



Université Lille I
Sciences et Technologies
Ecole Doctorale **SMRE**

THÈSE

pour obtenir le titre de
Docteur de l'Université Lille I

Discipline : Physique
Spécialité : Optique et lasers, physico-chimie, atmosphère

présentée et soutenue publiquement par :
François ANQUEZ

Mort cellulaire induite *in vitro* par activation directe à 1270 nm de l'oxygène singulet

soutenue publiquement le 7 décembre 2010 devant le jury composé de :

Jacques PIETTE	Professeur - Université de Liège	Rapporteur
Antoine DELON	Professeur - Université de Grenoble I	Rapporteur
Francesco Lenci	Directeur de recherche - CNR / Pisa	Examinateur
Jaouad Zemmouri	Professeur - Université de Lille I	Examinateur
Stéphane RANDOUX	Maître de conférence - Université de Lille I	Directeur de thèse
Emmanuel COURTADE	Maître de conférence - Université de Lille I	Co-encadrant

Thèse préparée, au sein du Laboratoire de Physique des Lasers, Atomes et Molécules
(UMR 8523), Université de Lille 1,
sous la direction de Stéphane Randoux et la co-direction d'Ikram El Yazidi.

The sciences do not try to explain, they hardly even try to interpret, they mainly make models. By a model is meant a mathematical construct which, with the addition of certain verbal interpretations describes observed phenomena. The justification of such a mathematical construct is solely and precisely that it is expected to work.

John Von Neumann

Résumé

L'oxygène singulet, premier état électronique excité du dioxygène, est considéré comme l'agent cytotoxique principal de la thérapie photodynamique (PDT) dans le traitement du cancer.

En PDT, l'oxygène singulet est créé via l'activation par la lumière d'une molécule photo-sensible qui transfère son énergie au dioxygène pour conduire à l'excitation de ce dernier dans l'état singulet.

Notre étude a permis de montrer qu'il est possible par activation optique directe à 1270 nm, sans agent photosensibilisant, de l'oxygène singulet d'obtenir un stress oxydant conduisant à la mort de cellules *in vitro*. Ceci a pu être réalisé grâce au développement d'une expérience de vidéo-microscopie, de lasers de puissance accordables autour de 1270 nm et d'une mesure *in situ* de l'échauffement induit par le laser. Ces trois points seront exposés avant de présenter les preuves de l'implication de l'oxygène singulet dans la mort cellulaire par irradiation laser à 1270 nm.

Dans une seconde partie du travail, nous nous sommes intéressés à des méthodes optiques de détection de l'oxygène singulet, excité directement par absorption à 1270 nm, pouvant être exportées en microscopie.

Mots clefs : oxygène singulet, lasers, microscopie optique de cellules vivantes, thermométrie optique, stress oxydant, mort cellulaire, photophysique, photochimie, photobiologie, cinétique chimique, interface physique-biologie, comptage de photon résolu en temps.

Abstract

Singlet oxygen is the first electronically excited state of molecular oxygen. This specie is considered as the main cytotoxic agent in photodynamic therapy (PDT) of cancer.

In PDT, singlet oxygen is produced via the activation by light of a photosensitizer molecule which will transfer its energy to molecular oxygen. This process leads to the excitation of molecular oxygen into the excited singlet state.

In our study we have shown that it is possible by direct optical activation at 1270 nm (without a photosensitizer) of singlet oxygen to obtain oxidative stress that leads to cell death *in vitro*. This was done through the development of a time-lapse experiment and the creation of high power tunable laser around 1270 nm and the *in situ* measurement of laser-induced temperature elevation. These three points will be described. Then the proves of the implication of singlet oxygen in cell death induced by 1270 nm irradiation will be exposed.

In a second part of this work we studied optical methods for the detection of singlet oxygen directly, created by light absorption at 1270 nm, that could be exported to microscopy.

Key words : singlet oxygen, lasers, optical microscopy of living cells, optical thermometry, oxidative stress, cell death, photophysics, photochemistry, photobiology, chemical kinetics, physics-biology interfac, time-resolved photon counting.

Remerciements

Il me semble clair qu'un travail de thèse ne peut être réalisé par un thésard seul et l'ensemble de ce qui est présenté dans ce manuscrit est le résultat de nombre d'interactions avec des personnes rencontrées ici et là. L'heure est venue de les remercier pour leurs contributions, leurs conseils ou leur soutien, ... La liste est longue et, sans être un républicain convaincu, je dois bien avouer que celle-ci pourrait débuter dans la petite enfance, à l'école. Mais ceci nous conduirait à un catalogue ennuyeux. Donc, si vous vous considérez oublié de cette page, dites vous que vous faites partie de la liste des inclassables.

Ce travail a été réalisé au sein du laboratoire PhLAM de l'université de Lille. Je réalise maintenant la liberté et la confiance apportée aux chercheurs dans ce laboratoire. Je tiens donc à remercier son directeur Georges Wlodarczack.

Mon attention va aussi aux membres du jury qui ont accepté d'évaluer ce travail. J'ai beaucoup apprécié les questions lors de la soutenance et la rencontre qu'a constitué ce moment. Je remercie donc, le professeur Jacques Piette et le professeur Antoine Delon d'avoir accepté d'être rapporteurs de ce travail, ainsi que le professeur Francesco Lenci et le professeur Jaouad Zemouri d'avoir accepté d'être examinateurs de cette thèse mais surtout pour leur soutien chacun à leur manière.

Si l'on suit le protocole, c'est maintenant le moment de remercier le directeur de thèse. Il se trouve que j'ai bénéficié de l'encadrement de quatre personnes. Ma sincère gratitude va donc à mes quatre encadrants, Stéphane Randoux, Emmanuel Courtade, Pierre Suret et Ikram El Yazidi.

Je remercie Ikram pour avoir apporté son expérience en biologie. En plus de nous avoir transmis quelques trucs et astuces en biologie expérimentale, tu as accepté une collaboration avec des physiciens malgré la barrière de « langage » et ce, sans franchement te soucier des risques que comportait ce projet.

Emmanuel avec qui j'ai vécu le quotidien de cette aventure, a permis la mise en forme de ce travail. Sa patience et sa minutie m'ont aidé à avancer sans brûler les étapes. Les discussions scientifiques autour d'un café-clopes, ponctuées de ton humour (que je ne peux complètement relater ici ;-), restent parmi les moments très agréables de cette thèse.

Stéphane, qui a accepté de diriger cette thèse, a très souvent consenti, à l'improviste, à discuter de manips ou de calculs parfois farfelus. Ta patience et ton expérience lors de ces moments (et du développement du corporate laser), ainsi que tes mots encourageants lors de moments de doute m'ont permis d'avancer.

Pierre m'a aidé et conseillé sur nombre d'aspects. Il m'a aussi poussé, par sa rigueur, par une passion qui naît souvent de peu et par une confiance en moi qui m'a souvent semblé un peu trop grande, à mieux formaliser de nombreux aspects de ce travail. Nos conversations, au carré ou au café, ont été des moments agréables.

Vos nombreux conseils à tous les quatre ont permis la réalisation de ce travail et ont contribué à mon apprentissage. La convolution de vos réponses impulsives constitue une expérience scientifique et humaine enrichissante. Merci. Maintenant que la barrière du grade est passée, je tiens à vous considérer comme des amis, au delà de ce que peut représenter une thèse. Cette déclaration, quoique maladroite, est sincère.

Au sein du PhLAM, j'ai pu découvrir qu'une équipe de recherche n'est pas réduite à sa composition officielle. Je tiens donc à remercier l'ensemble des chercheurs et personnels (techniques et administratif) avec lesquels j'ai pu échanger.

Parmi les gens avec lesquels j'ai pu interagir, merci aux chercheurs du PhLAM, Serge, Christophe, Marc, Quentin, et bien d'autres ... pour les discussions autour, souvent, d'un café. Merci aussi aux chercheurs de l'IRI, Corentin, Aimerick, Laurent, Dave, Franck et Bernard, pour les mêmes raisons.

Parmi cette équipe au sens large, un grand merci aux équipes qui gravitent autour des chercheurs. Votre travail, souvent dans l'ombre des activités de recherche, a été pour moi un grand bol d'air.

Merci pour votre bonne humeur. Merci à l'atelier de méca de l'UFR de Physique, Laurent, Jean-Luc et Daniel, pour les nombreux dépannages et leur expérience. Merci à l'atelier d'électronique, Michel, Hervé, Thierry et Philippe pour leur disponibilité, leur bonne humeur et leur efficacité. Merci au pôle technique du CERLA, Marc et Thierry, pour leur disponibilité et leur sympathie. Merci aux équipes administrative et technique du PhLAM, de l'UFR de Physique et du CERLA, Michel (l'ancêtre), Jean, Jean-Luc, Gérard (l'autre ancêtre), le duo de peintres Laurel et Hardy, Thibault, Nathalie (la grande ;-), André, Martine, Mickaël, Christophe, Danièle, Serge, Marie-T, Nadine, Sandrine et Nathalie (la petite) pour bien plus que des services. Merci aux personnes de l'UFR, expatriés du P1, Pascale, Hervé, Cyril, Thomas, Béné et Sandrine.

Il y a les aspects scientifiques, certes. Mais il y a ceux qui sont (ou ont été) dans la même galère... et qui, de facto, vous apportent leur soutien.

Merci à Aude pour avoir rejoint l'équipe et partager la salle de manip pendant un an. A Paul et Nico, pour avoir partagé certainement plus que le bureau, et à Adriana pour m'y avoir subi.

Au début de la thèse, nous avons envisagé une émulation scientifique autour de présentations de nos travaux et de discussions : « le vendredi soir des thésards ». Ceci c'est vite transformé en apéro du vendredi et ces moments comptent parmi les instants apaisants et joyeux de ma thèse. Pour tout cela, merci à Maxence, Ludo, Constant, Clément, Elodie, Aurélie, Filipe, Julien, Nico et Paul. Lorsque les « vendredi » ont évolué de nouveaux copains sont bizarrement apparus. Merci à PecstroMan, Valérie, Pierre-Emanuel, Marie-Ange, Nazeck, Carole, Sophie, Anne, Fred, James, Cécile et Sandrine.

De cette passion commune du houblon nacquissent, soyons mielleux, des amitiés. Celle-ci ce sont traduites par des vacances à vélo dans le plat pays ou ailleurs, étrangement, sans vélo, par des road trip en direction de la Bourgogne ou de la Somme, et j'en oublie certainement... Merci donc à vous les copains, Paul, Clément, Aurélie, Filipe, Elodie et Julien. Un grand merci à Paul pour son amitié qui l'a conduit à m'aider dans la rédaction de ce manuscrit en corrigeant le peu de fautes d'orthographe qui pouvaient subsister, et à, sans vouloir être lourd, bien plus en encore...

A la fin de ce texte, les mots me manquent, mais oh gens de ma famille, soyez certains que la gratitude reste présente. Je tiens à remercier mes parents pour votre soutien et votre amour sans borne. Merci à Romain pour ton humour et, parfois, ton recul. Merci à Elise pour ta bonne humeur. Merci à Marceau pour ton innocence sans limite et ta bonne (et mauvaise) humeur rafraichissante(s). Merci à Suzanne d'avoir accepté d'attendre la fin de la rédaction pour venir au monde et aussi pour ta bonne humeur croissante depuis ce jour.

Enfin, quand je disais au début qu'un thésard ne peut réaliser seul une thèse, ce n'était pas sans avoir une pensée pour toi Marie-Eve. Tu sais que ce n'est pas mon genre d'être dithyrambique, alors ces mots ne seront que peu de choses en comparaison de ce que tu m'as apporté. Tu as rapidement compris que tu devrais me partager avec ma passion pour les sciences. Et par amour, tu as fait preuve d'une patience, et d'une dévotion dont, je dois l'avouer, je pense être incapable. Pour tout cela, merci. Il y a des mots qui ne s'écrivent pas dans un document académique, mais je t'...

Table des matières

Introduction	8
I Etude <i>in vitro</i> de la mort cellulaire induite par irradiation laser : <i>preuves du rôle central de l'oxygène singulet à 1270nm</i>	10
1 Introduction et contexte de la première partie	11
1.1 Généralités sur le stress et la mort cellulaire	11
1.1.1 Stress : définition et mécanismes principaux	12
1.1.2 Mort cellulaire : définitions	14
1.1.3 Exemples de stress cellulaires	17
1.2 Photo-Thérapie Dynamique (PDT) : stress oxydant	19
1.2.1 Généralités	20
1.2.2 Quelles sont les premières espèces réactives en PDT ?	21
1.2.3 Dosimétrie de la PDT : quantité d'oxygène singulet produite	23
1.3 Motivations, objectifs et démarche	25
1.3.1 Motivations	25
1.3.2 Objectifs : excitation optique directe à 1270 nm du dioxygène dans son premier état électronique pour obtenir un effet analogue à la PDT	27
2 Dispositif expérimental et méthodes pour l'étude de la mort cellulaire induite par irradiation laser autour de 1270 nm	30
2.1 Observation de cellules biologiques en vidéo-microscopie	30
2.1.1 Maintien des conditions physiologiques pour l'observation longue de cellules .	31
2.1.2 Dispositif expérimental pour l'irradiation laser	32
2.1.3 Diagnostic de la mort cellulaire	34
2.2 Développement de lasers de puissance autour de 1270 nm	36
2.2.1 Laser Raman à Fibre (LRF) : principe et contexte	37
2.2.2 Réalisation d'un Laser Raman Fibré accordable	40
2.2.3 Résultats : performances du laser	41
3 Détermination de l'élévation locale de température induite par le laser	44
3.1 Causes de l'échauffement et modélisation	45
3.1.1 Position du problème et notations	45
3.1.2 Equation de la chaleur	46
3.1.3 Choix des conditions aux limites	47
3.2 Mesure de température par microscopie de fluorescence	50
3.2.1 Principe de la mesure	50
3.2.2 Effet de lentille thermique	52
3.2.3 Réalisation pratique	55
3.2.4 Notion de profondeur de champ et discussion	57

