub>2</sub>	1.1L/min He + 30 sccm O <sub>2</sub>
<b>Conditions opératoires</b>	30 sccm O <sub>2</sub> , 950V, DC=3%, 1.55 mm (1.488 mL pour plaque 6puits), paramètres de balayage (espacement 0.5mm M200 ; LA3, M4000 (largeur)).	
V= 40 step/s	*Légère ↓ densité/ P.A.	Arr.
V=100 steps/s	-	Arr.

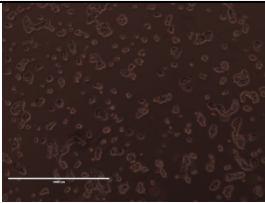
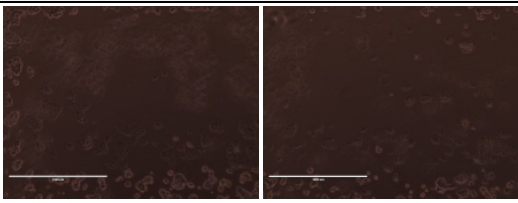
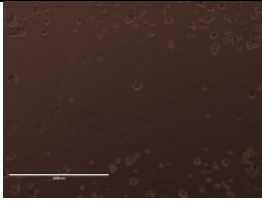
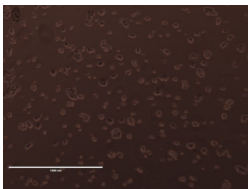
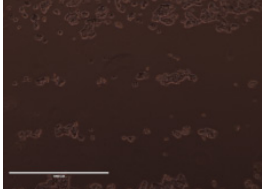
V=200 steps/s	*Légère ↓ densité/ P.A.	Arr.
V=400 steps/s	*Légère ↓ densité/ P.A.	P.A.

\* : résultats sur deux puits différents

Tableau XI. Résultats observés sur le détachement des cellules lorsque la vitesse de balayage et les débits de gaz varient. a : MDA-MB-231 et b : MCF7. **400 steps = 1mm.**

D'après les résultats présentés dans le tableau XI, les conditions optimales obtenues pour MDA sont 0.9 lpm He avec une vitesse variant de 40 à 400 steps/s, et, pour MCF7, 1lpm He avec une vitesse variant de 40 à 400 steps/s. Dans ces conditions opératoires, l'adhérence des cellules est préservée. On observe, parfois, que de légères variations de courant (Irms) peuvent mener à des degrés d'arrachement différents.

Afin de ne pas alourdir la lecture de cette section, seules les photos prises pour MCF7 seront présentées (Tab. XII). De manière générale, les photos prises au microscope ont permis, pour chaque condition opératoire testée, *d'évaluer si le traitement arrachait ou non les cellules de la surface sur laquelle elles adhèrent.*

MCF7	1L/min He + 30 sccm O <sub>2</sub>	1.1 L/min + 30 sccm O <sub>2</sub>
V= 40 step/s		
V=200 steps/s		
V=400 steps/s		



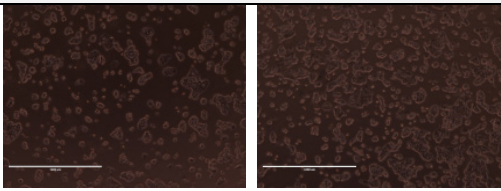
<b>Observations</b>	<p>⇒ Aucun arrachement pour toutes les vitesses de balayages (de 400 à 40 steps/s) à 1L/min He.</p> <p>⇒ A 1.1 lpm He, plus la vitesse ↑, moins les cellules sont arrachées.</p> <p>⇒ Une légère variation du débit (autour de 1lpm) induit un effet sur les cellules très différent.</p>
<b>Témoins</b>	

Tableau XII. Effet de la vitesse de balayage sur les cellules MCF7 pour deux débits de gaz. Cellulesensemencées dans *moule ou insert rectangulaire* en silicone (volume=300µL ; S=0.9 cm<sup>2</sup>) dans le but de se mettre dans les mêmes conditions que l'expérience du FACS ; les moules sont placés au centre du Pétri.

Cette expérience a été reprise et complétée en combinant l'effet de la puissance plasma, i.e., pour chaque vitesse, et pour les deux débits testés, on étudiera l'effet de la variation du DC (D1 et D3). Les principaux résultats sont, pour MDA, une légère baisse de la densité pour de faibles vitesses de balayage, et, pour MCF7, une forte diminution quelque soit la vitesse (mais pour 2000 steps/s, on observe un arrachement en ligne quand la puissance augmente). On souligne aussi un autre résultat observé, à savoir, qu'une légère variation du débit autour de 1 lpm donne lieu à des observations différentes du degré d'adhésion des cellules (Tab. XII).

Notons que tout changement dans le montage expérimental impliquera nécessairement une vérification de leur influence sur les conditions physiques optimisées (quantité de milieu...). Chaque expérience a été répétée au moins 3 fois à des dates différentes.

### 3.2.2 Perméabilisation

Comme nous l'avons présenté au chapitre précédent, un grand nombre d'études prouvent la possibilité du plasma, dans certaines conditions opératoires, à induire la

perméabilisation (provisoire ou permanente) des cellules. Dans cette étude, nous avons constaté que le plasma, APGD-t, généré dans un mélange He+O<sub>2</sub> induit une perméabilisation des cellules: toutefois, ce phénomène devient plus ou moins visible selon les conditions opératoires utilisées (section précédente). La figure 33 illustre deux exemples de perméabilisation des cellules MCF7 (a et b) et STS117 (c et d) sans détachement cellulaire induite par un traitement au plasma : le marquage au dapi permet de visualiser les cellules perméabilisées (en bleu) qui semblent correspondre à la trace du jet de plasma, et ce, sans créer de détachement cellulaire. Ces conditions optimales induisent une perméabilisation des cellules sans arrachement à forte puissance.

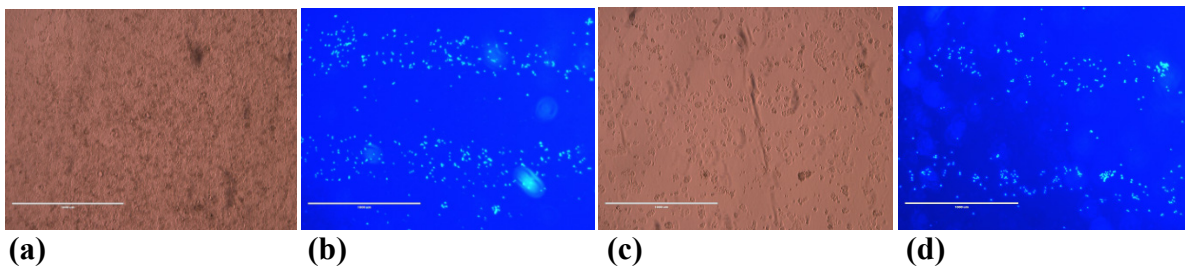


Figure 32. Images microscopes de cellules tumorales (a) MCF7 et (b) STS117 traitées dans les conditions suivantes : (a) : 900 V, D3, 1slm He, 30 sccm O<sub>2</sub> et hauteur de milieu optimale de 1.35-1.40mm et (b) 900 V, D3, 1slm He, 30 sccm O<sub>2</sub> et hauteur de milieu optimale de 1.30-1.35mm. Photos prises pour une hauteur de milieu commune de 1.35mm

Généralement, peu de perméabilisation (Dapi) est observée lorsque les cellules restent vivantes (Calcein AM) suite au traitement. Toutefois, pour certaines conditions opératoires, le traitement peut ne pas être assez efficace pour induire la mortalité mais juste assez pour perméabiliser la cellule (Tab. XIII) : pour l'estimer, il suffit de faire le compte des cellules colorées au Dapi, des échantillons témoins et traités. Le tableau XIII montre que le degré de perméabilité dépend des conditions de traitement et du type de cellules : par exemple, aucune perméabilité induite pour STS117 dans ces conditions.

Il est intéressant de remarquer que le degré de perméabilisation induit sur les cellules lorsqu'elles sont traitées à deux débits différents est relativement proche or, on s'attendait à observer un degré plus faible de perméabilisation pour 0.7 lpm He. En réalité, le paramètre

essentiel, dans ce cas, est la puissance déposée par le plasma qui est sensiblement la même dans ces deux conditions expérimentales. Une autre observation intéressante est la possibilité que la confluence influence l'efficacité du traitement puisqu'on observe moins de perméabilité induite dans les échantillons les plus confluent : il semblerait que les cellules situées au milieu d'un amas de cellules (monocouches) soient protégées par les cellules voisines (les cellules situées proches du bord d'un amas sont plus vulnérables et présentent un degré de perméabilisation relativement supérieure; ces données ne sont pas présentées afin de ne pas alourdir le contenu du mémoire).

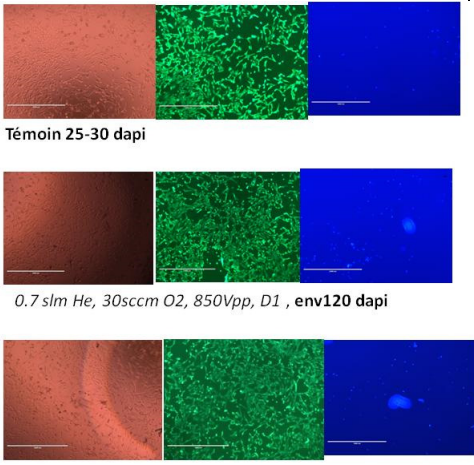
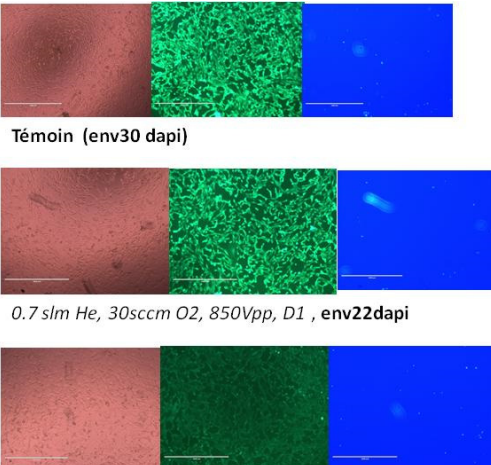

STS117 75-80% confluence	STS117 95% confluence	MCF7 80% confluence
Plaque 24 puits, 1mm milieu, 850Vpp, 0.7 slm et 1 slm He, 30sccm O <sub>2</sub> , DC=1%		0.7slm He
 <p>Témoins 25-30 dapi</p> <p>0.7 slm He, 30sccm O<sub>2</sub>, 850Vpp, D1, env120 dapi</p> <p>1 slm He, 30sccm O<sub>2</sub>, 850Vpp, D1, env100 dapi</p>	 <p>Témoins (env30 dapi)</p> <p>0.7 slm He, 30sccm O<sub>2</sub>, 850Vpp, D1, env22 dapi</p> <p>1 slm He, 30sccm O<sub>2</sub>, 850Vpp, D1, env32 dapi</p>	 <p>témoin ~6dapi</p> <p>traité~80-100dapi</p>
<ul style="list-style-type: none"> <li>-Augmentation de la perméabilité</li> <li>-Pas de détachement cellulaire</li> <li>-P = 0.3W et 0.25W</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>-Perméabilité comparable au témoin</li> <li>-Pas de détachement cellulaire</li> <li>-P = 0.3W et 0.25W</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>-Augmentation de la perméabilité</li> <li>-Pas de détachement cellulaire</li> <li>- P=0.25W</li> </ul>

Tableau XIII. Perméabilité induite par le traitement au plasma dépend des conditions de traitements et de la nature de la cellule.

Une fois ce travail d'optimisation confirmé (résultats reproductibles), l'étude sur l'efficacité de l'effet anti-cancer du plasma se fera en variant, principalement, la puissance déposée i.e, le voltage et la valeur de DC.

### **3.2.3 Résultat : quantification de l'efficacité du traitement 'sans sillon'**

#### **3.2.3.1 Effet de la variation de la puissance (V et DC)**

Après avoir défini les conditions expérimentales permettant de traiter les cellules sans les détacher, elles seront exposées au plasma sous différentes conditions de voltage et de DC, puis seront analysées au FACS pour quantifier le taux de mortalité et identifier les mécanismes impliqués menant à la mort cellulaire.

Dans un premier temps, un FACS 'exploratoire' a été mené sur les cellules STS 117 dont les conditions d'exposition et les résultats obtenus sont résumés dans la figure 33 : l'exposition au plasma, dans ces conditions, induit un taux de mortalité variant de ~12% à presque 20% lorsque le voltage passe de 700V à 950 V pour un DC fixe de 3%. L'écart entre le taux de mortalité induit à 950V et celui à 700V permet d'estimer la contribution de la variation de voltage sur l'efficacité du traitement ; alors que l'écart entre le taux de mortalité induit à 950V pour DC=1% et DC=3% permet d'estimer la contribution de la variation du DC dans l'efficacité du traitement. On en déduit que, même si la contribution des deux effets sont proches, l'effet de la variation de la tension (pour DC=3%) améliore relativement plus l'efficacité du traitement. Or, l'augmentation de la tension dans un plasma a pour effet de créer une plus grande variété d'espèces réactives (augmentation du taux de dissociation,...) qui pourrait être responsable (directement ou indirectement) de la mort des cellules traitées.

La comparaison entre les diagrammes des échantillons témoins versus traités permet de constater un déplacement du nuage de population vers l'apoptose (majoritairement apoptose tardif) : ce résultat est similaire à ce qui a été rapporté dans la littérature. Comme le taux de mortalité associé au témoin gaz (cellules traitées par un jet de gaz au même débit) est

comparable à celui du témoin non-traité, on peut affirmer que la mortalité induite n'est pas due à un effet physique de la force du gaz (débit) sur les cellules.

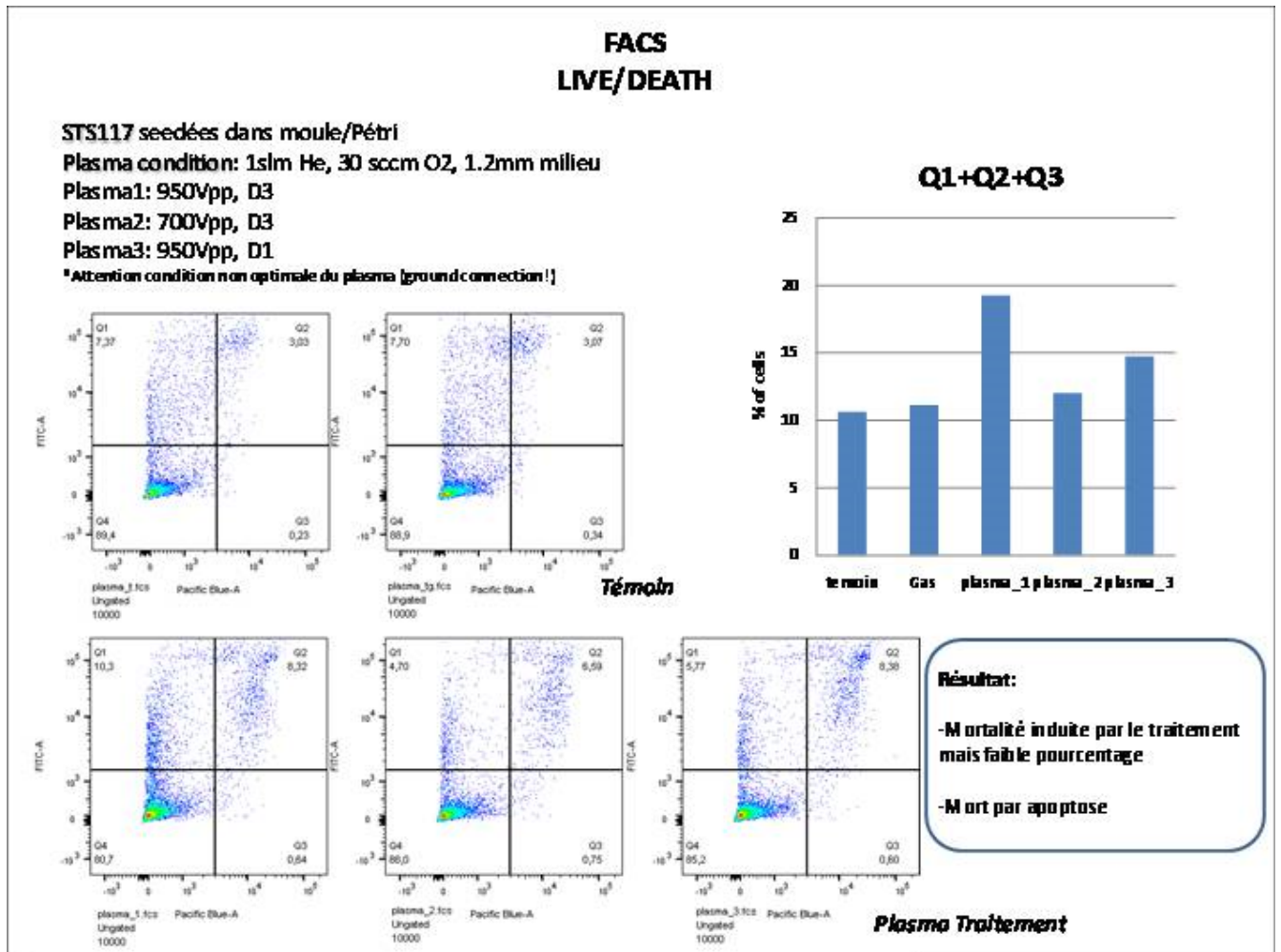
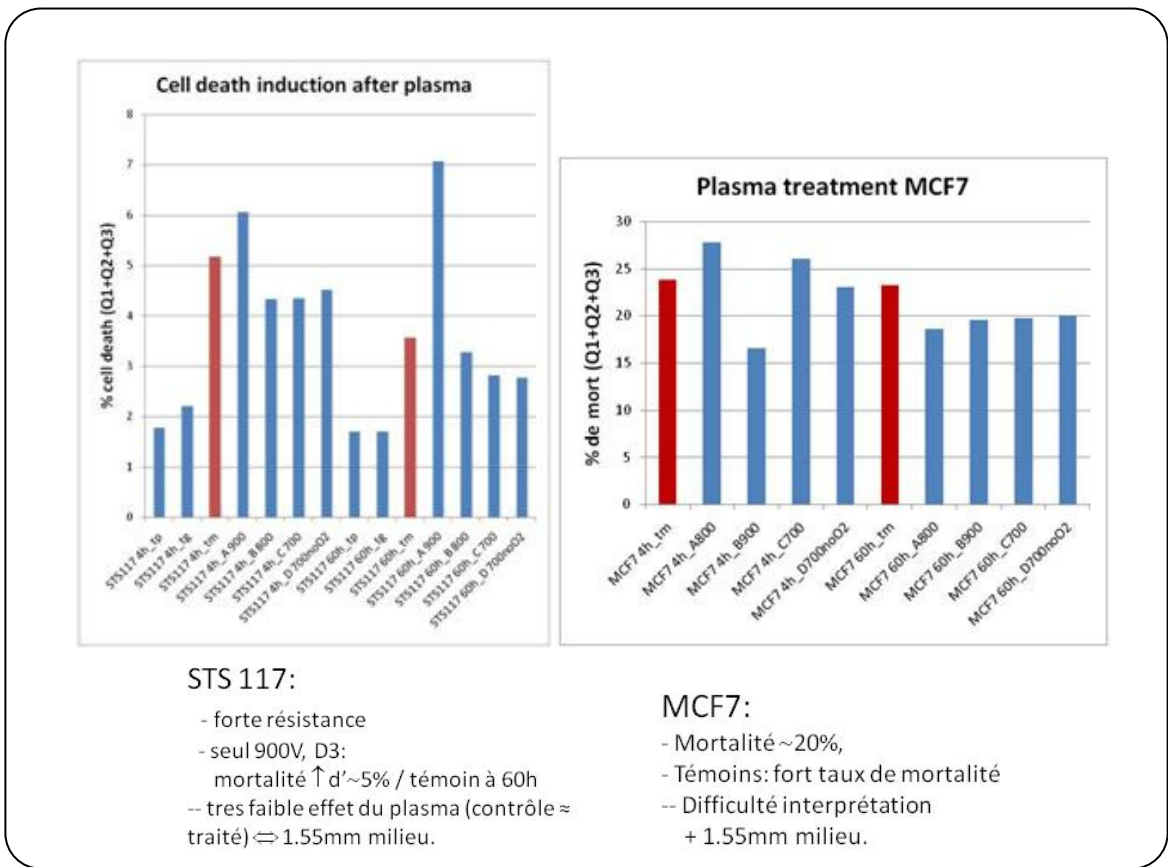


Figure 33. Résultats d'une analyse par FACS de cellules STS117 traitées au plasma pour différentes valeurs de voltage et de DC (*hauteur du milieu 1.2mm*).

Dans un second temps, une expérience 'd'envergure' a été menée sur deux lignées cellulaires (STS117 et MCF7) consistant à effectuer, en parallèle, une analyse FACS et un test clonogénique 4 heures et 60 heures après leur traitement au plasma. En effet, à travers cette expérience, on souhaitait comparer les deux méthodes de quantification (permettant de distinguer la mortalité de la sénescence) et évaluer l'effet de l'action du temps sur le taux de mortalité (on rapporte dans la littérature que l'effet du plasma continu d'agir après le

traitement et que les échantillons quantifiés jusqu'à 72h après leur traitement donnent de meilleurs résultats) [7,26,33,37].

Malheureusement, nos résultats (Fig. 34) ne nous permettent pas de conclure... Les deux principales difficultés ont été (1) un taux de mortalité trop important dans les inserts en silicone contenant des cellules non traitées (témoins) et (2) beaucoup d'incertitude dans les comptes du test clonogénique et résultat très différents de l'analyse FACS. On atteint, respectivement, au plus 7% (4% en relatif) et presque 30% (7% en relatif) de mortalité au FACS pour les cellules STS117 et MCF7, alors que le test clonogénique surestime globalement le nombre de cellules mortes (Fig.34A). Remarquons tout de même que, dans cette expérience, le volume du milieu lors du traitement est supérieur à celui utilisé lors du FACS précédent (1.55mm vs 1.2mm), ce qui peut avoir eu d'importants impacts sur l'efficacité du plasma à tuer les cellules (cf.§3.2.1.2, §*Effet protecteur du milieu*).



<i>Puissances vs Comptes</i>	<b>STS117</b>			<b>MCF7</b>		
Incubation	<i>Temps court (4h)</i>			<i>Temps long (60h)</i>		
<b>(A)</b>	<b>Comptes vivants/morts</b>		<b>P (W)</b>	<b>Comptes vivants/morts</b>		<b>P(W)</b>
<b>B</b> (900V)	≈60%	≈40%	≈2.68	≈58%	≈42%	≈2.73
<b>A</b> (800V)	≈68.7%	≈31.3%	≈2.00	≈83.5%	≈16.5%	≈2.05
<b>C</b> (700V)	≈85.7%	≈14.3%	≈1.43	≈85%	≈15%	≈1.44
<b>D</b> (700V, no O <sub>2</sub> )	≈83.4%	≈16.6%	≈1.46	X		≈1.45

Figure 34. Exposition de cellules STS117 et MCF7 dans différentes conditions plasma, pour deux temps d'incubation : les résultats de l'analyse FACS (B et C) et du test clonogénique (A) sont présentés. tm : échantillon témoin.

### 3.2.3.2 Effet de la vitesse de balayage

Suite aux derniers résultats, un bref retour aux études publiées dans la littérature s'est imposé. Il est bon de rappeler que les traitements décrits dans la littérature consistent, de manière générale, à l'exposition d'un jet unique et focalisé sur l'échantillon à traiter pendant un temps relativement court (variant de quelques secondes à quelques minutes) : les cellules reçoivent donc un jet continu d'espèces actives durant tout le temps de traitement. De plus, ce que la plupart des auteurs ne précisent pas, est que leurs échantillons ne sont pas monocouches : par exemple, des densités de  $10^4$  à  $10^6$  cellules par puits dans des plaques à 96 puits (et parfois des plaques à 24, 12 ou 6 puits) donne lieu à plusieurs couches de cellules ; or les photos (s'il y en a) montrent une monocouche de cellules, ce qui permet de penser que les premières couches ont totalement été pulvérisées. Dans notre étude, le plasma balaie l'échantillon donc le temps réel d'exposition de chaque cellule est en réalité d'autant plus grand que la vitesse de balayage est faible. Par conséquent, pour tenter de maximiser l'interaction plasma/cellules, on effectuera des traitements à des vitesses de balayages différents pour estimer le degré d'influence de ce paramètre sur l'action létale du plasma.

Dans un premier temps, une expérience exploratoire (Fig.35) nous permet de constater qu'à partir d'une certaine valeur, ce paramètre affecte beaucoup l'efficacité du traitement.

Les résultats obtenus pour STS117 (Fig.35) indiquent une légère augmentation du taux de mortalité lorsque que la vitesse de traitement diminue (conditions A/B : gain de 1.5% environ) sachant que dans ces conditions une ligne sur deux est réellement traitée (soit environ 50% des cellules)<sup>5</sup>; lorsqu'on effectue le traitement à 5mm/s avec un espacement de 0.5mm de sorte que toutes les cellules soient traitées, le gain reste faible, soit environ 2%. Donc réduire la vitesse de 5mm/s à 1mm/s n'apporte pas un gain conséquent du taux de mortalité de STS117.

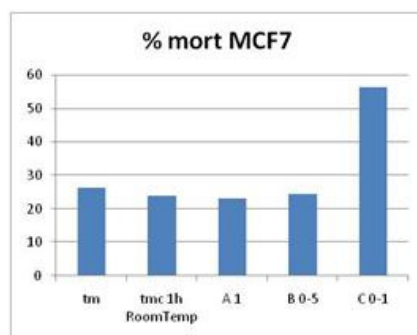
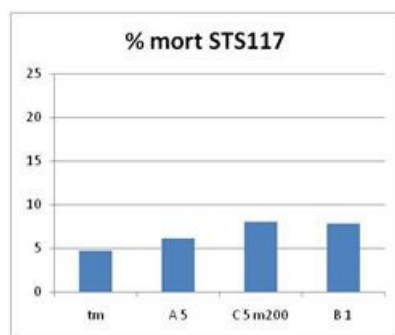
Concernant MCF7 (Fig.35), on observe une légère augmentation de la mortalité lorsque la vitesse de balayage varie de 1mm/s à 0.5mm/s. Par contre, lorsque cette vitesse varie de 0.5mm/s à 0.1mm/s, le taux de mortalité atteint presque 60% (~30% relativement au témoin), soit plus du double de la valeur atteinte à 0.5mm/s. Notons que dans cette expérience le volume de milieu correspond à une hauteur de 1.55mm. D'après les diagrammes obtenus par le FACS (Annexe 5), on voit que plus le temps d'exposition des cellules augmente (vitesse diminue), plus le nombre de cellules localisée dans le cadran 'apoptose' augmente : l'apoptose est la voie menant à la mortalité des cellules tumorales STS117 et MCF7 quelle que soit l'efficacité du traitement.

---

<sup>5</sup>. Rappel : un espacement de 1mm entre chaque ligne balayée par le jet de plasma signifie que 50% des cellules sont traitées (dans ce cas, on traite une ligne sur deux). L'espacement optimal (100% des cellules sont traitées) décrit dans la section 3.2



	STS 117			MCF7		
<b>Densité cellulaire</b>	3.5*10 <sup>4</sup> cells/moule			9.6x10 <sup>4</sup> cells/moule		
<b>Conditions expositions</b>	<i>Conditions générales</i> : 900Vpp, DC=3%, 1.55mm milieu (3.3mL, Petri 60mm), 30sccm O2. P≈ 3.1 ± 1 W					
	A	B	C	A	B	C
	1lpm He V=5mm/s Esp :1mm (400 step) *	1lpm He V=1mm/s Esp :1mm	1lpm He V=5mm/s Esp :0.5mm	0.9lpm He V=1mm/s Esp :1mm	0.9lpm He V=0.5mm/s**	0.9lpm He V=0.1mm/s***



	% mort STS117
tm	4.67
A 5	6.13
C 5 m200	8.04
B 1	7.77

	% mort MCF7
tm	26.16
tmc 1h RoomTemp	23.96
A 1	23.1
B 0-5	24.46
C 0-1	56.2

Figure 35. Conditions expérimentales et résultat de l'analyse FACS de STS117 et MCF7: effet de la vitesse de balayage (expérience exploratoire). \*Espacement entre chaque ligne de traitement; \*\* environ 20 min de traitement; \*\*\* temps d'exposition supérieur à 1h.

Dans un second temps, une analyse FACS a été menée sur des échantillons de MDA-MB-231 traités au plasma avec différentes vitesses de balayage (Fig. 36, Annexe 5) sachant que les vitesses testées sont inférieures à celles de l'expérience précédente : on atteint pratiquement 20% de mort pour  $v=0.5\text{mm/s}$  (200steps/s) ou 11% de mort relativement au témoin. Si on considère le traitement le plus rapide,  $v=400\text{ steps/s}$  (1mm/s), les cellules reçoivent chacune moins d'espèces actives par unité de temps, donc le traitement devrait être le moins efficace : ce qui semble être le cas d'après les résultats obtenus (10% mort à  $v=400\text{ steps/s}$  ou ~1% relativement au témoin). Par ailleurs, les résultats obtenus à  $v=100\text{ steps/s}$

(0.25mm/s) et  $v=200$  steps/s sont très proches de sorte que même si la vitesse est réduite de moitié, le gain reste inférieur à 3%. Or, il est essentiel de souligner que le résultat obtenu à  $v=100$  steps/s considère environ 2500 évènements enregistrés (NEE) alors que celui à  $v=200$  steps/s en considère environ 3800 (Annexe 4). Statistiquement, le résultat obtenu pour  $v=100$  steps/s est plus imprécis que celui à  $v=200$  steps/s or comme le nombre de cellules mortes devrait augmenter lorsque la vitesse diminue, il est donc possible que l'effet du plasma soit le même pour ces deux vitesses (pour le volume de milieu considéré). En réalité, en tenant compte des derniers résultats de cette étude (§3.2.2), on peut affirmer que ces taux sont largement *sous estimés* car plus les dommages subi par la cellule sont importantes, moins elles seront détectables (faible NEE) et plus le taux de mortalité sera sous-estimé. D'ailleurs, les photos prises au microscope montrent bien que les cellules sont, dans certaines conditions de traitement, très endommagées (Fig. 37), démontrant un fort taux de mortalité induit par le traitement. De plus, nous pouvons affirmer que la mortalité est uniquement due au traitement puisque, rappelons-le, les inserts rectangulaires ont été choisis pour permettre un traitement plus rapide, même pour de faibles vitesses de balayage, assurant, ainsi, d'éviter tout risque de tuer les cellules par dessiccation. Tout comme l'expérience précédente, le taux de mortalité des cellules témoins non-traitées demeure relativement important.

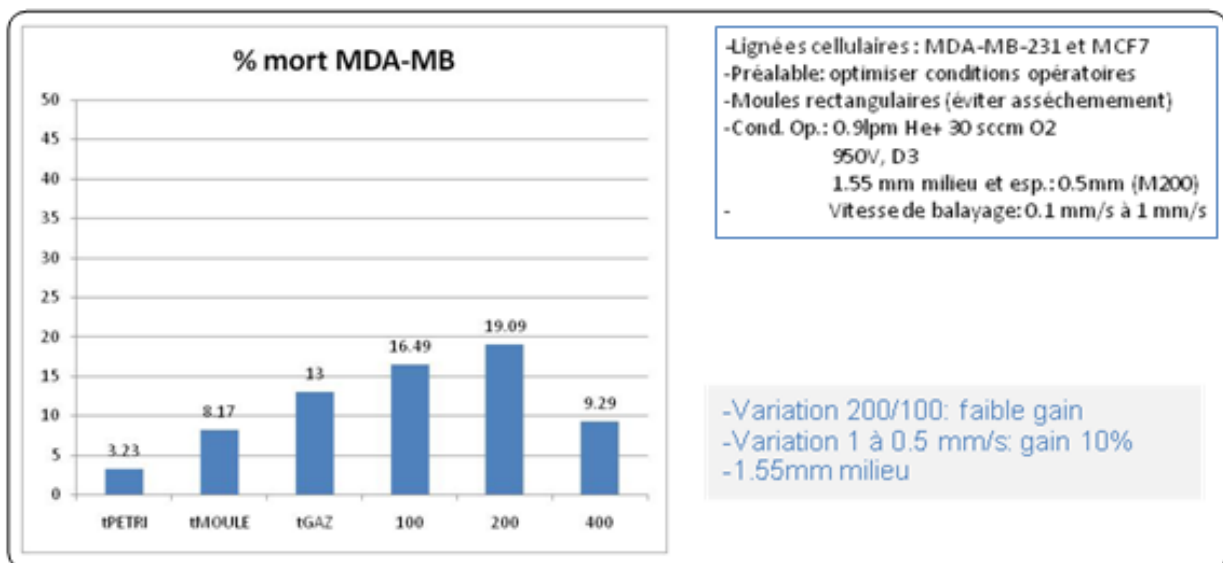


Figure 36. Résultat de l'analyse FACS des cellules MDA-MB-231 traitées au plasma (voir conditions opératoires) pour 3 vitesses de balayage.

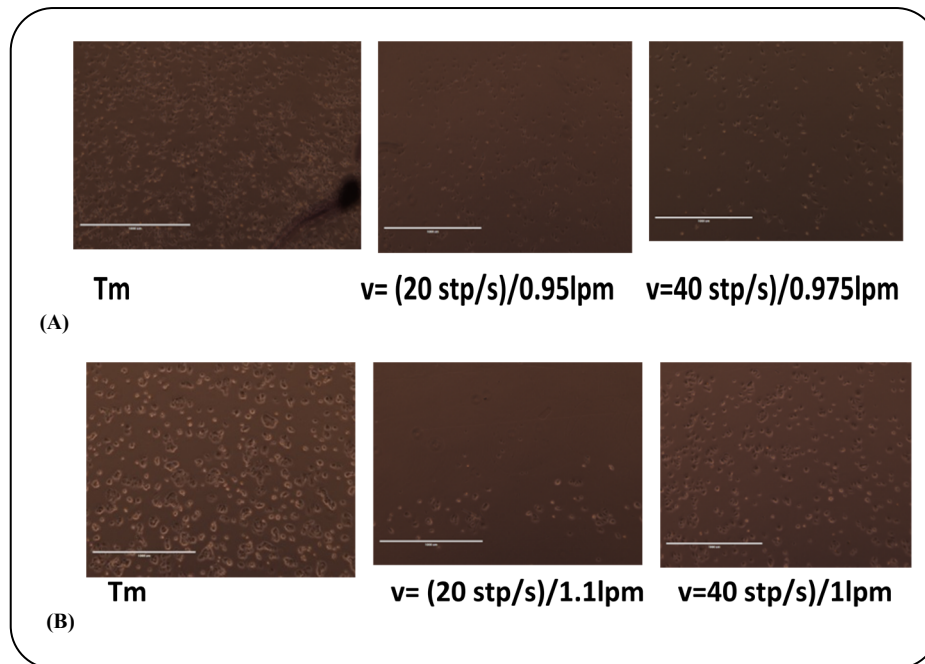


Figure 37. Effet de la variation de la vitesse de traitement sur les cellules : images prises au microscope. A) MDA-MB-231 et B) MCF7. 40 stps/s = 0.1mm/s et 20 stps/s = 0.05mm/s (*rappel: 400 steps=1mm*).

En conclusion, malgré tous les efforts fournis pour trouver les conditions létales tout en préservant l'adhésion cellulaire, on obtient toujours, au final, un faible taux de mortalité induit par le traitement. Rappelons, que l'on vise un minimum d'efficacité de 40-50% de mortalité induit par le traitement par un jet de plasma de sorte qu'une combinaison avec, par exemple, la radiothérapie permettrait d'atteindre des résultats satisfaisants (diminution du nombre de cellules cancéreuses) avec une plus faible dose de radiation.

Lors de l'exploration de la variation de vitesse sur une grande surface (insert circulaire) il est apparu, pendant le traitement, des sillons de sorte que le plasma était directement en contact avec les cellules : la mortalité induite était, par conséquent, plus importante. Cette découverte a eu lieu par hasard. Dans la seconde partie, on souhaite reproduire, de manière contrôlée, un

traitement dans lequel le plasma serait ‘momentanément’ directement en contact avec les cellules (car le plasma est en mouvement : balayage en X et Y).

### **3.3 Résultats d’un traitement par plasma ‘avec sillons’**

L’existence de sillons (ou ‘chemin’) générés par le balayage du jet de plasma dans le milieu de culture cellulaire (recouvrant les cellules) permet au plasma de traiter directement et efficacement les cellules tumorales. Pour pouvoir espérer voir des sillons lors de l’exposition des cellules au plasma, il faut, entre autre, que la hauteur du milieu ne soit pas trop importante et qu’elle demeure constante durant tout le traitement.

Pour ce faire, les cellules serontensemencées dans des Pétris (60mm) dans *toutes les expériences* (optimisation et quantification) qui suivront. L’utilisation du Pétri présente essentiellement deux avantages : (1) son étendue permet d’avoir une grande surface de traitement pour laquelle on éviterait les effets de ménisque assurant ainsi une hauteur constante du milieu dans la zone traitée; (2) pour minimiser l’effet de micro-évaporation du milieu (si elle a lieu) et garantir, ainsi, une hauteur stable durant le traitement.

#### **3.3.1 Optimisation des conditions opératoires et quantification de l’efficacité du traitement : conditions ‘fortes’ d’exposition**

Similairement à la section § 3.2.1, on souhaite travailler dans un intervalle de données paramétriques qui évite le détachement cellulaire tout en recherchant l’apparition de sillons. Pour éviter toute confusion et la possibilité que les cellules soient desséchées, on cherchera à obtenir de courts sillons de sorte que le liquide se referme assez rapidement : en effet, la ‘force’ du jet de plasma (débit de gaz) a pour effet ‘d’écarter’ le milieu de culture permettant aux espèces actives d’atteindre directement les cellules tumorales pendant un laps de temps (i) directement proportionnel à la vitesse de balayage du jet de plasma et (ii) qui dépend de la

hauteur du milieu nutritif recouvrant les cellules. Remarquons que l'exposition des cellules dans ces conditions (existence de sillons) augmente leur probabilité d'être arrachée de la surface sur laquelle elles adhèrent ; c'est pourquoi, l'optimisation de l'action anti-cancer du plasma sera évaluée en tenant compte simultanément de l'effet des paramètres expérimentaux sur la viabilité des cellules et leur adhésion à la surface : une étude quantitative (FACS) permettra d'estimer l'efficacité du traitement.

### 3.3.1.1 Optimisation des conditions opératoires

Une série de tests préliminaires ont été, initialement, menés sur Pétris avec et sans cellules pour observer certains comportements macroscopiques (présence ou non du sillon, variation de sa longueur et son épaisseur...) et microscopiques (effet sur cellules...). Par la suite, une série d'expériences permettra d'évaluer l'influence de la variation de paramètres physiques sur la viabilité des cellules, leur adhérence, leur perméabilité, leur morphologie... Les principaux paramètres physiques sont la vitesse de balayage, la quantité de milieu, le voltage, le DC et le débit de gaz. Dans les conditions d'exposition dites 'fortes', la puissance délivrée par le plasma est très proche de sa valeur maximale : dans cette situation, le voltage appliqué à la source du plasma (APGD-t) sera d'environ 900V (capacité maximale de 1kV).

◆ *Série 1* : Étude de la variation de la quantité de milieu pour 2 vitesses de balayages sur MDA-MB-231.

Les observations faites pendant le traitement (950V, DC=3%, 1lpm He+ 30scm O<sub>2</sub>) et celles au microscope seront prises en note et reliées à l'état des cellules (viabilité/perméabilité/morphologie).

MDA-MB-231	V=400 steps/s	V=2000 steps/s
1 mm	-Sillon se referme plus lentement vers la fin du traitement* -Très faible arrachement ;	-Sillon plus long et se referme plus vite qu'à v400 -Un peu + d'arr. relativement à v400 ;

	Forte perméabilisation et gd nb de mort.	Forte perméabilisation et gd nb de mort.
<b>1.1 mm</b>	-Sillon inexistant au début, puis apparait sillon (~3mm au max) de tps à autre, se referme très vite * -Arr. + de cells vivantes (/1mm) Dapi nous permet de voir la 'ligne'. Grand nombre de cells mortes (cells mortes visible a ↓).	-Sillon quasi-inexistant (~1mm) -Arr. Reste des cells vivantes (> v400) le lg d'une ligne; nb cells vivantes adhérees est + grand.
<b>1.2 mm</b>	-Pas de sillon - Perméabilité comparable au témoin	-Pas de sillon -Arr. On observe cell vivantes (pas ou très peu de morts visibles sur Petri). Cells permeabilisées ont, en général, une répartition ≠ des cellules vivantes

\*observation différente lorsque les Pétris ne contenaient que du milieu.

Notation : Arr = arrachement des cellules de leur surface d'adhésion

<b>MDA-MB-231</b>	<b>V=400 steps/s</b>	<b>V=2000 steps/s</b>
<b>1 mm</b>		
<b>1.1 mm</b>		
<b>1.2 mm</b>		

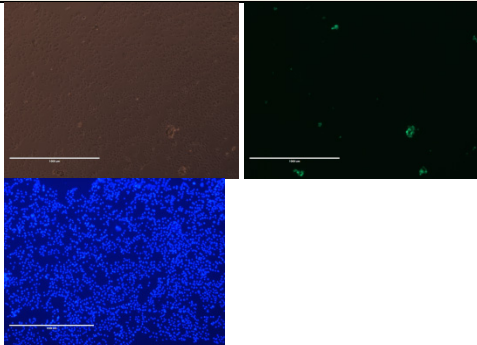
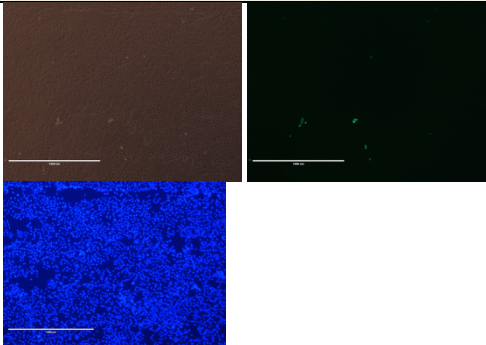
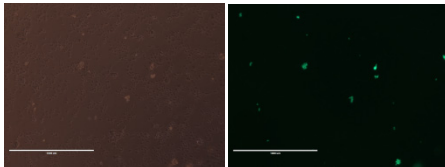
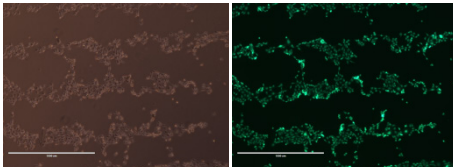
Notations : Arr = arrachement des cellules de leur surface d'adhésion Ovl: overlay ou superposition des images non coloré/avec Dapi/avec Calcein AM.

Tableau XIV. Tableaux (i) regroupant les observations pendant traitement (950V, DC=3%, He+O<sub>2</sub>) et celles au microscope, et, (ii) représentant les images au microscope de cellules traitées et colorées au Dapi et à la Calcein AM. **400 steps/s= 1mm/s et 2000 steps/s = 5mm/s.**

On observe donc, d’après le tableau XIV (ii) que plus la quantité de milieu augmente, moins de mortalité cellulaire sera induite et plus la densité cellulaire diminue. Ce résultat a été observé dans plusieurs études comme celle de Schlegel *et al.* Or il faut rappeler que les cellules sont traitées dans des conditions ‘fortes’, c’est pourquoi les variations observées sur les cellules lorsqu’un paramètre varie, ne changent que très peu (v=400/v=2000 steps/s et 1.1mm/1.2mm). Comme la densité cellulaire est conservée et le taux de mortalité est au maximum à 1mm de milieu, cette quantité de milieu sera fixée pour la 2<sup>ème</sup> série d’expérience.

**Série 2 :** Étude sur MDA-MB-231 de la variation de la tension et de DC pour 2 vitesses de balayage et une quantité de milieu fixée à *1mm*.

Les observations faites pendant le traitement (950V, DC=3%, He+O<sub>2</sub>, LA3) et celles au microscope seront considérées (Tab. XV).

MDA-MB-231	V=400 steps/s	V=2000 steps/s
950V, D3		
950V, D1		

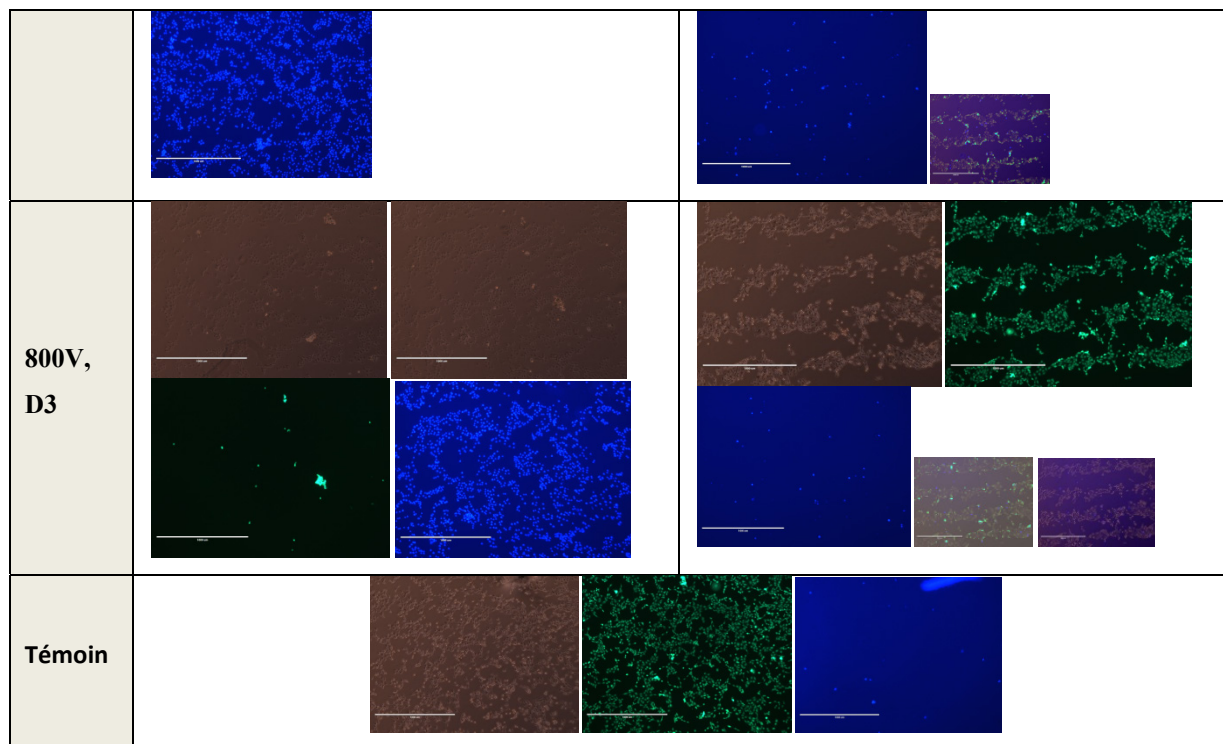


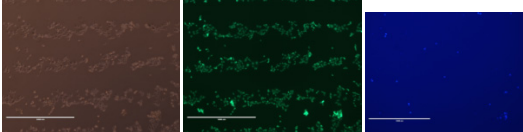
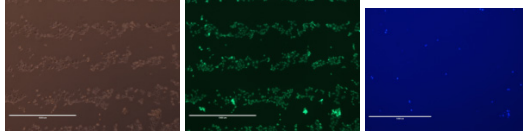
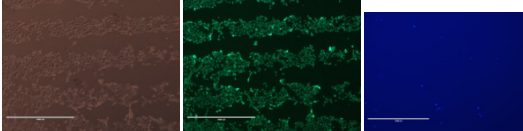
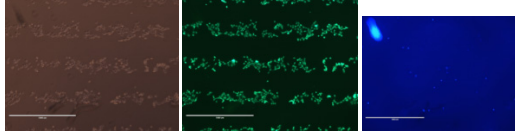
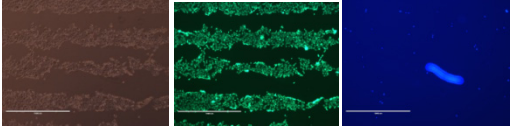
Tableau XV. Effet de la variation du voltage et de DC sur les cellules, dans 1mm de hauteur de milieu nutritif, traitées au plasma : images au microscope de cellules traitées puis colorées au Dapi et à la Calcein AM. *400 steps/s= 1mm/s et 2000 steps/s = 5mm/s.*

Lorsque le voltage diminue de 950V à 800V (à DC=3%), le traitement demeure très efficace pour une vitesse de 400 steps/s alors que pour une vitesse de 2000 steps/s, l'efficacité chute fortement (un plus grand nombre de cellules vivantes). La vitesse de balayage étant plus rapide, le temps d'interaction avec les cellules est, donc, plus court (moins de mortalité induite) et les cellules les moins bien adhérentes (mortes/perméabilisés/endommagées) sont plus facilement arrachées de la surface lorsque la vitesse du déplacement du jet de plasma est importante (2000 steps/s). On confirme le résultat de la série 1, à savoir que, lorsqu'une forte condition de traitement est utilisée (950V, DC=3%), la vitesse (comprise entre 400 et 2000 steps/s soit 1 à 5 mm/s) n'influence pas l'efficacité du traitement.

**Série 3 :** Étude de la variation de la tension et de DC pour 2 vitesses de balayages sur MDA-MB-231 et une quantité de milieu fixée à *1.1mm*.



Les observations faites pendant le traitement (950V, DC=3%, He+O<sub>2</sub>) et celles au microscope seront considérées (Tab. XVI).

<b>MDA- MB- 231</b>	V=400 steps/s	V=2000 steps/s
<b>950V, D3</b>	 <p>-Pas de sillons lors du traitement. -Existe cells mortes et vivantes: peu de cells mortes sur Pétri -Arr partiel (ligne visible).</p>	 <p>- Pas de sillons lors du traitement. -Existe + de cells vivantes : très peu de cells mortes sur Pétri. -Moins de perméabilité et moins de morts.</p>
<b>950V, D1</b>	 <p>-Pas de sillons lors du traitement. -Arr des cells vivantes, et, cells mortes n'apparaissent pas. -Faible perméabilité</p>	 <p>-Pas de sillons lors du traitement. -Arr + important -Faible perméabilité</p>
<b>800V, D3</b>	 <p>-Pas de sillons lors du traitement. -Rares cells mortes sur Pétri. Léger degrés de perméabilisation.</p>	<p>-Pas de sillons lors du traitement.</p>

Notations : Arr = arrachement des cellules de leur surface d'adhésion ; cells :cellules

Tableau XVI. Effet de la variation du voltage et de DC sur les cellules, dans *1.1mm* de hauteur de milieu nutritif, traitées au plasma : images au microscope de cellules traitées puis colorées au Dapi et à la Calcein AM. *400 steps/s= 1mm/s et 2000 steps/s = 5mm/s.*

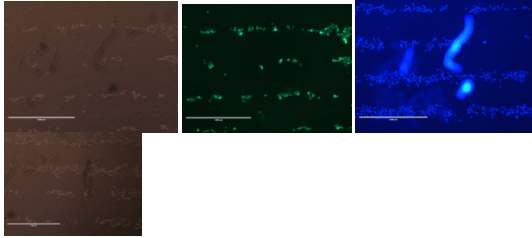
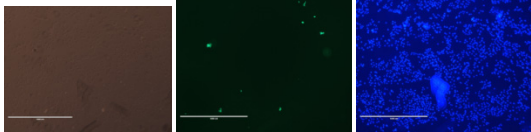
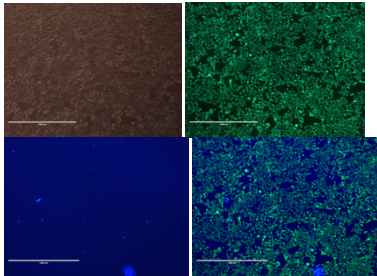
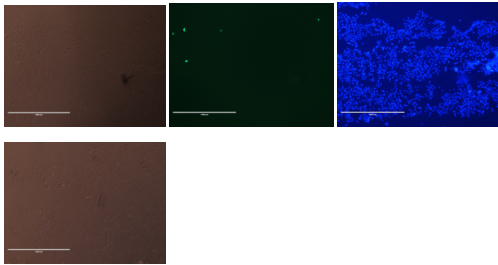
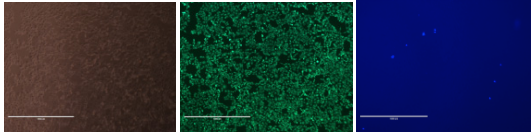
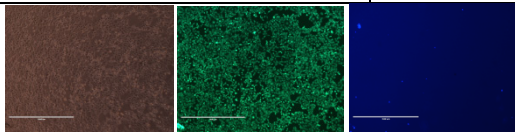
A 1.1 mm de milieu, aucune des conditions testées n'a fait apparaître de sillons : on retrouve, comme auparavant, une faible proportion de cellules mortes (dapi/calceinAM). De plus, le détachement des cellules est d'autant plus important que la vitesse de balayage est grande. D'après cette expérience (Tab. XVI), travailler à 1.1mm ne semble montrer aucun intérêt.

Une série de mesures a été menée pour une hauteur de milieu de 1.2mm dans le but de confirmer la tendance observée : on observe qu'à 950V/DC=3%, il existe une petite proportion de cellules arrachées (notamment les mortes). L'arrachement des cellules est d'autant plus important que la vitesse de balayage, la tension ou DC augmente (données non présentées).

**Série 4** : Étude de la variation du débit et de la quantité de milieu pour une vitesse de balayage de 400steps/s sur MDA-MB-231.

Le tableau XVII présente les observations effectuées pendant le traitement (950V, DC=3%, He+O<sub>2</sub>) et celles associées aux images vues au microscope.

D'après le tableau XVII, plus le débit diminue, moins le traitement est létal. La transition entre le moment où le traitement est efficace puis ne l'est plus est d'autant moins rapide que la quantité de milieu est faible : en effet, pour 1mm de milieu, le traitement demeure efficace à 1lpm et 0.9lpm alors que pour 1.1mm, les cellules sont viables dès 0.9 lpm de gaz, ce qui s'explique par la combinaison de l'effet protecteur du milieu (pas de sillon) et un faible débit (les espèces se rendent moins loin).

MDA -MB- 231	1.1 mm	1 mm
1 lpm	 <p data-bbox="293 600 708 674">-Sillon &lt;1mm - Arr : cells mortes et vivantes visibles.</p>	 <p data-bbox="854 495 1333 663">-Sillon visible -Degré très faible d'arr. -Beaucoup de cells mortes sur Petri. Pas de cellules normales (vivantes) visibles.</p>
0.9 lpm	 <p data-bbox="293 1026 448 1058">-Pas de sillons</p>	 <p data-bbox="854 1016 1235 1047">-Sillon visible et se referme très vite</p>
0.8 lpm	<p data-bbox="293 1121 821 1289">-Pas de sillon -Pas Arr. ; -Tres peu de permeabilisation/ pas de cells mortes 'visibles'</p>	 <p data-bbox="854 1268 1390 1388">-Pas de sillon -Pas Arr. ;Tres peu de permeabilisation/ pas de cells mortes 'visibles'</p>
Temo in	 <p data-bbox="992 1514 1203 1535"><i>zone non traitée du Petri</i></p>	

Notations : Arr = arrachement des cellules de leur surface d'adhésion ; cells :cellules

Tableau XVII. Effet de la variation du débit sur les cellules traitées au plasma pour 2 hauteurs différentes de milieu nutritif: images au microscope de cellules traitées puis colorées au Dapi et à la Calcein AM.

### ◆ Synthèse des expériences qualitatives

Ces séries d'expériences ont principalement montré **(i)** qu'il est possible de définir des conditions pour lesquelles le plasma tue les cellules tumorales, contrairement à ce que nous avons observé dans la première partie du travail (§3.2), et, **(ii)** que les modifications d'adhésion cellulaire ou du taux de viabilité des cellules suite au traitement varient selon les paramètres opératoires.

D'après les résultats obtenus dans ces 4 séries d'expérience, on note brièvement que l'augmentation **(1)** du débit augmente l'arrachement des cellules (un débit inférieur à 1 lpm, augmente le nombre de survivants), **(2)** de DC accentue l'effet mortalité/d'arrachement des cellules (mortes/vivantes), **(3)** de la quantité milieu a pour effet dans un cas d'augmenter l'arrachement (mort/vivant), et , dans un autre cas, de protéger les cellules (toutes les cellules restent vivantes et ne reçoivent directement qu'une quantité minimales d'espèces actives) ; l'adhésion cellulaire demeure plus importante pour les faibles volumes de milieu. Et enfin, **(4)** l'augmentation de la puissance diminue la viabilité des cellules. Quant à la vitesse de balayage, le taux d'arrachement des cellules augmente lorsqu'elle augmente ; cet effet est accentué si le volume de milieu est plus important (hauteur supérieure à 1.1 mm).

Soulevons un dernier point avant d'aller plus loin dans notre étude: l'important changement morphologique induit par le traitement sur les cellules (nous y reviendrons un peu plus tard) pourrait laisser croire aux plus sceptiques que les cellules soient mortes par dessiccation (de part la présence de sillon) et non par le traitement physique. Afin de confirmer/rejeter cette possibilité, un test de dessiccation a été effectué sur les cellules MDA-MB-231 (Tab. XVIII).

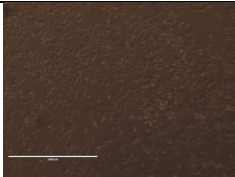
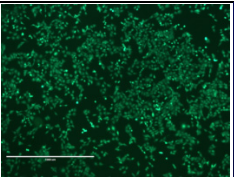
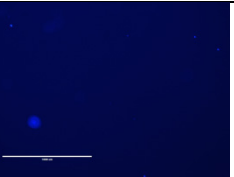
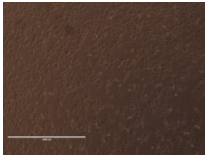
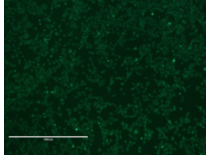
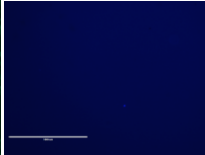
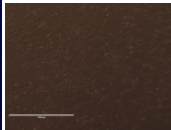
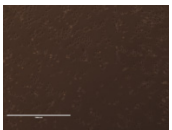
<b>Protocole</b>	Le milieu de culture contenu dans un Pétri contenant les cellules MDA est retiré. Le Pétri est laissé à l'air (sous hotte à flux laminaire) et à sec pendant 90s avant de remettre du milieu contenant du Dapi et de la Calcein AM. Le Pétri est mis dans l'incubateur pour quelques minutes avant d'être observé au microscope.				
<b>Petri test (90s sans milieu)</b>					
<b>Pétri Témoin (avant traitement)</b>					
<b>Observations</b>	Cellules vivantes ; pas de perméabilité induite ; pas de changement de morphologie des cellules.				

Tableau XVIII. Résultat du test de dessiccation effectué sur MDA-MB-231

Il apparait que la viabilité et la perméabilité des cellules laissées à sec pendant 90s ne soient pas altérées. Or, dans nos conditions de travail, les sillons sont courts (i.e, disparaissent rapidement) et, par conséquent, les cellules ne sont jamais laissées 'à sec' aussi longtemps : 90s représentent donc une valeur seuil supérieure jamais atteinte durant l'expérience, ainsi, toute ambiguïté est évitée dans l'interprétation des résultats du test de dessiccation. On confirme donc que la mortalité induite par le traitement par plasma est indépendante du phénomène de dessiccation. Toutefois, pour être prudent et éviter toute ambiguïté, les cellules traitées et qui feront l'objet d'un test quantitatif serontensemencées dans de petits inserts rectangulaires en silicone ( $S= 0.9 \text{ cm}^2$ ) placés, chacun, dans un Pétri afin d'éviter une éventuelle évaporation qui mènerait à une dessiccation (Fig. 38).

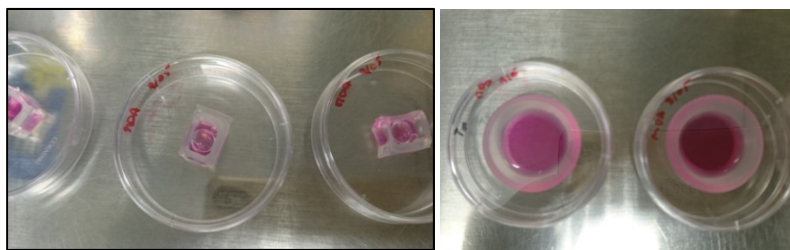


Figure 38. Photo de cellulesensemencées/incubées dans des inserts rectangulaires et circulaires.

Suite à l'étude qualitative, il est important, à ce stade, de quantifier l'efficacité du plasma sur les cellules cancéreuses. D'après les résultats qualitatifs, la condition la plus létale pour MDA-MB-231 (coloration bleu au Dapi et pas de coloration verte avec Calcein AM) serait 950V, DC=3%, 1lpm He +30 sccm O<sub>2</sub> et 1mm de milieu. Remarquons qu'une hauteur de milieu de 1.1 mm serait aussi un bon candidat : on favorisera, tout de même, 1mm car le degré d'arrachement est légèrement inférieur (les cellules mortes présentes sur le Pétri peuvent être caractérisées).

### 3.3.1.2 Quantification de l'efficacité du traitement: conditions 'fortes' d'exposition

Les conditions opératoires sont présentées dans le tableau XIX : on y décrit la nature et le nombre de cellules tumoralesensemencées dans différents types d'inserts et exposées à différentes conditions opératoires du plasma.

#### MDA-MB-231

Types d'échantillons	Nombres cellules 'seedées'	Conditions générales de traitement
*7 inserts rectangulaires : 5 conditions + 2 témoins (non traité et traité au gaz)  *5 inserts circulaires : 3 conditions et 2 témoins (non traité et traité au gaz)  *1 Petri sans insert	1.5*10 <sup>4</sup> cells/inserts Rect 5.0*10 <sup>4</sup> cells/insert Circ 3.3*10 <sup>5</sup> cells/Pétri	* <u>Inserts rectangulaires</u> 1mm milieu soit 2.130 mL ; 1lpm He + 30sccm O <sub>2</sub>  - <b>Tm, Tg</b> : témoins (non traité et gaz) -950 Vpp, D3, v=400 step/s <b>(A)</b> -950 Vpp, D1, v=400 step/s <b>(B)</b> -950 Vpp, D1, v=2000 step/s <b>(C)</b>

		-850 Vpp, D3, v=400 step/s <b>(D)</b> -750 Vpp, D3, v=400 step/s <b>(E)</b>  *Inserts circulaires 1.1 mm soit 2.343 mL ; v400 steps/s, 950Vpp et DC=3%, He+30sccm O2. - <b>TM, TG</b> : témoins (non traité, gaz) - 1lpm, <b>(F)</b> -0.9 lpm <b>(G)</b> -0.8lpm <b>(H)</b> 1 Pétri témoin
--	--	--

**Notations** :cells : cellules, Vpp : Volt peak to peak; rect et circ : rectangulaire et circulaire, **Tm et Tg** : témoin non traité et témoin traité uniquement au gaz dans le cas d'inserts rectangulaires, **TM et TG** : témoin non traité et témoin traité uniquement au gaz dans le cas d'inserts circulaires.  $400steps=1mm$ .

Tableau XIX. Description des conditions opératoires utilisées pour l'analyse FACS des cellules MDA-MB-231 traitées par plasma.

Avant de procéder au protocole de récupération pour l'analyse au FACS, les échantillons sont observés au microscope: mis à part les échantillons H et C dans lesquels on pouvait observer des cellules vivantes, intactes mélangées aux cellules mortes, tous les autres échantillons présentaient des cellules mortes sur la surface des Pétris (perte de réfringence, changement de morphologie et de taille...) dont le degré d'endommagement était directement lié aux conditions de traitement. Une évaluation visuelle au microscope des échantillons sera faite juste après exposition et 24h après exposition.

Le tableau général des données numériques provenant du FACS se trouvent dans l'Annexe 5.

Une bonne fiabilité des résultats obtenus par la méthode FACS nécessite un nombre minimal de comptes enregistrés : généralement, la valeur seuil de ce nombre est définie à 10000. Nous présenterons les résultats 'acceptables' (les plus grands nombres d'événements enregistrés)

dans les figures 39 et 40 : ces figures présentent le pourcentage de cellules mortes après traitement et le diagramme associé, pour chacune des conditions d'exposition.

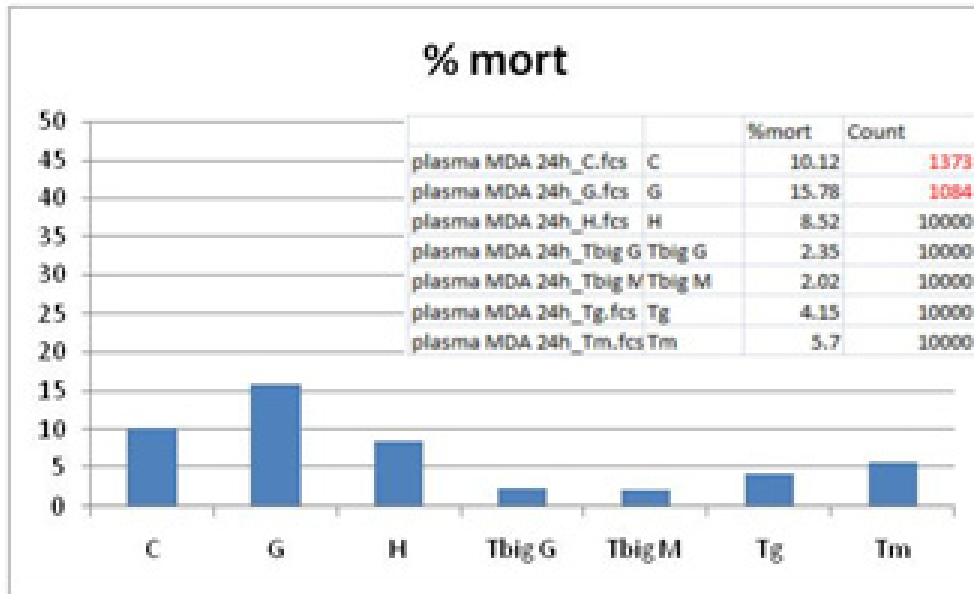


Figure 39. Pourcentage de cellules mortes des échantillons ayant eu un nombre de comptes 'acceptable'. Notations : TbigG :TG et TbigM :TM

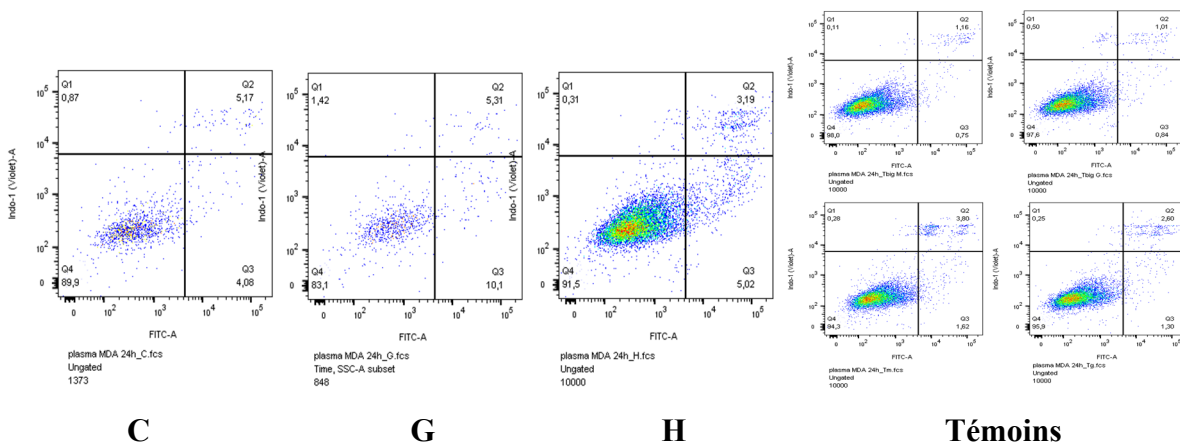


Figure 40. Représentation des diagrammes obtenus par la méthode FACS et associés aux données de la figure 39.



Pour tenter de mieux comprendre ces résultats et afin de compléter la discussion autour de ces résultats, nous avons jugé qu'il serait pertinent de garder à l'esprit l'ensemble des données obtenues (Tableau XX, Annexe 6).

A	B	C	D	E	F
plasma MDA 24h_A.fcs	249	2.41	11.2	21.3	65.1
plasma MDA 24h_B.fcs	52	1.92	7.69	9.62	80.8
plasma MDA 24h_C.fcs	1373	0.87	5.17	4.08	89.9
plasma MDA 24h_D.fcs	48	8.33	2.08	4.17	85.4
plasma MDA 24h_E.fcs	202	2.97	9.9	22.3	64.9
plasma MDA 24h_F.fcs	762	1.57	15.1	18.4	65
plasma MDA 24h_G.fcs	1084	1.48	5.26	9.04	84.2
plasma MDA 24h_H.fcs	10000	0.31	3.19	5.02	91.5

Tm, Tg : témoins  
 -950 Vpp, D3, v=400 (A)  
 -950 Vpp, D1, v=400 (B)  
 -950 Vpp, D1, v=2000 (C)  
 -850 Vpp, D3, v=400 (D)  
 -750 Vpp, D3, v=400 (E)

-TM, TG: témoins  
 - 1lpm (F)  
 -0.9 lpm (G)  
 -0.8lpm (H)

Tableau XX. Extrait des données du tableau général de résultats FACS présentés à l'Annexe 6. A : Échantillons, B : Comptes, C : Nécrose (%), D : Apoptose tardif (%), E : Apoptose précoce (%), F : Survivants (%). (1step=1mm).

### ◆ Discussion des résultats

Dans un premier temps, on peut aisément dire, d'après les résultats (Figs.39 et 40), que (1) les inserts utilisés n'induisent pas significativement de mortalité puisque les taux de mortalité demeurent inférieurs à 5% (2%, 2%, 4% et 5% pour TG, TM, Tg et Tm<sup>6</sup> respectivement); et (2) que le mécanisme général menant à la mort cellulaire est l'apoptose (apoptose précoce et tardif).

Dans un second temps, si on tient compte des résultats (Tab. XX) obtenus sans considérer les observations au microscope et le 'nombre d'événements enregistrés'(NEE) ou

---

<sup>6</sup> **Tm et Tg** : témoin non traité et témoin traité uniquement au gaz dans le cas d'inserts rectangulaires, **TM et TG** : témoin non traité et témoin traité uniquement au gaz dans le cas d'inserts circulaires. TbigG :TG et TbigM :TM.

‘Comptes’, on trouve que (1) plus le voltage diminue, plus le taux de survie des cellules est haut : ~65% (950V-D3) inférieur à ~ 85% (850V-D3); (2) plus la vitesse de balayage est grande moins le traitement est efficace (chaque cellule recevant, alors, moins d’espèces actives) : ~80% (950V et  $v=400\text{steps/s}$ ) inférieur à ~90% (950V et  $v=2000\text{steps/s}$ ); (3) Augmenter la puissance (via DC(%)), diminue le nombre de survivants au traitement par plasma : ~65% (950V-D3) inférieur à ~80% (950V-D1) ; (4) Plus le débit est faible, plus le nombre de survivants est important (puisque le jet ne transporte plus assez loin les particules actives, par conséquent seule une plus faible proportion d’espèces actives atteignent les cellules) : ~65% (1lpm) < ~84% (0.9lpm) < ~91% (0.8lpm). On atteint donc ~ 15% de mortalité relativement au témoin (TM ou TbigM).

Or, en réalité, un résultat sera considéré *acceptable* lorsque le NEE atteint environ  $1.10^4$ : ainsi un faible NEE aura probablement pour effet *d’induire une plus grande incertitude* sur le résultat (incertitude d’autant plus grande que le NEE est faible). Par conséquent, nos résultats semblent suivre la même tendance que les résultats qualitatifs exposés dans la section précédente mais les valeurs sont très incertaines. Notons que le nombre d’évènements est aussi lié au temps d’enregistrement des données qui varient d’un échantillon à l’autre.