3.3	Résultats	58
3.3.1	Comparaison expérience/théorie	58
3.3.2	Conclusions : peut-on éviter le stress thermique?	60
4	Mort cellulaire induite par excitation directe de l'oxygène singulet à 1270 nm	62
4.1	Mort cellulaire induite par irradiation laser à 1270 nm : preuves du rôle central de l'oxygène singulet	62
4.1.1	Mort cellulaire induite par irradiation laser à 1270 nm	63
4.1.2	Spectre d'action de l'irradiation laser autour de 1270 nm	65
4.1.3	Influence de la concentration en dioxygène dissous	67
4.1.4	Expériences complémentaires	69
4.1.5	Synthèse des résultats et conclusions	70
4.2	Effets biologiques sur les cellules MCF-7 de l'excitation directe à 1270 nm de l'oxygène singulet	71
4.2.1	Influence d'un « quencher » extracellulaire de l'oxygène singulet : les dommages sont-ils causés par excitation directe intra-cellulaire?	72
4.2.2	Eléments de dosimétrie : dose seuil d'oxygène singulet	73
4.2.3	Tests complémentaires pour le diagnostic de la mort cellulaire	76
4.2.4	Conclusions	78
 II Détection optique et études des interactions de l'oxygène singulet produit par excitation directe		81
5	Introduction et contexte de la deuxième partie :	82
5.1	Propriétés physico-chimiques de l'oxygène singulet en phase dense : dépendance avec l'environnement proche de la molécule	83
5.1.1	Transitions radiatives entre les trois premiers états électroniques du dioxygène : influence du solvant en phase dense	83
5.1.2	Désactivation non-radiative de l'oxygène singulet	85
5.2	Détection de l'oxygène singulet en phase dense	87
5.2.1	Grandeurs physiques pertinentes pour l'étude de l'oxygène singulet en milieu vivant	88
5.2.2	Détection de la phosphorescence à 1270 nm	89
5.2.3	Détection indirecte de l'oxygène singulet	91
6	Détection résolue en temps de la phosphorescence de l'oxygène singulet : expériences de comptage de photons	93
6.1	Objectifs : mesure du temps de vie de l'oxygène singulet produit par excitation directe	94
6.2	Dispositif expérimental	95
6.2.1	Dispositif expérimental	96
6.2.2	Collecter plus de photons : un compromis entre signal et saturation du détecteur	98
6.3	Calibration et limite de détection du dispositif	99
6.3.1	Détection de l'oxygène singulet excité à l'aide d'un photo-agent	99
6.3.2	Calibration et limite de détection	101
6.4	Excitation directe de l'oxygène singulet et détection de la phosphorescence à 1270 nm	102
6.4.1	Excitation directe de l'oxygène singulet	102
6.4.2	Conclusions et Perspectives	103
7	Etude Cinétique de la réaction de DPIBF avec l'oxygène singulet en solution	105
7.1	Contexte et motivations	106
7.1.1	Principe de détection de l'oxygène singulet avec DPIBF	106

7.1.2	Questions non-résolues concernant la détermination de la section efficace d'absorption à 1270 nm du dioxygène dans l'eau	107
7.1.3	Influence des micelles dans la détermination de la section efficace dans l'eau	107
7.1.4	Motivations et objectifs	108
7.2	Dispositif expérimental pour le suivi cinétique de la réaction entre DPIBF et l'oxygène singulet	110
7.2.1	Dispositif expérimental	110
7.2.2	Suivi temporel de la réaction entre DPIBF et l'oxygène singulet créé par irradiation laser à 1270 nm	111
7.2.3	Calibration : spectres et sections efficaces d'absorption de l'oxygène singulet des différents solvants organiques	112
7.3	Résultats : détermination simultanée de deux paramètres importants	113
7.3.1	Etude de la cinétique de réaction	114
7.3.2	Conclusions et perspectives	115
 Conclusions		 118
 Annexes		 121
A Protocole de culture cellulaire et de coloration des cellules		121
A.1	Culture cellulaire	121
A.1.1	Cellules MCF-7	121
A.1.2	Cellules PC12	121
A.2	Coloration et marquage	121
A.2.1	Test d'exclusion au bleu Trypan	121
A.2.2	Visualisation du noyau au Hoechst 33258	121
A.2.3	Test Annexine V - Iodure de Propidium	122
 B Le problème de Poisson avec conditions aux limites mixtes : formulation faible et résolution numérique de l'équation de la chaleur		 123
B.1	Préambule mathématique :	123
B.1.1	Formule de Stokes :	123
B.1.2	Espace Hilbertien :	124
B.1.3	Théorème de Lax-Milgram :	124
B.2	Forme variationnelle du problème de Poisson :	124
B.2.1	Le problème aux dérivées partielles :	124
B.2.2	Formulation faible :	125
B.2.3	Equivalence des deux formulations :	126
B.3	Interprétation de la formulation faible : que peut-on en tirer ?	126
B.3.1	Interprétation algébrique :	126
B.3.2	Existence et unicité de la solution :	126
B.3.3	Application à la méthode des éléments finis : Méthode de Ritz-Galerkin	127
B.4	Retour sur notre problème d'échauffement :	127
B.4.1	Cas de grandeurs définies par morceaux :	127
B.4.2	Passage en coordonnées cylindriques : prise en compte de la symétrie du problème	128

C	Profondeur de champ et contribution des plans au-dessus du plan objet en microscopie de fluorescence	129
C.1	Introduction géométrique de la profondeur de champ	129
C.2	Limite de résolution	130
C.3	Influence de la défocalisation	131
C.4	Contribution des plans précédant le plan focal objet et conclusions	133
D	Distance focale équivalente à la propagation dans un milieu d'indice parabolique : focale de la « lentille » thermique	134
D.1	Equation de propagation d'un milieu d'indice quadratique	134
D.2	Solution de l'équation quadratique	135
D.3	Matrice ABCD et distance focale équivalentes	135
E	Matériel supplémentaire : vidéos	137
E.1	Expériences d'irradiation	137
E.2	Stress hyperthermique	138
	Bibliographie	140

Introduction

Ce travail a été effectué au sein du laboratoire de Physique des Lasers, Atomes et Molécules (PhLAM), qui depuis sa création regroupe des chercheurs travaillant autour de l'interaction entre lumière et matière. Dans ces recherches, la lumière et ses interactions sont utilisées pour sonder la matière (spectroscopie et étude de la réactivité), pour la manipuler (atomes froids), pour porter l'information (photonique) ou en tant qu'objets d'étude (dynamique non-linéaire).

Cette thèse a débuté en même temps qu'un projet nouveau au laboratoire PhLAM. Ce dernier doit conduire, à terme, à l'étude biophysique du vivant par microscopie optique. Ce projet s'inscrit dans la volonté du groupe de dynamique non-linéaire de développer une activité nouvelle qui utilisera les compétences (en optique et systèmes dynamiques) de l'équipe pour l'étude de systèmes biologiques.

Pour un étudiant issu de la physique, l'étude de la biologie présente des aspects fascinants et nouveaux. En effet, contrairement aux objets inertes tels que les atomes, les cellules et les organismes vivants réagissent et s'adaptent à leur environnement d'une manière organisée qui implique la synthèse ou la modification de composés chimiques pour faire face à un événement extérieur. Cette réaction est mise en oeuvre au travers de mécanismes biochimiques régulés et auto-organisés comme la réponse au stress et/ou la mort cellulaire.

Parmi les stimuli extérieurs auxquels répondent les êtres vivants et les cellules qui les composent, la lumière tient une place importante dans nombre de mécanismes nécessaires à la coordination et la structuration du vivant. En effet, la lumière a un rôle dans des processus biologiques tels que l'horloge interne (rythme circadien) ou la synthèse de matière organique (photosynthèse).

Mais les rayonnements peuvent aussi avoir un effet délétère. Nous avons en effet tous déjà pu constater l'action sur la peau d'une exposition trop longue et trop intense au soleil. A long terme, cette exposition, en particulier aux rayons UV, est connue pour provoquer des maladies malignes comme le cancer.

Cette maladie est une prolifération incontrôlée de cellules qui forment une tumeur. Il est alors nécessaire de procéder à l'ablation ou à la destruction du corps indésirable. Pour ce faire, même si la chirurgie, la chimiothérapie ou les rayons ionisants sont les traitements les plus utilisés, la PhotoThérapie Dynamique (PDT) a fait son apparition en France dans le courant des années 1990 pour les traitements de « petits » cancers de la peau ou de la DMLA¹.

La PDT associe l'utilisation d'un médicament photo-sensible et de lumière pour conduire à la destruction du tissu indésirable. L'activation du photo-agent mène à la formation d'espèces chimiques réactives qui provoquent un stress cellulaire, dit oxydant, qui peut lui même provoquer la mort des cellules.

Parmi les facteurs chimiques responsables du stress oxydant en PDT, le dioxygène dans son premier état électronique excité, l'oxygène singulet², est considéré comme l'agent cytotoxique principal. C'est un état métastable et réactif.

Dans ce travail nous nous sommes intéressés à l'étude d'une possibilité alternative à la PDT. Nous avons envisagé la possibilité d'exciter directement le dioxygène pour conduire à la formation d'oxygène singulet *via* la transition radiative naturelle à 1270 nm entre les deux états de cette molécule : c'est à dire sans agent photoensibilisant par l'action seule de la lumière. En principe, la formation d'oxygène singulet doit conduire à un stress cellulaire dont l'action sur les cellules sera analogue à celle observée en PDT.

Ce manuscrit est scindé en deux parties. La première partie de ce travail est consacrée, outre à la mise en place de moyens d'étude de cellules en culture qui n'existaient pas au laboratoire au début de ma thèse, à l'étude de la réponse de cellules *in vitro* à une irradiation laser à 1270 nm

¹La Dégénérescence Maculaire Liée à l'Age (DMLA) est une maladie qui provoque une déformation du champ visuel. Dans certain cas, elle est due à l'apparition de vaisseaux sanguins sous la rétine.

²Notons que la dénomination « oxygène singulet » est tirée de l'anglais « singlet oxygen ». En anglais, le dioxygène est nommé « molecular oxygen » et le terme « singlet oxygen » s'est imposé pour désigner son premier état électronique excité. En français, ce terme s'est exporté pour désigner ce même état : « le premier état électronique excité, singulet de spin, du dioxygène ».

coïncidant avec la transition radiative entre l'état fondamental du dioxygène et l'oxygène singulet. Cette transition étant interdite à l'ordre dipolaire électrique, la création d'oxygène singulet par ce moyen est très peu efficace.

Nous commencerons dans le chapitre 1 par préciser le contexte et les motivations de ce travail de thèse en définissant les notions de stress et mort cellulaire et en décrivant le principe de la PDT.

Nous nous intéresserons ensuite au dispositif et aux méthodes expérimentales que j'ai mis en place pour assurer l'observation de cellules *in vitro* ainsi que le maintien des conditions physiologiques des cellules en culture pendant les expériences. En particulier, nous présenterons le développement d'un incubateur miniature destiné à l'observation de cellules par microscopie. Nous aborderons aussi la description de sources laser à 1270 nm que nous avons conçues et développées pour induire un stress oxydant analogue à la PDT. La réalisation d'un laser accordable destiné à l'irradiation à 1270 nm de cellules *in vitro* sera exposée.

La température est un des paramètres important dans le maintien des conditions physiologiques de cellules en culture, même si cette grandeur a pu facilement être contrôlée *via* l'utilisation de la chambre de culture réalisée, l'irradiation laser peut induire un échauffement local susceptible de conduire à un stress hyperthermique concurrent du stress oxydant que nous envisageons. Le troisième chapitre de la première partie du manuscrit est donc consacré à la détermination *in situ* de l'élévation de température induite par le laser à 1270 nm.

Enfin, le chapitre 4 est consacré aux résultats que nous avons obtenus concernant l'effet de l'irradiation à 1270 nm sur les cellules *in vitro*. Notre travail donne, à notre connaissance, pour la première fois la preuve qu'il est possible, sans photo-agent, *via* la transition radiative à 1270 nm du dioxygène, de produire une quantité suffisante d'oxygène singulet pour induire une réponse des cellules telle que la mort cellulaire. Les preuves d'un effet lié à la création d'oxygène singulet seront présentées et la dose de lumière à 1270 nm minimum nécessaire pour induire la mort cellulaire sera évaluée.

Pour la compréhension et l'étude des interactions de l'oxygène singulet dans une phase dense comme la cellule, la détection de cet état s'avère nécessaire. La seconde partie de ce manuscrit est consacrée à des expériences, complémentaires à celles de la première partie, que nous avons menées tant pour détecter optiquement l'oxygène singulet dans des solutions à température et pression standard, que pour étudier ses interactions avec d'autres molécules dans de telles solutions.

Le chapitre 5 est une introduction bibliographique à cette deuxième partie. Nous présenterons, en particulier, les transitions radiatives entre les trois premiers états du dioxygène et l'influence du solvant sur ces transitions. Les processus non radiatifs impliquant l'oxygène singulet seront exposés et ceci nous conduira à dégager les grandeurs physico-chimiques reflétant son comportement en phase dense.

Comme nous l'avons déjà évoqué, la transition radiative à 1270 nm entre l'état fondamental et le premier état électronique excité du dioxygène (oxygène singulet) est interdite à l'ordre dipolaire électrique en absorption (création d'oxygène singulet) comme en émission (désexcitation de l'oxygène singulet). Cependant la détection de l'oxygène singulet par émission d'un photon à 1270 nm a déjà pu être réalisée dans un milieu vivant. Cette méthode a permis des avancées dans la dosimétrie de la PDT traditionnelle et donne une mesure du temps de vie de cet état en cellule. Dans le chapitre 6 nous présenterons le dispositif expérimental que j'ai mis en place pour détecter l'oxygène singulet *via* sa phosphorescence à 1270 nm. Les moyens envisagés pour produire l'oxygène singulet, sans photo-agent, par excitation directe et aussi détecter sa phosphorescence seront exposés et discutés.

Enfin, dans le chapitre 7, nous présenterons une seconde méthode de détection de l'oxygène singulet que nous avons mise en place. Dans cette expérience, l'oxygène singulet, produit en solution sans photo-agent par irradiation laser à 1270 nm, est détecté à l'aide d'un piège chimique spécifique, DPIBF. Nous présenterons le contexte de cette étude et les résultats obtenus concernant la détermination simultanée de deux paramètres importants dans la réaction de l'oxygène singulet avec DPIBF.

Première partie

Etude *in vitro* de la mort cellulaire
induite par irradiation laser :
*preuves du rôle central de l'oxygène
singulet à 1270nm*

Chapitre 1

Introduction et contexte de la première partie

Ce travail de thèse s'inscrit dans le contexte des thérapies de cancer. Cette maladie, d'origine génétique, est caractérisée par une prolifération incontrôlée de cellules anormales [1].

Dans la nature, les cellules peuvent subir une altération de leur information génétique qui détermine leur devenir (mutations,...). Soumis à ce phénomène à l'échelle de milliards de cellules, les organismes mammifères protègent leur intégrité par un ensemble de processus dont la suppression des cellules anormales par un mécanisme de mort cellulaire programmée [1].

Les cellules cancéreuses ont, quant à elles, toutes perdu cette faculté à auto-induire leur mort et se divisent alors anormalement, conduisant à la formation d'un groupement de cellules malades : la tumeur. On distingue deux principales catégories de cellules tumorales. Certaines présentent une sur-expression de gènes, dits oncogènes, qui sont impliqués dans la régulation positive de prolifération cellulaire [1]. D'autres cellules, à l'inverse, voient leurs gènes, dits répresseurs de tumeur, sous-exprimés [1].

Un des principaux dangers d'un cancer dépisté tardivement est la formation de métastases, c'est à dire, la propagation de cellules tumorales dans une autre partie du corps [1]. Une stratégie thérapeutique consiste donc à éliminer, suffisamment tôt, des cellules tumorales à l'aide d'agents cytotoxiques pouvant conduire à la mort de ces cellules.

Comme nous le verrons, la photo-thérapie dynamique est une méthode de traitement des cancers qui associe l'utilisation de la lumière et d'un médicament photo-sensible [2]. L'action combinée de ces deux agents conduit à un stress, dit oxydant, capable d'induire la mort cellulaire.

Cette partie du manuscrit présente la contribution de ce travail de thèse à l'étude d'une possibilité alternative à la photo-thérapie dynamique. Cette possibilité consiste en l'utilisation de lumière laser qui pourrait, seule, conduire à la création d'une espèce cytotoxique : l'oxygène singulet. Cette entité est considérée comme l'agent cytotoxique principal responsable du stress oxydant en photo-thérapie dynamique [2].

Nous commencerons par donner la définition, en biologie, du stress cellulaire. Dans ce contexte la réponse biochimique de la cellule au stress et, en particulier, la notion de mort cellulaire seront précisées.

Puis les principes généraux de la thérapie photo-dynamique seront présentés. Nous nous concentrerons sur les premières espèces réactives qui induisent la mort cellulaire et les questions ayant trait à la dose de traitement.

Enfin, les motivations et objectifs de cette partie du travail de thèse seront exposés.

1.1 Généralités sur le stress et la mort cellulaire

Avant d'entrer dans le vif du sujet, j'ai choisi, dans cette section, d'exposer brièvement et modestement le contexte biologique de ce travail de physique. Les notions de biologie abordées ici nous ont servi de cadre de travail. Elles ont fourni des pistes de réflexion dans la genèse du projet sans pourtant être au coeur de ce qui sera exposé dans le manuscrit.

Cette section ne se veut ni exhaustive ni précise, elle ne s'intéresse d'ailleurs qu'à l'échelle cellulaire. Ce qui suit permettra, je l'espère, au non-spécialiste de se familiariser avec certaines notions de biologie et servira à replacer le travail dans un contexte plus général.

Nous commencerons par aborder la notion de stress cellulaire. Celle-ci, assez vague pour s'en faire une idée intuitive, mérite une définition précise du point de vue biochimique. Les mécanismes généraux de la réponse cellulaire au stress seront exposés. Notre travail prend place dans le contexte particulier des thérapies de cancers. Il s'agit de produire un stress suffisant pour conduire à la mort des cellules cancéreuses. C'est pourquoi nous nous attarderons quelque peu sur la mort cellulaire, avant de préciser deux types particuliers de stress qui nous intéresseront dans la suite de ce mémoire : les stress oxydant et thermique.

1.1.1 Stress : définition et mécanismes principaux

Le stress cellulaire peut être de natures très variées (mécanique, thermique, chimique ...). De manière générale, il s'agit d'une perturbation du fonctionnement de la cellule par son environnement proche : « quelque chose » modifie, empêche ou ralentit l'activité biochimique de la cellule. Il s'agit d'un bouleversement de l'équilibre homéostatique¹.

Généralités :

Rigoureusement, le stress cellulaire est l'induction d'une modification, conformationnelle (structure) ou chimique (fonction), des macromolécules² qui composent la cellule [3, 4].

Les macromolécules sont des molécules géantes jouant un rôle crucial dans la biochimie de la cellule. Citons par exemple, l'Acide DésoxyriboNucléique (ADN) molécule en forme de double hélice bien connue qui contient l'information génétique. Il s'agit d'un ensemble de séquences de nucléotides : les gènes.

Chaque séquence génique code pour une protéine [1] qui est aussi une macromolécule. Les protéines ont, contrairement à l'ADN, un rôle actif dans la biochimie de la cellule. Elles interviennent à la fois dans la structure de la cellule (ex. l'actine), la signalisation (ex. P53) ou la catalyse des réactions biochimiques (ex. enzymes). Les protéines présentent jusqu'à quatre niveaux de structuration. Ce sont des chaînes polypeptidiques, formées d'une séquence d'acides aminés (structure primaire) qui donnent lieu à une conformation tridimensionnelle locale (structure secondaire) et globale (structure tertiaire) de la cellule. Plusieurs chaînes polypeptidiques peuvent être associées par des liaisons non-covalentes pour former la structure quaternaire [1].

Enfin, les phospholipides peuvent aussi être considérés comme des macromolécules. Ce sont des molécules composées d'une partie hydrophobe et d'une extrémité hydrophile. Ils sont, par exemple, à la base de la structure de la membrane plasmique [1].

L'altération de ces macromolécules peut induire une modification du fonctionnement de la cellule et souvent un déséquilibre de son homéostasie. Par exemple, on comprend aisément qu'une modification chimique d'une des bases de l'ADN entraîne une perturbation du code génétique qui peut conduire à la perte de l'information codée ou à la modification de cette information [5].

De même, la dénaturation des protéines, souvent par modification de leur conformation tridimensionnelle, peut les rendre inactives et donc inutiles voire toxiques [6, 7].

Enfin, à titre d'exemple, l'oxydation des phospholipides membranaires peut induire un changement d'ordre mécanique sur la membrane et conduire à une modification des propriétés physico-chimiques des protéines transmembranaires [8].

L'ensemble des modifications citées ici n'est, bien sûr, pas exhaustif. Mais il donne un aperçu des dommages possibles sur les macromolécules de la cellule.

¹L'homéostasie est le maintien des conditions physiologiques nécessaires au bon fonctionnement de la cellule malgré des fluctuations des paramètres extérieurs.

²Les macromolécules sont des molécules géantes composées d'un assemblage de sous unités, molécules plus petites.

Les principaux mécanismes de la réponse cellulaire au stress

Consécutivement à un stress de nature donnée, la cellule réagit et engendre un ensemble d'opérations destinées à la protéger. Celles-ci sont en général déclenchées par des macromolécules spécifiques et/ou une production importante et rapide de petites espèces chimiques réactives : les radicaux libres. Le tout constitue un signal chimique de stress.

Si l'on pouvait conférer un but à la machinerie cellulaire de réponse au stress, ce serait de protéger les cellules viables [3, 4]. Hormis la mort cellulaire, qui sera discutée au paragraphe 1.1.2, la réponse cellulaire à un stress de nature quelconque implique quatre mécanismes principaux et génériques que nous allons succinctement décrire ici.

Les points de contrôle du cycle cellulaire : Un des effets du stress cellulaire est l'arrêt de la prolifération et de la croissance de la cellule. Au cours de son cycle, la cellule dispose de plusieurs étapes, nommées points de contrôle du cycle. A chaque étape, l'intégrité des macromolécules et l'accomplissement de certains processus cellulaires sont vérifiés avant d'initier la phase suivante du cycle [9]. En fait, une meilleure représentation consisterait plutôt à considérer que le déclenchement des phases du cycle cellulaire est induit par des signaux dépendant des mécanismes de contrôle.

Ces points de contrôle sont présents entre chaque phase du cycle cellulaire et sont régulés par un grand nombre de protéines [10, 11]. Ce mécanisme permet de conserver l'énergie et d'utiliser les métabolites ³ pour la réparation des macromolécules endommagées.

Réparation des dommages aux macromolécules : En cas de dommage, des mécanismes de réparation des composants nécessaires au fonctionnement de la cellule, comme par exemple le cytosquelette, sont enclenchés [12]. Un des mécanismes les plus connus et étudiés est certainement la réparation des dommages à l'ADN. Lorsque les bases ou la structure de l'ADN sont endommagées, la cellule peut opérer une réparation du matériel génétique.

Plusieurs mécanismes peuvent, selon le type de dommage, être mis en oeuvre. Souvent, le remplacement d'un fragment d'ADN endommagé se fait par copie du brin complémentaire, qui n'est *a priori* pas endommagé et qui sert alors de modèle [13].

Transcription des protéines de choc thermique (HSPs) : La transcription des protéines de choc thermique (ou Heat Shock Proteins (HSP) en anglais) constitue le premier mécanisme identifié de défense de la cellule [14]. Elle constitue une réponse rapide à des contraintes extérieures [15].

Contrairement à ce qu'indique leur nom, les HSPs ne sont pas seulement impliquées dans le stress thermique. La plupart d'entre elles jouent le rôle de chaperons moléculaires [16] dont le rôle est soit de maintenir la conformation des protéines dénaturées, soit de participer à la reconnaissance et la dégradation des protéines dépliées et agrégées [17, 18].

Suppression des débris macromoléculaires : La cellule procède à l'élimination des débris moléculaires à l'aide du protéasome. C'est un complexe protéique capable de « découper » les protéines. Les acides aminés sont alors recyclés par la cellule pour former de nouvelles protéines [19].

Les mécanismes résumés ici sont finement régulés par des voies transductionnelles⁴ et transcriptionnelles⁵. Ces voies de régulations sont interconnectées et dépendent du type de dommage et du type cellulaire [3, 4].

³Les métabolites sont des molécules élémentaires synthétisées ou non par la cellule servant de « briques de base » à la construction de macromolécules.

⁴En biologie cellulaire, la transduction désigne le mécanisme d'intégration d'un signal d'origine extracellulaire par une cellule.

⁵La transcription est, en biologie cellulaire, le mécanisme de copie de l'information génétique dans le noyau qui donnera lieu, dans le cytoplasme, à la traduction (processus par laquelle sont créées les protéines).

1.1.2 Mort cellulaire : définitions

Définir la mort cellulaire n'est pas chose aisée. Selon certains auteurs, ce terme désigne, dans la littérature scientifique, aussi bien un ensemble de processus qu'un état final de la cellule [20].

Le concept de mort cellulaire fut introduit pour la première fois en 1858 par Virchow [21]. A cette époque, il n'y avait pas de description microscopique du phénomène, mais le sujet était traité à l'échelle du tissu. On distinguait plusieurs processus différents désignés sous les termes dégénérescence, ramollissement, nécrose ou mortification [21, 22]. On constate, qu'à cette époque, on pouvait déjà caractériser plusieurs types de morts ainsi que plusieurs processus biologiques y conduisant.

Aujourd'hui, malgré les avancées de la biologie moléculaire, la situation est toujours aussi complexe. La raison de cette difficulté à définir la mort cellulaire réside peut-être dans le fait qu'historiquement la distinction entre les deux types de mort les plus courants (apoptose et nécrose) a été arrêtée sur des critères morphologiques [23]. Aujourd'hui, on sait que les voies de régulation menant aux deux « principaux » types de mort peuvent être intimement liées [24–26].

Je dois avouer que le débat dépasse largement le cadre de mes compétences en biologie. Cependant, après avoir introduit la mort cellulaire dans le contexte du stress cellulaire, je vais essayer d'en donner un aperçu. L'objectif de cette section est de préciser les moyens de diagnostiquer la mort cellulaire. Nous nous baserons sur les recommandations du « Nomenclature Committee on Cell Death » (NCCD) [24].

La mort cellulaire comme réponse au stress

La mort cellulaire peut faire partie du développement ou de l'évolution normale d'un organisme. Elle sculpte ou élimine certaines structures en ajustant le nombre de cellules nécessaires aux tissus ou en éliminant des cellules néfastes ou endommagées [27]. Il s'agit alors de morts dites génétiquement programmées.

Elle est aussi une réponse à un stimulus extérieur. Cette stimulation perturbant l'équilibre biochimique de la cellule est qualifiée de stress.

De manière générale, la mort semble survenir à la suite d'un stress lorsque les capacités de protection et de réparation des dommages cellulaires sont surpassées [4, 28].

D'autre part, les mécanismes conduisant à la mort cellulaire sont sujets à une régulation biochimique. Celle-ci implique parfois des signaux liés aux mécanismes de protection de la cellule cités au paragraphe 1.1.1. Par exemple, certains chaperons moléculaires peuvent avoir des effets anti-apoptotiques [29].

Lors d'un stress, des mécanismes « mesurant » les dommages macromoléculaires et les réparations doivent permettre à la cellule de « choisir » entre mort cellulaire et réparation [4]. Ce type de mécanisme de contrôle peut être géré par des boucles de rétroaction comme l'illustre le réseau de régulation p53/Mdm2 [30–33]. Dans ce cas on peut observer des oscillations dans l'expression de p53, une protéine pro-apoptotique induite lors de dommages à l'ADN. Son expression induit celle de son propre répresseur : Mdm2. Si les dommages ne sont pas trop importants, p53 peut être réprimée en évitant ainsi la mort cellulaire et en permettant un délai pour la réparation. Si les dommages persistent p53 est alors de nouveau exprimée, et ainsi de suite... soit jusqu'à la réparation totale des dommages soit jusqu'à la mort cellulaire.

Les types de mort cellulaire

Trois principaux types de mort cellulaire sont reconnus. La classification est essentiellement basée sur des critères morphologiques. Ces critères sont illustrés à la figure 1.1.

Les éléments exposés ci-dessous ne sont pas restrictifs. Il arrive même que la mort cellulaire présente une morphologie comprenant des traits présents dans les différents types de mort. Par

exemple, on peut observer en même temps des caractéristiques de la nécrose et de l'apoptose [24]. En fait, la frontière entre les différents types de mort n'est pas figée.

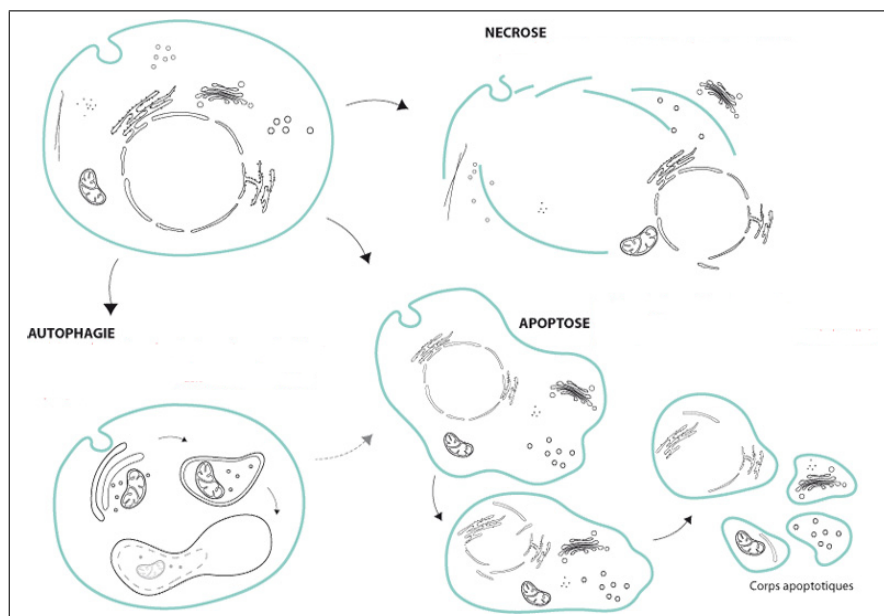


FIG. 1.1 – Représentation schématique de la morphologie des trois principaux types de mort cellulaire, apoptose, autophagie et nécrose, reproduit avec l'aimable permission de Patrick Goubau, disponible sur http://www.afd-ld.org/~fdp_viro/content.php?page=interaction.

Apoptose : De manière inexacte, on confond souvent apoptose et mort cellulaire programmée. Ce dernier terme sous-entend que la mort est prévue génétiquement comme une évolution normale du tissu dans le cas par exemple du développement ou du vieillissement. Il existe certains cas pour lesquels le terme « programmé » paraît inadéquat notamment dans le cas du stress, lorsque la mort est due à un agent cytotoxique⁶ [24]. Il faut distinguer le terme « programmée », qui désigne la faculté de la cellule à s'éliminer lorsqu'elle est anormale, de « biochimiquement régulé » qui désigne l'implication de processus pouvant être interrompus ou modulés.