Un dernier point essentiel à soulever est la grande différence entre les observations au microscope des échantillons après leur traitement et les pourcentages obtenus par la méthode FACS. Au microscope, les échantillons traités dans des conditions ‘létales’ montrent une très grande proportion de cellules ‘mortes’, ce qui s’est traduit par de faibles NEE ; autrement dit, les échantillons présentant un nombre de cellules vivantes relativement plus important, ont un NEE plus grand et la mesure est donc plus fiable. Il apparaît que moins la cellule est endommagée par le traitement, plus elle sera facilement détectée et comptabilisée ; autrement dit, les cellules très endommagées ne sont probablement pas comptées surestimant ainsi la proportion de cellules vivantes.

Finalement, on envisage une nouvelle série d’expériences (‘optimisation 2’) visant à tuer les cellules en présence de sillons sans les détacher et ce dans des *conditions expérimentales adoucies* ( $V$  et  $DC$ ) dans le but d’induire la mortalité en minimisant les

dommages à la cellule et, donc, d'améliorer leur détection au FACS et permettre ainsi de quantifier l'efficacité du traitement.

### **3.2.2 Optimisation des conditions opératoires et quantification de l'efficacité du traitement : conditions d'exposition 'adoucies'**

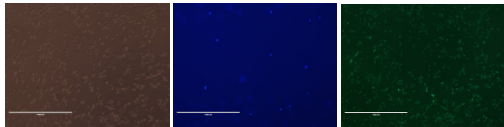
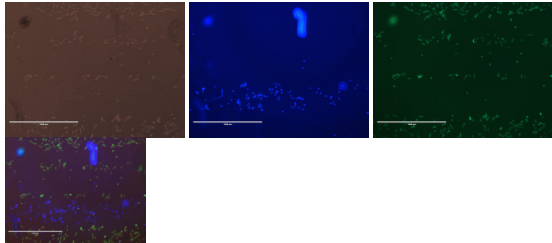
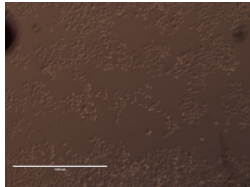
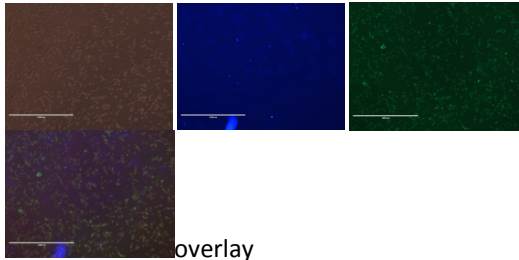
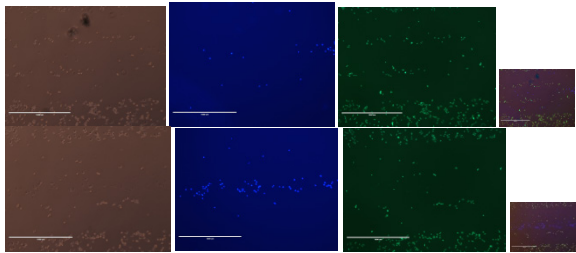
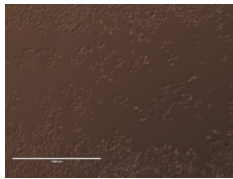
La proportion de cellules MDA-MB-231 effectivement mortes lors de l'expérience précédente n'a pas été démontrée par le FACS (Fig.39). Le FACS semble être très sensible à la variation de morphologie des cellules de sorte que si la cellule est trop endommagée, elle devient indétectable et par conséquent ne sera pas comptabilisée comme une cellule morte. C'est la raison pour laquelle, le nombre d'évènements était trop faible.

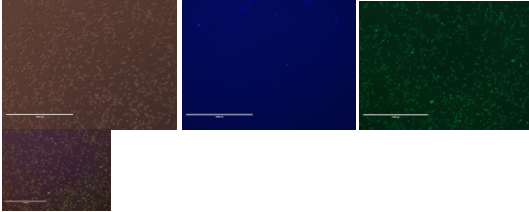
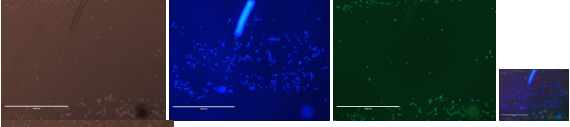
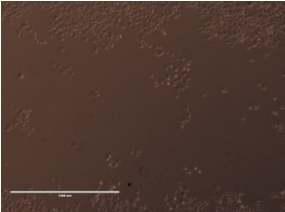
Dans cette section, le principal but sera *d'adoucir les conditions optimisées* pour permettre la détection et l'analyse des cellules au FACS (pour les deux lignées cellulaires, soit MDA-MB-231 et MCF7). On observera de plus près les *changements morphologiques* induits par le plasma afin d'estimer l'ampleur des dommages subis par la cellule.

#### **3.2.2.1 Optimisation des conditions opératoires**

Une série d'expériences (série1) menées avec MDA-MB-231 dans laquelle on évalue l'effet du voltage appliqué (750 Vpp vs 850 Vpp), du débit et de la puissance plasma (D1, D2 et D3) pour une hauteur de milieu *de 1.1mm* est présentée dans l'Annexe 7 : l'effet de ces paramètres est évalué en estimant la perméabilité, la viabilité et les modifications morphologiques visibles (par microscopie).

Série 1

MDA-MB-231		
	750 Vpp	850 Vpp
11pm He+30scm O2 et 1.1mm milieu dans Pétri		
D1	<p>PT : pas de Sillon. M : pas Arr, légère perméabilité, cell majoritairement vivantes</p> 	<p>PT : Sillon. M : Arr partiel, lignes visibles avec et sans cells mortes. Seules les cells mortes sont perméabilisées ; Cells réfringentes/vivantes ne sont pas perméables.</p>  <p>APRES 48H :</p>  <p>On voit encore quelques cellules mortes, et une prolifération des cellules vivantes.</p>
D2	<p>PT : pas S. M : pas Arr, légère perméabilisation, cell majoritairement vivantes (voir overlay)</p> 	<p>PT : S (~2mm). M : Arr + fort qu'à D1 mais voit cells mortes sur surface ; dans la 2ieme série d'images, on voit quelques cells 'vert' et 'bleu' simultanément dans la zone de cells mortes</p>  <p>APRES 48H :</p>  <p>On voit quelques cells mortes encore. Les cells</p>

		vivantes prolifèrent... la densité de cells < à celle en D1 ! (prolifération plus lente ?! oui, observé dans la littérature !)
<b>D3</b>	<p>PT : pas S. M : pas Arr, légère perméabilisation, cell majoritairement vivantes</p> 	<p>PT : pas S (1à qqsmm) M : Très peu Arr, les cells mortes adhèrent sur surface, et sont perméabilisées.</p>  <p><i>plus proche bord donc hauteur liquide + grande</i> : nombre cells vivantes a légèrement ↑ et le nombre de cells mortes adhérees sur surface a ↓ : sensibilité au variation de la hauteur du liquide !</p> <p><b>APRES 48H :</b></p>  <p>On voit seulement une légère prolifération des cells vivantes (soit survivantes, soit re-dépôt après avoir été arrachées vivantes) : la densité est encore plus faible qu'en D2 ou D1. Vitesse de prolifération ↓ ? Les cells mortes sont toujours sur la surface mais ont une taille beaucoup plus petite et semblent 'disparaître' (se désagrègent)... difficulté à régler le focus pour bien les distinguer.</p>

Notations : PT : pendant traitement ; M=microscope ; cell=cellule ; D=DC(%) ; Arr= arrachement des cellules ; S= sillons ; qqs : quelques.

Tableau XXI. Effet de la variation du DC(%) pour deux valeurs de voltage sur les cellules traitées au plasma pour une hauteur de milieu de 1.1 mm: images au microscope de cellules traitées puis colorées au Dapi et à la Calcein AM.

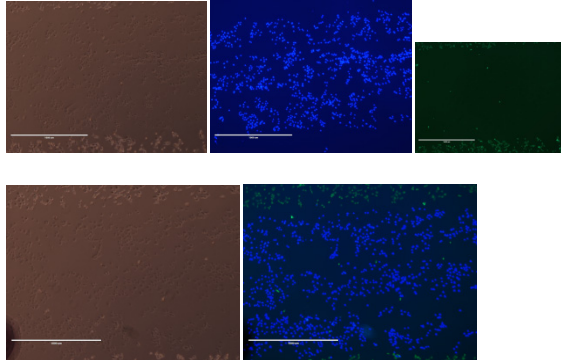
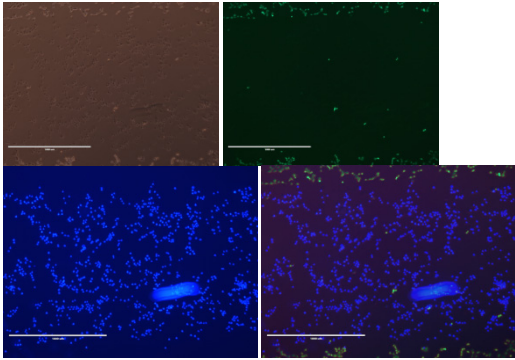
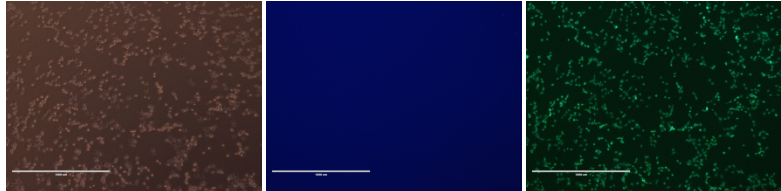
Les observations expérimentales décrites dans les tableaux XXI et XXII sont présentées à titre indicatif et viennent appuyer l'interprétation des résultats.

Pour une hauteur de milieu de 1.1mm (Tab. XXI) et pour les conditions de voltage/DC testées, la présence de sillons n'est pas toujours observée. Les hauts degrés de perméabilisation et une présence notable de cellules mortes sont associés à la présence de sillons. Il est intéressant de noter la sensibilité de l'efficacité relativement à la hauteur du milieu dans certaines conditions de voltage : à 750V et 850V, D3 (DC=3%), 1lpm He, on observe qu'une très légère variation de la hauteur ('effet du ménisque') du milieu affecte l'efficacité du traitement. Dans ce dernier cas, on observe soit l'effet protecteur du milieu ou le détachement cellulaire dû à un effet d'entraînement du liquide : ces deux effets seront donc minimisés lorsque la hauteur sera inférieure à 1.1mm. Cette grande sensibilité à la quantité de milieu a déjà été observée auparavant en laboratoire.

## Série 2

Dans une vision d'optimisation et de comparaison, la même méthodologie a été reprise pour une hauteur de milieu de 1mm (série 2).

MDA-MB-231		750Vpp	850Vpp
1lpm He+30sccm O2 et 1mm milieu dans Petri			
D 1	PT : S M : Pas ou très léger Arr, quelques cells vivants et cells majoritairement mortes sur surface.		PT : S M : pas ou léger Arr, quelques cells vivantes, cells mortes adhèrent sur surface et captent bien dapi ! cells semblent plus endommagé qu'en 750, D1.
D 2	PT : S M : très léger Arr, densité cells mortes proche de D1, (cells ± endommagés)		PT : S M : léger Arr, densité cell ↓ légèrement. Peu de cells vivantes.

D 3	<p>PT : S M : pas ou très léger Arr (très légère ↓ densité), quelques cells vivantes visibles, moins de cells mortes visibles ; Les cells mortes sont visiblement + endommagées qu'en D1, D2 : changement de morphologie (taille, aspect plus granuleux...)</p> 	<p>PT : S M : pas ou très peu d'Arr, quelques cells vivantes (non perméabilisées); cells majoritairement mortes et adhèrent à la surface.</p> 
	<p><u>Témoins :</u></p> 	

Notations : PT : pendant traitement ; M=microscope ; cell=cellule ; D=DC(%) ; Arr= arrachement des cellules ; S= sillons ;

Tableau XXII. Effet de la variation du DC(%) pour deux valeurs de voltage sur les cellules traitées au plasma pour une hauteur de milieu de 1 mm: images au microscope de cellules traitées puis colorées au Dapi et à la Calcein AM.

### ◆ Synthèse des expériences qualitatives

D'après les tableaux XXI et XXII, il apparait clairement que les conditions optimales permettant d'induire un taux de mortalité plus important et sans affecter l'adhésion cellulaire sont atteintes pour une hauteur de milieu de 1mm dans un Pétri. Dans cette condition, la présence de sillons est constatée et, ce, pour tous les voltages et DC testés. Encore une fois, on constate le lien entre la présence de sillons et le fort taux de mortalité atteint après traitement. On remarque, d'après le tableau XXII, que même si le traitement est très efficace pour les deux voltages, le nombre de cellules en vie est inférieur lorsqu'elles sont traitées à 850V (cf.

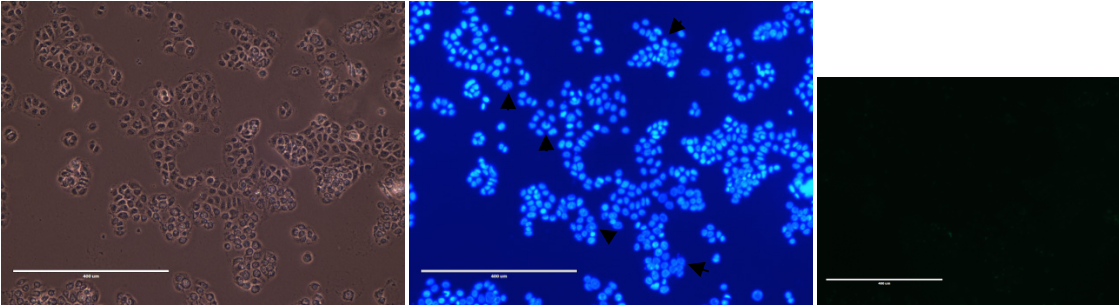
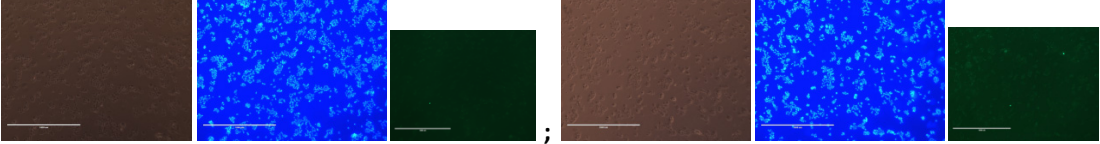
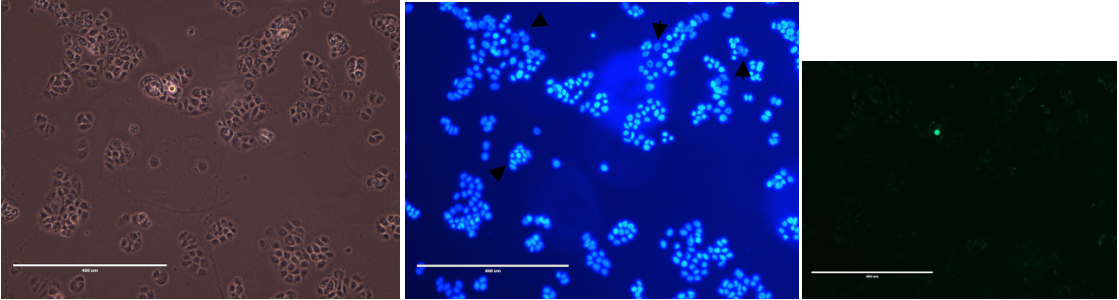
images Calcein AM) confirmant ainsi que l'efficacité est améliorée par l'augmentation du voltage (en accord avec la littérature).

Les colorations au Dapi et à la Calcein AM confirment que les cellules sont non seulement perméabilisées mais aussi mortes. Des photos prises dans ces mêmes conditions avec un grossissement (x10) et ré-observées 48h après, nous permettent d'estimer les modifications morphologiques de MDA-MB-231(Annexe 8) : d'après ces images, on retiendra que le degré des dommages subis sont proportionnels à la puissance déposée par le plasma (proportionnelle à V et DC). Pour de faibles conditions (exemple, 750V-D1) on observera, chez les cellules mortes, une perte de réfringence plus ou moins totale, un aspect externe différent, un 'effet de beigne' présent en faible proportion ; plus les conditions d'exposition se durcissent et plus les cellules sont endommagées (morphologie) avec un effet de beigne très marqué, une coloration Dapi moins intense et une perte d'intégrité de la cellule (bris des membranes). Il n'existe que quelques rares cellules survivantes. L'Annexe 8 montre et décrit les modifications morphologiques observées. L'observation des cellules 48h après traitement montre que l'action du plasma perdure avec le temps (tel que démontré dans la littérature, voir §1.4) puisque les cellules sont alors dans un stade critique très avancé : on note une diminution de la taille, certaines semblent s'être désagrégées ('fondues' sur elle-même sans trace de milieu intracellulaire dans l'environnement) et le focus devient alors plus difficile à régler pour pouvoir visualiser simultanément une zone traitée et une zone non traitée : ce phénomène a été observé dans certaines études [14,25,45]. D'après Dobrynin *et al.*, pour de faibles doses de plasma, les cellules de mélanome (cancer de peau) ne montrent aucune différence morphologique avec les cellules non traitées alors qu'elles ont cessé de proliférer ne montrant, alors, aucune croissance 24h après traitement [15,20]. Plus de 24h après traitement, les cellules commencent à changer d'aspect et lentement à se désintégrer (similaire à un mécanisme d'auto-suicide' de la cellule, autrement nommé, apoptose). Cette observation fut confirmée dans cette étude par le biais de deux expériences (le test TUNEL et la coloration avec l'Annexin V) qui indiquent l'implication d'un apoptose tardive et d'un apoptose précoce. D'autres études montrent que, similairement à nos observations (Annexe 7, Tab. XXIII), les cellules tumorales traitées au plasma montrent des modifications morphologiques proches de ce que nous observons en laboratoire [14,25,45].

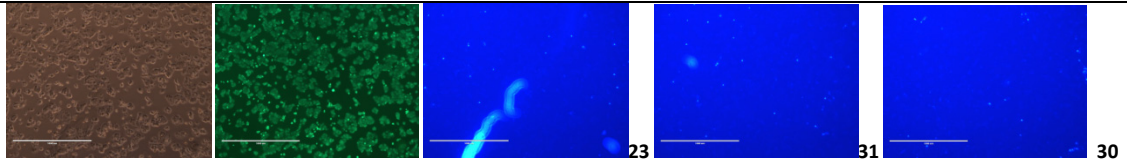


A ce stade, on constate que les résultats obtenus par les dernières séries d'expérience et le dernier FACS (§3.3.1.2) semblent soulever une contradiction : l'efficacité du traitement ne dépasserait pas ~20% (grand NEE) et ~ 37% (faible NEE). Or d'après les images prises au microscope, la proportion de cellules mortes est beaucoup plus importante. En prévision d'une seconde analyse au FACS, nous avons réussi à adoucir les conditions d'exposition tout en préservant un très haut taux de mortalité et un haut degré d'adhésion cellulaire pour les deux lignées tel qu'illustré dans le tableau XXIII pour MDA-MB-231 et MCF7. Ces images permettent de distinguer les changements morphologiques induits par un traitement moins agressif pour les cellules.

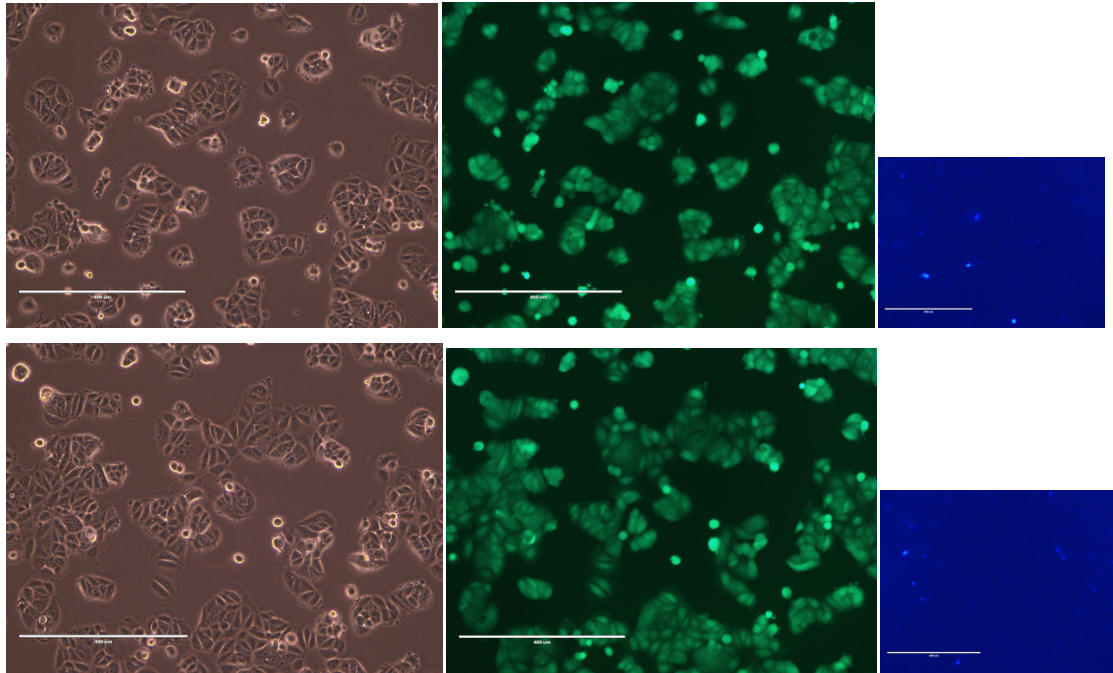
(a)

MCF7	Images		
<b>Conditions opératoires: 750Vpp, D3, 1lpm He + 30 sccm O2, 0.9 mm milieu (2083 µL)</b>			
			
<b>Traité</b>			
			

EchTe  
moin

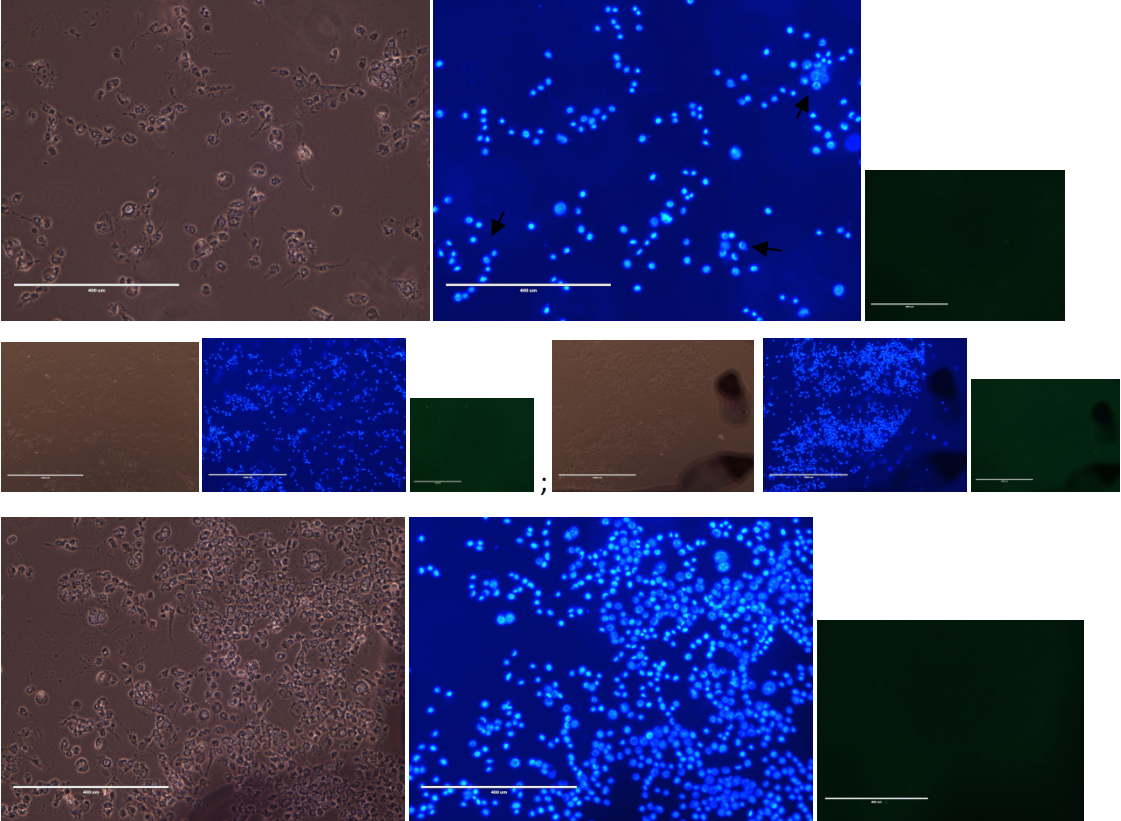
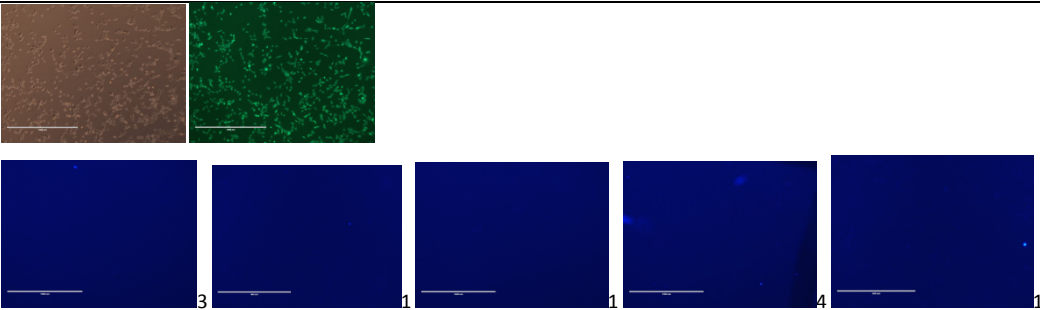


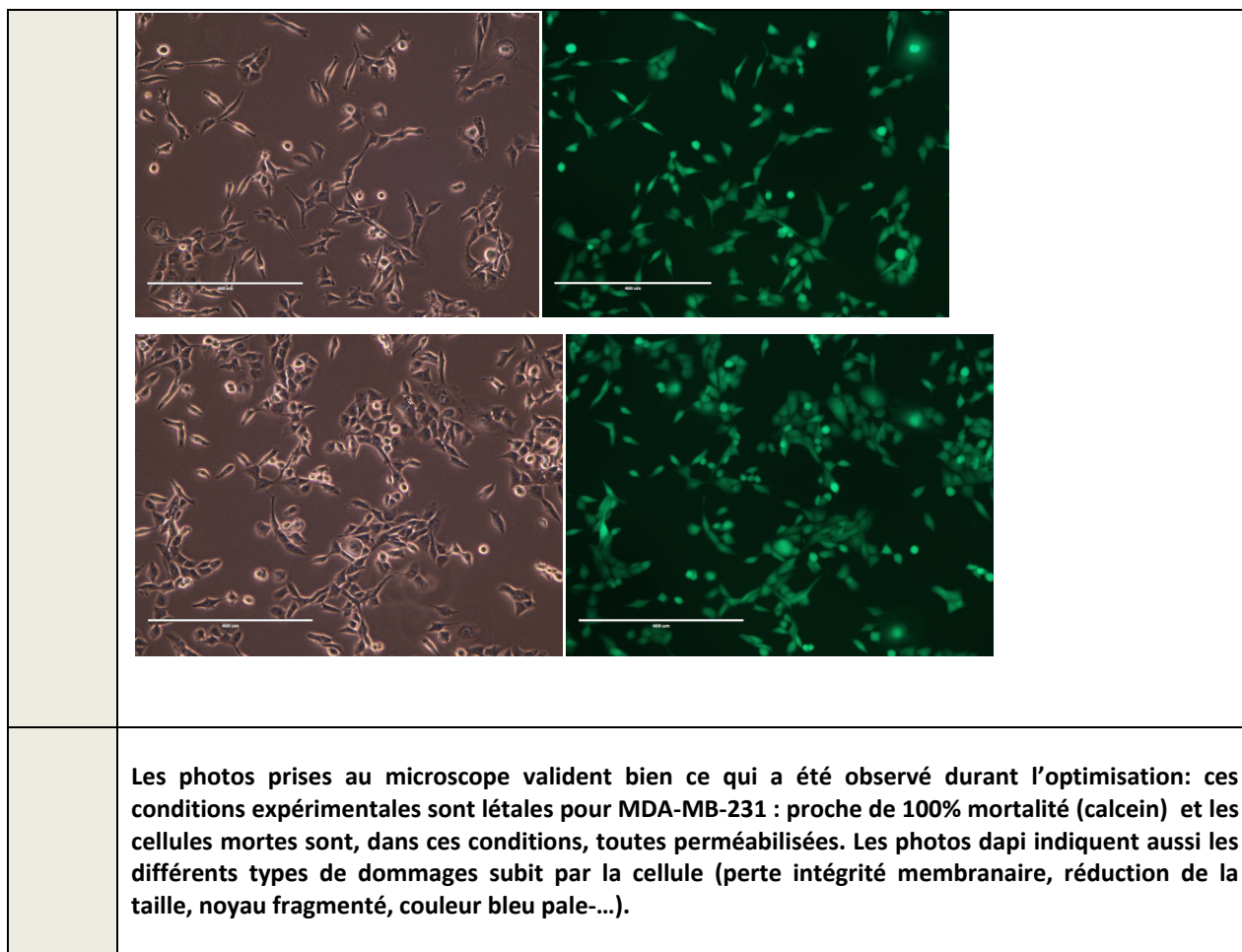
Nombre cellules perméables dans Pétris non traités.



Les photos prises au microscope valident bien ce qui a été observé durant l'optimisation: ces conditions expérimentales sont létales pour MCF7 : proche de 100% mortalité (calcein) et les cellules mortes sont, dans ces conditions, toutes perméabilisées. Les photos dapi indiquent aussi les différents types de dommages subis par la cellule (perte intégrité membranaire, noyau fragmenté, couleur bleu pale-...).

(b)

MDA	Images
	Conditions opératoires: 750Vpp, D3, 1lpm He + 30 sccm O2, 0.9 mm milieu (2083 µL)
Traité	
Témoin	



*Pour chaque échantillon, 3 images microscopiques sont prises pour une meilleure statistique des comptes.*

Tableau XXIII. prises au microscope pour (a) MCF7 et (b) MDA-MB-231 : conditions expérimentales adoucies permettant d'obtenir un haut taux de mortalité et un haut degré d'adhésion cellulaire. Compte Dapi.

### ***3.2.2.2 Quantification de l'efficacité du traitement: conditions d'exposition 'adoucies'***

Les résultats de l'analyse FACS des cellules tumorales traitées par plasma dans des conditions expérimentales 'adoucies' (défini dans le tableau XXIII), en présence de sillon et en préservant l'adhésion sur la surface du Pétri sont représentés dans les tableaux XXV(A) et XXV(B). Les conditions opératoires adoucies dans lesquelles ont été traitées les cellules figurent dans le tableau XIV.

<i>Conditions générales de traitement</i>	
MCF7	MDA
<p><u>*Petits inserts rectangulaires :</u></p> <p>0.9mm de milieu (2.083 mL) et v=400 steps/s = 1mm/s)</p> <p>-A) 750V, D3 ; 0.9 lpm He + 30sccm O2            -B) 750V, D3 ; 1 lpm He + 30sccm O2            -C) 850V, D3 ; 0.9 lpm He + 30sccm O2            -D) 850V, D3 ; 1 lpm He + 30sccm O2            -E) 850V, D1 ; 0.9 lpm He + 30sccm O2</p> <p>Et témoins (Tm, Tg, Tp)</p>	<p><u>* Grands inserts circulaires</u></p> <p>(1/1.1* mm soit 2.130 mL/2.343 mL) ; v400, sauf C ;</p> <p>-A :750V, D1, 1lpm He + 30sccm O2, v=1mm/s            -B: 850V, D1, 1lpm He + 30sccm O2, v=1mm/s            -C: 850V, D1, 1 lpm He + 30sccm O2, v=5mm/s</p> <p>Et témoins (TM, Tg, Tp)</p>

Tableau XXIV. Description des conditions opératoires utilisées pour l'analyse FACS des cellules MDA-MB-231 et MCF7 traitées par plasma en présence de sillons (conditions adoucies). Notations : Tp signifie échantillon témoin (cellules ensemencées sur Pétri sans insert).

A	Q4: FITC-A-, Indo-1 (Violet)-A-	Q1: FITC-A-, Indo-1 (Violet)-A+	Q2: FITC-A+, Indo-1 (Violet)-A+	Q3: FITC-A+, Indo-1 (Violet)-A-	Count	dapi + Freq. of Parent	
	Freq. of Parent	Freq. of Parent	Freq. of Parent	Freq. of Parent			
plasma 24h_TPetriMCF7.fcs	98	0.29	0.64	1.03	10000	1.12	
	alive	necrotic	apoptotic	early apoptotic			mort
MCF7_Tm	58.3	13.5	18.5	9.7	3319	33	41.7
MCF7h_Tg	71.4	4.89	13.9	9.83	9787	19.3	28.62
MCF7_A	64	4.43	13.5	18.1	7886	19.6	36.03
MCF7_B	31	1.65	5.22	62.1	728	12.9	68.97
MCF7_C	36.5	2.25	12	49.3	1780	17.6	63.55
MCF7_D	31.8	0.78	4.85	62.5	515	14	68.13
MCF7_E	67.5	4.72	10	17.8	10000	16.9	32.52

B	Q4: FITC-A-, Indo-1 (Violet)-A-	Q1: FITC-A-, Indo-1 (Violet)-A+	Q2: FITC-A+, Indo-1 (Violet)-A+	Q3: FITC-A+, Indo-1 (Violet)-A-	Ungated	dapi Freq. of Parent	
	Freq. of Parent	Freq. of Parent		Freq. of Parent			
plasma 24h_TPetriMDA.fcs	91.4	5.44	1.19	1.93	10000	7.2	
	Alive	necrotic	apoptotic	early apoptotic			mort
MDA_Tg	97.2	0.72	1.08	0.96	10000	1.84	2.76
MDA_Tm	97.1	0.31	1.49	1.11	10000	1.84	2.91
MDA_A	38.9	0.96	36.4	23.8	1667	37.4	61.16
MDA_B	46.3	0.53	29.4	23.7	2078	30.8	53.63
MDA_C	90.8	0.56	3.61	4.99	10000	4.26	9.16

Tableau XXV. Résultats bruts issus de l'analyse par FACS des cellules MCF7 (A) et MDA-MB-231 (B) dans les conditions présentées au tableau XXIV.