Le terme « apoptose » a été proposé par Kerr *et al.* pour décrire une succession de changements morphologiques conduisant à la mort cellulaire [23]. On distingue [34] :

- la formation de protubérances membranaires,
- la perte de volume cellulaire,
- la condensation de la chromatine⁷ et la fragmentation de l'ADN,
- la modification de la membrane (pour la phagocytose),
- la formation de corps apoptotiques (« découpage » de la cellule) et digestion par les macrophages.

Les principales réactions hydrolytiques⁸ sont catalysées par une famille d'enzymes nommées « caspases » [35, 36]. Ces caspases sont activées par deux voies principales, l'une intrinsèque et l'autre extrinsèque. Les deux voies sont liées [34] comme l'illustre la figure 1.2 (b).

La voie extrinsèque est induite par l'activation de récepteurs membranaires comme FAS ou TNFR à la suite d'un signal externe [34]. La voie intrinsèque est, quant à elle, issue d'un signal intra-cellulaire suite à des dommages à l'ADN par exemple [34].

Après la phase d'initiation les deux voies conduisent à une phase dite d'exécution pendant laquelle les changements morphologiques deviennent évidents [35, 36].

⁶Ici, cytotoxique désigne des espèces chimiques capables d'altérer les propriétés de la cellule.

⁷La chromatine est la forme sous laquelle se présente l'ADN dans le noyau entre deux divisions successives.

⁸L'hydrolyse désigne la décomposition en milieu aqueux d'une molécule par réaction avec une molécule d'eau.

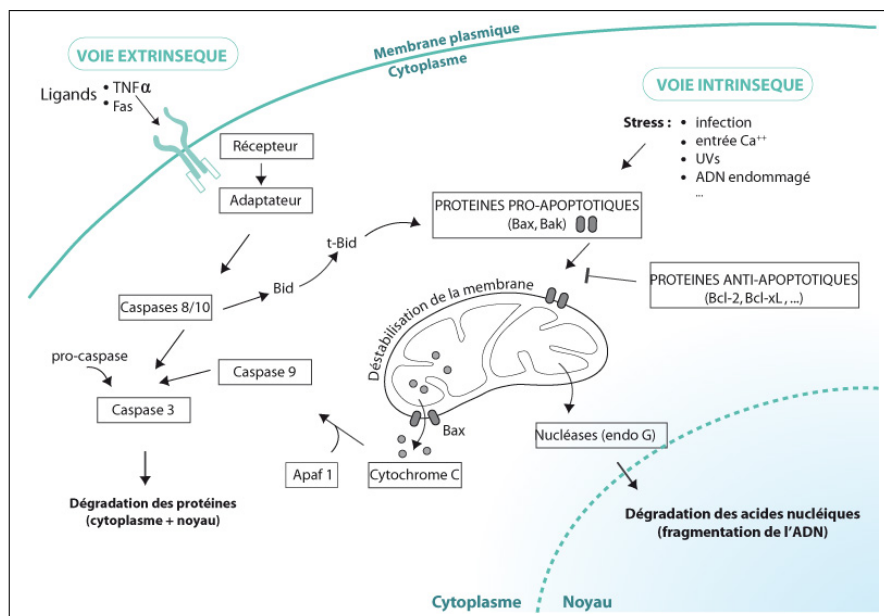


FIG. 1.2 – Représentation schématique des principales voies d'activation de l'apoptose, reproduite avec l'aimable permission de Patrick Goubau, disponible sur http://www.afd-ld.org/~fdp_viro/content.php?page=interaction.

Autophagie : L'autophagie ressemble à une auto-digestion de la cellule. Elle a aussi une définition morphologique. Il s'agit d'une mort cellulaire qui s'accompagne d'une forte vacuolisation de la membrane plasmique sans condensation de la chromatine [24]. Les vacuoles contiennent des organites cytoplasmiques dégénérés ou du cytosol [37] et sont distinguables des vésicules en microscopie électronique.

L'autophagie peut, par exemple, être un processus de mort cellulaire programmée induite par des agents connus comme pro-apoptotiques [38].

Nécrose : La nécrose est habituellement considérée comme un type de mort cellulaire ne présentant pas de signes d'apoptose ou d'autophagie [24]. Elle s'accompagne souvent *in vivo* d'une inflammation des tissus environnants.

Ce type de mort est depuis longtemps considéré comme brutal et accidentel par opposition à l'apoptose. On sait aujourd'hui que cette conception n'est pas exacte. En effet, plusieurs travaux récents ont montré que ce type de mort peut être finement régulé [25]. Il peut même, par exemple, impliquer l'activation d'une voie apoptotique faisant intervenir la sous-unité caspase8/BID du schéma 1.2 [26].

Certains auteurs proposent une description morphologique de la nécrose par opposition à l'apoptose et l'autophagie [34]. On distingue :

- un gonflement de la cellule,
- une légère fragmentation de l'ADN et une condensation de la chromatine,
- un déchirement de la membrane plasmique,
- un déversement du cytosol dans le milieu extracellulaire.

Diagnostiquer la mort cellulaire

On vient de voir que la mort cellulaire est précédée par de nombreux changements morphologiques différents définissant ainsi plusieurs types de mort. Ajoutons que de nombreux processus peuvent conduire aux mêmes modifications. Dans ce contexte, il semble périlleux, en particulier pour un non-spécialiste, de s'aventurer à diagnostiquer la mort cellulaire. D'autant qu'aucun mécanisme biochimique n'a, pour l'instant, pu faire consensus dans la communauté scientifique pour marquer

un point de non-retour dans le mécanisme conduisant à la mort cellulaire par apoptose [24]. Cependant cette notion de « point de non-retour » permet de s'accorder sur une définition aussi précise que possible.

Le NCCD préconise au moins l'un des trois critères indépendants suivants pour déclarer une cellule morte [24] :

1. perte de l'intégrité de la membrane plasmique indiquée par des colorants vitaux *in vitro*,
2. fragmentation complète de l'ADN,
3. le corps ou les fragments de la cellule ont été engouffrés par les cellules voisines.

Dans la suite de ce manuscrit nous utiliserons cette définition et le terme mort cellulaire désignera le fait qu'au moins un des trois critères est observé. Les méthodes de diagnostic seront précisées au paragraphe 2.1.3.

Enfin, concernant le type de mort cellulaire, le NCCD préconise de préciser la nature du test effectué pour diagnostiquer le type de mort plutôt que d'utiliser les termes « apoptose » ou « nécrose » sans avoir identifié le(s) mécanisme(s) de régulation(s) ou les symptômes au niveau moléculaire [24].

1.1.3 Exemples de stress cellulaires

Nous allons nous attacher ici à définir et décrire succinctement deux types de stress qui ont trait à mon travail de thèse. L'objectif de ce travail est d'induire un stress oxydant par irradiation laser de cellules vivantes. Le stress thermique est un stress inhérent à l'utilisation du laser car un faisceau intense induit un échauffement du milieu de culture et donc au niveau des cellules. Ainsi, dans nos expériences, le stress thermique peut agir de manière concomitante au stress oxydant.

Le Stress oxydant

Les radicaux libres⁹ et leurs premiers dérivés jouent un rôle privilégié dans la biochimie de la cellule. Parmi eux, on distingue la famille des Espèces Réactives de l'Oxygène (ERO) dans laquelle on classe par exemple l'anion superoxyde ($O_2^{\bullet-}$), le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) ou le radical hydroxyle (HO^{\bullet}) [39–41]. Ces ERO sont toutes des formes oxydées (à divers degrés d'oxydation), protonnées ou non, du dioxygène. Certains auteurs y ajoutent l'oxygène singulet parce qu'il a un effet biologique analogue¹⁰, premier état électronique excité du dioxygène. Cet état du dioxygène est au coeur de mon travail de thèse.

La famille des ERO joue un rôle paradoxal dans la biochimie de la cellule. Ces espèces sont à la fois partie prenante de la signalisation cellulaire ou de la machinerie mitochondriale de respiration et peuvent à hautes doses devenir toxiques pour les macromolécules chez les plantes comme chez les mammifères [40–43].

En effet, on trouve les ERO impliquées dans des processus biochimiques normaux comme la chaîne mitochondriale de transport des électrons servant à la synthèse de l'ATP¹¹. Les ERO jouent aussi un rôle dans la transduction (amplification) de signaux cellulaires, souvent en brisant l'équilibre chimique entre les formes oxydée et réduite d'une même espèce [40].

Le lecteur intéressé par une revue des sources et implications endogènes des ERO pourra se reporter au livre de Jacques Delattre, Jean-Louis Beaudeau et Dominique Bonnefont-Rousselot [40].

⁹Un radical est une espèce chimique présentant un électron libre sur sa couche externe (non respect de la règle de l'octet). Ce sont des formes instables. Ils sont à distinguer de l'ion : si les électrons de la liaison sont répartis équitablement entre deux atomes de manière à respecter la règle de l'octet, on parle d'ion, alors que dans le cas du radical l'un des atomes capte les deux électrons de la liaison.

¹⁰L'oxygène singulet n'est pas à proprement parler un radical.

¹¹L'ATP, adénosine triphosphate, peut être considérée comme l'unité élémentaire d'énergie de la cellule [40]. Elle est aussi impliquée dans la synthèse de l'ARN qui est une molécule similaire à l'ADN servant de copie du matériel génétique dans la synthèse des protéines [1].

D'autre part, les ERO peuvent causer des dommages aux macromolécules de la cellule, comme par exemple à l'ADN [44] ou aux phospholipides [45].

Pour « lutter » contre les effets toxiques des radicaux libres liés à l'oxygène, la cellule met en oeuvre un mécanisme de protection par l'intermédiaire d'antioxydants enzymatiques, comme la superoxyde dismutase¹² ou non-enzymatiques comme le glutathion ou la vitamine E [40].

Il existe un équilibre chimique entre les espèces oxydantes et anti-oxydantes, qualifié d'homéostasie redox. Les concentrations des ERO endogènes sont régulées par, à la fois leur taux de production, et leur taux d'élimination (lui même régulé par la concentration d'espèces anti-oxydantes) [40].

Un déséquilibre permanent dans la balance oxydants-antioxydants est responsable ou impliqué dans de nombreuses pathologies, comme la maladie d'Alzheimer, la maladie de Parkinson, le diabète ou certains cancers [40, 42]. C'est aussi une des conséquences physiologiques du vieillissement.

A contrario, un déséquilibre temporaire, induit par des agents exogènes, est souvent utilisé dans les thérapies visant à obtenir la mort de cellules indésirables, comme les thérapies de cancers. Par exemple, les rayons ionisants induisent des ERO en radiothérapie [46, 47]. Enfin, la photo-thérapie dynamique, intimement liée à ce travail, conduit à la production d'ERO, comme l'oxygène singulet ou les peroxydes [2, 48, 49].

Le Stress hyperthermique : 40 – 47°C

La température normale des cellules des mammifères se situe autour de 37°C. C'est la température utilisée pour la culture des cellules *in vitro*. En deçà (hypothermie : < 30°C) ou au-delà (hyperthermie : 40 – 47°C, ablation thermique : > 50°C), on peut observer des effets cytotoxiques pouvant aller jusqu'à la mort des cellules [50, 51].

Selon la gamme de température, la nature du stress et les effets sur les macromolécules sont très différents. Nous n'allons considérer ici que la gamme de températures, qualifiée d'hyperthermique, comprise entre 40°C et 47°C.

En effet, entre 30°C et 40°C, aucun effet notable sur la survie des cellules ou sur les macromolécules n'a été observé [51]. Au delà de 49°C, les dommages causés à la cellule sont physiques et irréversibles. Ils relèvent plus de la physique de la matière molle que de la biologie. Des températures au delà de 50°C sont d'ailleurs utilisées pour l'ablation thermique [50].

Les principaux effets de l'hyperthermie sur les cellules : La propriété de la cellule la plus touchée par hyperthermie est certainement la croissance. Celle-ci est accélérée par l'augmentation de la température jusqu'à un maximum après lequel la croissance est fortement inhibée [51]. Signalons que de manière générale, les cellules en phase S du cycle sont très sensibles à l'hyperthermie [50].

Au niveau moléculaire, des effets de dépliement des protéines dans la gamme de températures 40 – 47°C ont pu être mis en évidence [51]. Ceci implique l'exposition des groupes hydrophobes qui peuvent alors interagir et conduire à la formation d'agrégats. En principe, ces effets sur les protéines sont réversibles en présence de chaperons moléculaires comme HSP70 [52, 53]. Par contre, dans la gamme de températures associée à l'ablation thermique (50 – 60°C) les protéines sont irréversiblement dénaturées [54].

Bien qu'au-delà de 50°C des dommages à l'ADN aient pu être prouvés [55], dans la gamme de températures de l'hyperthermie (40 – 47°C) aucun dommage ADN n'a pu être décelé par mesure directe [56]. Des travaux ont cependant reporté la formation par hyperthermie de foyers d'histones γ H2AX suggérant des dommages à l'ADN [57].

Généralités sur la mort cellulaire par hyperthermie : Les causes précises de la mort cellulaire dans la gamme de températures associée à l'hyperthermie (40–47°C) restent à ce jour mal connues [50, 54]. Cependant, il existe des modèles mathématiques semi-empiriques, qui décrivent la fraction de cellules

¹²La superoxyde dismutase catalyse la dismutation du superoxyde $O_2^{\bullet-}$ en dioxygène O_2 et peroxyde d'hydrogène H_2O_2 .

pouvant survivre à une exposition à une certaine température pendant un temps donné. Ces modèles donnent des résultats en bon accord avec l'expérience [50].

De manière générale, les effets sur la mort cellulaire *in vitro* d'un stress hyperthermique sont très dépendants de la température et du temps d'exposition à cette température (dose de stress hyperthermique). Par exemple pour des cellules de type HeLa, à 41°C , on observe à peine 15% de mort cellulaire pour près de 6 heures d'exposition [58,59], alors qu'à 45°C , il faut moins d'une heure pour réduire la fraction de cellules vivantes à moins de 1% [59].

On distingue, au sein de la gamme de températures associée à l'hyperthermie, deux régions aux comportements différents. Les modèles mathématiques et les expériences suggèrent une transition, un changement de comportement, autour de $42 - 43^\circ\text{C}$ [51].

Pour des températures comprises entre 43 et 47°C , la fraction de cellules survivantes décroît exponentiellement avec le temps d'exposition à une température donnée [50].

Pour des températures modérées (entre 40 et $42 - 43^\circ\text{C}$), on observe une décroissance beaucoup moins prononcée : le taux de mortalité¹³ des cellules est environ 100 fois plus grand à 47°C qu'à 42°C ¹⁴. De plus, en-dessous de $42 - 43^\circ\text{C}$, la fraction de cellules survivantes montre un plateau au-delà d'un certain temps d'exposition : les cellules développent, par rapport au stress hyperthermique, une tolérance dite chronique [50].

Cette transition autour de $42 - 43^\circ\text{C}$, observée sur la survie d'une population de cellules *in vitro*, est corroborée par la réponse au stress thermique à l'échelle d'une seule cellule. En effet, au niveau moléculaire, on observe un mécanisme de réponse au stress thermique qui est, à une température modérée ($\sim 42^\circ\text{C}$), réversible à l'échelle de la transcription de protéines de choc thermique (HSP) [61,62]. Si le stress n'est pas prolongé, la cellule survit.

Enfin, notons que l'hyperthermie est utilisée dans certains pays pour le traitement des cancers. Cette méthode de traitement est mise oeuvre, soit en combinaison d'autres traitements pour ses propriétés de sensibilisation aux radiations [63], soit seule pour l'effet fatal qu'elle peut induire sur les cellules [64]. Certains de ces traitements utilisent les lasers pour le traitement local de tumeurs [65].

1.2 Photo-Thérapie Dynamique (PDT) : stress oxydant

Dans cette section, nous allons introduire la Photo-Thérapie Dynamique (PDT) qui est un traitement de maladies malignes cliniquement utilisé depuis le début des années 1990 [2]. Cette thérapie est basée sur l'utilisation combinée de deux agents individuellement non-toxiques, une molécule Photo-Sensible (*PS*) et la lumière, qui, ensemble, conduisent à la création d'ERO toxiques pour les cellules et tissus.

Une part des effets de la PDT est due à la production d'oxygène singulet, le premier état électronique excité du dioxygène [66]. La première partie de mon travail de thèse consiste en l'étude d'une possibilité alternative à la PDT. Nous allons examiner la possibilité selon laquelle l'oxygène singulet pourrait être créé par la lumière seule, sans photo-agent, pour induire des effets analogues à la PDT. C'est pourquoi, j'ai tenu à préciser ici quelques aspects de la PDT afin d'introduire les motivations de ce projet.

Dans un premier temps, nous présenterons la PDT en général. Nous nous pencherons sur les aspects biologiques et cliniques dans les traitements de maladies. Puis, nous nous intéresserons à une échelle plus petite de la PDT en décrivant les processus moléculaires conduisant à l'oxydation

¹³La fraction de cellules vivantes, S , peut être décrite, dans la gamme de températures associées à l'hyperthermie, par la relation [50] : $S = 1 - (1 - \exp(-k.t_T))^n$, où t_T est le temps d'exposition des cellules à une température T , n un paramètre qui dépend de la lignée cellulaire, et k représente un taux de mortalité qui dépend de la température.

¹⁴Le taux de disparition k suit, expérimentalement, une loi de type arrhenius [50] : $k = k_\infty \cdot \exp(-\frac{E_a}{R.T})$, où k_∞ est un taux de mortalité de référence (quand $T \rightarrow \infty$), R la constante des gaz parfaits et E_a une énergie d'activation. J'ai calculé les valeurs relatives citées à partir de l'énergie d'activation déterminée expérimentalement par Nielsen *et al.* [60].

des substrats biologiques après activation d'un agent Photo-Sensibilisant (*PS*). Enfin, nous nous attarderons sur la question de la dosimétrie en PDT au moins à l'échelle de la cellule *in vitro*.

1.2.1 Généralités

Dans sa forme actuelle, la PDT consiste à administrer un agent non-toxique, connu sous le nom d'agent Photo-Sensibilisant (*PS*) ou de photo-agent, à un patient présentant des lésions, cancéreuses ou non. Après un temps d'incubation, cette lésion est ensuite illuminée, généralement avec de la lumière rouge (620 – 700 *nm*). La lumière active alors le *PS* qui, en présence d'oxygène, conduit à la productions d'ERO susceptibles d'induire la mort cellulaire et la destruction des tissus [2, 67].



Les moyens d'action de la thérapie

Etant donné leur grande réactivité, les ERO produites par excitation du *PS* ont un temps de vie très court en présence de substrats biologiques ($\sim \mu s$). Elles ne peuvent, par conséquent, diffuser sur de longues distances en milieu biologique [2]. Les effets cytotoxiques de la PDT sont donc induits à proximité du lieu d'absorption de la lumière par le *PS*.

Il y a, *in vivo*, trois effets principaux par lesquels la PDT permet l'éradication de tumeurs. Nous allons brièvement les décrire ici pour illustrer la complexité de cette thérapie.

Induction *in vivo* de la mort cellulaire : La PDT peut induire directement la mort des cellules tumorales par nécrose ou apoptose, *in vitro* comme *in vivo* [67].

La question de la dose de traitement permettant la mort cellulaire sera détaillée au paragraphe 1.2.3. Pour l'instant, retenons qu'*in vivo*, la destruction directe des tumeurs par PDT peut être influencée par plusieurs paramètres. Le premier est l'inhomogénéité de la distribution du *PS* au sein de la tumeur qui peut conduire à la persistance d'une partie des cellules tumorales [68]. Le second est la présence d'oxygène dans la tumeur (nécessaire à la création d'ERO) qui peut être modulée par l'activation même du *PS*. En effet, l'excitation du *PS* peut conduire à la diminution de la quantité d'oxygène dans les cellules par production d'ERO. Ce dernier point peut conduire en pratique à réduire l'intensité lumineuse ou à fractionner le traitement dans le temps pour permettre la réoxygénation des tissus [69].

Effet sur les vaisseaux sanguins : La PDT peut induire une vasoconstriction impliquant une réduction de l'apport en oxygène et nutriments. Ces effets vasculaires ont été associés à des retards de croissance de la tumeur [70].

Réponse immunitaire : Enfin, le traitement par PDT peut induire une réponse immunitaire [71] et ainsi conduire, à long terme comme à court terme, à la destruction de la tumeur par les leucocytes ou les macrophages. La PDT pourrait avoir des applications en tant que thérapie immunitaire [72] à l'image d'un vaccin.

Une multitude de réponses cellulaires possibles

Plusieurs réponses cellulaires sont observables après PDT. En effet, selon sa nature, le *PS* peut être localisé dans différents compartiments cellulaires, comme la mitochondrie, l'appareil de Golgi, le noyau ou, comme l'illustre la figure 1.3, la membrane plasmique [73]. Cette localisation du *PS* peut évoluer au cours du temps pendant et après l'incubation.

Comme nous l'avons déjà évoqué, à cause du faible temps de vie intra-cellulaire des ERO produites par PDT, les dommages sont directement causés sur le lieu d'activation du *PS*. On comprend

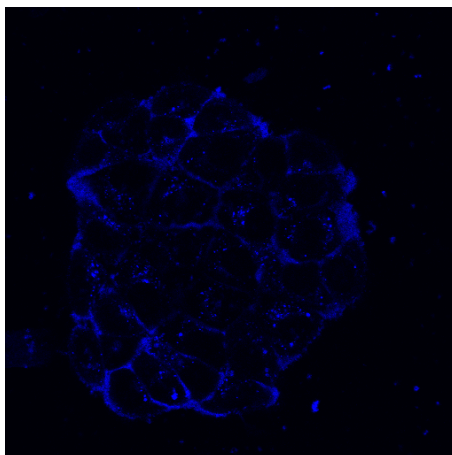


FIG. 1.3 – Image par microscopie confocale de la fluorescence à $\sim 680\text{ nm}$ de l’Aluminium-chloro-tétrasilfoné phtalocyanine (AlS_4Pc) incubée pendant 30 min dans des cellules MCF-7. Ce sont des cellules de cancer du sein que nous avons utilisé pour notre étude. La longueur d’onde d’excitation est $\sim 620\text{ nm}$. On observe une localisation du photo-agent autour de la membrane plasmique et la formation d’agrégats dans certains compartiments de la cellule.

alors aisément que cette localisation intracellulaire du PS est l’un des facteurs déterminants de la réponse : le lieu d’accumulation du PS détermine la cible des principaux dommages.

De plus, selon le type de cellule et de photo-agent, on peut observer une multitude de voies de transduction du signal et de réponses biochimiques après la PDT. Citons, à titre d’exemple, l’induction de vagues calciques et les voies impliquant les protéines de choc thermique (HSP). Ces voies mènent à une modification du métabolisme des lipides et à l’activation de facteurs de transcription, eux mêmes à l’origine d’une perturbation de la prolifération, de l’adhésion et de la survie cellulaire [67].

Enfin, remarquons que même si des dommages à l’ADN ont pu être observés après PDT, ces dommages n’ont pu être associés directement à des effets de mort cellulaire [67].

1.2.2 Quelles sont les premières espèces réactives en PDT ?

Il existe dans la littérature plusieurs revues retraçant l’histoire de la découverte et surtout l’interprétation au niveau moléculaire de la PDT. Près de 100 ans de débats ont mené à l’interprétation actuelle de l’oxydation photo-induite. Le lecteur intéressé par des précisions à ce sujet pourra se reporter à l’intéressante et très complète revue de A. A. Krasnovsky Jr. [74]. Citons aussi la revue de A. Greer [75] écrite en hommage à C. Foote qui a contribué à cette « histoire » en proposant l’interprétation communément admise aujourd’hui.

Notons que des mécanismes analogues à l’activation du PS se produisent sans injection de celui-ci, c’est à dire avec des photo-agents naturels (endogènes), lors de l’exposition à des rayonnements UV chez les mammifères [76] ou lors des premières étapes de la synthèse de la chlorophylle chez les plantes [77].

Comme l’illustre le schéma de la figure 1.4, l’exposition du PS à la lumière (généralement visible) conduit à la formation d’ERO par deux voies distinctes et simultanées [66].

Dans les deux voies, le PS initialement dans son état fondamental, S_0 (singulet de spin¹⁵), est excité vers un autre état électronique singulet (S_1), un état instable. Par reconversion interne et croisement inter-systèmes (ISC), l’état S_1 subit une perte d’énergie pour finir dans un état triplet de spin, T_1 , métastable.

¹⁵Un état singulet est un état pour lequel la résultante de spin est nulle.

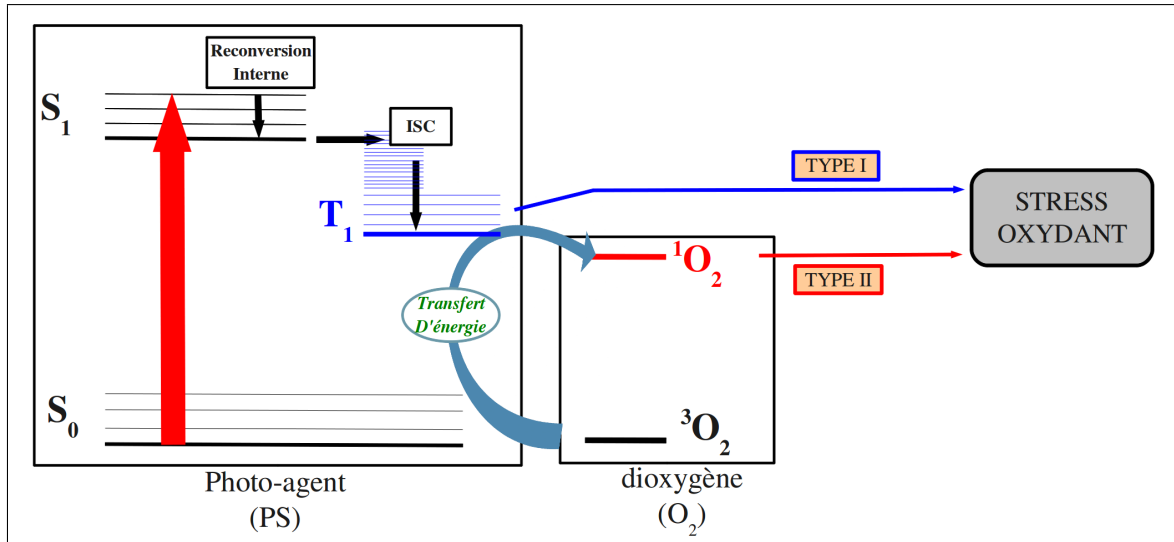


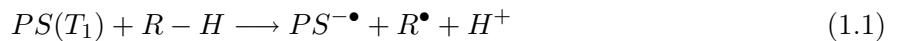
FIG. 1.4 – Illustration schématique des deux mécanismes menant à la production d'ERO en PDT, en bleu mécanisme de type I dans lequel le *PS* réagit et, en rouge mécanisme de type II associé à la formation d'oxygène singulet.

Mécanisme de type I

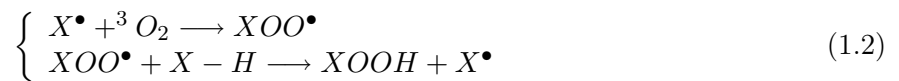
Dans le mécanisme dit de type I, l'état T_1 peut alors réagir avec les substrats biologiques pour conduire à la production d'ERO et donc à un stress oxydant. On parle de « quenching » chimique : l'énergie est transférée au milieu environnant par voie chimique.

Le type de réactions primaires directement engendrées par la voie de type I peut être une série de réactions en chaîne conduisant à l'accumulation de produits peroxydés [78, 79].

A titre d'exemple, intéressons-nous à la peroxydation des lipides. Si $R - H$ (qui peut être en cellule une molécule du cytoplasme ou une espèce associée à la membrane) est suffisamment réducteur, le transfert d'électron entre RH et T_1 conduit à la formation de deux radicaux par la réaction (1.1) [78, 79].



Ainsi, d'une part, le radical R^{\bullet} peut initier une série de réactions en chaîne du type (1.2) qui conduisent à l'accumulation d'hydroperoxydes ($XOOH$). Ici X^{\bullet} joue le rôle de R^{\bullet} .



D'autre part, $PS^{\bullet-}$ peut conduire à la formation de HO^{\bullet} qui est un radical très réactif [78]. Il peut réagir avec une chaîne carbonnée LH par la réaction (1.3).



Le radical L^{\bullet} formé par cette réaction peut initier lui aussi la série de réactions en chaîne (1.2) et conduire à l'accumulation d'hydroperoxydes. Dans ce cas, X^{\bullet} joue alors le rôle de L^{\bullet} .

Enfin, les hydroperoxydes ($LOOH$) ainsi accumulés, peuvent engendrer une nouvelle cascade de réactions en chaîne conduisant à l'augmentation des dommages [78], comme l'illustre la figure (1.5).

Notons que dans la cellule, $R - H$ et $L - H$ peuvent représenter des phospholipides si le *PS* est localisé près de la membrane, mais aussi d'autres espèces comme par exemple l'anti-oxydant $NAD(P)H$ [78, 79].

En effet, au niveau moléculaire, plusieurs interactions entre les états du *PS*, les états du dioxygène, le solvant ou d'éventuels réactifs intracellulaires peuvent, comme l'illustre la figure 1.6, complexifier le schéma simple présenté à la figure 1.4 [87].