#### ◆MDA-MB-231

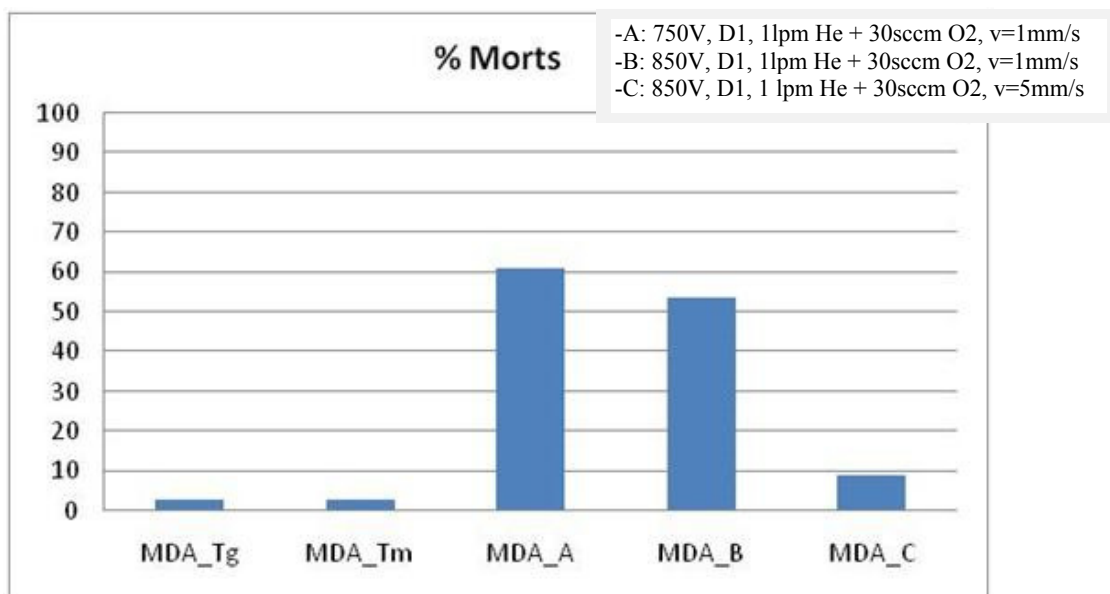
Les résultats obtenus viennent confirmer l'hypothèse émise en conclusion du précédent FACS, à savoir qu'en adoucissant les conditions expérimentales tout en maintenant une grande efficacité du plasma, le FACS devrait enregistrer un nombre de comptes suffisamment grand pour améliorer la précision de la mesure de viabilité par cette méthode. En effet, dans ces conditions, les NEE sont supérieurs et le taux de mortalité est beaucoup plus important approchant, ainsi, les résultats obtenus lors de l'optimisation (Dapi/Calcein AM) ; toutefois, deux conditions sur trois présentent un NEE inférieur à 10000 ce qui justifierait l'imprécision de la mesure, notamment le fait de sous-estimer, encore une fois, légèrement le taux de mortalité : on atteint ainsi plus de 50% de mortalité dans les cas A et B (alors que nos conditions de traitement sont relativement plus douces).

D'après la figure 41, on constate que le traitement à plus haut voltage ne donne pas nécessairement le meilleur taux de mortalité même si les valeurs sont très proches, soit 53.63% pour 850V-D1 et 61.16% pour 750V-D1. La même tendance a été observée au FACS précédent, à savoir, que le plus haut voltage ne donne pas nécessairement le plus haut taux de mortalité : 850V-D3 : ~15% et 750V-D3 : ~35%. On remarque que pour un traitement

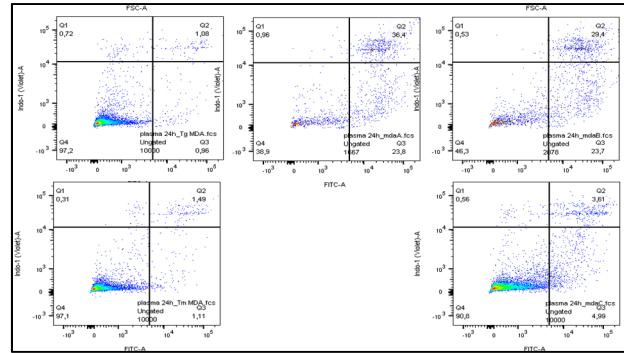
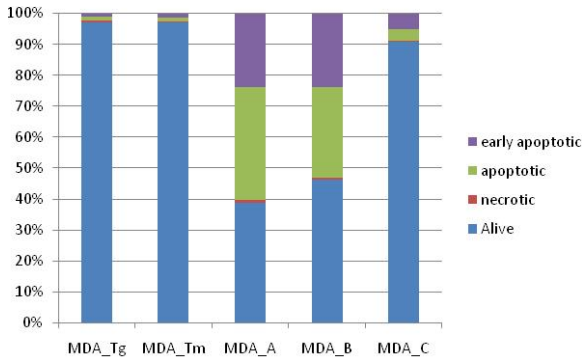
caractérisé par un DC fixe, 1lpm de gaz, 750V et 850V, les taux de mortalité obtenus sont très proches pour les deux lignées cellulaires testées.

Comme nous l'avons déjà présenté, plus les conditions sont adoucies, plus grande est la détection car plus grand est le nombre d'évènements enregistrés et, donc, plus précis est le résultat (sans oublier que le résultat ne concerne que les cellules détectées, i.e., celles ayant été le moins endommagées). Par conséquent, il faut être prudent dans l'interprétation des résultats FACS selon la valeur de NEE.

Selon la figure 41(i), on observe que l'augmentation de la vitesse de balayage de 1 à 5mm/s diminue d'au moins un facteur 4 l'efficacité du traitement (pour 850V, D1). A titre de comparaison, on obtenait lors du FACS précédent (Tab.XIV) une différence de 10% lorsqu'on passait de 1 à 5mm/s : toutefois, en réalité la différence doit être plus grande puisque les conditions étant plus drastiques, la mortalité doit être plus importante (dommages aux cellules) ; le NEE correspondant à 950V, D3, v=1mm/s se réduisait à 52 ce qui sous-estime énormément la mortalité si l'on s'en tient aux images des cellules marquées avec Dapi/Calcein AM dans les mêmes conditions.



(i)



(ii)

(iii)

Figure 41. Représentations graphiques (i) du taux de mortalité et (ii) des proportions relatives des mécanismes menant à la mort cellulaire, impliqués pour chaque condition de traitement des cellules MDA-MB-231 et déterminées à partir (iii) des diagrammes obtenus. Données enregistrées par le FACS.

### ◆ Discussion

Comme le confirme les figures 41(ii) et 41(iii), le processus impliqué dans la mort des cellules suite à un traitement par plasma est l'apoptose. Les 2 conditions les plus létales présentent un taux d'apoptose précoce important mais inférieur à l'apoptose tardif. Dans la condition la plus drastique pour les cellules (normalement 850V, D1 ; tel que observé avec les marqueurs), les taux d'apoptose précoce et tardif sont proches alors que pour une condition un peu moins drastique, le taux d'apoptose tardif est plus important (le double). Plus les dommages subis par la cellule sont importants, plus sa détection au FACS est affectée puisque le NEE en sera réduit, et, plus la proportion de l'apoptose précoce relativement à l'apoptose tardif enregistrée par le FACS sera plus élevée. Les cellules ont aussi été observées 24h après leur traitement par plasma, au moment de la récupération des cellules pour l'analyse au FACS.

Tout comme la condition B (Fig. 41(ii)), qui devait présenter un taux de mortalité plus important et qui révèle des taux d'apoptose précoce et tardif très proches, on retrouve dans le FACS de la figure 42 (analysant l'effet de la vitesse de balayage) le même schéma. En effet, la condition 200steps/s ( $v=0.5\text{mm/s}$ ) donne un plus haut taux de mortalité (relativement à la condition 100, soit  $0.25\text{ mm/s}$ ) et présente des taux d'apoptose précoce et tardif très proches : la condition supposément plus létale donne un pourcentage légèrement inférieur avec une



valeur de NEE aussi inferieur. Remarquons que dans chaque condition testée, le phénomène d’apoptose précoce est du même ordre de grandeur que l’apoptose tardif.

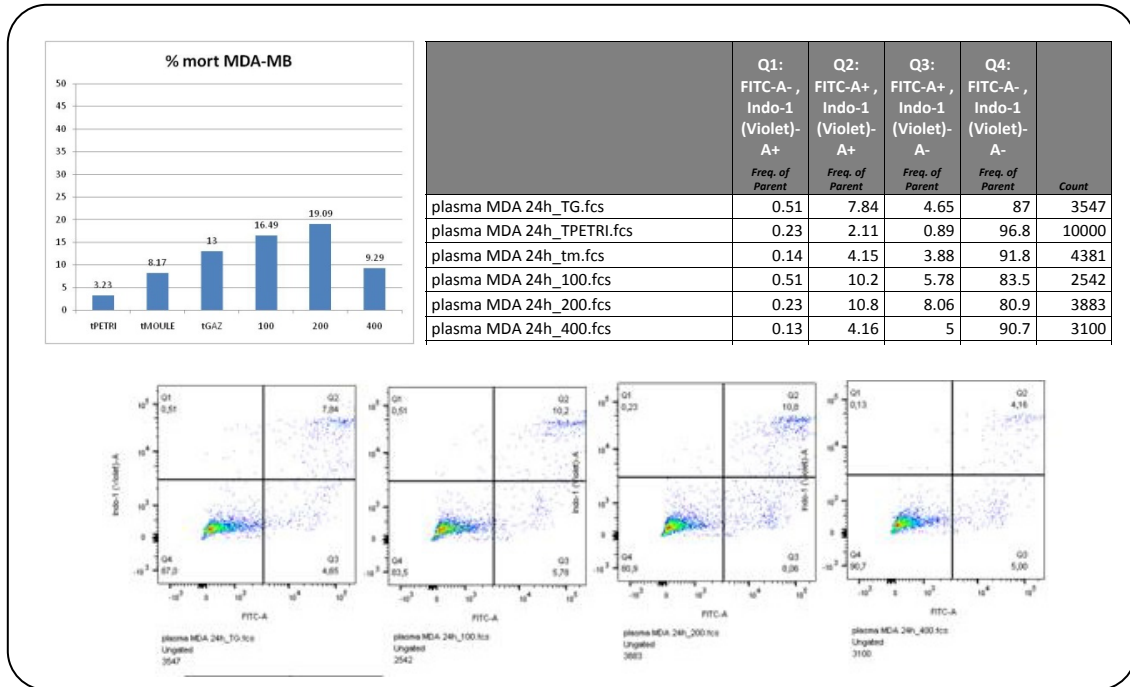


Figure 42. Résultats obtenus à partir du FACS analysant l’effet de la vitesse de balayage.

◆ **MCF7**

On présente les résultats de l’analyse obtenus par le FACS suite au traitement des cellules MCF7 (Figs. 43 et 44) dans les conditions décrites sur la figure 43.

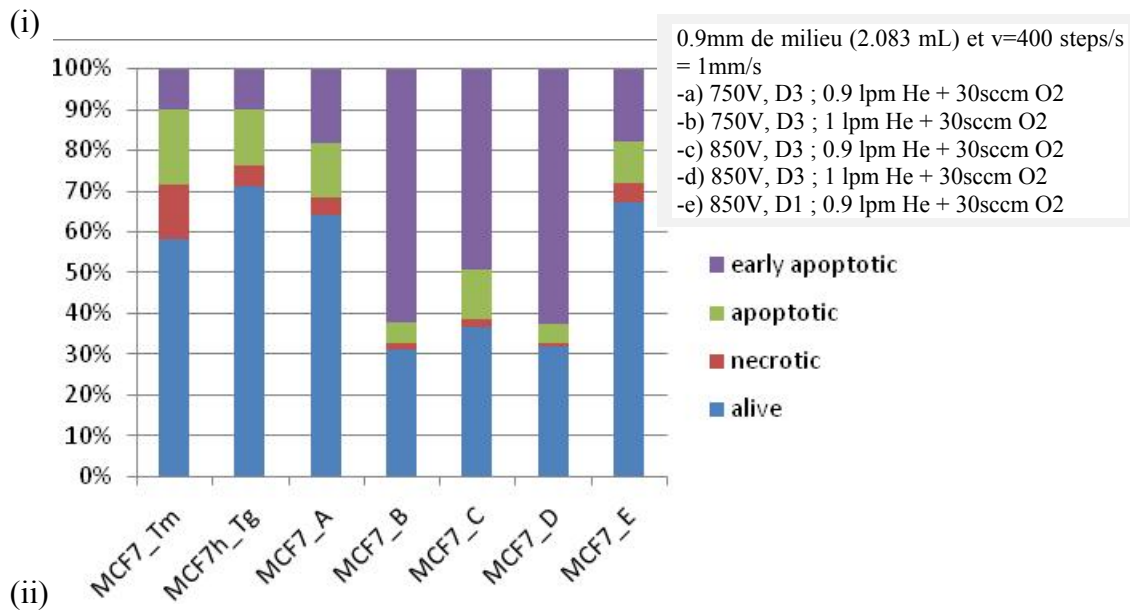
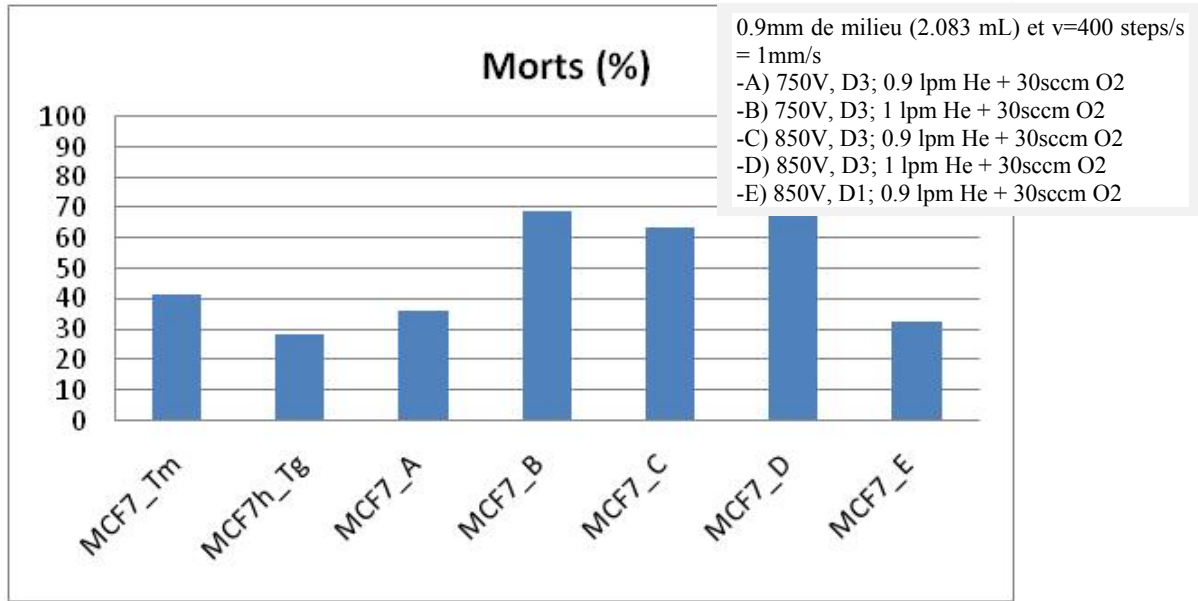


Figure 43. Représentations graphiques (i) du taux de mortalité et (ii) les proportions relatives des mécanismes impliqués pour chaque condition de traitement des cellules MCF7. Données enregistrées par le FACS.

Dans un premier temps, on observe que le taux de mortalité enregistré pour les échantillons Tm et Tg sont du même ordre de grandeur signifiant que la ‘pression’ physique du gaz n’induit pas une mortalité significative. La force du jet n’est donc pas la cause de la mortalité observée. Dans un second temps, on observe que (similairement aux FACS

précédents) les cellules MCF7 présentent un taux de mortalité dans les échantillons témoins supérieurs à ceux déterminés pour MDA (0 à ~7%) ou STS117 (0 à ~5%). Dans tous les FACS précédents de MCF7, Tm présentaient environ ~25% de mortalité; or dans cette expérience, ce taux est particulièrement supérieur. Toutefois et de manière générale, une grande part des cellules mortes des échantillons témoins de MCF7 sont dues à la nécrose (exception faites pour cette expérience), contrairement aux cellules témoins MDA-MB-231.

D'après la figure 43 (i), l'effet du débit est plus marqué à faible voltage qu'à haut voltage (pour un même DC) ce qui peut s'expliquer par le fait qu'à plus haut voltage, les dommages subis par les cellules étant plus importants, une 'faible' variation du débit n'aura pas autant d'effet sur l'efficacité du traitement que lorsqu'on les traite à plus faible voltage (comparaison des variations entre A et B et celles entre C et D). En effet, à 750V (DC=3%), l'augmentation du débit d'Hélium de 0.9lpm à 1 lpm (A/B) améliore l'efficacité du traitement puisque les espèces actives du plasma se rendant plus loin, un plus grand nombre atteignent les cellules. A 850V, le gain apporté par l'augmentation du débit semble être plus faible, soit ~6% relativement à ~32% pour 750V : il semblerait que la puissance générée étant plus importante, une légère augmentation du débit aura une contribution 'positive' plus limitée (C/D).

L'augmentation du voltage, de manière générale, améliore l'efficacité du traitement. Or, comme nous l'avons précisé, cette amélioration semble dépendre du débit avec lequel on travaille (A/C, B/D). L'augmentation de la puissance améliore l'efficacité du traitement (E/C) : le nombre de cellules mortes enregistrées est doublé lorsque, pour un voltage fixe de 850V, le DC varie de 1% à 3% (passant de 32.5% à 63.5% de mortalité induite). Remarquons que le NEE associé à la condition C est faible relativement à celle liée à la condition E, ce qui laisserait penser que l'incertitude du nombre de cellules mortes enregistrées est plus importante ; or comme les images obtenues au microscope, dans cette condition, montrent une proportion de cellules mortes très importantes, nous pouvons dire que le NEE, dans ce cas, sous-estime la valeur réelle du nombre de cellules mortes.

Plus généralement, on constate, d'après les tableaux XXV(A) et XXV(B) que le nombre d'évènement enregistré par le FACS (NEE), pour chaque condition de traitement, est plus important que ceux associés au FACS précédents (§3.3.1.2) : ce fait tend à confirmer le

lien étroit entre le taux de dommages subit par les cellules et leur détectabilité au FACS, de sorte que plus les dommages aux cellules sont importants et moins de cellules seront détectées ce qui se traduit par un NEE plus faible, sous-estimant ainsi les valeurs réelles des cellules mortes. Une des solutions possibles serait de faire *un clonogenic assay* où seraient comptées toutes les cellules vivantes capables de croître et donc de donner des colonies. Il est toutefois essentiel de rappeler que les tendances observées vont dans le même sens que celles observées lors des tests d'optimisation (Dapi/Calcein AM) : l'unique différence concerne la quantification des cellules mortes.

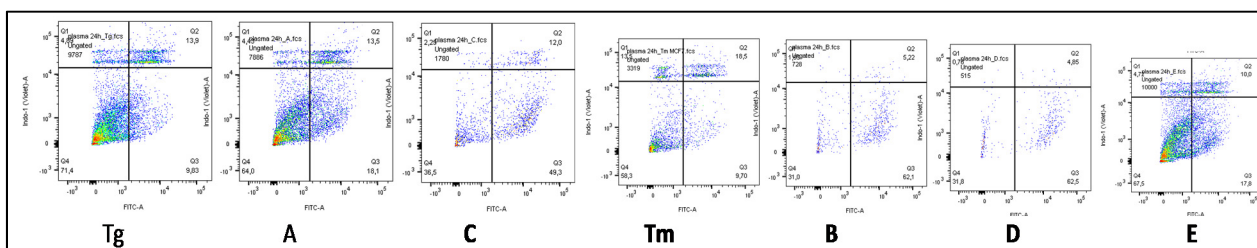


Figure 44. Diagrammes obtenus pour chaque condition d'exposition au plasma montrant la proportion de cellules MCF7 vivantes et celles mortes par apoptose (early and late apoptosis) et par nécrose.

### ◆ Discussion et Synthèse

Les FACS précédents ont montré que, quel que soit le type de cellules traitées, la mortalité induite par le traitement (même si faible sans la présence de sillons) se faisait majoritairement via le processus d'apoptose (Tab.XX, Fig.45). Dans les figures 43(ii) et 44, on remarque que pour les conditions où le taux de mortalité est le plus important, l'apoptose précoce vaut environ 50% alors que pour de plus faibles taux de mortalité (A et E), la contribution de l'apoptose précoce est de moins de 20% (~10% apoptose tardif). Si on compare aux anciens facs, on observe que plus les conditions deviennent drastiques pour les cellules, plus le taux d'apoptose (tardif) augmente sachant que pour la condition la plus létale, les proportions de l'apoptose tardif et précoce devenaient importantes (*cf. résultats FACS, Fig.45*):

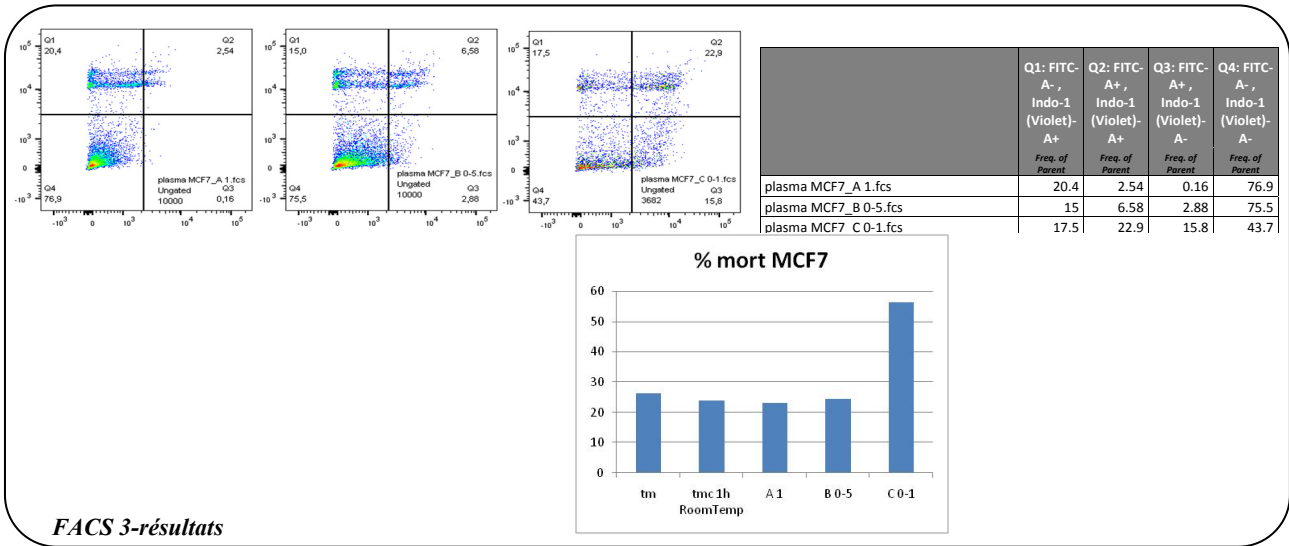


Figure 45. Résultat du FACS explorant l'effet de la vitesse de balayage (1mm/s, 0.5 mm/s et 0.1 mm/s) dans le traitement des cellules MCF7.

On note que pour les conditions A et E, pour lesquelles on atteint le même ordre de grandeur de mortalité, les proportions d'apoptose précoce et tardif sont très similaires : donc pour ces conditions, les processus menant à la mort de la cellule sont probablement très proches.

En observant les figures 43(ii) et 44, on remarque un fait original et intrigant dans ce FACS : dans les conditions les plus drastiques (B,C,D), les cellules présentent un taux d'apoptose précoce en moyenne de ~55%. Or le FACS a lieu 24h après l'exposition des cellules au plasma : dans ce cas, la proportion d'apoptose tardif devrait être supérieure à celle de l'apoptose précoce. Or si on observe les photos des échantillons prises 24h après leur traitement (juste avant la récupération des cellules pour l'analyse au FACS), on observe que les cellules se sont fortement détériorées comparativement à leur apparence juste après le traitement (Fig.46 et Fig.47) : elles sont séparées les unes des autres, leur taille a diminué et le focus pour pouvoir les distinguer est plus difficile à faire (les cellules se désagrègent).

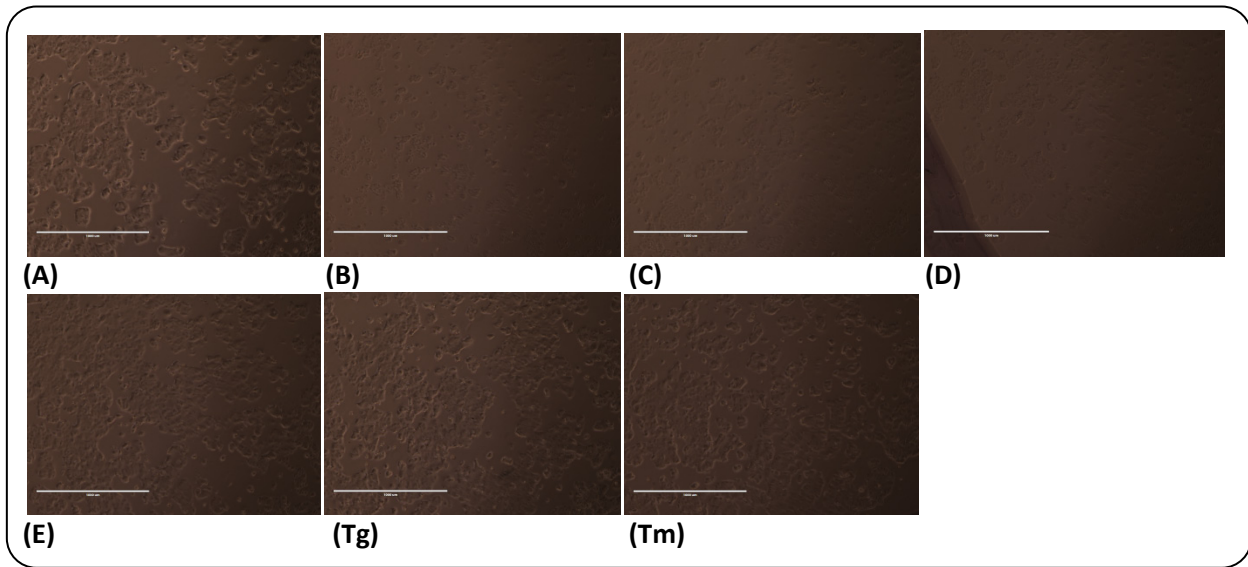
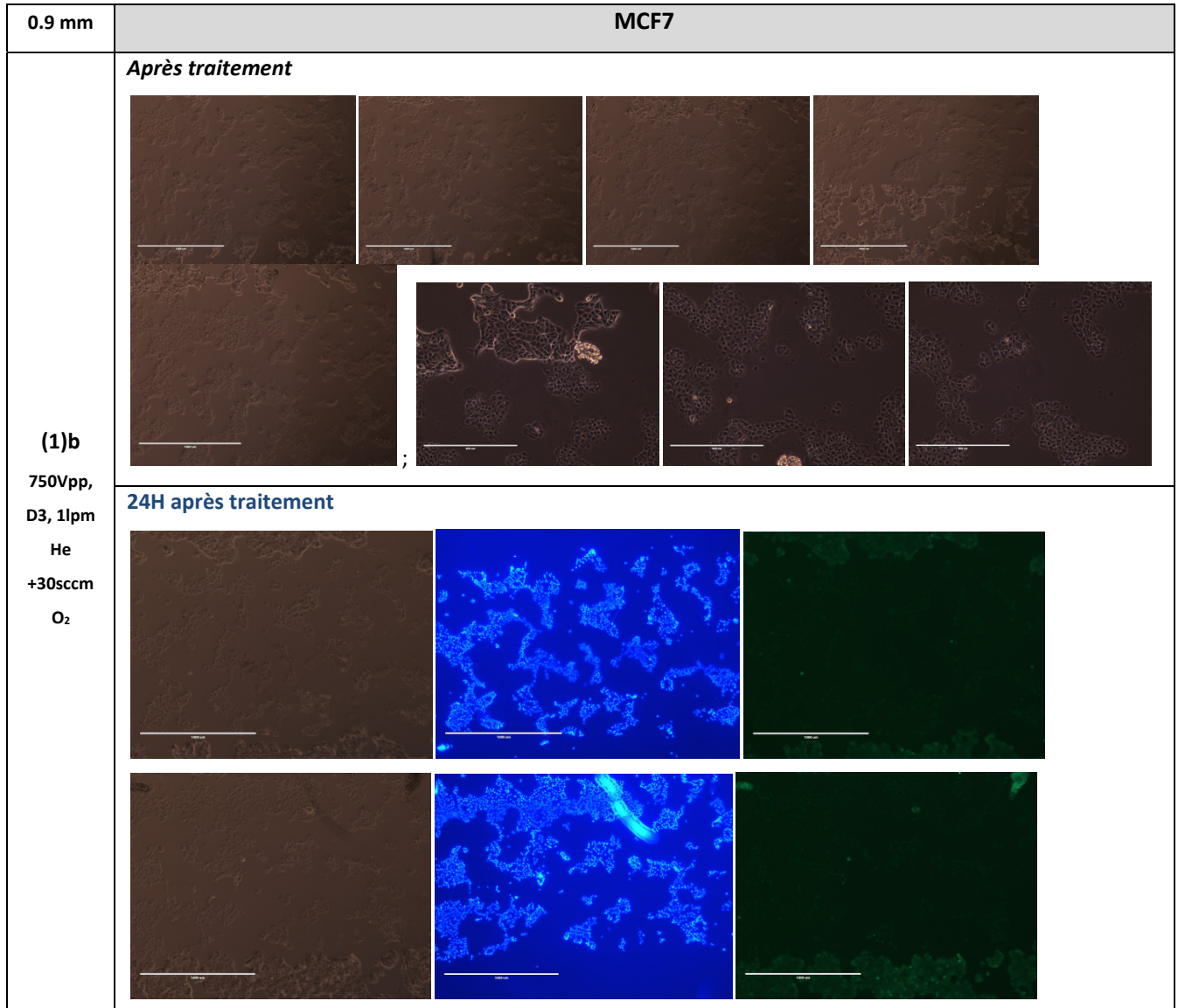


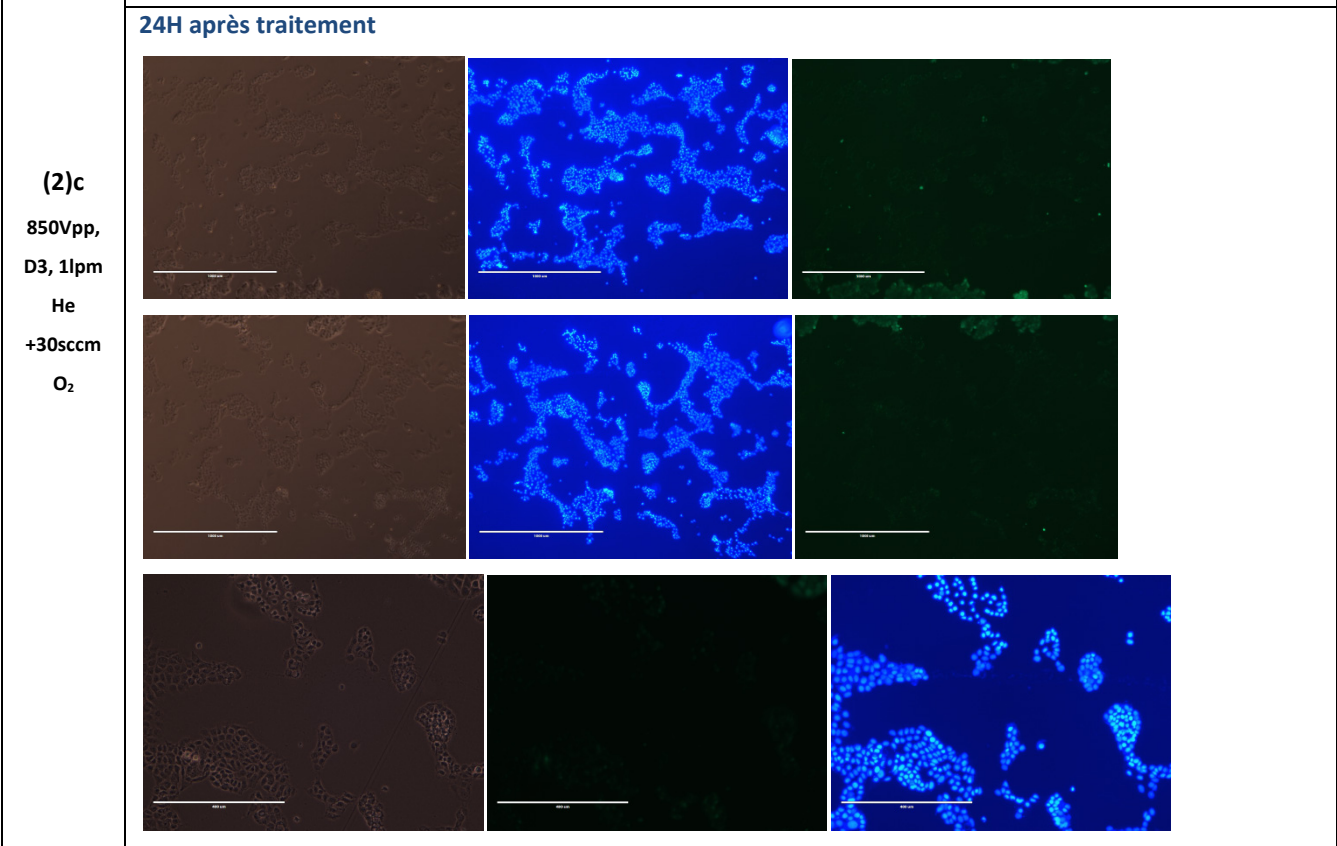
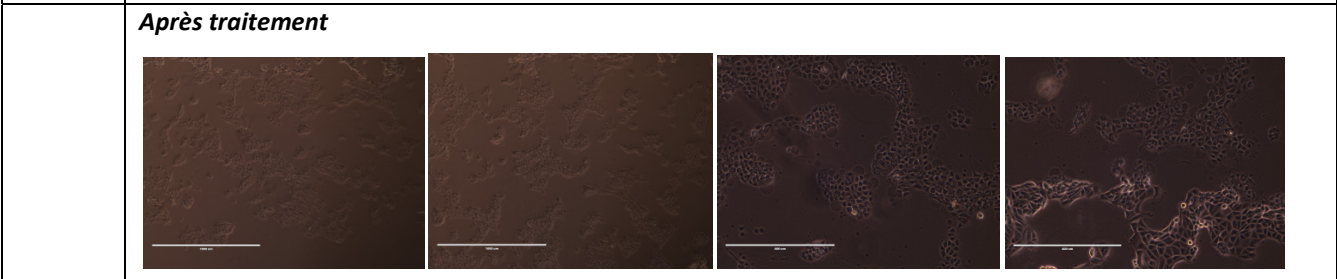
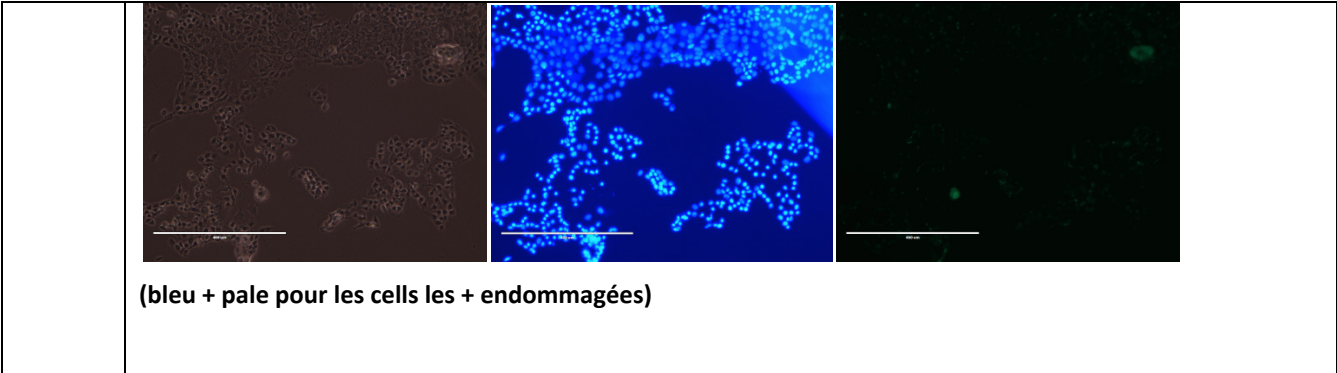
Figure 46. Images des cellules MCF7 24h après leur traitement au plasma et précédant l'analyse FACS.

L'état de détérioration avancée des cellules après traitement par plasma qui mènerait à penser que le taux de mortalité doit nécessairement être supérieur à 90% (voir aussi les résultats avec Calcein AM), auquel se rajoute (i) l'évolution de la détérioration dans le temps, (ii) la faible détectabilité des cellules lorsque le traitement est trop agressif, (iii) conditions auxquelles sont associées un fort taux d'apoptose précoce, montrerait que le FACS ne serait pas une méthode d'analyse adéquate pour des traitements où la cellule serait morphologiquement trop modifiée. Il est toutefois intéressant de noter que si, pour ces conditions, le taux d'apoptose précoce est si important relativement à l'apoptose tardif, cela signifierait que le marquage à l'AnnexinV perdure jusqu'à 24h après le traitement et que les cellules ne capteraient pas le Dapi puisque le signal associé est très faible, même 24h après traitement (fragmentation ADN ? dénaturation des acides aminés ?...).