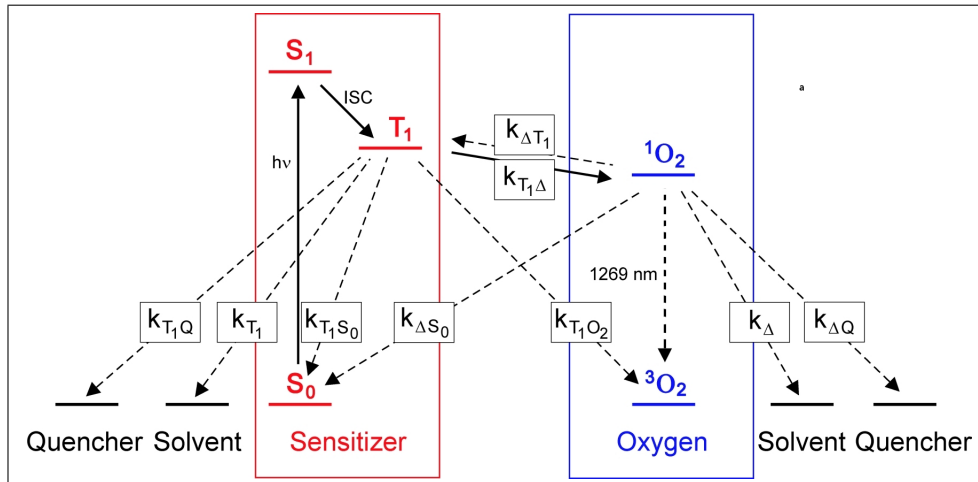


FIG. 1.6 – Schéma représentant les possibles interactions entre les espèces moléculaires intervenant en PDT. Ce diagramme montre les différentes constantes bimoléculaires (k_{ij}) pouvant être significatives pour la dosimétrie quantitative de la PDT. Les traits pleins représentent les mécanismes conduisant à la création d'oxygène singulet par PDT, alors que les traits discontinus représentent les mécanismes concurrençant de la formation d'oxygène singulet. Figure reproduite avec l'aimable autorisation de Jurgen Baier [87].

Par exemple, *in vitro*, même lorsque la quantité en dioxygène intracellulaire (3O_2) varie peu, le photoblanchiment¹⁶ du *PS* conduit à des variations non négligeables de sa concentration sur des échelles de temps comparables à la durée du traitement [88, 89].

La dose de traitement, liée à la production d'oxygène singulet, n'est alors pas proportionnelle à l'intensité d'irradiation. En d'autres termes, il ne suffit pas de déposer plus de lumière plus longtemps pour augmenter la dose de dommages et donc la fraction de cellules mortes.

De plus, *in vivo* et *in vitro*, la déplétion du dioxygène dissous dans la cellule par production et réaction de l'oxygène singulet conduit à complexifier encore le système dynamique que constitue la PDT.

Enfin, ajoutons que la distribution de *PS* n'est, comme l'illustre la figure 1.3, pas homogène dans les tissus et que sa concentration intra-cellulaire n'est pas une donnée facile à obtenir.

Il est évident qu'en pratique, pour une application clinique, une dosimétrie prédictive et précise est une question cruciale. Des outils de diagnostic, basés sur des données accessibles *in vivo*, sont nécessaires.

Dans cette optique, deux principales méthodes ont été proposées. La première est basée sur le suivi de la concentration du *PS* pendant le traitement en mesurant sa fluorescence¹⁷ naturelle [86]. La concentration instantanée en oxygène singulet est alors, si la concentration en dioxygène intracellulaire varie peu, liée aux variations de concentration du *PS* et la dose est donnée par une expression ne dépendant que de la concentration en *PS* [86].

La seconde méthode est basée sur la détermination directe de la concentration en oxygène singulet par la mesure de la phosphorescence¹⁸ de cet état. C'est une mesure délicate. En effet, l'émission d'un photon par le dioxygène dans son premier état électronique excité (1O_2) est un

¹⁶Le terme photoblanchiment désigne une diminution de la concentration du *PS* liée à la puissance de la lumière excitatrice. Ce photoblanchiment peut être dû à la réaction chimique entre l'état fondamental du *PS* et, soit l'oxygène singulet, soit l'état triplet excité du *PS*.

¹⁷La fluorescence est la désactivation d'une molécule par émission d'un photon *via* une transition dite permise entre deux états singulet de spin.

¹⁸La phosphorescence est la désactivation d'une molécule par émission d'un photon *via* une transition, dite interdite, entre deux états dont les résultantes de spin sont différentes. Ce processus est en général beaucoup moins efficace que la fluorescence.

processus peu probable (voir les sections 1.3.2 et 5.1.1 pour plus de détails). Ceci conduit à la mise en oeuvre d'un dispositif de comptage de photons. Cependant, ce type de dosimétrie présenterait l'avantage de donner accès à plus d'informations concernant l'oxygène singulet : en plus d'une information sur la quantité d'oxygène singulet créée, on pourrait envisager avoir une information sur sa réactivité en mesurant son temps de vie (voir le paragraphe 5.1.2 pour plus de détails).

Les deux méthodes de dosimétrie donnent, pour les photo-agents étudiés, de bonnes corrélations entre la dose (définie par la concentration cumulée d'oxygène singulet produit) et la mort cellulaire *in vitro* et *in vivo* [82–86]. Ceci semble indiquer que, pour les photo-agents et types cellulaires étudiés cette définition de la dose est acceptable même si des variations de plus d'un ordre de grandeur ont été observées concernant la dose minimum [86].

1.3 Motivations, objectifs et démarche

Maintenant que le contexte général est introduit, nous allons nous attacher à décrire précisément les motivations et les objectifs de cette partie de mon travail de thèse. On pourrait résumer la question qui m'a été posée au début de ce projet ainsi : est-il possible d'induire la mort cellulaire par création d'oxygène singulet, sans photo-agent, par excitation optique directe à 1270 nm de cet état ?

Nous commencerons par décrire les motivations qui ont conduit ce travail. Ensuite nous exposerons les difficultés envisageables pour répondre à cette question et expliquerons la démarche choisie.

1.3.1 Motivations

Pour mémoire, la photothérapie dynamique (PDT) est une méthode de traitement de maladies malignes, cancéreuses ou non, en plein essor depuis la fin des années 1990 [2]. Comme on l'a déjà dit, elle associe la lumière et une molécule photosensibilisatrice (*PS*) pour conduire, dans les tissus ciblés, à l'activation du *PS* et la production d'espèces réactives de l'oxygène (ERO). Ces ERO produisent alors un stress oxydant capable d'induire la mort des cellules de la tumeur [2, 71].

La production d'ERO se fait par deux principaux mécanismes [66, 90], dont l'un conduit à la production d'oxygène singulet, considéré comme l'agent cytotoxique majeur et qui est à la base des modèles actuels de dosimétrie de la PDT [82–86].

La création directe, c'est à dire sans *PS*, de l'oxygène singulet présenterait un certain nombre d'avantages que nous allons énumérer ici.

Pour une thérapie moins invasive

Bien que les *PS* dans leurs états fondamentaux ne soient pas toxiques et que leur efficacité en thérapie ait été prouvée¹⁹, certains d'entre eux présentent des effets secondaires post-traitement. En effet, l'évacuation du *PS* post-traitement peut être lente et conduire à une sensibilisation du patient à la lumière solaire jusqu'à plusieurs semaines après l'injection du *PS* [2].

Une thérapie basée sur la création optique directe d'oxygène singulet, *i.e.* sans photo-agent, est une perspective enthousiasmante. Elle permettrait de s'affranchir des effets secondaires du *PS*. Enfin, il est possible que le coût du traitement soit réduit si l'on peut s'affranchir du photo-agent.

La PDT : un problème multi-échelles complexe

La PDT est un système complexe à plusieurs échelles de temps et d'espace *in vivo* comme dans la cellule.

¹⁹Certain *PS* ont, de plus, la faculté de s'accumuler préférentiellement dans les tumeurs et des possibilités de vectorisation et de ciblage des tumeurs ont été démontrées.

In vivo, la réponse immunitaire, la vasoconstriction des vaisseaux autour de la tumeur et la déplétion intra et extra-cellulaire en dioxygène conduisent à une réponse à la thérapie aussi riche que complexe. En effet, il existe de nombreux protocoles thérapeutiques. Certains sont, par exemple, fractionnés dans le temps pour permettre la réoxygénation des tissus [2].

En cellule, il existe une multitude de voies de transduction et de signalisation conduisant à la mort cellulaire. Celles-ci sont interconnectées [67]. Leur compréhension n'est pas aujourd'hui complète et représente un enjeu pour la PDT et la biologie de la réponse cellulaire au stress en général.

La situation à l'échelle moléculaire (mécanismes physico-chimiques) n'est pas plus simple. Citons, à titre d'exemple, les mécanismes de photoblanchiment du photo-agent [88, 89] et l'existence de deux mécanismes moléculaires conduisant à la création d'ERO (type I et II) [66, 90], qui peuvent complexifier la compréhension de la réponse cellulaire.

Enfin, il existe pléthore de *PS* et de types cellulaires pour l'évaluation d'une dose ou l'étude de la réponse cellulaire en PDT [2], ainsi qu'une multitude de modes de traitements (y compris fractionnés). Dans ces conditions, on comprend que l'uniformisation et la synthèse des données pour l'élucidation des mécanismes de réponse à la PDT soient une tâche difficile.

Comme on le verra dans la partie II, la production d'oxygène singulet par excitation optique directe à 1270 nm, sans photo-agent, constitue un système plus simple au moins à l'échelle moléculaire. Ce moyen de production pourrait dans certains cas apporter des informations qui sont difficilement accessibles en PDT traditionnelle. Nous pensons que l'excitation directe peut apporter de nouvelles idées et méthodes pour l'étude du stress oxydant au moins à l'échelle cellulaire, comme par exemple la distinction de la part des mécanismes de type I et II dans la mort cellulaire par PDT.

De plus, l'excitation directe à 1270 nm devrait conduire à une dosimétrie plus simple. En effet, si la concentration intracellulaire d'oxygène dans l'état fondamental varie peu (ou pas), le taux de production d'oxygène singulet par irradiation laser à 1270 nm est directement proportionnel à l'intensité laser. Ainsi la dose, définie par la quantité d'oxygène singulet produite par irradiation à 1270 nm, devrait être linéaire avec la puissance et le temps d'irradiation, contrairement à la PDT traditionnelle.

Obtenir des informations intracellulaires

Les modèles actuels de dosimétrie de la PDT se basent sur la quantité d'oxygène singulet produite plutôt que sur la quantité d'oxygène singulet ayant réagi [82–86]. Ce fait s'explique par la difficulté à obtenir des données quantitatives en milieu vivant.

En effet, la majorité des données quantitatives concernant la réactivité et la production photo-induite de l'oxygène singulet sont mesurées dans des solutions macroscopiques. Les mécanismes physico-chimiques peuvent, dans un milieu complexe comme la cellule, être fortement perturbés par l'environnement électronique proche du *PS* [81, 91].

Ajoutons que les travaux d'Ogilby et ses collaborateurs suggèrent que l'oxygène singulet est en cellule moins réactif qu'attendu d'après les expériences en solution : la valeur de son temps de vie en cellule est relativement proche de la valeur dans un milieu dans lequel il ne réagit pas [92–95].

Comme on l'a déjà dit la production par excitation directe d'oxygène singulet présente l'avantage d'être plus simple au moins au niveau moléculaire. Son utilisation devrait donner accès à des informations intracellulaires difficilement accessibles en PDT. Elle pourrait conduire à un nouvel outil pour l'étude de la réactivité de l'oxygène singulet en cellule et de la réponse cellulaire.

Implication des ERO dans de nombreux phénomènes biologiques

Enfin, l'oxygène singulet est impliqué dans de nombreux mécanismes biologiques chez les mammifères comme chez les plantes. Il est par exemple produit par l'absorption de lumière par la chlorophylle qui peut agir comme un photo-agent [43, 77].

De manière générale les ERO sont impliquées dans de nombreux processus de transduction du signal [40, 43] en particulier dans le développement et la croissance des cellules chez les plantes comme chez les mammifères [96, 97].

Ainsi, une production, non-invasive, maîtrisée quantitativement et contrôlée (spatialement et dans le temps), d'ERO spécifiques comme l'oxygène singulet constitue un outil intéressant pour l'étude de nombreux processus biologiques à l'échelle cellulaire ou tissulaire.

1.3.2 Objectifs : excitation optique directe à 1270 nm du dioxygène dans son premier état électronique pour obtenir un effet analogue à la PDT

L'objet de la première partie de mon travail de thèse consiste en l'étude de la possibilité d'obtenir un effet analogue à la PDT sans utilisation d'agent photosensibilisant par excitation directe à 1270 nm de la transition ${}^3\text{O}_2 \rightarrow {}^1\text{O}_2$ du dioxygène.

Principe

Le principe est simple et illustré à la figure 1.7. Un photon à 1270 nm a une énergie correspondant à l'écart d'énergie entre l'état fondamental, ${}^3\text{O}_2$, et le premier état électronique excité, ${}^1\text{O}_2$ (oxygène singulet), du dioxygène. Son absorption conduit donc au passage du dioxygène depuis l'état fondamental vers l'état singulet [98, 99].

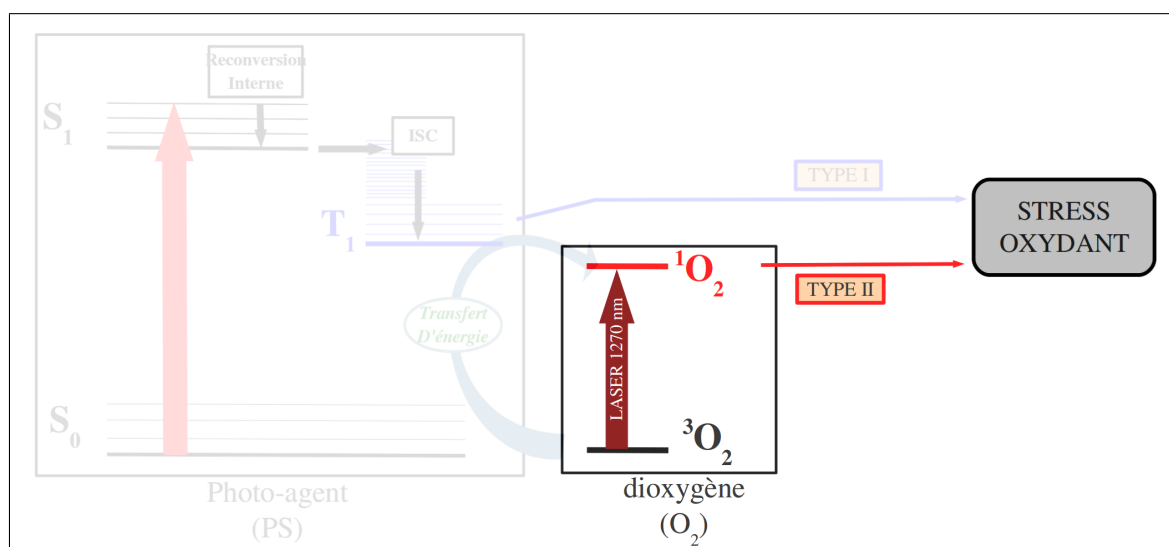


FIG. 1.7 – Schéma de principe de l'excitation directe de l'oxygène singulet à 1270 nm pour obtenir un effet analogue à celui de la PDT.

L'oxygène singulet ainsi créé peut, en principe, induire un stress oxydant analogue à celui induit en PDT et conduire à la mort des cellules.

Difficultés

La production par excitation optique directe de dioxygène dans l'état singulet ${}^1\text{O}_2$ à 1270 nm, n'est en fait pas triviale. C'est un phénomène en général peu probable. En effet, l'état singulet est métastable, au sens où les règles de sélection des transitions radiatives interdisent, à l'ordre dipolaire électrique, la transition entre les deux états en émission (désexcitation) comme en absorption (excitation) [98, 99].

Cependant, dans un solvant en phase dense, la transition est plus probable, en émission comme en absorption [100–102]. Ces effets sont très dépendants de la nature du solvant. Nous reviendrons en détails sur ces aspects à la section 5.1.1.

En pratique, même avec les propriétés de renforcement de la transition en solution, la probabilité de transition reste très faible. La section efficace d'absorption²⁰ typique d'un agent photosensibilisant, $\sigma_{PS} \sim 10^{-18} \text{ cm}^2$ en solution, doit être comparée à celle de la transition ${}^3O_2 \longrightarrow {}^1O_2$ de l'ordre de $\sigma_{1270nm} \sim 10^{-23} \text{ cm}^2$ en phase dense à pression standard [100, 103]. L'efficacité quantique du *PS*, c'est-à-dire la fraction de molécules dans l'état excité singulet (S_1) conduisant à la création d'oxygène singulet (1O_2), est typiquement de l'ordre de 0,1 à 0,5 [104]. On s'aperçoit donc que, pour le même nombre de photons incidents par unité de temps, l'excitation directe à 1270 nm est de 10^{-5} à 10^{-6} fois moins efficace que la création photo-induite à l'aide d'un photo-agent.

En d'autres termes, l'excitation directe de la transition ${}^3O_2 \longrightarrow {}^1O_2$ à 1270 nm nécessite l'utilisation de beaucoup plus d'intensité lumineuse pour conduire à un taux de production d'oxygène singulet comparable à la PDT. Une forte densité de puissance peut conduire à l'apparition d'effets concurrentiels non désirés, comme par exemple un échauffement local dû à l'absorption par le solvant de la lumière.

Ajoutons que la détection de l'oxygène singulet n'est pas aisée en phase dense. Des méthodes de détection de l'oxygène singulet seront proposées dans la partie II. Cependant, celles-ci ont été, dans un premier temps, écartées pour cette partie du travail.

En effet, la transition ${}^1O_2 \longrightarrow {}^3O_2$ est peu probable en émission (phosphorescence). La détection optique directe de l'oxygène singulet créé à l'aide d'un photon-agent nécessite en solution l'utilisation d'une technique délicate de comptage de photons à l'aide de photomultiplicateurs²¹ [105]. Les détecteurs actuels présentent peu d'efficacité dans la gamme de longueurs d'onde associées à la transition (1270 nm) et la méthode d'excitation qui nous intéresse est ~ 10000 fois moins efficace que l'excitation photo-induite. La détection optique directe conjuguée à l'excitation optique directe à 1270 nm de l'oxygène singulet semble donc techniquement compromise surtout dans un milieu vivant.

Reste alors la possibilité de détecter indirectement l'effet de l'oxygène singulet dans un milieu vivant. Il existe des pièges dit spécifiques à l'oxygène singulet et notamment un biosenseur commercial de l'oxygène singulet [106] : SOSG²². Il est dit spécifique au sens où il présente peu d'affinité avec d'autres ERO en solution ([106]). Cependant, il est évident que son affinité chimique avec tous les radicaux n'a pu être testée ; en cellule il est possible que ses propriétés chimiques soient modifiées. De plus, cette espèce peut induire la création d'oxygène singulet à la manière d'un photo-agent [107]. Son utilisation mérite donc des précautions.

Au début de la thèse, compte tenu de ces considérations, il nous est apparu que la manière la plus simple d'étudier de potentiels effets cytotoxiques à 1270 nm était simplement d'essayer !

Contexte

Il existe, à ma connaissance, peu de travaux portant sur la création d'oxygène singulet *via* la transition ${}^3O_2 \longrightarrow {}^1O_2$ par absorption d'un photon à 1270 nm en milieu vivant et ses potentielles applications en thérapie comme analogue à la PDT. Ceci est dû au manque de sources laser suffisamment puissantes à 1270 nm pour induire un effet directement observable. D'autre part, l'efficacité de la PDT en terme de cytotoxicité et la dénomination « transition interdite » (qui signifie plus précisément interdite à l'ordre dipolaire électrique²³) ont certainement conduit la communauté scientifique à écarter cette possibilité.

Cependant depuis 2003, les travaux de Krasnovsky *et al.* ont pu montrer la possibilité d'exciter

²⁰Il s'agit d'une surface fictive qui représente la surface que devrait avoir un atome ou une molécule pour représenter la probabilité de transition.

²¹Le photomultiplicateur est un dispositif permettant la détection de photons. Il sera décrit au chapitre 5.2.2.

²²Singlet Oxygen Sensor Green.

²³Pour étudier l'interaction entre un champ électromagnétique et une molécule, on décompose l'énergie d'interaction en plusieurs ordres multipolaires. L'ordre dipolaire électrique constitue le premier ordre de l'approximation, c'est-à-dire le terme, *a priori*, prépondérant.

directement l'oxygène singulet à 1270 nm sans photo-agent dans des solutions saturées en air²⁴ [103, 108]. Dans ces phases denses les propriétés de la transition à 1270 nm du dioxygène sont semblables à celles dans l'eau et donc, par extension, comparables à ses propriétés dans un milieu vivant [103, 109]. De plus, la concentration en dioxygène dissout dans ces solvants est du même ordre de grandeur que la concentration en dioxygène intracellulaire²⁵.

Concernant l'effet d'une irradiation à 1270 nm sur les tumeurs, Zakharov et Ivanov ont montré que celle-ci conduit à la diminution de la croissance de tumeurs implantées dans des rats [112, 113].

Très récemment, pendant la rédaction de ce manuscrit, Yusupov *et al.* ont publié la réalisation d'un laser Raman émettant à 1270 nm et dont l'utilisation a montré des résultats prometteurs en thérapie. Ils ont traité 12 patients présentant des basaliomes²⁶ essentiellement sur le visage. Dans tous les cas, la rémission de la tumeur a été observée en moins de 40 jours pour des doses de lumière allant de 150 à 250 J.cm⁻² [114].

Pourtant, à ce jour, aucune des études en milieu vivant ne montre clairement l'implication de l'oxygène singulet dans les effets cytotoxiques induits par l'irradiation laser à 1270 nm. Yusupov *et al.* suggèrent même l'implication non négligeable d'effets thermiques dus au laser. En effet, étant donnée la faible probabilité de transition, les densités de puissance nécessaires à la création d'une quantité d'oxygène singulet comparable à celle créée en PDT sont très grandes. D'autres effets potentiels sont à prendre en compte, en particulier des effets thermiques dus à l'irradiation laser.

Au vu de ces références bibliographiques, la question formulée au début de la section 1.3 doit être reformulée. Je l'énoncerais donc ainsi : les effets cytotoxiques de l'irradiation laser à 1270 nm sont-ils liés à la création optique directe d'oxygène singulet ? Si oui, dans quelle mesure est-il possible d'obtenir un effet biologique uniquement lié à la création optique directe à 1270 nm de l'oxygène singulet ?

Démarche

Comme on l'a déjà évoqué, l'utilisation d'une forte densité de puissance pourrait induire d'autres effets concurrents d'un stress oxydant induit par la création d'oxygène singulet à 1270 nm. La création ou l'activation par la lumière d'autres espèces cytotoxiques, ainsi qu'une élévation de température, certes locale mais non négligeable autour du faisceau laser, sont à considérer.

La maîtrise et la mesure de l'élévation de température dans un tissu paraît difficilement réalisable. De plus, *in vivo* la réponse à l'irradiation laser peut être complexifiée par une réponse globale au niveau du tissu ou à une échelle encore plus grande au sein de l'organisme.

In vitro, l'échelle de la cellule unique semble, en l'absence de marqueurs spécifiques, statistiquement peu crédible. Nous avons donc choisi de travailler sur une population de cellules en culture *in vitro* qui constitue un système expérimentalement maîtrisable et statistiquement pertinent.

Cette première partie du manuscrit est donc principalement consacrée à une présentation du système expérimental et à la description de l'approche utilisée pour discriminer ou invoquer l'influence d'autres effets potentiels dans la mort cellulaire induite par irradiation laser à 1270 nm.

En particulier, nous verrons au chapitre 3 que l'élévation de température par le laser peut être mesurée *in situ* et qu'il est donc possible de prendre en compte l'implication des effets thermiques dans la mort cellulaire.

²⁴Par saturée en air, j'entends en équilibre avec de l'air, c'est à dire que la concentration en dioxygène dissout suit la loi de Henry.

²⁵La concentration en dioxygène dissout dans l'eau peut être évaluée à partir de la loi de Henry ($\sim 200\mu\text{mol.L}^{-1}$) [110]. La concentration intracellulaire a été mesurée dans des macrophages par Lee Koo *et al.* ($\sim 400\mu\text{mol.L}^{-1}$) [111]

²⁶Le basaliome est un des types de cancer de la peau les plus fréquents.

Chapitre 2

Dispositif expérimental et méthodes pour l'étude de la mort cellulaire induite par irradiation laser autour de 1270 nm

Comme on vient de l'évoqué, cette première partie du travail est consacrée à l'étude d'une possibilité alternative à la PDT dans laquelle un laser à 1270 nm serait utilisé pour créer l'oxygène singulet, sans photo-agent, dans le but d'obtenir un effet analogue à la PDT.

Ce travail de thèse s'inscrit dans un nouvel axe de recherche au laboratoire qui doit conduire, à terme, à des problématiques de biophysique et en particulier à l'étude dynamique de systèmes biologiques par microscopie optique.

Au début de ma thèse, les moyens de culture et d'étude de cellules de mammifères n'étaient pas disponibles au laboratoire. J'ai donc participé à la mise en place d'une salle de culture cellulaire.

De plus, cette nouvelle thématique a nécessité la création et le développement soit d'outils pour permettre l'observation de cellules par microscopie, soit de lasers autour de 1270 nm suffisamment intenses pour espérer créer une quantité suffisante d'oxygène singulet capable d'induire la mort cellulaire. Une partie de mon travail de thèse a été consacrée à ces aspects et c'est à ceux-ci qu'est consacré ce chapitre.

Nous avons déjà expliqué notre choix de travailler sur une population de cellules *in vitro*. Bien que les cellules *in vitro* constituent un système mieux contrôlé qu'une tumeur *in vivo*, leur culture nécessite le maintien de certaines conditions dites physiologiques. Nous commencerons donc par exposer ces conditions nécessaires à la survie des cellules. Ceci nous conduira à présenter l'incubateur permettant l'observation des effets de l'irradiation laser par vidéo-microscopie des cellules pendant près de trois jours. Puis, nous préciserons les méthodes employées pour le diagnostic de la mort cellulaire. Enfin, la seconde partie de ce chapitre sera consacrée à présenter le laser accordable autour de 1270 nm que j'ai réalisé.

2.1 Observation de cellules biologiques en vidéo-microscopie

Dans cette section, nous nous intéressons au dispositif expérimental que j'ai mis en place pour l'observation et l'irradiation de cellules *in vitro*. Le but est de pouvoir observer une population de cellules, parmi lesquelles une sous-population a été exposée à une irradiation laser autour de 1270 nm. Ce dispositif doit répondre principalement à deux contraintes, la première étant l'utilisation d'un microscope. Une cellule mesurant entre 20 et 40 μm , il est évident que nous avons besoin d'un tel système pour l'observation. La seconde contrainte est le maintien des conditions physiologiques nécessaires à la culture de cellules *in vitro* pendant l'irradiation et plusieurs jours après celle-ci. En effet, des expériences préliminaires ont montré que la mort cellulaire survient au moins 24h post-irradiation. Il nous faut donc pouvoir observer les cellules pendant plus d'un jour.

Dans un premier temps, nous exposerons les paramètres physiologiques nécessaires à la culture «traditionnelle» des cellules de mammifère. Ceci nous conduira à nous intéresser à la chambre de

culture miniature pour l'observation des cellules sous microscope que j'ai conçue avec l'aide des ateliers de mécanique et d'électronique du laboratoire. Enfin, nous présenterons le dispositif dans son ensemble, ainsi que les paramètres physiques pertinents pour la création d'oxygène singulet par excitation directe à 1270 nm.

2.1.1 Maintien des conditions physiologiques pour l'observation longue de cellules

Les cellules choisies pour les principales expériences sont des cellules humaines de cancer du sein : les MCF-7¹ [115]. Celles-ci constituent une référence en recherche sur le cancer [116] et présentent l'intérêt d'être bien caractérisées. MCF-7 est une lignée de cellules épithéliales² issue de cellules qui, *in vivo*, adhèrent à un substrat : la lame basale³.

De manière générale, la culture cellulaire n'est pas une tâche aisée. Je ne présenterai ici que quelques aspects clefs pour en illustrer les principales difficultés. L'annexe A.1 présente le détail du protocole pour la culture et le déroulement des expériences. A ce stade, retenons trois points essentiels pour le maintien d'une lignée de cellules.

Premièrement, il faut maintenir les conditions physiologiques. C'est à dire une température de 37°C pour une activité biochimique normale, et une atmosphère régulée avec 5% de CO₂ pour maintenir le pH du milieu de culture [117].

Le second point est l'utilisation d'un milieu de culture adapté. Sans entrer dans les détails, retenons que celui-ci est composé à 80-90% d'eau et qu'il contient des vitamines, ions et protéines nécessaires au développement des cellules. Une petite variation de concentration des espèces chimiques qu'il contient, par évaporation de l'eau par exemple, peut en effet entraîner un choc osmotique fatal pour les cellules.

Enfin, pour éviter la contamination bactérienne, les instruments et l'environnement en contact direct avec les cellules doivent être gardés stériles. En effet, les bactéries se développent plus rapidement que les cellules des mammifères. Le temps moyen entre deux mitoses est de l'ordre 20 à 100 minutes pour une bactérie, contre 24 heures environ pour les cellules MCF-7. L'introduction d'une seule bactérie dans le milieu de culture des cellules induit une colonisation rapide⁴ qui empêche la survie des cellules eucaryotes. L'ajout d'antibiotiques dans le milieu de culture peut, cependant, limiter la contamination bactérienne.

Les cellules adhérentes sont cultivées sur des boîtes de Petri en plastique avec un dépôt particulier assurant l'adhérence. La composition de celui-ci est tenue secrète par le fabricant ; nous verrons à la section 4.1.4 que ceci nous a conduit à réaliser des expériences complémentaires. Les boîtes de Petri sont en polystyrène cristal transparent, ce qui permet la visualisation au microscope inversé. L'épaisseur (1 mm) du fond de la boîte de Petri limite l'observation à des distances de travail relativement longues (>1mm), qui nous conviendra pour nos expériences sur une population de cellules.

Pour l'observation longue de cellules sous microscope, j'ai développé un incubateur permettant à la fois l'observation de cellules en vidéo-microscopie pendant plusieurs cycles cellulaires et le maintien des conditions nécessaires à la culture pendant l'observation.

Comme le montre la figure 2.1, l'incubateur permet de positionner la boîte de Petri de manière étanche. Nous stérilisons donc la chambre de culture avant les expériences. Ainsi, si tous les éléments en contact avec les cellules sont restés stériles avant la mise en place de la boîte de Petri dans la chambre, la stérilité est garantie pendant l'expérience. Pour chaque expérience, les cellules sont plongées dans 5 mL de milieu de culture. A l'aide de débimètres et de bouteilles de gaz pur sous pression, l'atmosphère est précisément régulée. Les proportions en volume des espèces chimiques

¹Michigan Cancer Foundation - 7.

²Un ensemble de cellules «attachées» les unes aux autres constitue un épithélium.