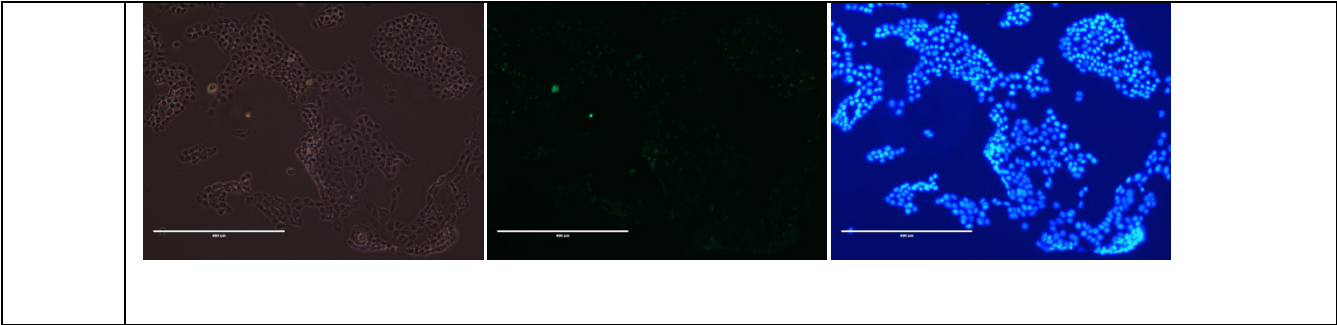
Pour vérifier ce dernier point, un test rapide consistant à colorer les cellules tumorales au Dapi 24h après traitement permettra d'évaluer si l'évolution des dommages empêcherait les cellules de capter le Dapi ce qui justifierait le taux d'apoptose tardif relativement à l'apoptose précoce. La figure 47 montre très clairement que (1) les dommages accumulés par la cellule menant à sa perméabilisation, à des changements morphologiques (perte réfringence, aspect général différent, membrane externe détériorée, possibilité d'ADN fragmenté et non limité au noyau puisque le signal Dapi est plus diffus/pâle) mènent à la mort de la cellule ; (2) les

molécules de Dapi sont capables de se lier aux (noyaux des) cellules pour toutes les conditions de traitement et quelque soit la lignée tumorale observée ; (3) le marquage perdure pendant au moins 48h (même si plus diffus): à ce stade, la question reste toujours posée sur la raison pour laquelle un tel rapport de proportions d'apoptose précoce/tardif est observé chez les cellules traitées dans des conditions 'agressives'.

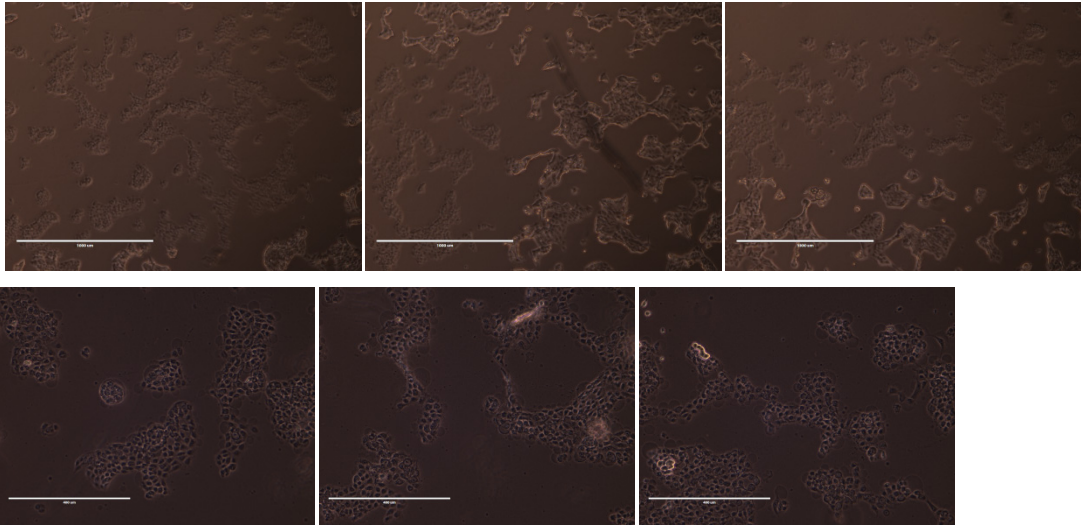








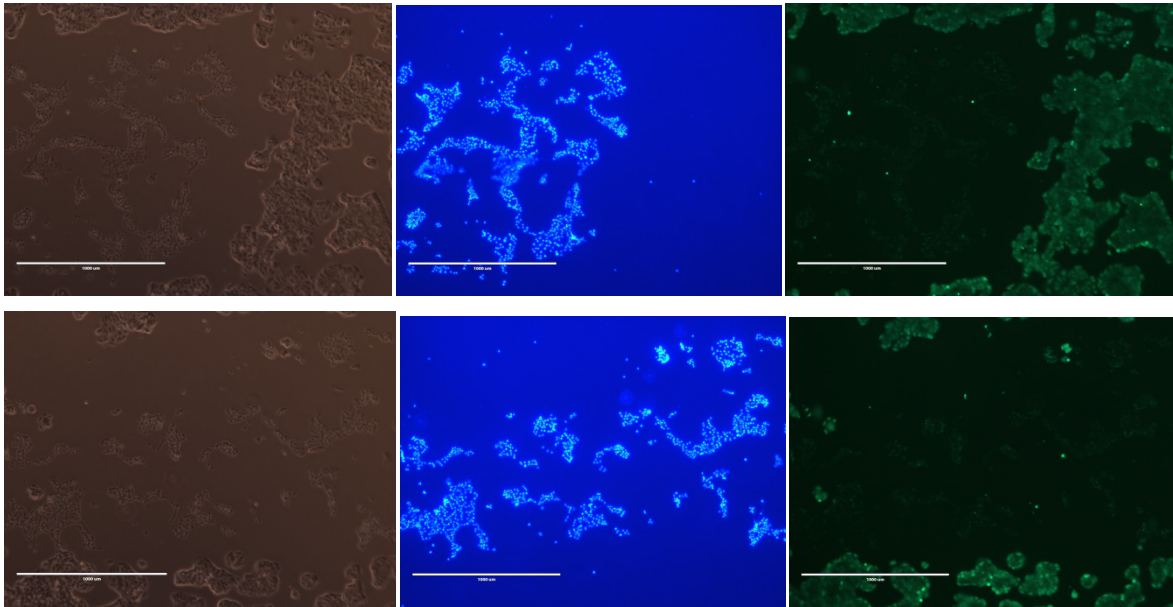
*Après traitement*

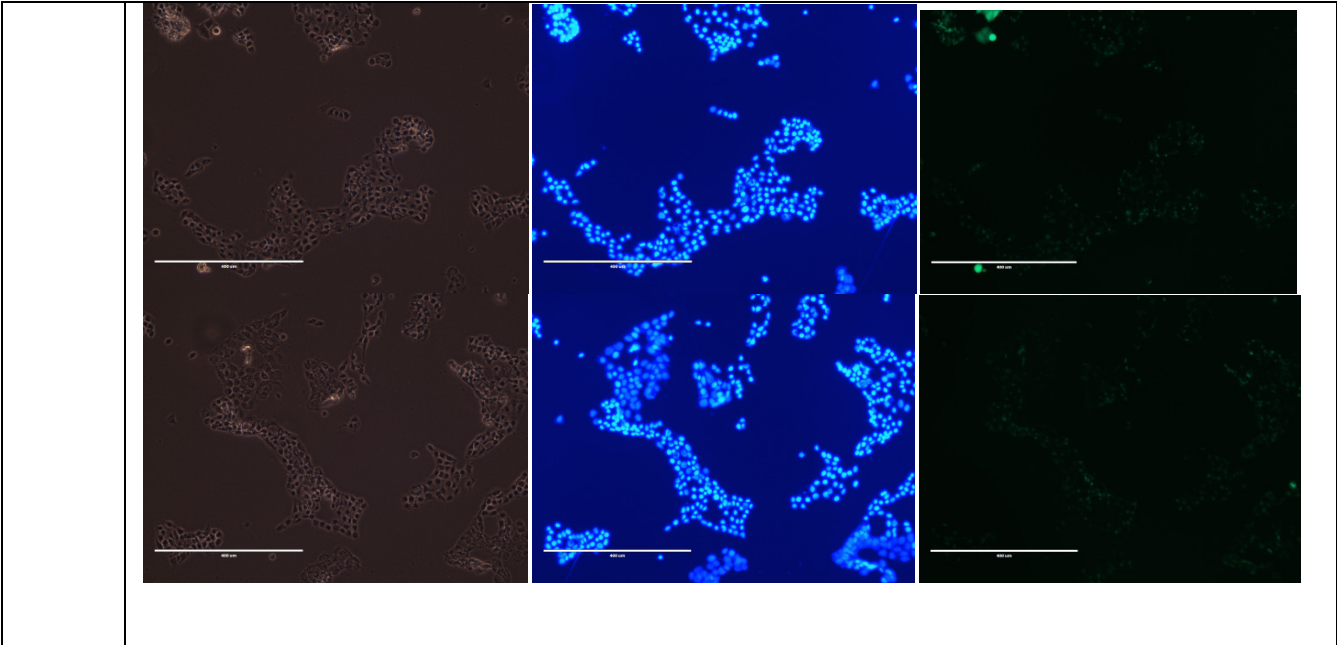


**(3)d**

850Vpp,  
D3,  
0.9lpm He  
+30sccm  
O<sub>2</sub>

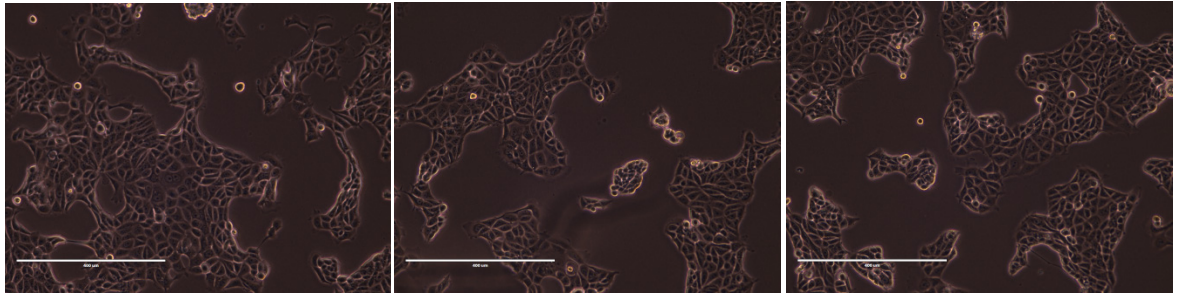
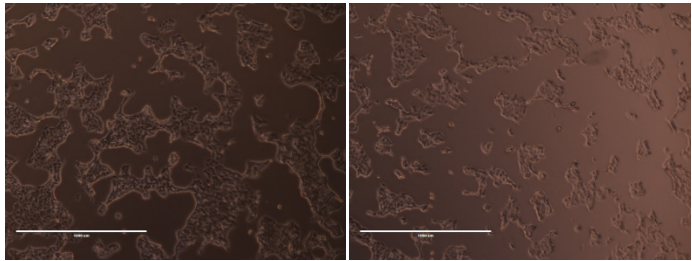
*24H après traitement*



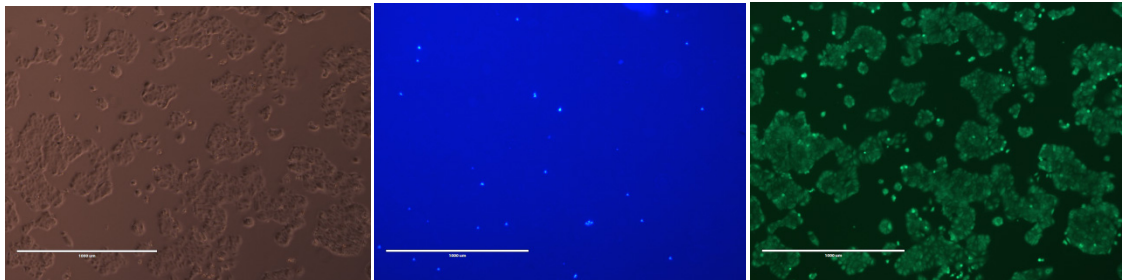


TEM

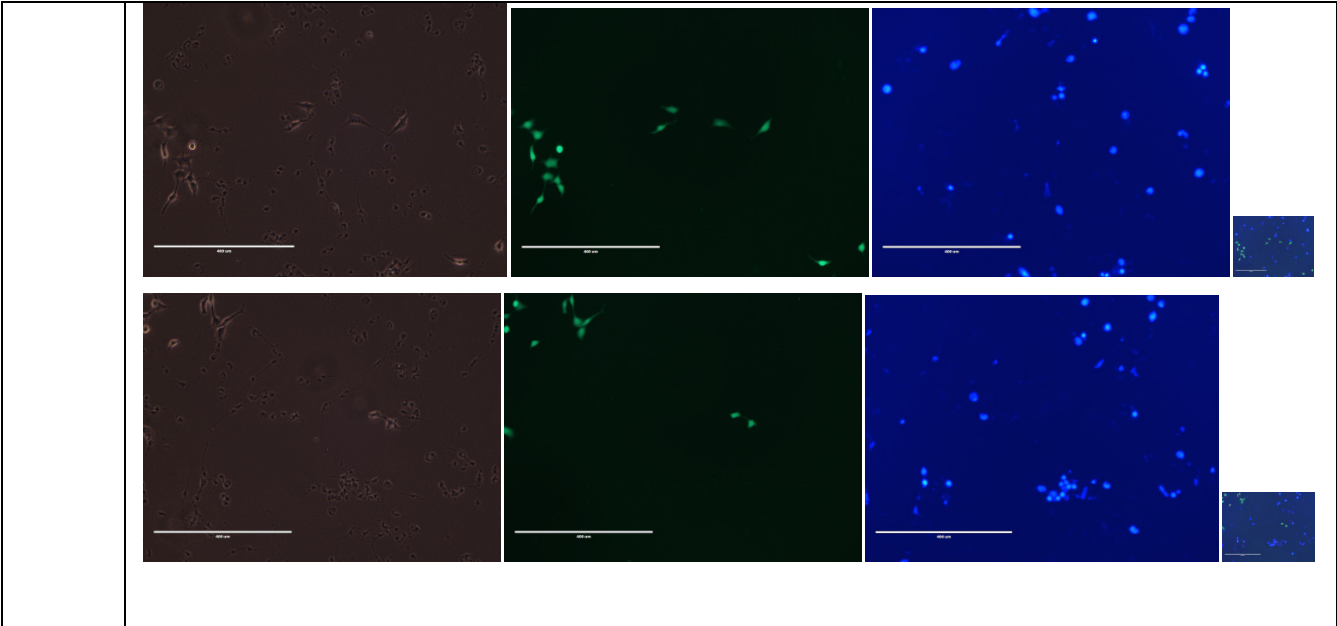
**Non traité**



**24H après.**

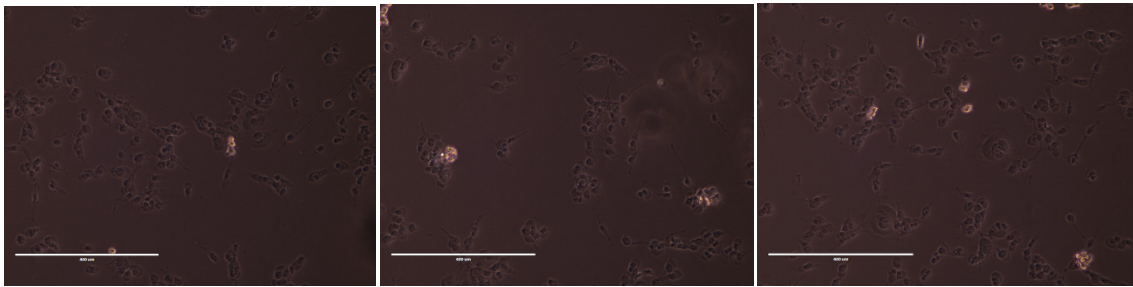


1.1 mm	MDA
<p>(A)</p> <p>750Vpp, D1, 1lpm He +30sccm O<sub>2</sub></p>	<p><i>Après traitement</i></p>
	<p><i>24H après traitement</i></p>

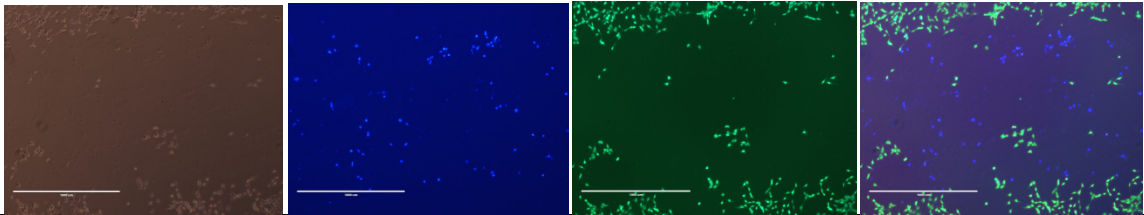


**Après traitement**

**(B)**  
 850Vpp,  
 D1, 1lpm  
 He  
 +30sccm  
 O<sub>2</sub>



**24H après traitement**



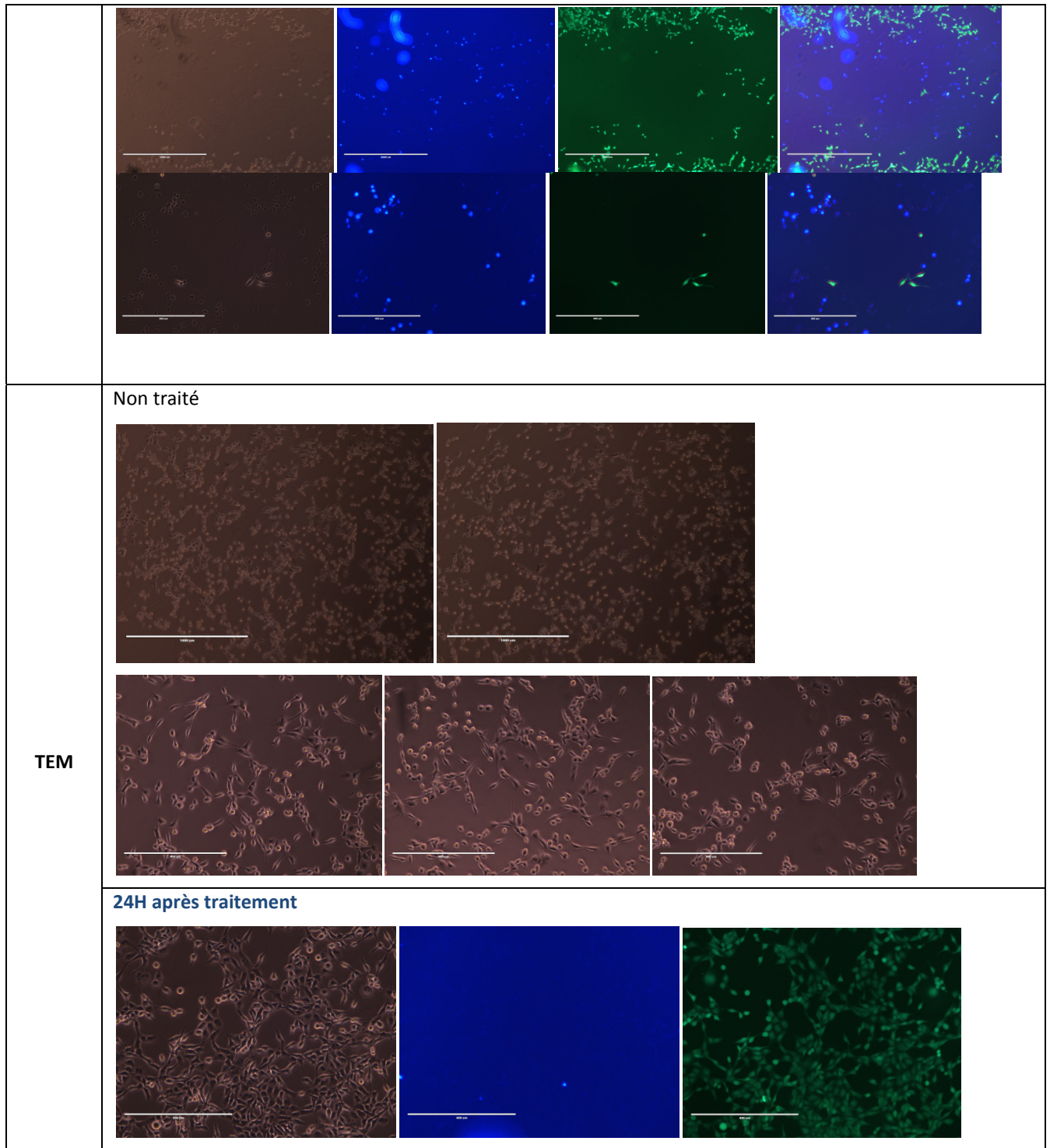


Figure 47. Cellules exposées dans les mêmes conditions expérimentales du FACS, présentent les mêmes caractéristiques et semblent capter la molécule de DAPI 24h après traitement quelque soit les conditions de traitement et la lignée cellulaire.

Selon les images de la figure 47, il apparaît que les cellules traitées ayant atteint un degré de dégradation avancé sont tout de même capables de retenir la coloration Dapi : par conséquent, on s'attendrait à ce que le FACS soit en mesure de détecter les cellules (apoptose tardif). Or pour ces cellules, non seulement le NEE est faible mais la proportion des signaux liés à l'apoptose précoce et tardif reste difficile à interpréter. Ce problème n'existe pas lorsque les conditions d'exposition sont adoucies. Comme la coloration Dapi, 24h après exposition, peut être moins intense selon les conditions d'exposition (elle est d'autant moins intense que la cellule est dégradée), on peut émettre l'hypothèse que la sensibilité de détection du FACS soit limitée de sorte que les cellules ayant une coloration bleu pâle ne soient pas détectées convenablement.

### **3.4 Comparaison avec les cellules saines : sélectivité ?**

Un nombre croissant d'études très récentes prouvent que, dans certaines conditions, le traitement par plasma a la possibilité d'être sélectif en tuant les cellules tumorales et en préservant les cellules saines, et ce, pour une variété de lignées cellulaires dont les cellules de cancer de sein (cf. §.1.4.2).

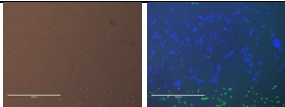
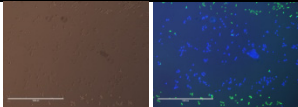
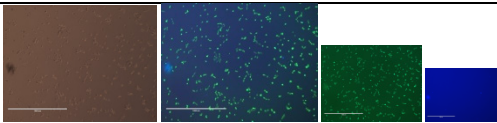
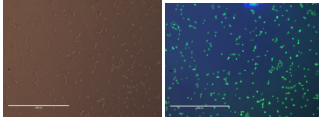
Nous avons voulu explorer cette voie et tenter de déterminer s'il existe des conditions expérimentales pour lesquelles le plasma généré par l'APGD-t aurait un effet sélectif sur les cellules traitées.

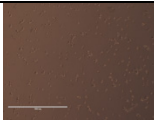
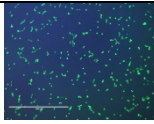
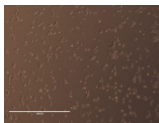
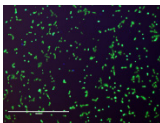
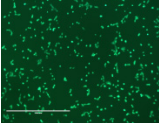
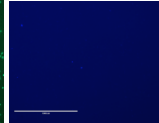
Pour ce faire, un grand nombre d'expériences ont été menées pour, d'une part, vérifier la reproductibilité des conditions de traitement sur différentes lignées et, d'autre part, vérifier que les conditions pour lesquelles la sélectivité est observée soient relativement constantes d'une expérience à l'autre. Mais avant toute chose, il semble essentiel, dans un premier temps, de définir les conditions 'limites' pour lesquelles les cellules saines demeurent vivantes après traitement ; puis utiliser cette information comme point de départ dans le traitement des cellules cancéreuses/saines. Au final, une fois les conditions minimales de sélectivité définies, on pourra aisément supposer que ces conditions puissent s'appliquer pour toutes cellules

saines relativement plus résistantes que les Arpe (telles que les cellules fibroblastes FB-u). En effet, les cellules saines utilisées dans ces expériences sont les Arpe, des cellules épithéliales : malheureusement, l'obtention de cellules saines de sein n'était pas possible durant la période de cette étude.

### 3.4.1 Cellules saines : Arpe

Les premières expériences concernant, uniquement, les cellules Arpe sont présentées dans les tableaux ci-dessous. Le tableau XXVI illustre l'effet de la variation de débit en fonction des résultats du marquage au Dapi et à la Calcein AM des cellules traitées: les résultats permettent de définir, comme point de départ à l'étude suivante, un débit de gaz de 0.9 lpm He + 30 sccm O<sub>2</sub>, pour 1mm de milieu dans un Pétri (60 mm).

<b>Arpe</b>					
Débit (x lpm He + 30 sccm O <sub>2</sub> )	Hauteur du milieu	Volta ge (Vpp)	Présence de Sillon (S) ?		Photos
			1*	2*	
1	1mm (1230 µL)	0	S	S	Cells mortes 
0.95	1mm	0	S	S	Cells mortes + qqv vivantes 
0.9	1mm	0	Pas S	Pas S	Cells vivantes + non permeab 
0.85	1mm	0	Pas S	Pas S	Cells vivantes + non permeab 

0.8	1mm	0	Pas S	Pas S	Cells vivantes + non permeab		
Temoin (Ech1)	1mm						Cells vivantes + non permeab (5+)

\* photos des échantillons 1 et 2 disponibles. Rem : Pétri 1 : marque autre ; Pétri 2 : Costar (usuel).

Tableau XXVI. Évaluation du débit de gaz sur la viabilité des cellules saines. Zéro volts (0 Vpp) signifie que les cellules sont traitées uniquement au gaz et, donc, sans plasma.

Le second tableau XXVII permet d'évaluer l'effet de la variation du voltage et de DC sur la viabilité des cellules Arpe : ces résultats, qui devront être reproduits, permettront d'identifier les conditions pour lesquelles les Arpe restent vivantes, lesquelles serviront d'indications pour les expériences comparatives 'saines/tumorales'.

Les conditions préliminaires retenues sont : 750V (tous les DC), 800V-D1 et D2, 850V-D1 (D2 et D3 à valider, i.e., à confirmer à l'aide d'expériences supplémentaires) et 900V-D2.

Arpe (13/14-06)	Voltage, DC (%), S ?											
<b>Conditions expérimentales</b>	≈400000c/Petri incubées 24h avant traitement Débit optimisé 0.9 lpm He + 30 sccm O2, 1mm milieu (2130μL), v=400 steps/s (1mm/s), d=3mm											
	900	D1	Pas S	900	D1	Pas S	900	D1	Pas S	900	D2	Pas S
				900	D2	Pas S	900	D2	Pas S/S	900	D2	Pas S
							900	D3	Pas S/S	900	D3	S
							900	D1.5	Pas S			
	850	D1	Pas S									
	850	D2	Pas S/S									
	800	D1	Pas S	800	D1	Pas S						
	800	D4	S	800	D2	Pas S						
	800	D3	S	800	D3	Pas S						
	800	D2	Pas S/S	(légère ↑ perméab)								
	(ordre: évapor...)											



	750 D1 Pas S											
	750 D2 Pas S											
	750 D3 Pas S											
	<p>*Les conditions sans sillons sont celles qui nous intéressent : les cellules tumorales seront testées notamment dans ces conditions pour tenter de déterminer l'existence ou non de sélectivité.</p> <p>*D'après résultats les expositions préliminaires, on retiendra (1) : <u>750V (tous les D), 800V-D1etD2, 850V-D1, 900V-D2 pour traiter les cells tumorales</u>; (2) : faire repeat 800V D2-D3 et 900V D2-D3 avec Arpe .</p> <p>*Pb de reproductibilité ?</p>											
<b>RAPPEL</b>												
<b>Optimisation et Validation Expériences (avant modifications)</b>	<p>Anciennes conditions minimales pour avoir mortalité.</p> <table border="0"> <tr> <td><b>MDA :</b></td> <td><b>MCF7 :</b></td> </tr> <tr> <td>1mm milieu (2130μL)</td> <td>0.9 mm milieu (2083μL)</td> </tr> <tr> <td>750V, DC=1%</td> <td>750V, DC=3%</td> </tr> <tr> <td>1 lpm He +30 sccm O2</td> <td>1 lpm He +30 sccm</td> </tr> </table>				<b>MDA :</b>	<b>MCF7 :</b>	1mm milieu (2130μL)	0.9 mm milieu (2083μL)	750V, DC=1%	750V, DC=3%	1 lpm He +30 sccm O2	1 lpm He +30 sccm
<b>MDA :</b>	<b>MCF7 :</b>											
1mm milieu (2130μL)	0.9 mm milieu (2083μL)											
750V, DC=1%	750V, DC=3%											
1 lpm He +30 sccm O2	1 lpm He +30 sccm											

Tableau XXVII. Tableau récapitulatif et version synthétisée des résultats d'exposition de cellules Arpe au plasma.

La figure 48 présente les images prises au microscope de deux conditions expérimentales sans sillon pour lesquelles les cellules restent vivantes et ne sont pas perméabilisées.

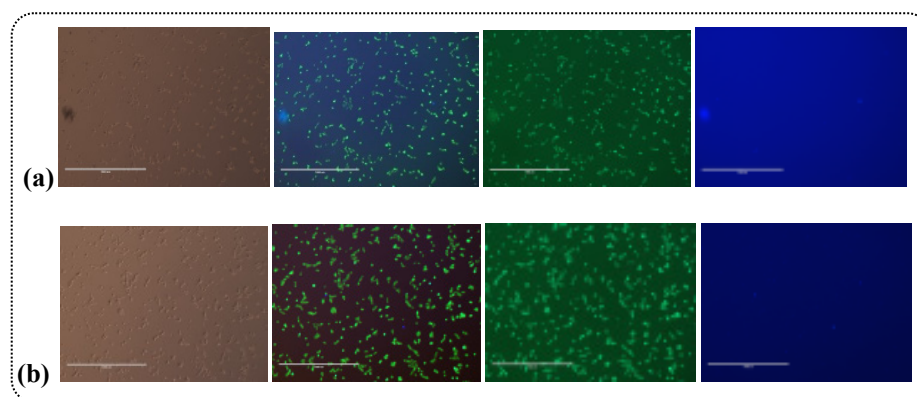


Figure 48. Images au microscope des cellules Arpe traitées à un débit de 0.9 lpm He+30sccm O<sub>2</sub> et une hauteur de milieu de 1mm (a) à 750V, DC=3%, et (b) 800V, DC=1%.

### 3.4.2 Cellules saines/cancéreuses : Arpe/MCF7/MDA-MB-231

Lors des expositions des cellules saines/cancéreuses, on observe, pour la première fois dans cette étude, un manque de reproductibilité des données (de viabilité et de perméabilisation) : en réalité, les nouvelles conditions ‘optimisée’ montrant de la sélectivité demeurent relativement proches des anciennes même si elles diffèrent. En multipliant les expositions et variant la méthodologie (exposition de D1 à D3 en comparaison avec D3 à D1, changement de milieu, réduction du nombre de test par Pétri...), on observe que le phénomène d'évaporation<sup>7</sup> est plus présent que ce qui n'a pu être observé jusqu'à présent : ce fait pose problème puisqu'il interfère avec la possibilité d'observer des sillons lors du traitement (il interférerait, dans ce cas, sur l'efficacité du traitement des cellules tumorales par plasma). Notons qu'aucun changement n'a été apporté dans le protocole ou dans le montage expérimental, seul un changement de bouteille d'He a été effectué. Par ailleurs, il est connu que les plasmas générés à la PA peuvent être sensibles aux conditions externes si, par exemple, le taux d'humidité ambiant venait à trop varier, la décharge nécessiterait un voltage légèrement supérieur pour l'initier. Comme ces expériences ont été menées en juin, nous avons, par la suite, relevé températures et taux d'humidité afin de détecter s'il existe un lien entre ces données et les résultats d'exposition. Au final, après différentes investigations, il s'est avéré que la température du gaz (He) est le paramètre qui affecte (le plus) les résultats puisque les expériences menées dans des conditions similaires de température de gaz se sont avérées reproductibles en termes de présence de sillons. Autrement dit, c'est très probablement, l'unique paramètre qui ait varié avec le temps pour des raisons que l'on ignore encore. Cette température est obtenue par le logiciel de commande qui est directement lié au débitmètre. Pour ne pas alourdir le mémoire, ne seront pas présentés les derniers résultats d'exposition Arpe/MCF7 et Arpe/MDA-MB-231 pour lesquels les conditions sont ‘mieux contrôlées’ ; Un tableau de synthèse dans lequel tous les résultats y sont regroupés sera

---

<sup>7</sup> Micro-évaporation du milieu de culture pouvant avoir lieu lors de son exposition au jet de plasma (balayage) : si le phénomène est non-négligeable, il peut alors induire une variation de la hauteur du milieu (ce qui affecte l'existence ou non de sillons et donc interfère avec l'efficacité du traitement).

présenté dans l'Annexe 9 : 'Pas de S' et 'S' signifiant que les cellules sont, respectivement, vivantes sans aucune perméabilisation induite (sauf si indication contraire), et, mortes (à plus de 90%) et entièrement perméabilisées.

Malgré les légères différences de conditions létales déterminées pour MCF7 et MDA-MB-231 et qui s'expliquent naturellement par la nature/la composition de la cellule, il a été possible de définir une condition pour laquelle la sélectivité a été observée pour les trois lignées cellulaires<sup>8</sup>: 0.9lpm He + 30sccm O<sub>2</sub>, hauteur du milieu de 1mm, vitesse de balayage de 1mm/s (400 steps/s) et 850V (DC=2-3%) pour T<sub>He</sub>=34-35°C. Remarquons que la valeur de 850V-DC=1% est envisageable mais la reproductibilité a été moins vérifiée pour MCF7 que pour MDA-MB-231, c'est pourquoi, cette condition n'a pas été retenue.

La figure 49 illustre un autre exemple de sélectivité.

<b>Photos microscopes</b>	
<u>Conditions</u> : 0.9lpm He + 30sccm O <sub>2</sub> , hauteur du milieu de 1mm, vitesse de balayage de 1mm/s (400 steps/s) et 800V (T <sub>He</sub> = 31 à 34C).	
<p><b>Arpe,</b> 800V, D1, D2, D3 : tous pas de S et Tg pas de S.</p> <p>D3 (~20) D3 (~13)</p>	<p><b>Témoins</b></p> <p>(~10) (~18)</p> <p>Tg Non traité</p>
<p><b>MDA,</b> 800V, D1 et D2 : pas S ; 800V, D3 : S (I2 et I3) Et Tg pas de S.</p>	<p><b>Témoins</b></p> <p>(3)</p> <p>Tg</p>

<sup>8</sup> Il ne sera pas possible d'établir un tableau similaire à la figure 49 car il manque certaines photos pour illustrer l'ensemble de ces conditions... mais les résultats sont tous répertoriés dans le tableau de synthèse.

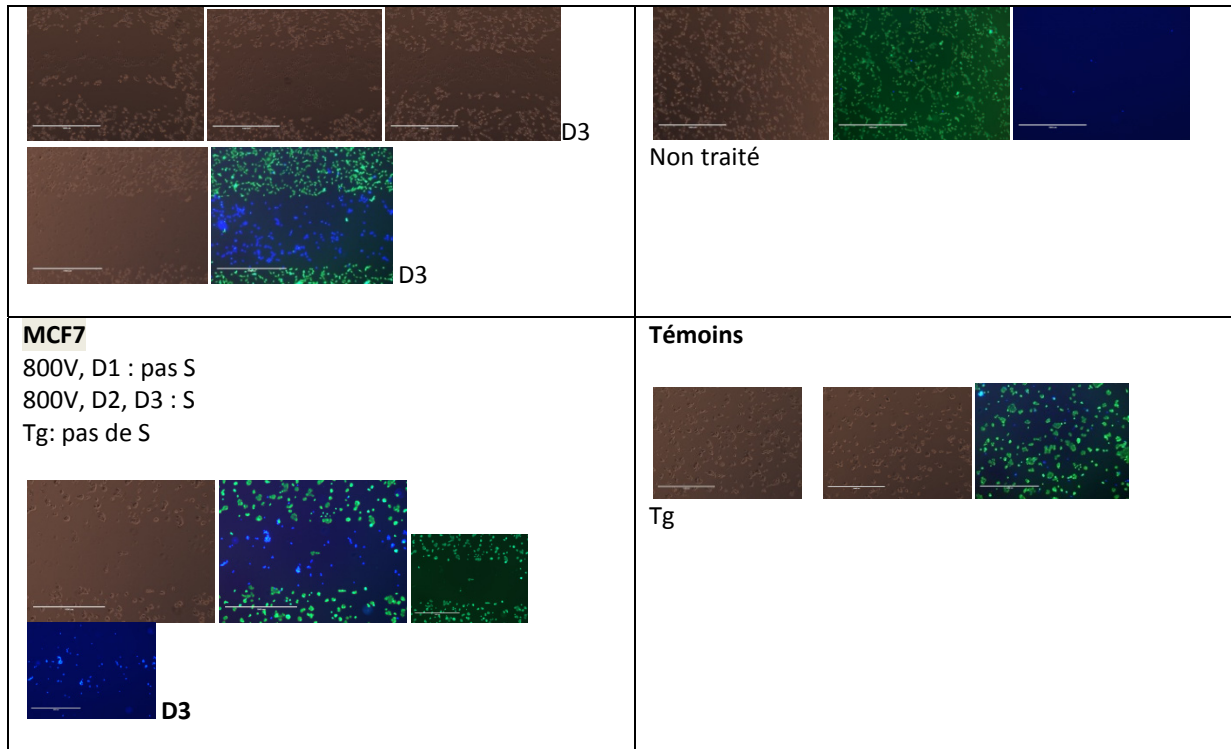


Figure 49. Photos prises au microscope illustrant la sélectivité d'un traitement des cellules utilisant l'APGD-t. Les nombres entre parenthèses correspondent aux nombres de cellules perméabilisées comptabilisés sur les photos prises avec le Dapi.

Et enfin, un point très important, ces expériences devront être reprises dans des conditions ambiantes de température (et d'humidité) 'normales', hors période estivale, afin de *repréciser* les conditions expérimentales permettant d'observer la sélectivité, en prévoyant que les nouvelles conditions seront très peu différentes de celles qui ont été définies dans cette étude. On rapporte, dans la littérature, qu'un traitement combinant plasma et hausse de température améliore son efficacité [12].

Malgré toutes ces difficultés expérimentales, il a été démontré qu'un traitement par un plasma froid, au moyen de l'APGD-t, peut traiter les cellules de manière sélective, et ce, pour deux lignées tumorales de sein et une lignée de cellules saines (Fig.49).

## Synthèse et Conclusion

Le travail effectué dans cette étude s'inscrit dans le cadre de la recherche et du développement de nouveaux traitements du cancer utilisant un procédé plasma. La source de plasma utilisée dans cette étude est l'APGD-t qui génère un plasma froid à la PA à partir d'un mélange He+O<sub>2</sub>. Elle présente une caractéristique originale et avantageuse de pouvoir contrôler la concentration en oxygène atomique, une espèce oxydante très réactive ayant un rôle clé dans la plupart des applications visées. Pourquoi avoir recours à une technologie plasma pour traiter le cancer ? Nous avons présenté dans le chapitre 1 **(i)** les caractéristiques physico-chimiques du plasma, **(ii)** les différents modes de traitements possibles, **(iii)** les avantages qu'il présente relativement aux méthodes conventionnelles imparfaites et **(iv)** une revue bibliographique dans laquelle les études se concentrent à identifier le mode d'action du plasma sur les cellules cancéreuses ainsi que les espèces réactives impliquées (ROS, RNS....). On retiendra, entre autre, qu'un plasma froid, tel que généré par une technologie telle l'APGD-t, est capable de **(i)** traiter les cellules dans une région bien localisée en préservant les cellules voisines, **(ii)** cibler les cellules cancéreuses à travers des mécanismes impliquant les ROS et tirant profit des caractéristiques redox spécifiques à ces cellules, **(iii)** causer une mort 'propre' (apoptose) et **(iv)** d'avoir, dans certaines conditions, une action spécifique en différenciant les cellules tumorales des cellules saines (i.e., le traitement tue, dans ces conditions, les cellules cancéreuses tout en préservant les cellules saines). Par ailleurs, les résultats des études menées *in-vivo* et *in-vitro* sont très prometteurs. Et enfin, aucune résistance des cellules tumorales au traitement par plasma n'a été rapportée dans la littérature jusqu'à présent.

L'APGD-t présente plusieurs caractéristiques intrinsèques qui en font un bon candidat pour des applications biomédicales. Notre étude expérimentale visait, essentiellement, à démontrer la capacité de ce procédé plasma à tuer efficacement des cellules cancéreuses de sein en vue d'applications cliniques. La caractérisation physique de la décharge nous permet de connaître la gamme de puissance dans laquelle les cellules sont traitées. L'optimisation des paramètres physiques de la décharge (hauteur du milieu nutritif, débit de gaz, voltage, DC...)

visait à définir des conditions expérimentales pour lesquelles les cellules tumorales ne seraient pas détachées et seraient majoritairement tuées par le traitement.

Nos résultats montrent, dans un premier temps, que les cellules traitées par plasma ‘à travers’ le milieu de culture (i.e., ‘sans sillon’) exhibent un faible taux de mortalité pour toutes les lignées exposées même si leur sensibilité est différente (taux de mortalité variant de ~5% à ~20%). Malgré les efforts à optimiser les paramètres expérimentaux, on réussira difficilement à dépasser les ~20% d’efficacité, ce qui n’est pas acceptable si on vise une application clinique. Par ailleurs, on montre aussi, dans ces conditions de traitement, que le mécanisme menant à la mort cellulaire est l’apoptose et ce, pour toutes les cellules testées quelle que soit leur sensibilité au traitement.

En diminuant la vitesse de traitement et/ou en variant légèrement la hauteur du milieu nutritif, on a vu apparaître, par hasard, des sillons qui ont permis d’améliorer fortement l’efficacité du traitement. C’est ainsi que l’étude s’est orientée, dans un second temps, sur l’optimisation des paramètres permettant d’observer des sillons sans détacher les cellules de la surface où elles adhèrent (Annexe 10). Les études qualitatives (utilisant des marqueurs tels que le Dapi et la Calcein AM) montrent qu’en présence de sillons le traitement devient très efficace : d’après les images prises au microscope, on estime que la mortalité peut atteindre des taux supérieurs à 90% (avoisinant même les 100% dans certaines conditions expérimentales) et ce, pour les différentes cellules testées. Les cellules mortes présentent un haut degré de perméabilisation et d’importantes modifications morphologiques qui sont d’autant plus marquées que le traitement est ‘dure’ (c’est-à-dire haut voltage/haut DC). D’ailleurs, comme il a été reporté dans la littérature, nous avons observé que ces modifications évoluent avec le temps. Ces modifications morphologiques ont causé des difficultés quant à la quantification par la méthode FACS : plus les conditions d’exposition étaient ‘dures’, plus la cellule était endommagée et plus le NEE était faible induisant une grande incertitude sur la mesure obtenue en minimisant la valeur réelle du taux de mortalité. En effet, lorsque les conditions d’exposition sont ‘adoucies’ tout en maintenant un haut taux de mortalité, le FACS donne un pourcentage de mortalité supérieure (car la détectabilité des cellules est meilleure et non parce que les conditions de traitement induit plus de cellule mortes). En conclusion, dans

de telles conditions de traitement, il faut être très prudent dans l'interprétation des résultats obtenus par FACS.

Ayant montré la possibilité de tuer les cellules tumorales, la question qui s'est naturellement posée est la possibilité d'identifier des conditions pour lesquelles le plasma agirait sélectivement sur les cellules : les expériences menées ont montré qu'il était possible de définir des conditions de sélectivité. Toutefois, on a été confronté, pour la première fois, à un problème de reproductibilité. Même si la variabilité des données n'est pas drastique, il est tout de même très important que nos résultats soient reproductibles. Après plusieurs investigations, nous avons trouvé que la température du gaz augmentait pendant nos séances d'expériences au laboratoire ce qui impliquerait une 'micro-évaporation' du milieu nutritif suffisante pour 'perturber' ou 'influencer' les conditions d'apparition des sillons. Il serait donc intéressant de reprendre ces expérimentations dans des conditions de température plus 'stables' pour confirmer nos résultats.

Un effort combiné des physiciens en plasma, des biologistes, chimistes et médecins dans la recherche scientifique permettra d'entrevoir rapidement de futures applications cliniques des plasmas froids dans le traitement contre le cancer. En effet, à la lumière de notre étude, le traitement par plasma (APGD-t) *in-vivo* pourrait s'avérer efficace : rappelons le, il permet le traitement de cellules tumorales préférentiellement aux cellules saines dans une zone bien localisée. Dans le contexte du cancer de seins, l'APGD-t serait utilisé dans le cadre d'un traitement intra-opératoire : suite à l'ablation de la tumeur, le plasma permettrait de balayer précisément certaines régions du lit tumoral en inactivant les cellules cancéreuses restantes dans la zone opérée et en préservant les cellules saines avoisinantes. Évidemment, ceci présume que les paramètres physiques du plasma aient été optimisés : on suppose que les conditions optimisées diffèrent légèrement selon le type de traitement considéré (*in-vivo* ou *in-vitro*). Afin de maximiser le taux de mortalité des cellules tumorales, nous avons constaté dans nos expériences *in-vitro* que la présence de sillons était nécessaire. Or nous savons que le tissu biologique, lors d'une chirurgie, est toujours recouvert d'une faible épaisseur de liquide pouvant être du sang, du sérum... Ainsi, on espère pouvoir visualiser des sillons et, par conséquent, tuer les cellules malignes de manière identique à ce que nous avons observé durant nos expérimentations et ce, tout en préservant les cellules saines.

Ce mémoire décrit la première étude expérimentale sur l'utilisation de l'APGD-t dans le traitement des cellules cancéreuses. Bien évidemment, il reste encore à approfondir et à peaufiner la compréhension des mécanismes impliqués dans l'inactivation des cellules tumorales afin d'optimiser au mieux le protocole expérimental : parmi les étapes nécessaires avant d'envisager une application clinique, on compte principalement la détermination d'un protocole expérimental (conditions de traitement bien définis) optimal permettant d'atteindre une action létale maximale sur les cellules tumorales et minimale sur les cellules saines, et ce, sur plusieurs types de cellules cancéreuses du sein. Cette étude devrait être effectuée *in-vitro* dans un premier temps puis *in-vivo* dans un second temps. L'efficacité minimale visée par le traitement par un jet de plasma est de ~50% de sorte que, combiner à la radiothérapie, il permettrait de diminuer significativement la dose de radiation administrée au patient. On peut envisager que le traitement par plasma soit effectué par une personne spécialiste (chirurgien, physicien médical...) ou par un système simple automatisé permettant le balayage de la région d'intérêt en respectant, en tout temps, la distance entre la source plasma et les cellules tumorales.



## Bibliographie

- [1] D. Kim, B. Gweon, D.B. Kim, W. Choe, J.H. Shin. A faisability study for cancer therapy using cold plasma. IFMBE Proceedings, **23**, p.355-357, 2009.
- [2] L. I. Partecke, K. Evert, J. Haugk, F. Doering, L. Normann, S. Diedrich. Tissue tolerable plasma (TTP) induces apoptosis in pancreatic cancer cells in vitro and in vivo. BioMed Central cancer, **12**, p.473, 2012.
- [3] A.M. Nokhandani, S. Mahsa, T. Otaghsara, M.K. Abolfazi, et al. A review of new method of cold plasmas in cancer treatment. Sch. Acad. J. Biosci, **3**(2B), p.222-230, 2015.
- [4] M. Moisan, J. Pelletier. *Plasmas collisionnels : physique des décharges RF et micro-onde 2e éd.* Edition EDP Sciences, Collection : Grenoble sciences. 2014.
- [5] N. Kaushik, N. Uddin, G.B. Sim, Y.J. Hong, K. Y. Baik, C.H.Kim et al. Responses of solid tumor cells in DMEM to reactive oxygen species generated by non-thermnal plasma and chemically induced ROS systems. Scientific Reports **5**:8587, DOI: 10.1038/srep08587. 2015.
- [6] S. Kalghatgi, C. Kelly, E. Cerchar, B. Torabi, O. Alekseev, A. Fridman, J. Azizkhan-Clifford. Effects of non-thermal plasma on mammalian cells. PLoS ONE **6** (1): e16270. 2011.
- [7] M. Wang, B. Holmes, X. Cheng, W. Zhu, M. Keidar, L.G. Zhang. Cold atmospheric plasma for selectively, ablating metastatic breast cancer cells. PLoS ONE **8** (9): e73741, 2013.
- [8] S. Kalghatgi, C. Kelly, E. Cerchar, J. Azizkhan-Clifford. Selectivity of non-thermal atmospheric pressure microsecond-pulsed dielectric barrier discharge plasma induced apoptosis in tumor cells over healthy cells. Plasma Medecine, **1**, N°3-4, 2011.
- [9] Hea Min Joh, Sun Ja Kim, T. H. Chung and S. H. Leem Comparison of the characteristics of atmospheric pressure plasma jets using different working gases and applications to plasma-cancer cell interactions. AIP ADVANCES, **3**, 2013.
- [10] M. Leduc, D. Guay, R.L. Leask, S. Coulombe. Cell permeabilization using a non-thermal plasma. New Journal of Physics, **11**, 2009.

- [11] A. Mahfoudh, F. Poncin-Épaillard, M. Moisan, J. Barbeau. Effect of dry-ozone exposure on different polymer surfaces and their resulting biocidal action on sporulated bacteria. *Surface Science*, **604**, Issues 17–18, p. 1331-1542, 2010.
- [12] A. Calugaru, L. cremer, A. Herold, A. Lupu, G. Szegli, C. Lungu, A. Lungu, N. Georgescu. The effect of the plasma needle on tumoral cell lines apoptosis, 2005.
- [13] G. Fridman, A. Shereshevsky, M.M. Jost, A.D. Brooks, A. Fridman, *et al.* Floating electrode dielectric barrier discharge plasma in air promoting apoptotic behaviour in melanoma skin cancer cell lines. *Plasma Chemistry and Plasma Processing*, **27**, Issue 2, 163–176, 2007.
- [14] E Stoffels, I E Kieft<sup>1</sup>, REJ Sladek. Plasma needle for in vivo medical treatment: recent developments and perspectives. *Plasma Sources Sci. Technol.*, **15**, p.169-180, 2006.
- [15] J. Gay-Mimbrera, M.C. Garcia, B. Isla-Tejera, A. Rodero-Serrano, A.V. Garcia-Nieto, J. Ruano. Clinical and biological principles of cold atmospheric plasma application in skin cancer. *Adv. Ther.* **33**, p.894-909, 2016.
- [16] G. Isbary, T. Shimizu, Y-F Li, W. Stolz, H.M. Thomas, G.E. Morfil. Cold atmospheric plasma devices for medical issues. *Expert Review of Medical Devices*, **10**, 3, p.367-377, 2013
- [17] C. Hoffmann, C. Berganza, J. Zhang. Cold atmospheric plasma: methods of production and application in dentistry and oncology. *Medical Gas research*, **21**, **3**, 2013.
- [18] A. Shashurin, M. Keidar, S. Bronnikov, R. A. Jurjus, M. A. Stepp. Living tissue under treatment of cold plasma atmospheric jet. *Applied Physics Letters* **93**, **18**, 2008.
- [19] J. Shlegel, J. Koritzer, V. Boxhammer. Plasma in cancer treatment. *Clinical Plasma Medicine* **1**, p.2-7, 2013.
- [20] D. Dobrynin, G. Fridman, G. Friedman, A. Fridman. Physical and biological mechanisms of direct plasma interaction with living tissue. *New Journal of Physics*, **11**, 2009.
- [21] P. Arpitha. Cold atmospheric plasma as an alternative therapy for cancer treatment. *Cell. Dev. Biol.*, **4**, 2, 2015.
- [22] M. Keidar. Plasma for cancer treatment. *Plasma Sources and Technology*, **3**, **24**, 2015.

- [23] S. J. Kim, T.H. Chung, S.H. Bae, S H. Leem. Induction of apoptosis in human breast cancer cells by a pulsed atmospheric pressure plasma jet Appl.Phys. Letters **97**, 2010.
- [24] Z. Chen, X. Cheng, L.Lin, M. Keidar et al. Cold atmospheric plasma generated in water and its potential use in cancer therapy. Proceedings of the XIIth International Mineral Processing Symposium. 2016.
- [25] M. Laroussi, S. Mohades, N. Barezzi. . Killing adherent and nonadherent cancer cells with the plasma pencil. Biointerphases, 10(2), 029401 (029407 pp.). doi: 10.1116/1.4905666, 2015.
- [26] M.Vandamme, E. Robert, J. Sobilo, V. Sarron, D. Ries, *et al.* In situ application of non-thermal plasma: preliminary investigations for colorectal and lung tolerance. 2011.
- [27] H.M. Joh, S.J. Kim, T.H. Chung, H. Leem. Reactive oxygen species-related plasma effects on the apoptois of human bladder cancer cells in atmospheric pressure pulsed plasma jets. Applied Physics Letters, **101**, 2012.
- [28] Hea Min Joh , Ji Ye Choi , Sun Ja Kim , T. H. Chung & Tae-Hong Kang. Effect of additive oxygen gas on cellular response of lung cancer cells induced by atmospheric pressure helium plasma jet.Sci. Rep. **4**, 6638; DOI:10.1038/srep06638, 2014.
- [29] R. Sensenig, S. Kalghatgi, E. Cerchar, G. Fridman B. *et al.* Non-thermal plasma induces apoptosis in melanoma cells via production of intracellular reactive oxygen species. Anals of Biomedical Engineering, **39**, No2, p.674-687, 2011.
- [30] R. Guerrero-Preston, T. Iogawa, M.Uemura, G. Shumulinsky, B.L. Valle, F. Pirini, *et al.* Cold atmospheric plasma treatment selectively targets head and neck squamous cell carcinoma cells. International Journal of Molecular Medicine, **34**, p.941-946, 2014.
- [31] E.A. Ratovitski, X. Cheng, D. Yan, J. H. Sherman, J. Canady, B. Trink, M. Keidar. Anti-cancer therapies of 21<sup>st</sup> century: Novel approach to treat human cancers using cold atmospheric plasma. Plasma Process. and Polym, DOI:10.1002/ppap.201400071, 2014.
- [32] M. Keidar, A. Shashurin, O. Volotska, M.A. Stepp, *et al.* Cold atmospheric plasma in cancer therapy. Physics of plasma, **20**, 057101, 2013.

- [33] M. Keidar, R. Walk, A. Shashurin, P. Srinivasan, A. Sandler, S. Dasgupta et al. Cold plasma selectivity and the possibility of paradigm shift in cancer therapy. *British Journal of Cancer*, **105**, p.1295-1301, 2011.
- [34] D. Yan, A. Talbot, N. Nourmohammadi, X. Cheng, J. Canady, J. Sherman, M. Keidar. Principles of using cold atmospheric plasma stimulated media for cancer treatment. *Scientific reports* **5**:18339 (DOI: 10.1038/srep18339), 2015.
- [35] C. Weiz, S. Emmeert, M. Canis, A. Becker, P. Baumeister, T Shimizu, et al. Cold atmospheric plasma : a promising complementary therapy for squamous head and neck cancer. *PLoS ONE*, DOI:10.1371/journal.pone.0141827, 2015.
- [36] S. Kalghatgi, G. Friedman, A. Fridman, A.M. Clyne. Endothelial cell proliferation is enhanced by low dose non-thermal plasma through fibroblast growth factor-2 release. *Anal of Biomedical Engineering*, **38**, N°3, 748-757, 2010.
- [37] S-B Park, B. Kim, H. Bae, H Lee, S. Lee, E.H. Choi, S.J. Kim. Differential epigenetic effects of atmospheric cold plasma on MCF-7 and MDA-MB-231 breast cancer cells. *PLoS ONE*, DOI:10.1371/journal.pone.0129931, 2015.
- [38] W. Zhu, SJ Lee, NJ Castro, D. Yan, M. Keidar, LG Zhang. Synergetic effect of cold atmospheric plasma and drug loaded core-shell nanoparticles on inhibiting breast cancer cell growth. *Scientific reports* **6**:21974 (DOI: 10.1038/srep21974), 2016.
- [39] W. Zhu, SJ Lee, M. Keidar, LG Zhang. Combination of cold atmospheric plasma and nanoparticles drug delivery toward more efficient breast cancer therapy. *Biomaterials*, 2015.
- [40] Hiroaki Kajiyama, Fumi Utsumi, Kae Nakamura, Hiromasa Tanaka, Shinya Toyokuni, Masaru Hori and Fumitaka Kikkawa. Future perspective of strategic nonthermal plasma therapy for cancer treatment. *J. Clin. Biochem. Nutr.*, **60**, 1, p.33–38, 2017.
- [41] I.E.Kieft, M. Kurdi, E. Stoffels. Reattachment and apoptosis after plasma-needle treatment of cultured cells. *IEEE Transactions on plasma science*, **34**, 4, 2006.
- [42] S. Yonson, S. Coulombe, V. Lèveillé, R.L. Leask. Cell treatment and surface fonctionnalization using a miniature atmospheric pressure glow discharge plasma torch. *J. Phys. D: Appl. Phys.*, **39**, 3508-35-13, 2006.

- [43] O. Volotskova, T.S. Hawley, M.A. Stepp, M. Keidar. Targeting the cancer cell cycle by cold atmospheric plasma. *Scientific Reports*, **2**,636, DOI:10.1038/srep00636. 2012.
- [44] H. Tanaka, M. Misuno, K. Ishikawa, K. Nakamura, H. Kajiyama, H. Kano, F. Kikkawa, M. Hori. Plasma activated medium selectively kills glioblastoma brain tumor cells by down-regulating a survival signalling molecule, AKT Kinase. *Plasma Medicine*, **1**, p.265-277, 2011.
- [45] H.J.Lee, C.H. Shon, Y.S. Kim, S. Kim, G.C. Kim, M.G. Kong. Degradation of adhesion molecules of G361 melanoma cells by a non-thermal atmospheric microplasma. *New Journal of Physics* **11**, 115026, 2009.
- [46] S. Arndt, E. Wacker, Y-F Li, T. Shimizu, H. M. Thomas, G. E. Morfill, S. Karrer, J. L. Zimmermann and A.K. Bosserhoff. Cold atmospheric plasma, a new strategy to induce senescence in melanoma cells; *Experimental Dermatology*, **22**, p.284–289, 2013.
- [47] R.N. Ma, H.Q. Feng, Y.D. Liang, Q. Zhang, Y. Tian, B. Su, J. Zhang and J. Fang. Atmospheric-pressure cold plasma leads to apoptosis in *Saccharomyces cerevisiae* by accumulation intracellular reactive oxygen species and calcium. *Journal of Physics D: Applied Physics*. **46**, 285401, 2013.
- [48] Vandamme M, Robert E, Lerondel S, Sarron V, Ries D, Dozias S, Sobilo J, Gosset D, Kieda C, Legrain B, Pouvesle JM, Pape AL. ROS implication in a new antitumor strategy based on non-thermal plasma. *Int J Cancer*., **130**(9) p.2185-94, 2012.
- [49] A. Jalili, S. Irani, R. Mirfakhraie. Combination of cold atmospheric plasma and iron nanoparticles in breast cancer : gene expression and apoptosis study. *Onco Targets and Therapy*, **9**, p.5911-5917, 2016.
- [50] G Collet, E Robert, A Lenoir, M Vandamme, T Darny, S Dozias, C Kieda and J M Pouvesle. Plasma jet-induced tissue oxygenation: potentialities for new therapeutic strategies *Plasma Sources Science and Technology*, **23**, 1, 2014.
- [51] M. Leduc, D. Guay, S. Coulombe, R.L. Leask. Effects of non-thermal plasmas on DNA and mammalian cells. *Plasma Processes and polymers*, **7**, p.899-909, 2010.

- [52] V. Léveillé, S. Coulombe, C. Yonson. Design and optimization of a miniature He-O<sub>2</sub> atmospheric pressure glow discharge torch for bio-applications. *Plasma Sources Science and Technology*, **14**, p.467-476, 2005.
- [53] V. Léveillé, S. Coulombe. Atmospheric oxygen production and exploration of reaction mechanisms in a He-O<sub>2</sub> atmospheric pressure glow discharge torch. *Plasma processes and polymers*, **3**, p.587-596, 2006.
- [54] M. Pezet. Plateforme de cytométrie en flux. Université Joseph Fourier, Grenoble, France, Mars 2015.
- [55] Dayun Yan, Haitao Cui, Wei Zhu, Niki Nourmohammadi, Julian Milberg, Lijie G. Zhang, Jonathan H. Sherman & Michael Keidar. The Specific Vulnerabilities of Cancer Cells to the Cold Atmospheric Plasma-Stimulated Solutions. *Scientific Reports*, **7**: 4479, DOI:10.1038/s41598-017-04770-x, 2017.
- [56] Dayun Yan, Jonathan H. Sherman and Michael Keidar. Cold atmospheric plasma, a novel promising anti-cancer treatment modality. *Oncotarget*, **8**, p. 15977-15995, 2017.
- [57] S. Mirpour, H. Ghomi, S. Piroozmand, M. Nikkah, S.H. Tavassoli, S.Z. Azad. The selective characterization of nonthermal atmospheric pressure plasma jet on treatment of human breast cancer and normal cells. *IEEE Trans. On Plasma Sc.*, **42**, 2014.
- [58] S. Thakur , D.I. Cattoni, M. Nöllmann. The fluorescence properties and binding mechanism of SYTOX green, a bright, low photo-damage DNA intercalating agent. doi: 10.1007/s00249-015-1027-8. *Eur Biophys J.* **44** (5), p.337-48, 2015.
- [59] R. Anghel, D. Jitaru, L. Badescu, M.Ciociu, M. Badescu. The Cytotoxic Effect of Cecropin A and Cecropin B on the MDA-MB-231 and M14K Tumour Cell Lines. *Journal of Biomedical Science and Engineering*, **7**, ID:47343, 2014.
- [60] C. Hoffmann, C. Berganza, J. Zhang. Cold atmospheric plasma: methods of production and application in dentistry and oncology. *Medical Gas research* **3**:21, 2013.

## Annexe 1 Proposition de mécanisme basée sur l'étude menée par Dobrynin *et al.* [20].

Dans un premier temps, l'électron issu du plasma réagirait avec l'oxygène présent dans le liquide (milieu nutritif) pour donner l'ion  $O_2^-$  (anion superoxyde). Or les cellules saines ont un mécanisme de défense contre les superoxydes permettant de les convertir en  $H_2O_2$  (peroxyde d'hydrogène) moins dangereux via une réaction de dismutation catalysée par une enzyme particulière la superoxyde dismutase. Les molécules de  $H_2O_2$ , alors présentes en solution, peuvent être converties en radicaux hydroxyles via la réaction de Fenton (réaction en chaîne) si les conditions y sont favorables. A l'inverse, d'autres études stipulent que les radicaux hydroxyles en solution (provenant du plasma) réagissent pour former  $H_2O_2$ . Plusieurs études ont démontré leur présence en solution (( )) et ont été capable de les quantifier (concentration).

Les radicaux hydroxyles à proximité de la cellule vont, ainsi, pouvoir réagir avec les molécules organiques et mener à une réaction d'oxydation en chaîne causant alors des dommages à l'ADN, aux protéines, etc... (( )) : Soit R, une molécule organique quelconque appartenant à la cellule, voici une série de réactions possibles, (1)  $OH + RH \rightarrow R^\bullet + H_2O$ , (2)  $R^\bullet + O_2 \rightarrow RO_2$ , (3)  $RO_2 + RH \rightarrow RO_2H + R^\bullet$ . Ainsi, conformément à l'opinion scientifique, on comprend que la réaction de peroxydation de la bicouche de phospholipides (membrane cellulaire) mène à la mort cellulaire via un processus de réaction en chaîne pouvant induire des modifications de la molécule d'ADN [3,20,21] ; toutefois certaines études illustrent que l'accumulation des sous-produits de la peroxydation des lipides n'affecte pas nécessairement l'intégrité de l'ADN [19].

En radiothérapie (rayonnement gamma), la dose minimale pour obtenir des lésions double brins sur des cellules fibroblast est de 0.5-1 Gy de sorte que la concentration de ROS (en solution) produit suite à ce traitement radiatif a été quantifiée à  $0.1\mu M$  ( $\sim 10^7 J/mol$ ). Des études montrent que la concentration de  $H_2O_2$  nécessaire en solution, pour observer un effet équivalent à 0.5-1 Gy sur l'ADN, est de  $10\mu M$   $H_2O_2$  dans le milieu extracellulaire. Ainsi la comparaison entre la radiation ionisante et l'ajout d'une solution de  $H_2O_2$  montre que l'efficacité de transport de ROS à travers la membrane pour créer des lésions double brins est

de 1/100. Dobrynin *et al.* comparent cette donnée à un traitement de cellules fibroblastes par plasma (de type FE-DBD) : suite à l'optimisation des conditions expérimentales, la densité de puissance minimale ( $0.8 \text{ W/cm}^2$  ou  $10^6 \text{ J/kg}$ ) pour obtenir des lésions à l'ADN est telle que la quantité de ROS produite dans le milieu extracellulaire, et mesurée par titration, est proche de  $\sim 0.1 \text{ }\mu\text{M}$  (à  $\sim 10^7 \text{ J/mol}$ ).



## Annexe 2 : Synthèse bibliographique sur traitement par plasma des cellules cancéreuses du sein

Articles	plasma	Lignées cellulaires (avt tt)		Plasma conditions	Autres conditions opératoires		Tests	resultats	Autres resultats/commentaires
1 (2005)	Plasma needle	-BrSk (human breast carcinoma). (-B16).	-2x10 <sup>5</sup> cells/ml -Incub:24h -Confl: 90%	-FG:He, Ar, N2, Air -Db: en ml/min (He:3ml/min) -Vrms: 150-400V -Taille plasma:1mm	-d=1mm -qtéM: 0.3mL -plaque 96 puits	Tt: 30, 60, 180 s	-Flow cytometry analysis -Morphology mod. Ass. -Temperature effect	-a Tt: 30s, 60s, 180s, --a 32C: 75-80%v et :40%v --a37C:80%, 6% et 5%v. -apoptose (pas nécrose) -photos : loss of membrane symmetry + chromatin condensation + ADN fragmentation... modif morphol	-resultats 37C meilleur (Tcorps!) pour BrSk ! -pictures : cells damage (plaque 96puits)
2 (2011)	DBD	-MCF10A : normal -MCF10A- NEUT :mali gnant	-Plated on glass cover slips -1x10 <sup>4</sup> cells (-4x10 <sup>5</sup> cells pr clonog ass.) - Incub:24h	-Vpp=20kV -à 500Hz : 0.13Watts/cm <sup>2</sup> et à 1.5kHz : 0.31 W/cm <sup>2</sup> -Cond de traitmt : 0.1-1W/cm <sup>2</sup> et doses de 0.2 à 5 J/cm <sup>2</sup> .	-d=2mm (bottom) +x (le fond) -qtéM=100µL -tps incub : 1h avant immunoF/WesternB -tps incub : 48h avant mesure apoptose	-Dose d'exposition* : 0.13à7.8 J/cm2	-Cell prolif assay (mesure à day 1 et 3) -Clonogenic ass. (24h apres traitmt, 11j incub avant staining) - Flow cytometry analysis ou FACS (Annx/PI) -Western Blot -gamma H2AX -Immunofluorescence	-dose<0.65J/cm2: pas effet sur viabilité (2 cells) ; apoptose idem pour les 2 cells. -dose=4-5 à 7.8 J/cm2 : ≠ apoptose 50% de plus apoptose pr cells malignes - survie ↓ qd dose ↑ - ↑H2AX phosphorylé qd ↑ dose (0à 4.65J/cm <sup>2</sup> ) : DNA damage is dose dependent.	-Selon dose⇒prolif à apoptose -Selectivité - <u>mécanisme</u> poss : génération de ROS (faible qté ⇒ prolif forte qté ⇒dommage ADN) -confirmation :NAC= ROS scavenger.
3 (2011)	Meme étude que (2) juste qqs tests supplémentaires (ADN, ROS...) ms tous concernent les cellules normales. Rien de nouveau sur les cells malignes.								

4 (2013)		-MDA- MB-231 -MSC (normal)	-1x10 <sup>4</sup> cells/well (plaque 48 puits) --5x10 <sup>5</sup> cells/dish (pour WH assay) - Incub:24h (ds 300µl media)	FG : He (ds air) Db=4.6L/min V≈3kV (3.76kV) -Rayon plasma=2mm	-d=3 cm (tip/bottom) -tps incub 24h. -Etude: tps Inc=1,3,5j	- Tt :0,30,60,9 0, 120s s	-MTS assay (quatifier les cell attachées + prolif) -cell migration (kit) -2D wound healing assay -kit (molec probe) : evaluer viabilité -kit (ethidium+calceinAM) : evaluer distrib des cells vivant/mort (photos)	-après Tt=60s : détachement/lyse MDA et min influence sur MSC (prolif, ok ; mort : faible qté) : <i>selectivité (entre 30 et 60s)</i> -cells <i>exposé daily</i> jusque 5j a differents tt :prolif optimal entre 30 et 60s apres j3 et j5 (inhib prolif mda apres j3 et j5) -v(cell_migration) ↓ et d (cell_migration)↓ 3x a tt=90s. (-graphe : ↓ de 5.5x10 <sup>4</sup> à 4.3x10 <sup>4</sup> MDA.)	-spectre plasma He ds air. -effets + et - selon valeur de R (Ω sur normal/cancer cells.) -ROS, RNS possible cause
(5) Kim 2010									
(6)	Plasma Jet	HBC: MCF7. NC : MCF10A	-2x10 <sup>4</sup> cells/well (plaque 96 puits) + 100µl media (incub ON) pr MTT ass. -confl:70-75% -1x10 <sup>5</sup> cells/well (plaque 24 puits) + 100µl media (incub ON) pour MTT assay.	-FD : He (pur à 99.999%) -Db (He)=2l/min -T=30-40C -V : 0 à 10 kV a Tt=60s -(He+O2) :O2 = 5% (-6kV= breakdown seuil)	-d=1cm -cells traitées ds PBS	Tt :30,60,120 ,300s V=6-8-10 kV (↑2kV at each step of experim)	-MTT Assay (cell viability) -Apoptosis assay -Caspase-Glo 3/7 : kit	-morphology: detach+ cells mortes+cells vivantes (3zones juxtaposées) -diff entre (He) et (He/O2) : qqs% à ≈10% -↓≈10%, ≈30-40%, ≈50%, ≈40% pr Tt=30s à 300s : ↓ conséquence dès Tt=60s. -300s ;↓viabl meilleur que drogue - 5% ajout O2: ↑ réduction	-OES -comparaison avec Doxorubicin** (chimio):20µl/well-24h incub -sélectivité: visible dès 60s; meilleure que drogue (qqsoit tps Tt) -pas chgmt morphol saines cells même après 300s tt (32%

								<p>cancer cells</p> <p>-↓viabilité avec ↑voltage :  6kV(≈15%↓), 6-  8kV(≈30%↓), 6-8-  10kV(≈40%↓) ; tt=60s.  -↓rapide viabilité de 30-  60s et 60-120s, puis plus  lente 120-300s.</p>	<p>différence de viabl :  sélectivité).  - +V↑, + observe  détachement : car  plasma plume area ↑ et  donc surf traitée + gde.</p>
7 (poster )	DBD	MCF7		-Indirect mode -5kV, 5kHz, P=0.15-0.2 W/cm <sup>2</sup> .			-viabilité mesure: Alamar blue fluorescence	-15 min traitmt: ↓ 50%, 'tps lg' car cells entièrement immersion dans le media ; -si couche plus fine : 100% mortalité apres 4 min traitement. -plasma puis chimio : 'add' ou 'syn' : amélioration mortalité !	-5j incubation
8 (Yan et al.) 2015	Plasma jet (He)	MCF7, MDA-MB- 231, Glioblasto ma (U87)	-2 a 8x 10 <sup>4</sup> cells/mL -24h incub avant traitmt.	-He: 4.7 L/min -Input volt:11.5V -Output volt:3.16 kV -P≈5W	Cond: 1.traité milieu (6puits...), 2.transfere treated media to cells (96 puits)		-MTT assay : cells viabilité -Methylen Blue : indiq generation ·OH; spectrro a 664nm : bleu to incolore) -spectro optique: identify espèces plasma -SM: interaction plasma et solution de acides amines. - FHPA kit : mesure concentration de H2O2	-efficacité↑ qd Tt ↑ (dose ↑) -efficacité↓ qd confluence cells ↓. -mcf7 et mda response to cap media est presque identq. -antitumor media ↓ qd taille puits ↓ (dépendance du liquid area/accumul espèces...)	-plasma direct : 3a 5 couche cells -plasma indirect : milieu injecté en profondeur... 'garde ppté 7j. -mtt assay : colorimétrie assay -tps vie OH : few microsec (form H2O2 principalement)

								<p>-gap (bottom plate et sortie du nozzle) sur viabilité ; lié espèces formés (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/NO)</p> <p>-volume milieu : effet dilution espèces.</p> <p>-Les a.a. consommés par CAP : 5 (cystéine, tryptophane...)</p> <p>-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (dose dépendant): réactif espèces, ms pas seul cause mortelle.</p>	<p>-test 1mL milieu ds ≠ plaques : 12.2mm a 1 mm (6puits).</p> <p>--Général :param important : tps traitement, gaz source composition, voltage, gold nanoparticules, ms en plus... gap (surf/nozzle) (petit) , vol milieu (petit)</p> <p>-stress oxydatif (voir art)</p> <p>--mécanisme d'attaque de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> et NO.... (voir)</p> <p>--p53 remarque !!!</p> <p>--aqp1,4,5 highly express in breast cancer cells line !</p>
9 ( Park et al, 2015)	DBD plasma	MCF7 (oestrog +), MDA-M-231 (oestrog -), MCF-10A (normal cells), MCF-12A (normal cells)	<p>-50% confl in Petri dish (60mm)</p> <p>-24h incub</p> <p>-1.10<sup>5</sup> cells/mL:</p> <p>apoptos analyz</p> <p>-2.10<sup>3</sup> cells in 96 puits:</p> <p>prolif-1.3.10<sup>4</sup> cells/dish: colony form assay.</p> <p>4.10<sup>3</sup> cells/puit (96puits): ROS detect</p>	DBD: Ar gas - 2.24 kV	-exposition: 30 s 10 fois (600s traitement pour ROS détection)		<p>-FACS : apoptos analyz,</p> <p>-FACS: prolif analyz (calc, formul!)</p> <p>-cell counting kit : cell prolif</p> <p>-Colony formation assay (clonog ass?! ) (dish)</p> <p>-pyrosequencing.....</p> <p>-genome-wide methylation assay</p> <p>-pathway analyz</p>	<p>-taux apoptose MDA ( 7 a 13%)≥ mcf7(10 a 13%)</p> <p>-selectivité : pas de chgmt significatif pr mcf-10A.</p> <p>-↓ taux de prolif MDA ≥mcf7 : sensibilité traitement aux type cell.</p> <p>-Fig4 ! mcf7 : ≈20% apop de plus, mda : ≈ 35-40% apop de plus. (10% de plus pour saine cells)</p>	

		HCT-15 (colon cancer), NCI-H1299 (lung cancer)					-RT-PCR -ROS detection assay (detected by DCFH-DA, fluoresce detect))	-Courbes prolif sur 6 jours. Fig6 !ROS accumul mcf7>mda	
10 (Zhu, 2015)	CAP/core-shell nanoparticules drug delivery syst.	-MDA-MB-231 -MSC		-PLGA: shell -5-FU: drug -CAP:	Tps exposit: 0 a 90s		RT-PCR: influence du traitement sur gène expression.	-Tt= 60s :+ grande inhib dans gene expression. -synergétiq effect (comp a chaque traitement seul) après 24h.:25-30% relat au control.	
11 (Chen et al, 2016)	Plasma 'jet' créé dans l'eau dionised	MDA-MB-231		Indirect mode 2-5 kV Débit: 0.3 l/min 30kHz N2, Ar, He : carrier gas			-MTT assay -spectroscopy optique (Uv-vis, nearIR) -ROS et RNS mesure : FHPA kit et Griess reagent syst.	-traitement 24h : 10 `30% efficacité -traitement 48h :jusque 70% effic, pr Ar plasma solution	-comparaison avec cap direct mode. : plasma He : diminution 20% (fig5c) -H2O2 produit comparaison quand plasma in et out solution: pour He : gde difference : He produit sol≥ out of solution.
12 (Zhu et al, 2016)	Plasma/nanoparticules	MDA-MB-231, MSC		-PLGA: shell -5-FU: drug -CAP:			MTS assay :prolif assay (en deduit viabilité, après 60s traitement) -RT-PCR (gene analyz)	-concentration (FU) et tps dpt : --3j incub ↑ efficacité de 34% (relativement au 24h) ou60% (relativ au témoin) --↑concentration, ↑ efficacité (↓viabilité)	-revue lit : mcf7 :↓46%

									-Synergetic effect.

\*densité de puissance (W/cm<sup>2</sup>) x tps de traitement (s)= dose (J/cm<sup>2</sup>)

\*\* Conventional breast cancer therapy (chemotherapy)

❖ Abréviations :

Incub: incubation                      ON: Over night  
 Confl: confluence                      OES: Spectroscopie Optique d'Émission  
 Db: debit                                      Tt: temps de traitement  
 V : vivant                                      qtém : quantité de milieu nutritif  
 HBC : Human Breast Cancer              NC : Normal cells  
 FG : feed gas                                Db : débit de gaz  
 d : distance tip/cells                      Tt : tps de traitement  
 qtém : quantité milieu                      SM : spectroscopie de masse  
 FHPA : fluorometric hydrogen peroxide assay kit.

❖ Références:

1. A.Calugaru, L. cremer, A.Herold, A. Lupu, G. Szegli, C. Lungu, A. Lungu, N. Georgescu. The effect of the plasma needle on tumoral cell lines apoptosis, 2005.
2. S. Kalghatgi, C. Kelly, E. Cerchar, J. Azizkhan-Clifford. Selectivity of non-thermal atmospheric pressure microsecond-pulsed dielectric barrier discharge plasma induced apoptosis in tumor cells over healthy cells. Plasma Medecine, **1**, N°3-4, 2011.
3. . S. Kalghatgi, C. Kelly, E. Cerchar, B. Torabi, O. Alekseev, A. Fridman, J. Azizkhan-Clifford. Effects of non-thermal plasma on mammalian cells. PLoS ONE **6** (1) : e16270. 2011
4. M. Wang, B. Holmes, X. Cheng, W. Zhu, M. Keidar, L.G. Zhang. Cold atmospheric plasma for selectively, ablating metastatic breast cancer cells. PLoS ONE **8** (9): e73741, 2013.
5. S. J. Kim, T.H. Chung, S.H. Bae, S H. Leem. Induction of apoptosis in human breast cancer cells by a pulsed atmospheric pressure plasma jet Appl.Phys. Letters **97**, 023702, 2010.
6. S. Mirpour, H. Ghomi, S. Piroozmand, M. Nikkah, S.H. Tavassoli, S.Z. Azad. The selective characterization of nonthermal atmospheric pressure plasma jet on treatment of human breast cancer and normal cells. IEEE Trans. On Plasma Sc., **42**, N°2, 2014

7. A. Karim, D.S. Clark, D. B. Graves. Ambient plasma treatment of cancer cells (*Poster*  $\geq 2011$ )
8. D. Yan, A. Talbot, N. Nourmohammadi, X. Cheng, J. Canady, J. Sherman, M. Keidar. Principles of using cold atmospheric plasma stimulated media for cancer treatment. *Scientific reports* **5**:18339 (DOI: 10.1038/srep18339), 2015.
9. S-B Park, B. Kim, H. Bae, H Lee, S. Lee, E.H. Choi, S.J. Kim. Differential epigenetic effects of atmospheric cold plasma on MCF-7 and MDA-MB-231 breast cancer cells. *PLoS ONE*, DOI:10.1371/journal.pone.0129931, 2015.
10. W. Zhu, SJ Lee, M. Keidar, LG Zhang. Combination of cold atmospheric plasma and nanoparticles drug delivery toward more efficient breast cancer therapy. *Biomaterials*, 2015.
11. Z. Chen, X. Cheng, L.Lin, M. Keidar et al. Cold atmospheric plasma generated in water and its potential use in cancer therapy. *Proceedings of the XIIth International Mineral Processing Symposium*. 2016.
12. W. Zhu, SJ Lee, NJ Castro, D. Yan, M. Keidar, LG Zhang. Synergetic effect of cold atmospheric plasma and drug loaded core-shell nanoparticles on inhibiting breast cancer cell growth. *Scientific reports* **6**:21974 (DOI: 10.1038/srep21974), 2016.
13. S.J. Kim, T.H. Chung, S.H. Bae, S H. Leem. Induction of apoptosis in human breast cancer cells by a pulsed atmospheric pressure plasma jet. *Applied Physics Letters*, **97**,2, 2010.

**Annexe 3 : Exemples de programmes informatiques codant le balayage (axes X et Y) de l'APGD-t lors du traitement des cellules selon le type de substrat utilisé.**

**\*\* plaque 6 puits,**

*programme 1: balayage carré*

N (pour définir que le pt de départ est notre zéro)

F, C, S1M2000, S2M2000, A1M2, A2M2, I1M8973, I2M400, I1M-8973, I2M400, LA5, I1M8973, IA1M0, IA2M0, R

*programme 2: carré (+ grand, centré)*

N, F,C,S1M2000, S2M2000, A1M2, A2M2, I1M8973, I2M8973, I1M-8973, I2M-8973,R

*programme 3: ligne (diamètre)*

N, F,C,S1M2000, S2M2000, A1M2, A2M2, I1M12690, IA1M0, R

**\*\* Pétri (60 mm)**

N, F,C,S1M2000, S2M2000, A1M2, A2M2, I1M19380, IA1M0, R pour balayer le diamètre

N, F,C,S1M2000, S2M2000, A1M2, A2M2, I1M8973, I2M4487, I1M-8973, I2M4487, I1M8973, IA1M0, IA2M0, R

**\*\* Moule ou insert silicone (circulaire),**

*---programme 1: balayage carré*

// en pratique : moule circulaire:

N, F,C,S1M400, S2M400, A1M2, A2M2, I1M9000, I2M200, I1M-9000, I2M200, LA21, I1M9000, IA1M0, IA2M0, R

*---Programme 2: carré (+ grand, centré)*

N,F,C,S1M2000, S2M2000, A1M2, A2M2, I1M9000, I2M9000, I1M-9000, I2M-9000,R

*---- programme 3: ligne (un peu plus que diamètre réel)*

N, F,C,S1M2000, S2M2000, A1M2, A2M2, I1M9000, IA1M0, R

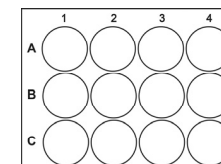
**\*\*Moules ou inserts rectangulaires:**

N, F,C,S1M40, S2M40, A1M2, A2M2, I1M4000, I2M200, I1M-4000, I2M200, LA1, I1M4000, IA1M0, IA2M0, R

N, F,C,S1M40, S2M40, A1M2, A2M2, I1M4800, I2M200, I1M-4800, I2M200, LA9, I1M4800, IA1M0, IA2M0, R



## Annexe 4 Exemple de méthodologie d'optimisation des paramètres expérimentaux pour MCF7.

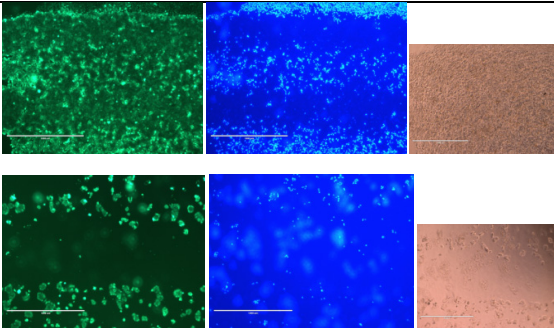
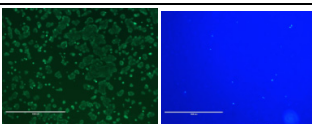
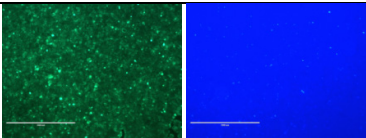
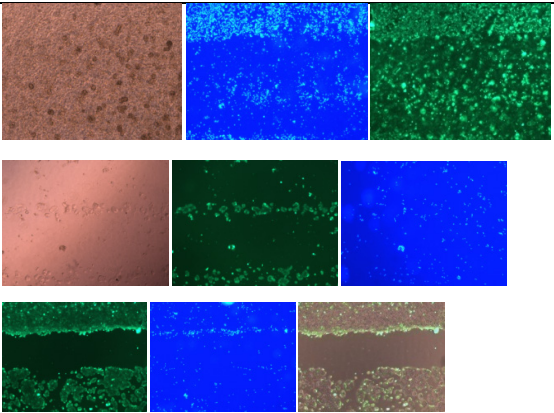


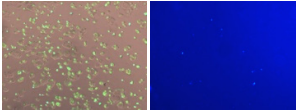
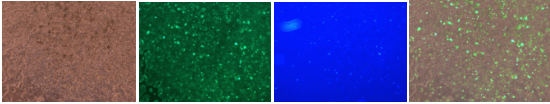
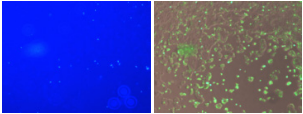
### Expériences exploratoires MCF 7: dapi/calcein AM

#### Conditions opératoires

850Vpp, DC=4% sauf indication contraire et 390µL de milieu sauf indication contraire. Plaques 12puits ;

Échantillon	Milieu (mm)	Décollement (estimation)	dapi	Observation	Puissance	
Témoin			9à17 (tps1-2) (17-90-32) tps 3à6	Zones très denses et zones peu denses		
A1 (b) plasma He 0.7 slm, D4, 1.1mm milieu (390µL)	1.1	Non (ou peu visible?)	Non homogène: +60; 11;200	Petite ↑ de la perméabilité (non homog car cell non homog en densité). Pour dense : aspect nuage dans dapi (pas dans témoin)	≈1.18	
A3 (c) plasma He 1 slm, D4, 1.1mm	1.1	Oui (peu, moins que sts117 pour ces memes cond)	Perméabilisation des cells aux alentours. <u>Estimation :500micro ns</u>	Trace visible (dapi) avec peu de cells arrachées : cells vivantes mais perméabilisées (calcein) : double marquage.	≈1.3	

<p>A4 (d) plasma He 1.5slm, D4, 1.1mm</p>	<p>1.1</p>	<p>Oui (selon densité)</p>	<p>Estm:800 env (cells + debris).  Photos-traces (800microns env : 650à900))</p>	<p>Dépend de la densité : trace non visible directement mais visible avec dye !  (rem : sts117, qq soit densité, sont arrachées)</p>	<p>≈1.1-1.5</p>	
<p>B2 (f) plasma He 0.7slm, D4, 1.5mm milieu (525μL)</p>	<p>1.5</p>	<p>non</p>	<p>Env 80-16</p>	<p>(pas ou peu de différence avec témoin : milieu protège les cells)</p>	<p>≈1.18</p>	
<p>B3 (g) plasma He 1slm, D4, 1.5mm</p>	<p>1.5</p>	<p>non</p>	<p>60-14</p>	<p>Peu ou pas d effet sur la perméabilité et viabilité : encore effet de protection du milieu.</p>	<p>≈1.3</p>	
<p>B4 (h) plasma He 1.5slm, D4, 1.5mm</p>	<p>1.5</p>	<p>Oui (visibilité trace selon densité)</p>	<p>Perméabilité  Trace estimée a 850- 880 et 650-770 selon densité photos.</p>	<p>A ce débit, cells arrachées malgré 1.5mm milieu (pas effet protection comme sts 117)  Bizarre : + milieu ms + arrach ; tendance inverse pour 117 (logique ? ou due à la forte densité et donc plus facile à décoller...)</p>	<p>≈1.1-1.5</p>	

C2 (j) plasma He+O2, 1slm,30sccm, D1		non	25-14	Pas ou peu d'effet? (calcein /dapi)	≈0.35	
C2 (k) plasma He+O2, 1slm,30sccm, D4		non	+60-14	Perméabilité augmente Légère diff avec calc : mortalité existe mais en faible proportion.  (faible diff d1 et d4 due à P ?)	≈ 1-1.4	
C2 (l) plasma He+O2, 1slm,30sccm, D4, 1kV.		non	+100-17	Semble deviner une trace (calc)  (attention : condition plasma non optimal :ground connection)	≈2.2	

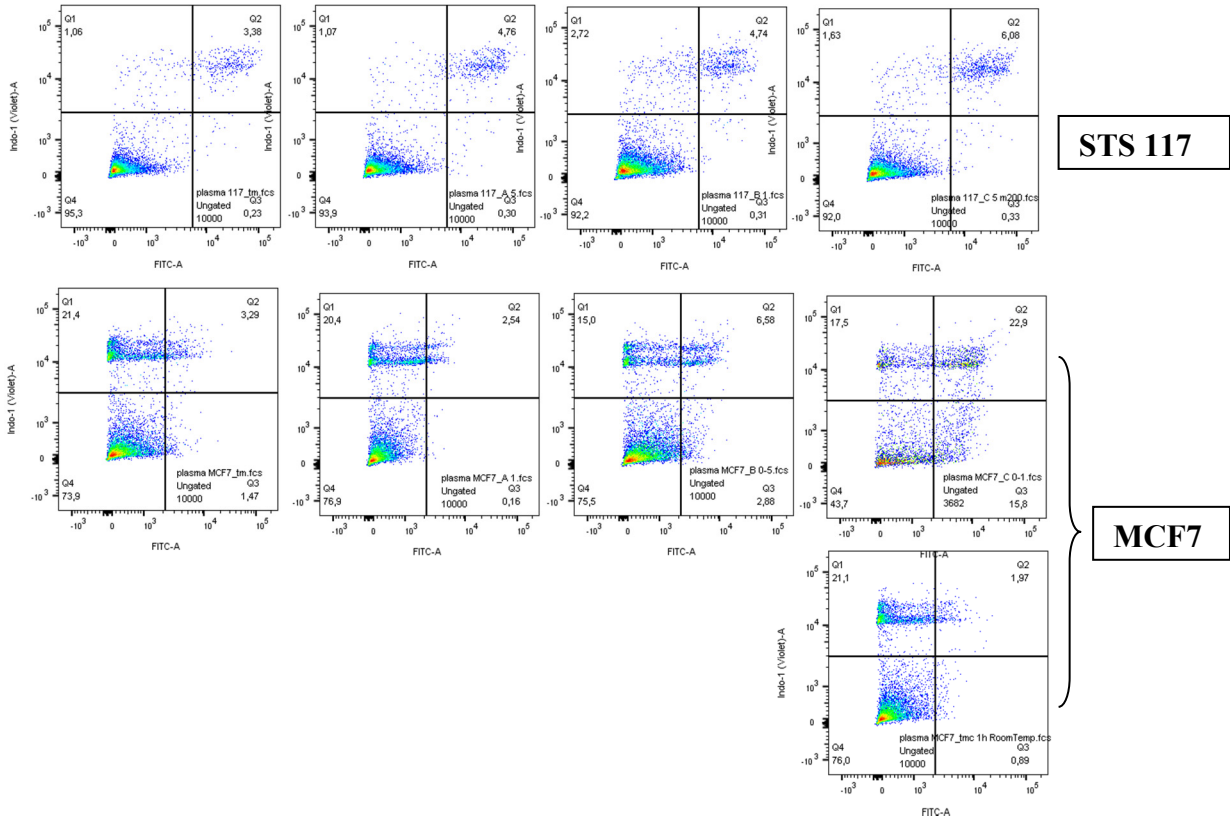
Les cellules ont été observées au microscope (*EVOS, Life Technologies*).

**Annexe 5 : Données brutes des FACS analysant l'effet de la variation de la vitesse de balayage sur les cellules.**

**1. Résultats du FACS de l'expérience exploratoire sur l'effet de la vitesse de balayage dans le traitement par plasma des cellules STS117 et MCF7.**

## Table

	Q1: FITC-A- , Indo-1 (Violet)- A+ <i>Freq. of Parent</i>	Q2: FITC-A+ , Indo-1 (Violet)- A+ <i>Freq. of Parent</i>	Q3: FITC-A+ , Indo-1 (Violet)- A- <i>Freq. of Parent</i>	Q4: FITC-A- , Indo-1 (Violet)- A- <i>Freq. of Parent</i>
plasma MCF7_A 1.fcs	20.4	2.54	0.16	76.9
plasma MCF7_B 0-5.fcs	15	6.58	2.88	75.5
plasma MCF7_C 0-1.fcs	17.5	22.9	15.8	43.7
plasma MCF7_tm.fcs	21.4	3.29	1.47	73.9
plasma MCF7_tmc 1h RoomTemp.fcs	21.1	1.97	0.89	76
plasma 117_A 5.fcs	1.07	4.76	0.3	93.9
plasma 117_B 1.fcs	2.72	4.74	0.31	92.2
plasma 117_C 5 m200.fcs	1.63	6.08	0.33	92
plasma 117_tm.fcs	1.06	3.38	0.23	95.3
Mean	<b>11.3</b>	<b>6.25</b>	<b>2.49</b>	<b>79.9</b>
SD	<b>9.42</b>	<b>6.43</b>	<b>5.07</b>	<b>16.3</b>

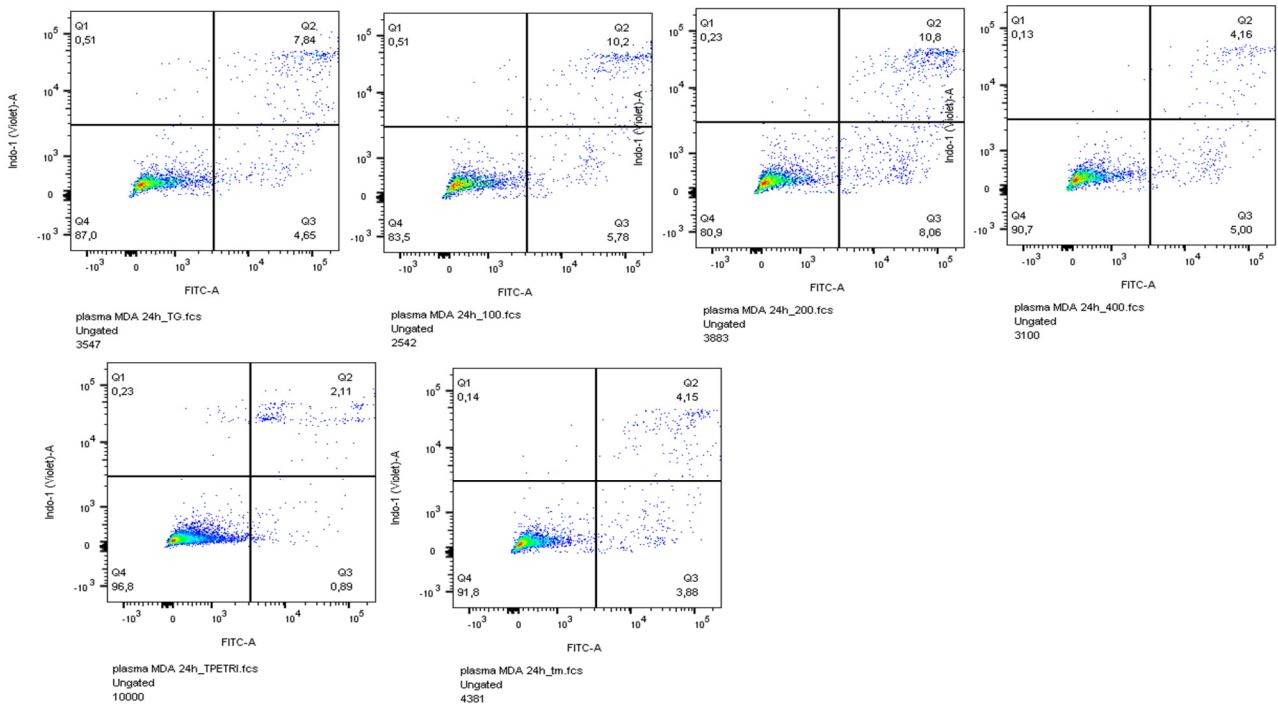


Résultats numériques et diagrammes associés à chaque condition de traitement décrit dans les conditions expérimentales.

## 2. Résultats du FACS de l'expérience sur l'effet de la vitesse de balayage dans le traitement par plasma des cellules MDA-MB-231

	Q1: FITC-A- , Indo-1 (Violet)- A+	Q2: FITC-A+ , Indo-1 (Violet)- A+	Q3: FITC-A+ , Indo-1 (Violet)- A-	Q4: FITC-A- , Indo-1 (Violet)- A-	Count
	<i>Freq. of Parent</i>	<i>Freq. of Parent</i>	<i>Freq. of Parent</i>	<i>Freq. of Parent</i>	
plasma MDA 24h_TG.fcs	0.51	7.84	4.65	87	3547
plasma MDA 24h_TPETRI.fcs	0.23	2.11	0.89	96.8	10000

plasma MDA 24h_tm.fcs	0.14	4.15	3.88	91.8	4381
plasma MDA 24h_100.fcs	0.51	10.2	5.78	83.5	2542
plasma MDA 24h_200.fcs	0.23	10.8	8.06	80.9	3883
plasma MDA 24h_400.fcs	0.13	4.16	5	90.7	3100
Mean	<b>0.29</b>	<b>6.54</b>	<b>4.71</b>	<b>88.4</b>	<b>4576</b>
SD	<b>0.17</b>	<b>3.58</b>	<b>2.36</b>	<b>5.82</b>	<b>2732</b>



Résultats numériques et diagrammes associés à chaque condition de traitement des cellules MDA-MB-231 décrit dans les conditions expérimentales.

**Annexe 6 : Données brutes des FACS analysant des cellules traitées dans des conditions ‘fortes’ en présence de sillon.**

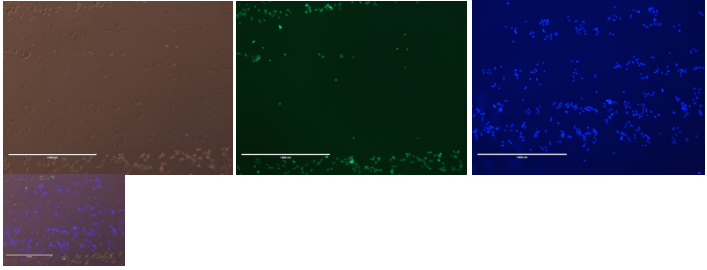
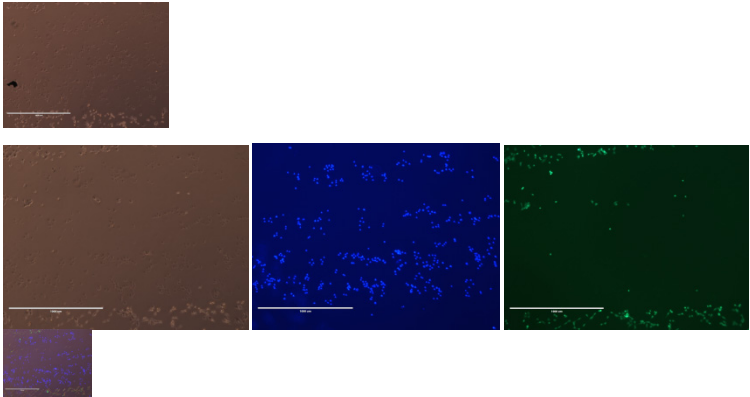
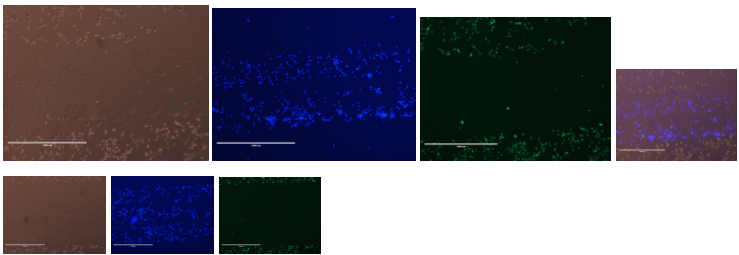

- Résultat MDA-MB-321 pour les conditions d’exposition décrites dans le tableau XIX.

Tableau1

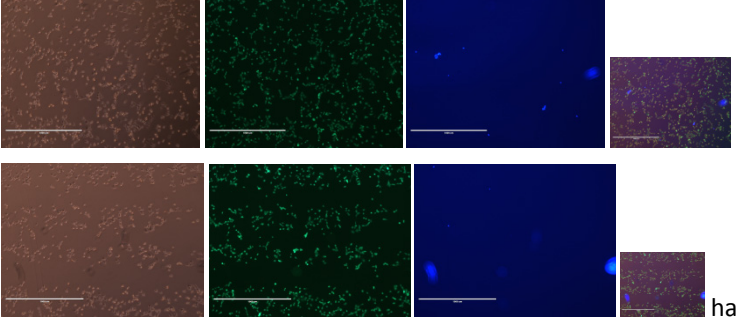
		Ungated Count	Q1: FITC-A- , Indo-1 (Violet)- A+ Freq. of Parent	Q2: FITC- A+ , Indo-1 (Violet)-A+ Freq. of Parent	Q3: FITC- A+ , Indo-1 (Violet)-A- Freq. of Parent	Q4: FITC-A- , Indo-1 (Violet)- A- Freq. of Parent
plasma 24h_A.fcs	MDA	249	2.41	11.2	21.3	65.1
plasma 24h_B.fcs	MDA	52	1.92	7.69	9.62	80.8
plasma 24h_C.fcs	MDA	1373	0.87	5.17	4.08	89.9
plasma 24h_D.fcs	MDA	48	8.33	2.08	4.17	85.4
plasma 24h_E.fcs	MDA	202	2.97	9.9	22.3	64.9
plasma 24h_F.fcs	MDA	762	1.57	15.1	18.4	65
plasma 24h_G.fcs	MDA	1084	1.48	5.26	9.04	84.2
plasma 24h_H.fcs	MDA	10000	0.31	3.19	5.02	91.5
plasma 24h_TPetri.fcs	MDA	10000	0.06	0.84	0.99	98.1
plasma 24h_Tbig G.fcs	MDA	10000	0.5	1.01	0.84	97.6
plasma 24h_Tbig M.fcs	MDA	10000	0.11	1.16	0.75	98
plasma 24h_Tg.fcs	MDA	10000	0.25	2.6	1.3	95.9
plasma 24h_Tm.fcs	MDA	10000	0.28	3.8	1.62	94.3
Mean		4905	1.62	5.31	7.65	85.4
SD		4924	2.23	4.45	8.01	12.9

**Annexe 7: Optimisation des paramètres (débit/voltage) des cellules MDA-MB-231 pour une hauteur de milieu de culture cellulaire 1.1 mm.**

**Série A**

MDA-MB-231	1.1mm	Images (x4)
950V, D3	PT : S M : Très peu ou pas d'Arr + cells mortes adhérees sur surface. Les cells mortes sont toutes perméabilisées (tous les noyaux st colorés); qqs cells semblent avoir résistées au traitement.	
850V, D3	PT : S M : Très peu ou pas d'Arr + cells mortes adhérees sur Pétri (cells + gde taille que 950,D3)	
750V, D3	PT : S M : Très peu Arr + cells mortes (cells + gde taille que 850, D3) Sensibilité à la quantité de milieu (test ménisque)	
650V, D3	PT : Pas de S M : Pas ou très léger Arr + cells vivantes.	

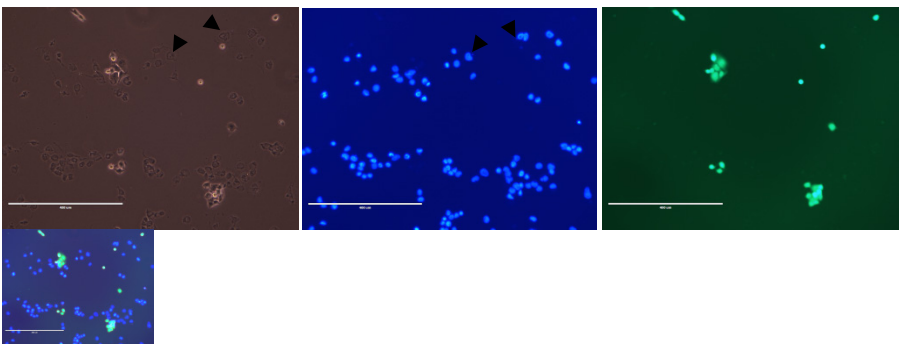


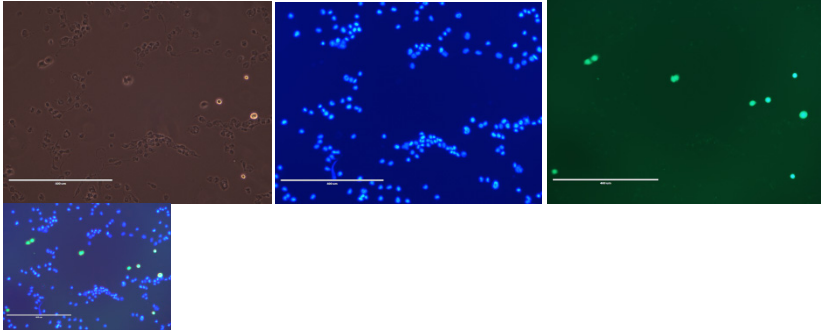
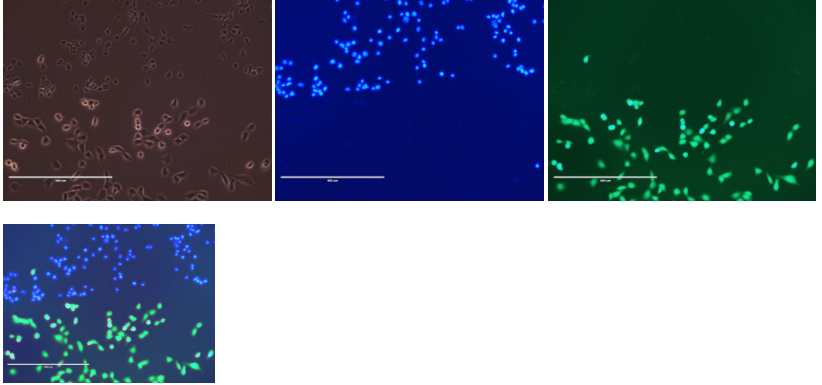
	Sensibilité a la quantité de milieu (test si ± centré): si légèrement plus de solution (haut), léger arr. visible.	
--	--	--

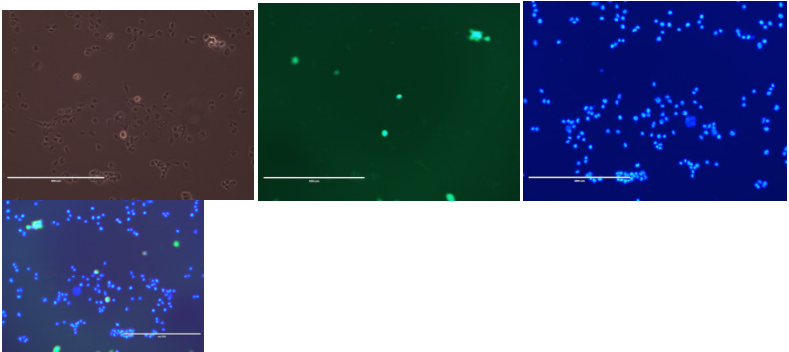
PT: pdt traitement et M: microscope, Arr. : arrachement, qqs : quelques, refring : réfringent, cells : cellules  
 Les cellules ont été observées au microscope (*EVOS, Life Technologies*).

Rem : 750, D3, 1.1mm : --si 1lpm He, sillon visible et pas/léger arrachement selon qté liquide  
 --Si 0.9 lpm He. Pas sillon, pas arrachement, cells visiblement (majoritairement) vivantes.

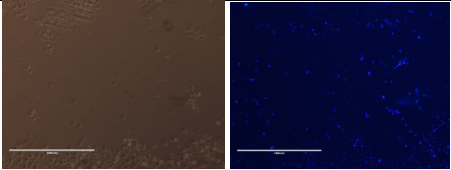
Le tableau suivant présente les images obtenues dans les mêmes échantillons exposés mais avec un grossissement plus important (x10, relativement à x4). L'idée ici étant d'observer les changements dans la cellule et tenter de comprendre pourquoi on ne détectait que très peu de cellules au facs précédent.

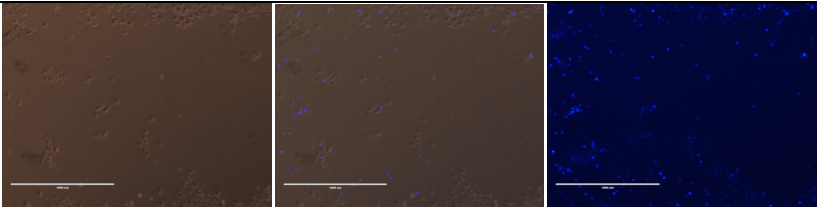
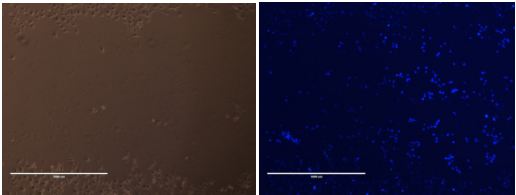
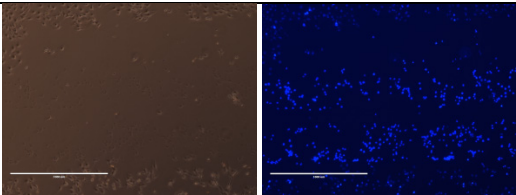
MDA-MB-231	1.1mm	Images (x10)
950V, D3	PT : S M : Tres peu ou pas d'Arr + cells mortes adhérees sur surface. Les cells mortes sont toutes perméabilisées ; qqs cells semblent avoir résistées au traitement.	 <p><u>Morphologie</u> : Image M+dapi montrent les forts dommages a la cellule : membrane disrupted, effet de beigne + perte intégrité+ perte du milieu intracellulaire autour de la cell dans ce dernier cas, la cellule semble bleu pale... ADN brisé ? déversé dans</p>

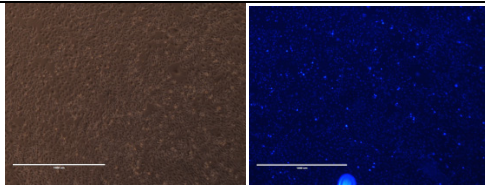
		<p>le milieu intra/extra cellulaire (voir flèches)?</p> <p>*qqq cells vivantes : vivantes mais morphologiquement ≠ des cellules 'saines' ; certaines sont vivantes/perméabilisées d'autres vivantes/non perméabilisées. Généralement, les cells très refring sont, dans ces conditions d'expositions, vivantes et pas ou peu perméabilisées.</p>
850V, D3	<p>PT : S</p> <p>M : Très peu ou pas d'Arr + cells mortes adhérees sur Petri (cells + gde taille que 950,D3))</p>	 <p><u>*Morphologie :</u></p> <p>Cells plus endommagées qu'à 750V ; membranes endommagées + perte intégrité ; images Dapi confirment ceci (effet beigne, membrane disrupted...) les plus endommagées retiennent moins la coloration (bleu plus pale moins brillant) : ADN endommagé ? dispersé dans la cellule et non dans le noyau ?</p> <p>*qqq cells réfringentes/non perméabilisées sont vivantes.</p>
750V, D3	<p>PT : S</p> <p>M : Arr + cells mortes (cells + gde taille que 850, D3)</p> <p>Sensibilité à la quantité de milieu (test ménisque)</p>	 <p><u>*Changements morphologiques :</u></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>-perte réfringence</li> <li>-dommage à la membrane externe (avec ou sans perte intégrité)</li> <li>-Capte Dapi : coloration très forte : bleu intense uniforme + effet beigne +perte intégrité , visibles dapi.</li> </ul>

		<p>*Cells majoritairement morte (Cal) mais morphologiquement moins altérées qu'à + ht voltage (pour un meme DC).</p> 
--	--	---

Le tableau suivant est une observation des cellules et de la coloration au dapi **après 48h** de traitement (tout comme nous l'aurions fait avec le InQSite). Observer ces images dans ordre *croissant* de voltage pour suivre l'évolution.

MDA- MB-231	Images
950V, D3	 <p>Perméabilisation des cells toujours présentes (Dapi toujours lié aux cellules) : coloration bleu intense n'est plus homogenement repartie et bcp de coloration bleu pale des cells signifiant que le degre de desintegration est fortement avancé (le dapi ne trouve plus assez ADN pour se lier (ADN brisé/desagrégé partiellement)).</p> <p>Taille des cellules traitées, majoritairement mortes, a fortement diminué : cells se désagrègent 'proprement' en diminuant de taille (focus difficile a faire au microscope !) ; ce phénomène est encore plus prononcé qu'en 850V, D3 .</p> <p>Notons que les cellules vivantes non traitées continuent de proliférer (lentement) : voir haut et bas de l'image. De plus, d'après les images ci-dessous, les qqs cellules vivantes arrachées lors du traitement, se redéposent sur la surface, s'y fixent et peuvent proliférer... Notons que l'arr. les cells peuvent être vivantes ou mortes ! selon les conditions d'expositions.</p>

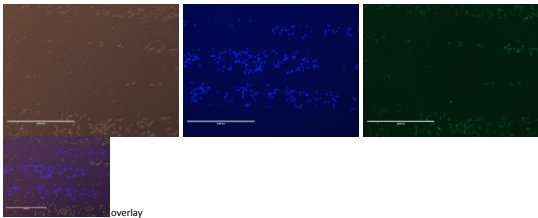
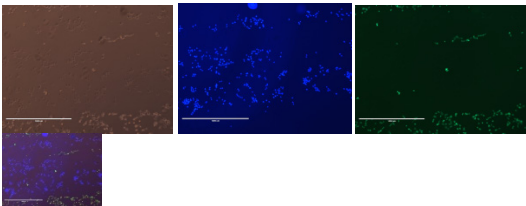
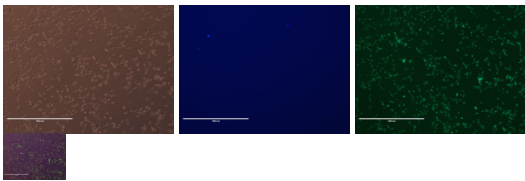
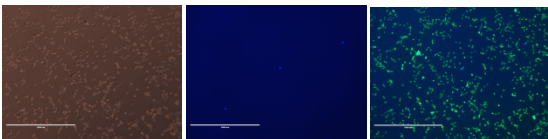
	
<p>850V, D3</p>	 <p>Perméabilisation des cells toujours présentes (Dapi toujours lié aux cellules) : coloration bleu intense n'est plus homogenement repartie.</p> <p>Taille des cellules traitées, majoritairement mortes, a bcp diminué : cells se désagrègent 'proprement' en diminuant de taille (focus plus difficile a faire au microscope) ; ce phénomène est encore plus prononcé qu'en 750V, D3 : la coloration bleu pale pourrait donc représenter les cells qui ont un degre de desintegration plus avancé et le dapi ne trouve plus assez ADN pour se lier (ADN brisé/desagrégé partiellement).</p> <p>Notons que les cellules vivantes non traitées continuent de proliférer (lentement) :voir haut et bas de l'image.</p>
<p>750V, D3</p>	 <p>Perméabilisation des cells toujours présentes (Dapi toujours lié aux cellules) : coloration tjrs bleu intense donc pas (ou extremement faible) déversement du contenu des cellules.</p> <p>Taille des cellules traitées, majoritairement mortes, a bcp diminué : cells se désagrègent 'proprement' en diminuant de taille (focus plus difficile a faire au microscope)</p> <p>Notons que les cellules vivantes non traitées continuent de proliférer (lentement).</p>

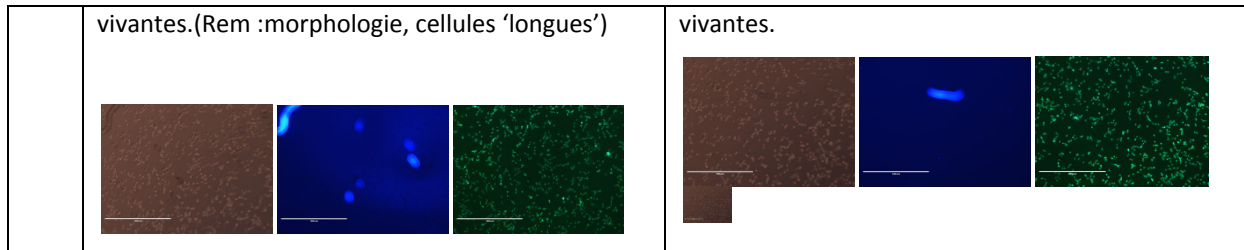
650V, D3	
Faible de permeabilisation/prolif des cells(/ pas ou tres peu de morts)	

### Série B :

On observera l'effet du débit d'hélium (+30sccm O<sub>2</sub>) pour deux voltages différents, pour une quantité de milieu de 1.1 mm. On cherche toujours à adoucir les conditions d'exposition tout en ayant des cellules mortes et pas/peu d'arrachement.

#### 1.1mm

	850, D3	750, D3
1 lpm	PT : début, pas de S ; puis S de 1 à 2 mm M : Faible Arr, selon la ligne (voir overlay); cells mortes sur le Pétri ; qqs cells vivantes aussi.  	PT : S M : Léger Arr ; cells mortes dans fond Pétri ; qqs cells vivantes  
0.9 lpm	PT : pas de S M : pas d'Arr ; pas/tres peu perméab ; cells majoritairement vivantes.  	PT : pas de S M : pas d'Arr ; pas/faible perméab ; cells majoritairement vivantes.  
0.8 lpm	PT : pas de S M : pas d'Arr ; pas perméab ; cells majoritairement  	PT : pas de S M : pas d'Arr ; pas perméab ; cells majoritairement  

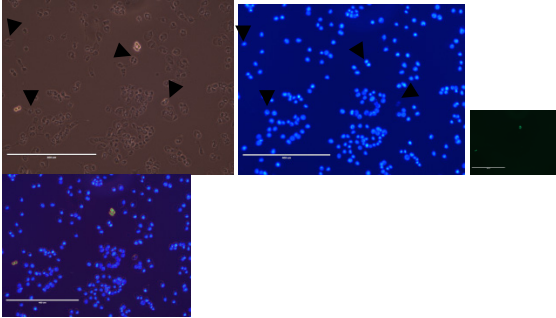
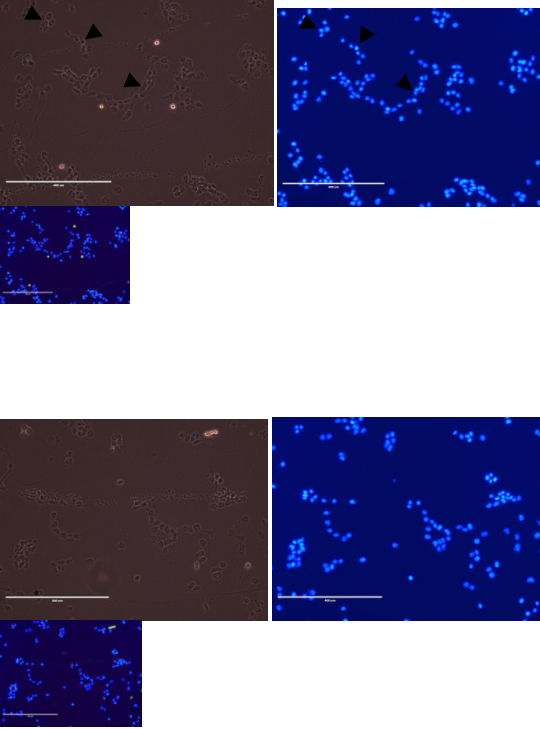


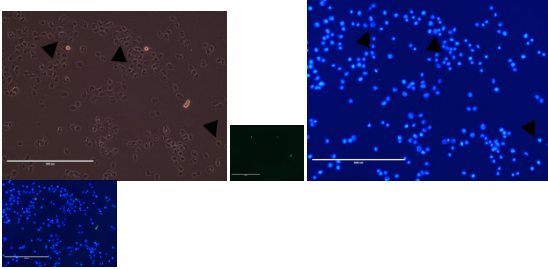
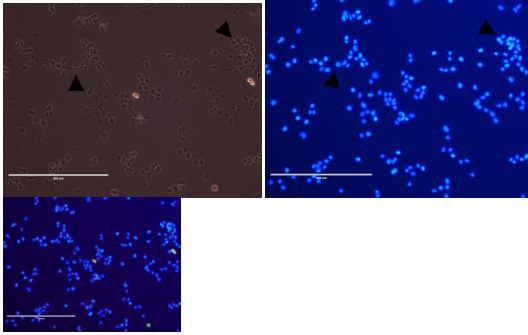
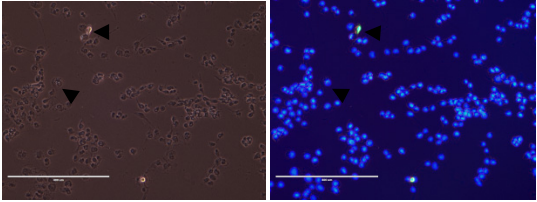
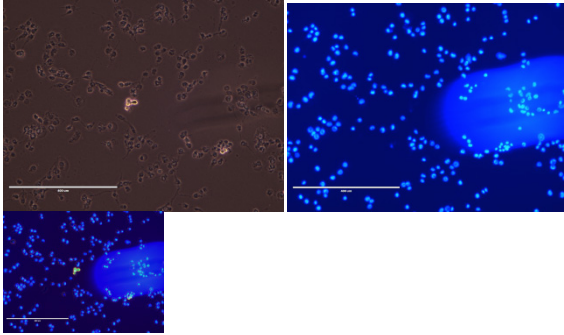
PT : pendant traitement, S :sillon, Arr : arrachement (des cellules)  
 Les cellules ont été observées au microscope (*EVOS, Life Technologies*).

Globalement, on voit que diminuer le débit ne nous permet pas d'atteindre nos objectifs. Donc pour les séries suivantes, la puissance et la quantité de milieu vont 'légèrement' varier pour 1 lpm He+30sccm O<sub>2</sub>.

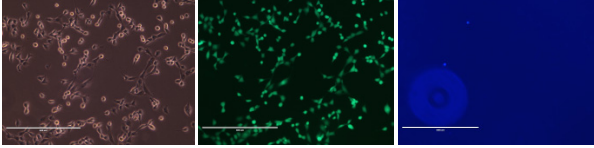
**Annexe 8 : Images MDA-MB-231 marquées après traitement et observées au grossissement (x10) 48h après exposition au plasma.**

Les cellules ont été observées au microscope (*EVOS, Life Technologies*).  
*Conditions opératoire : cf. tableau XXII.*

x10	750Vpp	850Vpp
D1	<p>M : Les cells refring sont vivantes et ne sont pas perméabilisées. Les cells mortes, sur la surface, ont perdu la refring, et ont accumulées des dommages (effet de beigne, dommages aux membranes avec ou sans perte d'intégrité de la cell...)</p> <p><i>Flèches</i> : 1. cells mortes, gardent aspect 'normal' (sans refring) ; 2. Cells avec légèrement refring, non vivantes et légèrement perméabilisé ('commence à mourir') ; 3. Perte intégrité membrane ; (4. Si forts dommages aux membranes, la coloration dapi est légèrement plus pale).</p> 	<p>M : Qqs cells vivantes refring et non perméabilisées. Cells mortes, à la surface, ont accumulé dommages (effet beigne, perte refring, morphologie différentes).</p> <p>-Dans la 2<sup>nde</sup> serie d'images, on voit plus de dommages aux membranes externes et le bleu Dapi est plus pale ;</p> <p>-Présence de débris cellulaires sous forme d'une trainée : possiblement dû au déplacement du jet de plasma ; toutefois, ce n'est pas de l'ADN car la coloration dapi ne les révèle pas (c'est probablement des débris de membranes externes de cells se trouvant exactement sous le jet ou les débris de 'tentacules' qui lient les cells entre elles)...</p> 

<p>D2</p>	<p>M : Les cells refring sont vivantes et ne sont pas perméabilisées. Les cells mortes, à la surface, ont perdu la refring, et ont accumulées + de dommages qu'en D1 (effet de beigne, forts dommages aux membranes avec ou sans perte d'intégrité de la cell et <i>fractionnement visible ds noyau</i> de la cellule...). Les cells avec membrane très endommagées ont une couleur plus pale au Dapi (possibilité ADN fortement détruit ou déversé dans milieu intracell (à l'ext du noyau)).</p> 	<p>M: Cells vivantes refring visibles (non perméabilisées). Dommages aux cells st un peu + importants : effet beigne + présent ; coloration bleu pale du dapi montrant que l'ADN n'est plus concentré localement dans le noyau et/ou possibilité de fragmentation ADN. Existe encore une bonne proportion de cells qui n'ont pas accumulées de forts dommages (membranes 'intègres' et coloration bleu intense du dapi).</p> 
<p>D3</p>	<p>M : Quelques cells refring st vivantes (flèche : une cell semble survivre malgré les dommages subits). Cells mortes, sans refring, ont leur membrane externe très endommagée : la proportion de cells bleu pale (au dapi) semble légèrement supérieure à D2... signe que ADN est + fragmenté ?</p> 	<p>M : Cells vivantes refring, non perméables au centre, versus cells vivantes (bas/droite), majoritairement refring possiblement perméabilisé. Cells mortes, non refring, ont accumulé un peu + de dommages aux membranes qu'à D1/D2 (effet beigne + présent...), et visuellement existe des cells+ dégradé (répartition des tailles inhomogènes et coloration dapi intense/pale).</p> 
<p>Te m oi</p>		



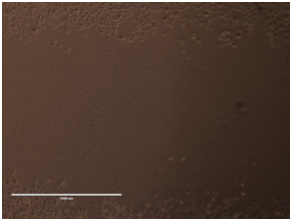
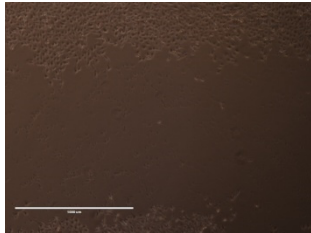
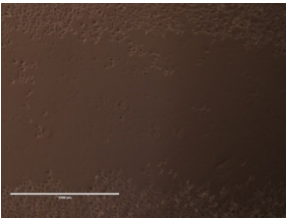
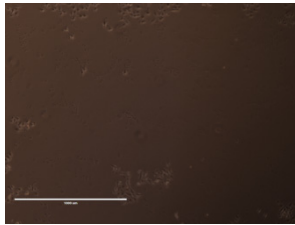
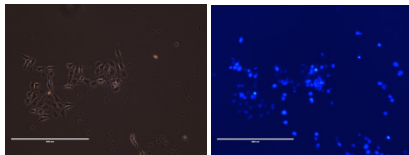
n	
	<p>Cells tumorales 'saines' : cells vivantes, <math>\pm</math> réfringentes, pas (tres peu) de perméabilisation, morphologie 'normale' et homogène (les petites boules réfringentes sont des cells ds stade de division cellulaire).</p>

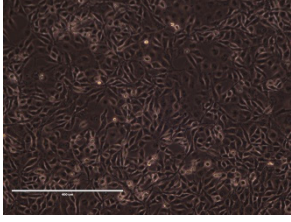
Refring=réfringente, cell=cellule,

Tableau: : images au microscope de cellules traitées puis colorées au Dapi et à la Calcein AM représentant l'effet de la variation du DC(%) pour deux valeurs de voltage sur les cellules traitées au plasma, pour une hauteur de milieu de 1 mm.

**APRES 48H**

Pour avoir une idée de l'évolution de la zone traitée...

	750Vpp	850Vpp
D 1	<p>M :</p> 	<p>M :</p> 
D 3	<p>M :</p> 	<p>M :</p>  <p>x10</p> 

T E M	 <p><b>témoin après 48h</b> (pas de coloration bleu des cells individuelles (juste background) et pas de coloration verte car la Calcein AM n'agit plus contrairement au Dapi).</p>
-------------	--

\* Exposition à un tps t puis coloration le jour même et mis à l'incubateur pendant 48h, puis, observation au microscope.

## Annexe 9 : Tableau de synthèse sur l'étude de la sélectivité et la reproductibilité des données.

**Après optimisation du débit, les conditions opératoires 'constantes' étaient:** 0.9 lpm He + 30 sccm O<sub>2</sub>, 1mm milieu (2130μL), v=400 steps/s (1mm/s), d= 3mm.

**Arpe :** ≈400000 cell/Pétri incubées 24h avant traitement

**Synthèse sur les expériences liées à la sélectivité et la reproductibilité des résultats.**

### Tableau récapitule effets du voltage et de DC sur les cellules testées :

La présence de Sillon signifie que les cellules sont mortes et 'pas de S' signifie que les cellules sont vivantes.  
Notation DC=1% équivalente à D1.

Arpe	Voltage, DC (%), S ?											
	900	D1	Pas S	900	D1	Pas S	900	D1	Pas S	900	D2	Pas S
				900	D2	Pas S	900	D2	Pas S/S	900	D2	Pas S
							900	D3	Pas S/S	900	D3	S
							900	D1.5	Pas S			
	850	D1	Pas S									
	850	D2	Pas S/S									
	800	D1	Pas S	800	D1	Pas S						
	800	D4	S	800	D2	Pas S						
	800	D3	S	800	D3	Pas S						
	800	D2	Pas S/S									
	(ordre: évapor...)											
	750	D1	Pas S									
	750	D2	Pas S									
	750	D3	Pas S									
	<p>*Les conditions sans sillons sont celles qui nous intéressent : ainsi les cellules tumorales seront testées notamment dans ces conditions pour tenter de déterminer l'existence ou non de la sélectivité.</p> <p>*D'après ces résultats, on retiendra (1) : 750V (tous les D), 800V-D1etD2, 850V-D1, 900V-D2 pour traiter les cellules tumorales; (2) : faire repeat 800V D2-D3 et 900V D2-D3 avec Arpe .</p> <p>* Quelques situations où reproductibilité non vérifier.</p>											
<b>RAPPEL</b>												

<b>Optimisation et Validation précédentes</b>	<b>Conditions minimales pour avoir mortalité (expériences effectuées juste avant chgmt bouteille He...)</b>			
	<b>MDA :</b> 1mm milieu (2130µL) 750V, DC=1% 1 lpm He +30 sccm O2	<b>MCF7 :</b> 0.9 mm milieu (2083µL) 750V, DC=3% 1 lpm He +30 sccm O2		
<b>Série 2</b>				
<b>Arpe (ancien)</b>	<b>Voltage, DC (%), S ?</b>			
	900 D2 Pas S			
	900 D3 Pas S			
	850 D1 Pas S			
	850 D2 Pas S			
	850 D3 Pas S (ou <1mm)			
<b>MDA</b>	900 D1 Pas S	900 D1 S	900 D1 S (1ligne)	900 D3 S
	900 D2 Pas S	900 D2 S	900 D2 S	(dès fin 1 <sup>ère</sup> ligne)
	900 D3 S	900 D3 S	900 D3 S	900 D2 S
				900 D1 S
	850 D1 Pas S			
	850 D2 Pas S			
	850 D3 Pas S			
	750 D3 Pas S	750 D3 Pas S		
	750 D2 Pas S	750 D2 Pas S		
	750 D1 Pas S	750 D1 Pas S		
<b>MCF7</b>	900 D1 Pas S	900 D3 Pas S	900 D1 S (pas début)	
	900 D2 légerS	900 D2 S	900 D2 S (pas début)	
	900 D3 S (<1mm)	900 D1 S (court/lg)	900 D3 S (pas début)	
	850 D1 S			
	850 D2 S (lg2-3)			
	850 D3 S (lg2-3)			
	800 D1 Pas S			
	800 D2 Pas S			
	800 D3 Pas S			
	800 D3 S (évap)			
<b>Résultats:</b>				

<b>1. Reproductibilité:</b>				
Arpe : 900V D1 et D2 ; 850 V D1 (on peut déduire, si pas de S à 850V et 900V, alors pas de S à 800V, à 750V)				
<b>2. Sélectivité?:</b>				
Arpe/MDA : 900V (D1 à D3)				
-- 3 échantillons indépendants présentent S (dc cells mortes) pour MDA				
-- 1 échantillon : pas de S ; de plus, résultat 13-06 : 3 échantillons indépendants de Arpe montrent aucun S à 900V (D1 et D2 ; D3= partiel)				
Arpe/MCF7 : 900V D2 et 850V.				
<b>Série 3</b>				
Duplicata pour chaque condition pour cells tumorales (comparer avec expériences série2)				
<b>MDA (ancien)</b>	750 D1 Pas S			
	750 D2 Pas S			
	750 D3 S (I2-I3)			
<b>MDA (new)</b>	800 D1 Pas S	800 D1 S		
	800 D2 Pas S	800 D2 S		
	800 D3 Pas S (fin I1 à I3)	800 D3 S		
	850 D1 Pas S	850 D1 Pas S		
	850 D2 Pas S	850 D2 S (fin I1 à I3)		
	850 D3 S (fin I1 à I3)	850 D3 S (fin I1 à I3)		
	900 D1 Pas S	900 D1 Pas S		
	900 D2 S	900 D2 S (>ech1)		
	900 D3 S	900 D3 S (>ech1)		
<b>MCF7 (ancien)</b>	750 D1 Pas S			
	750 D2 Pas S (I1,I3) S (I2)			
	750 D3 Pas S			
	800 D1 Pas S	800 D1 Pas S		
	800 D2 Pas S	800 D2 S (I2-I3)		
	800 D3 Pas S	800 D3 S (I2-I3)		
	850 D1 Pas S	850 D1 Pas S		
	850 D2 S (mi-I2,I3)	850 D1 Pas S		
	850 D3 S (I2-I3)	850 D1 Pas S		
	900 D1 Pas S	900 D1 S		

	900 D2 S (I2-I3)	900 D2 S		
	900 D3 S (court)	900 D3 S		
Arpe	750 D1 Pas S			
	750 D2 Pas S			
	750 D3 Pas S			
	800 D1 Pas S			
	800 D2 Pas S			
	800 D3 Pas S			
	900 D1 S (fin I1 à I3)			
	900 D2 S (I2)			
	900 D3 S			

**Rem et observation :**

-La comparaison, s il y a lieu, devrait se faire *ech1 (condition i)- ech1 (condition i)* que se soit pour une meme lignée ou différentes lignées cellulaires) ; notons que pour l'ech2, généralement, l'évaporation est + importante que pour l'ech1 (a cause de la température...). Dans les expériences de la série 1, on découvre ce nouveau paramètre qui influe la reproductibilité des résultats. ....

-Il aurait été intéressant de faire Arpe à 850V...

Jusqu'ici le but était de vérifier la reproductibilité des résultats pour chaque lignée indépendamment.

**Résultats :**

**1. Reproductibilité :**

Comparativement aux anciennes expériences, les conditions qui se reproduisent, sont

Pour Arpe : 800V D1 à D3 et 750V

Pour MDA : 900V-D2 et D3 ; 850V-D1 et D2 ; 750V D1 et D2

Pour MCF7 : (900V D1) 900V D2 et D3 ; 850VD1 et 800V-D1 pour cette expérience, mais pour l'ensemble des expériences 850V D2- D3, et, 800V D2-D3

**2. Sélectivité :**

Arpe/MDA

750V-D3 et 800V- D1 à D3 (1x)

Arpe/MCF7

800V-D2 et D3 (1x)

*Il aurait été intéressant de tester Arpe à 850V...*

Rem : la sélectivité observé mai pas en duplicata...

**Dans la suite...**

Les expériences vont être reprises en traitant une *lignée tumorale/une lignée saine, en triplicata* : recherche de conditions où parait la sélectivité : 1 lignée cancéreuse/saine seront traitées sur deux journées différentes, et, comparaison direct de l'effet d'un même plasma. Les conditions ambiantes seront notées pour suivre l'évolution : température et taux d'humidité de la pièce ainsi que la température du gaz.

Série4				Arpe et MDA-MB-231			
	Ech1 (1à3)			Ech2 (3à1)			Ech3
<b>Arpe</b>	900	D1	S	900	D1	S	900 D1 Pas S
	900	D2	S	900	D2	S	900 D2 S (fin l1 à l3)
	900	D3	S	900	D3	S	900 D3 S (fin l1 à l3)
	(fin l1 à l3) pour les 3 cond						
	T <sub>He</sub> =26C à 31C						
	850	D1	Pas S	850	D1	S	850 D1 S
	850	D2	Pas S	850	D2	S	850 D2 S
	850	D3	Pas S	850	D3	S	850 D3 S
	(fin l1 à l3) pour les 3 cond						
	T <sub>room</sub> =23.5C, RH= 40%, T <sub>Hei</sub> =33.9C						
	800	D1	Pas S	800	D1	Pas S	800 D1 Pas S
	800	D2	Pas S	800	D2	Pas S	800 D2 S (l2)
	800	D3	Pas S	800	D3	Pas S	800 D3 S (l2 et fin l3)
	T <sub>room</sub> =22.5C, RH= 47%, T <sub>Hei</sub> =33.2C						T <sub>Hei</sub> =35.4C
<b>MDA</b>	900	D1	Pas S	900	D1	S	900 D1 Pas S
	900	D2	S (fin l1 à l3)	900	D2	S	900 D2 S
	900	D3	S	900	D3	S	900 D3 S
	(fin l1 à l3) pour les 3 cond						fin l1 à l3) pour les 2 cond
	T <sub>Hei</sub> =32.6 C						
	850	D1	Pas S	850	D1	S (1l)	850 D1 S
	850	D2	S (l2)	850	D2	S	850 D2 S
	850	D3	S (très léger)	850	D3	S	850 D3 S
	T <sub>room</sub> =22.5C, RH= 44%, T <sub>Hei</sub> =35.2 C						

	800 D1 Pas S	800 D1 Pas S	800 D1 Pas S	
	800 D2 Pas S	800 D2 Pas S	800 D2 Pas S (S : fin 3 <sup>ème</sup> ligne)	
	800 D3 S (I2 et fin I3)	800 D3 Pas S	800 D3 S (I2)	
	T <sub>room</sub> =22.5 C, RH= 47%, T <sub>Hei</sub> =36 C		T <sub>Hei</sub> =35.1 C	
<p>-Notations :T<sub>room</sub> :Température ambiante, T<sub>Hei</sub> = Température du gaz (ou Hélium) initiale</p> <p><b>-Importance de la procédure expérimentale pour interpréter les résultats.</b></p> <p><b>-Conditions expérimentales constantes pour les 2 expériences (séries 4et5)</b></p> <p>Distance nozzle/cells : 3mm</p> <p>V (balayage) = 1mm/s</p> <p>Debit gaz : 0.9 lpm He + 30 sccm O2</p> <p>Quantité de milieu : 1mm soit 2130 µL</p> <p>Traitement sur 3 lignes (pour éviter problème d'évaporation)</p>				
<p><b>Résultats</b></p> <p><b>1. Reproductibilité</b></p> <p>Arpe : 900V-D1 (1x) ; 850V D1 à D3</p> <p><b>2. Sélectivité</b></p> <p>Arpe/MDA : 850V (1x)D1 et surtout D2-D3 (car MDA 3x). 800V-D3.</p>				
<p><b>Enfin les comparaisons pour l'ensemble des expériences est à prendre avec des pincettes car la température du gaz et les conditions ambiantes influencent les résultats. On DOIT être dans des conditions stables de températures (ambiante ou gaz) et de RH pour une meilleure interprétation des données. Reprendre ces expériences en hiver car toutes les expériences menées précédemment ne montraient aucun problème de reproductibilité !</b></p> <p>(pb d instabilité avec mcf7, dernière lignée testée, instabilité dû à la température ... qui augmente tout le long des expériences.)</p>				
<p><b>Série5</b> <span style="float: right;">Arpe et MCF7</span></p>				
	Ech1 (1à3)	Ech2 (3à1)	Ech3	
<b>Arpe</b>	900 D1 Pas S	900 D1 Pas S	900 D1 Pas S	
	900 D2 Pas S	900 D2 Pas S	900 D2 S (I2 à I3)	
	900 D3 Pas S	900 D3 Pas S	900 D3 S (I2 à I3)	



		(fin l1 à l3) pour les 3 cond	
	T <sub>He(i)</sub> =30-31 C		T <sub>He(i)</sub> =33.8-33.9 C
	850 D1 S (l2 à l3)	850 D1 Pas S	850 D1 Pas S
	850 D2 S (l2 à l3)	850 D2 Pas S	850 D2 Pas S
	850 D3 S (l2 à l3)	850 D3 Pas S	850 D3 Pas S/S
		(fin l1 à l3) pour les 3 cond	
	T <sub>r</sub> =22.5C, RH <sub>i</sub> =47% , T <sub>He(i)</sub> =34.8 C		T <sub>He(i)</sub> =35.7 C
	800 D1 S (fin l1 à l3)	800 D1 S	800 D1 Pas S/ S (l2)
	800 D2 S (fin l1 à l3)	800 D2 S	800 D2 Pas S
	800 D3 S (court)	800 D3 S	800 D3 S
	T <sub>r</sub> =22.5C, RH <sub>i</sub> =46%, T <sub>He(i)</sub> =36.2 C	T <sub>He(i)</sub> =36.6 C	T <sub>He(i)</sub> =36.7-36.8 C
<b>MCF7</b>	900 D1 Pas S	900 D1 Pas S	900 D1 Pas S
	900 D2 Pas S	900 D2 Pas S	900 D2 S (l2 à l3)
	900 D3 Pas S	900 D3 Pas S	900 D3 S (mi-l1 à l3)
	T <sub>r</sub> =22.5C, RH <sub>i</sub> =46%, T <sub>He(i)</sub> =32-32.3 C		T <sub>He(i)</sub> =33.8-33.9 C
	850 D1 Pas S	850 D1 Pas S	850 D1 Pas S
	850 D2 S (l2 à l3)	850 D2 S (l2)	850 D2 Pas S/S (l2-l3)
	850 D3 S (l2 et fin l3)	850 D3 S (l2)	850 D3 Pas S/S (l2 et fin l3)
	T <sub>r</sub> =22.5C, RH <sub>i</sub> =47% , T <sub>He(i)</sub> =35 C	T <sub>He(i)</sub> =35.3C	T <sub>He(i)</sub> =35.7C
	800 D1 Pas S	800 D1 Pas S	800 D1 Pas S
	800 D2 Pas S	800 D2 S (l2-l3)	800 D2 Pas S
	800 D3 Pas S	800 D3 S (fin l1-l3)	800 D3 Pas S
		T <sub>He(i)</sub> =36.6C	T <sub>He(i)</sub> =36.7C
	<b>Rem importante</b> : Qd T atteint 35C et + : la majorité de ces conditions montrent <i>l'existence de S</i> ! (un peu moins pour MCF7 au début du traitement)		
<b>Résultats</b>			
<b>1. Reproductibilité</b>			
Arpe : 900V-D1 (3x) ; 850V D1 à D3 (2x), (800V-D2)			
MCF7 :850V D2-D3 (3x) (850V D1, 3x ; 800V-D1 3x et 800V-D2 2x))			

## 2. Sélectivité

Arpe/MCF7: 850V D2-D3 avec  $T_{He} \approx 34-35C$  comme résultat série4, (800V-D2, 1x)

Rem : ici, la condition est commune aux 3 lignées cellulaires ! auparavant, les conditions étaient différentes mais proches.

## Annexe 10 : Schématisation de la séquence expérimentale adoptée dans cette étude.