³La lame basale est un assemblage de protéines extracellulaires.

⁴En supposant une période de division de 20 min, on obtient en 24h, $2^{24 \times 3} \sim 4 \times 10^{21}$ bactéries pour l'introduction d'une seule cellule mère.

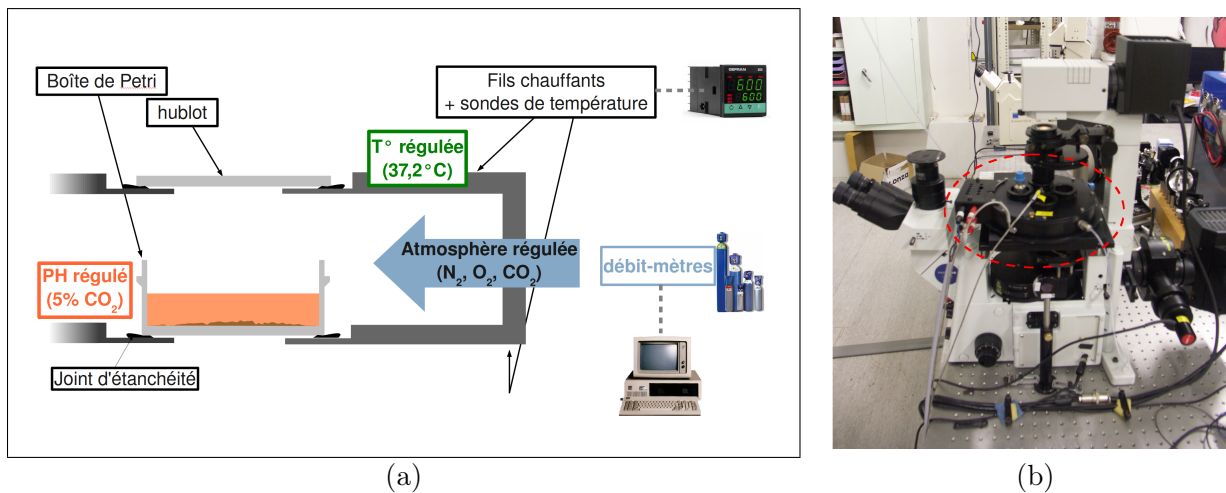


FIG. 2.1 – (a) schéma de la chambre de culture miniature réalisée - (b) photographie de la chambre de culture miniature disposée sur le microscope

présentes dans l'atmosphère sont : 5% de CO_2 ; 75% de N_2 ; 20% de O_2 dans les conditions normales d'utilisation. Notons que ce dispositif permet de moduler la concentration en dioxygène dissous. En effet, la loi de Henry prédit une relation linéaire entre la pression partielle et la concentration de gaz dissous en équilibre avec le liquide [110, 118]. L'humidité de l'atmosphère est assurée par une réserve d'eau distillée placée dans la chambre, ce qui limite l'évaporation du milieu de culture comme les incubateurs « traditionnels ». Enfin, la température est contrôlée par un régulateur électronique et le chauffage s'opère à l'aide de fils chauffants placés de part et d'autre de la chambre, comme le montre la figure 2.1.

J'ai vérifié que ce dispositif assure une culture dans de bonnes conditions pendant 3 jours (~ 3 cycles cellulaires). Passé ce délai, l'évaporation du milieu entraîne un choc osmotique qui conduit à une mort brutale des cellules.

La figure 2.2 (a) montre la croissance des cellules dans l'incubateur miniature pour une densité cellulaire⁵ de départ d'environ $\sim \frac{1}{1000}$. Le temps inter-mitoses moyen est de 23 à 27h et correspond aux données de la littérature [119]. Les cellules sont donc maintenues dans cette chambre miniature dans des conditions de culture normales.

La figure 2.2 (b) montre une photographie des cellules cultivées dans l'incubateur miniature. Le champ représente une surface de 2 mm^2 . Le diamètre d'une cellule étant d'environ $35 \mu\text{m}$, on peut observer au total un peu moins de 2000 cellules à 100% de confluence.

Cet incubateur présente pour une boîte de Petri deux accès optiques, en haut à l'aide d'un hublot transparent et par dessous au travers du fond de la boîte de Petri. Il permet donc la réalisation d'une vidéo-microscopie de transmission montrant l'évolution des cellules pendant trois jours.

L'incubateur dispose de quatre emplacements symétriques (non représentés sur la figure 2.1) pour boîtes de Petri. Il est donc possible, en disposant une autre boîte de Petri (non-observée) dans un autre emplacement, de mesurer des paramètres physiques comme la température et la concentration en oxygène dissous sans perturber les cellules observées. Signalons enfin que l'on peut facilement étendre son utilisation à une microscopie mieux résolue spatialement à une distance de travail de 200 à 300 μm , comme dans les techniques confocale et bi-photon, en remplaçant la boîte de Petri par une lame de verre prévue pour ce genre de technique.

2.1.2 Dispositif expérimental pour l'irradiation laser

Nous nous intéressons maintenant à présenter le dispositif expérimental utilisé pour l'irradiation laser des cellules. Ceci nous conduira à définir et mesurer les paramètres pertinents pour l'étude des

⁵La densité cellulaire est simplement le taux de remplissage d'une surface de culture par des cellules adhérentes, c'est à dire le ratio entre la surface occupée par les cellules et la surface totale disponible.

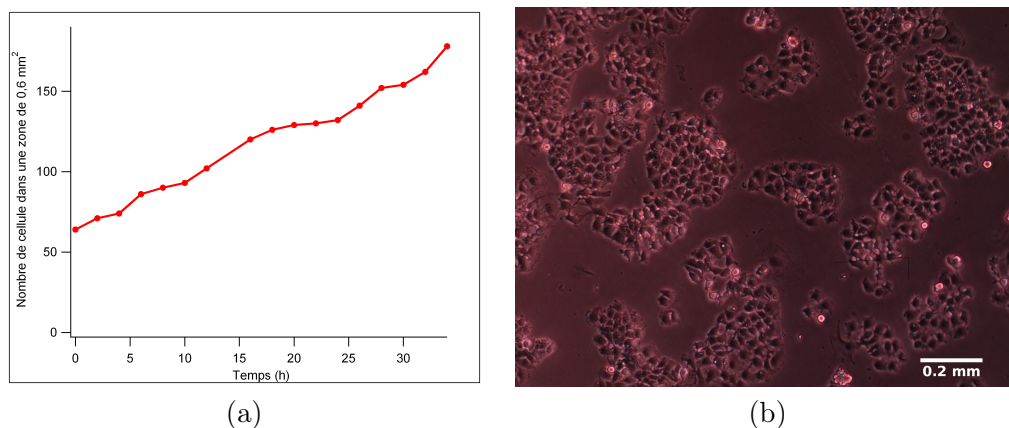


FIG. 2.2 – (a) évolution de la population de cellules dans l’incubateur en fonction du temps pour une densité cellulaire de départ d’environ $\frac{1}{1000}$. On peut remarquer que la population double en $\sim 24 h$. - (b) photographie des cellules au microscope à contraste de phase à l’aide d’un objectif 4×

effets cytotoxiques de l’oxygène singulet. Ces paramètres sont au nombre de deux. Le premier est le temps d’exposition des cellules à l’irradiation laser. Le second est l’intensité laser à 1270 nm : la quantité d’oxygène singulet produite est en effet proportionnelle au nombre de photons incidents par unité de surface.

Au paragraphe 1.3.2, j’ai expliqué notre choix de travailler sur une population de cellules. Il s’est avéré qu’un objectif de grossissement 4× est un bon compromis entre l’observation d’un assez grand⁶ nombre de cellules et une résolution spatiale suffisante pour diagnostiquer la mort cellulaire.

Comme le montre la figure 2.3, le dispositif expérimental comporte un microscope (Olympus - modèle IX71) légèrement modifié⁷, dans lequel est injecté un laser à 1270 nm pour l’irradiation des cellules. A ce stade, retenons que le laser infra-rouge est réfléchi par un miroir dichroïque⁸ (D_{vis-IR}) approprié et passe au travers de l’objectif de microscope (4×) pour irradier les cellules. L’utilisation d’un miroir dichroïque transmettant la lumière visible permet la transmission de l’image des cellules, image qui est projetée sur une caméra à l’aide de la lentille de fin de tube (L_t).

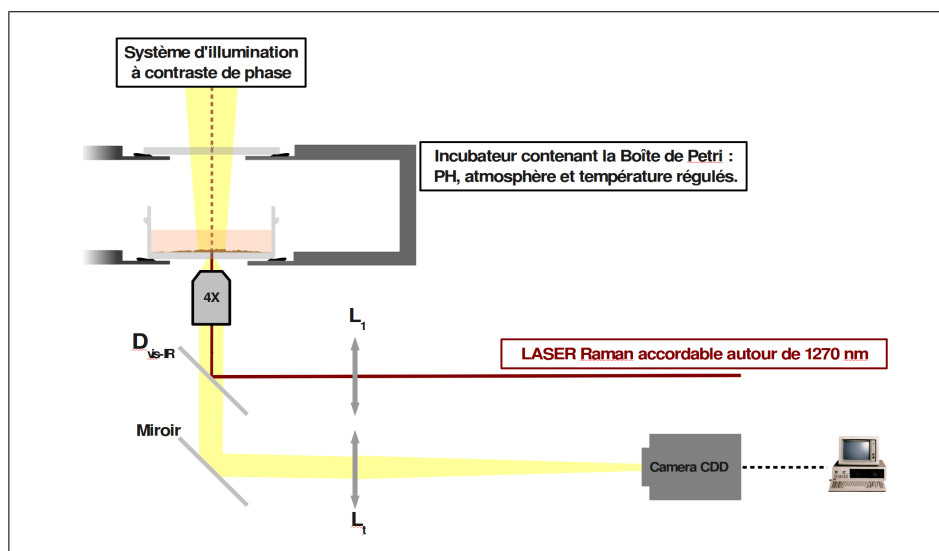


FIG. 2.3 – schéma du dispositif expérimental

Evidemment le temps d’irradiation est facile à contrôler. L’intensité quant à elle est égale au

⁶Le terme « assez grand » sera défini plus loin.

⁷La modification apportée au microscope et son intérêt seront décrits plus précisément à la section 3.2.

⁸Un miroir dichroïque est un composant optique permettant la séparation de deux ondes lumineuses de longueurs d’onde différentes. L’une est transmise alors que l’autre est réfléchie.

rapport de la puissance par la surface du faisceau laser. Pour la mesure de la puissance, j'ai utilisé un puissance-mètre calibré (modèle Ophir Nova II). Il reste donc à déterminer précisément le profil spatial du faisceau laser dans le plan des cellules.

Après le passage dans la lentille L_1 et dans l'objectif de microscope, le faisceau laser est bien décrit par l'équation des faisceaux gaussiens [120]. En choisissant la distance focale de la lentille L_1 identique à celle de la lentille L_t , on obtient une diminution du diamètre transverse du faisceau d'un facteur égal au grossissement de l'objectif (ici $4\times$). La figure 2.4 (a) montre la variation selon l'axe de propagation du rayon du faisceau définie à $\frac{1}{e^2}$ du maximum d'intensité. On peut remarquer que celui-ci diverge peu autour de la position des cellules ($z=0$). La figure 2.4 (b) représente le profil en intensité du faisceau au niveau des cellules, le diamètre à mi-hauteur est d'environ $300\ \mu m$, ce qui signifie que 50 % de l'intensité lumineuse est comprise dans un disque de diamètre $300\ \mu m$, soit une surface de $0,07\ mm^2$. Ce disque contient donc environ 75 cellules d'un diamètre moyen de $35\ \mu m$.

Notons que j'ai réalisé les mesures présentées ici avec l'air pour milieu de propagation. Je me suis assuré qu'il n'y a pas de modification du profil, par effet de lentille thermique par exemple, juste après le passage du faisceau au travers de la boîte de Petri.

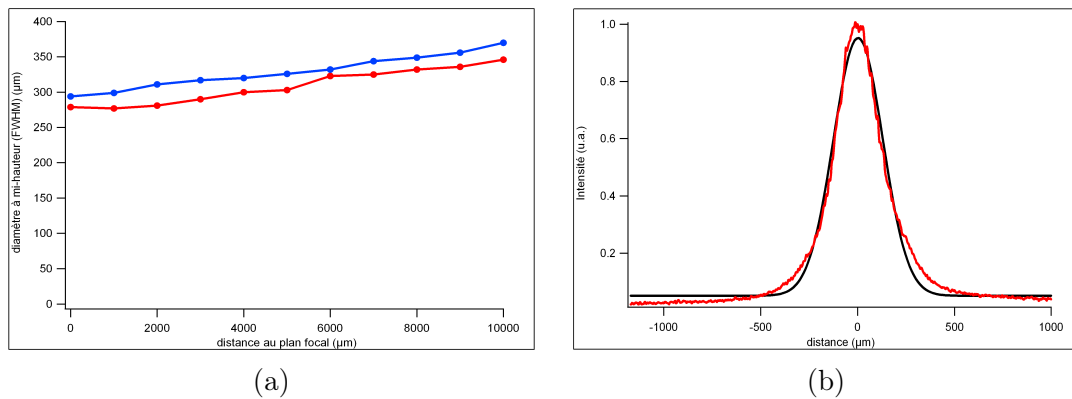


FIG. 2.4 – (a) Variation selon la direction de propagation du diamètre à mi-hauteur (FWHM) du faisceau laser après passage dans l'objectif $4\times$, en rouge le diamètre selon une direction, en bleu le diamètre selon la direction perpendiculaire. - (b) en rouge, profil transverse en intensité du faisceau dans le plan des cellules (plan focal de l'objectif $4\times$), en noir ajustement par un profil gaussien.

Nous disposons donc d'un faisceau suffisamment grand pour irradier plus de 75 cellules. Les cellules non-irradiées du champ servent, elles, de témoins non affectés par l'irradiation et permettent donc une vérification du bon déroulement des expériences.

2.1.3 Diagnostic de la mort cellulaire

Nous allons préciser ici les méthodes employées pour le diagnostic de la mort cellulaire. Il ne s'agit pas encore de présenter les résultats des expériences d'irradiation, mais de définir les critères employés pour « déclarer » une cellule morte.

Une première contrainte pour réaliser le diagnostic de la mort cellulaire est le choix d'un protocole qui n'induit pas un stress supplémentaire aux cellules irradiées. En effet, nous voulons nous assurer que la seule voie par laquelle survient la mort cellulaire est due à un stress induit par le laser (et peut-être par création d'oxygène singulet).

En pratique, il ne nous est pas commode de retirer du microscope la boîte de cellules traitées et ce pour deux raisons. La première provient de la taille de la zone irradiée : celle-ci est suffisamment petite devant la taille totale de la boîte de Petri ($3,5\ cm$ de diamètre) pour qu'il soit nécessaire de passer plusieurs heures à la recherche. La seconde est que nous voulons étudier la cinétique d'apparition de la mort cellulaire à l'échelle de la population de cellules. Il nous faut donc une méthode non-invasive pour le diagnostic de la mort cellulaire.

Le moyen le plus sûr pour ne pas introduire de stress supplémentaire est de n'introduire aucun

composé autre que ceux nécessaires à la culture cellulaire. On peut alors s'intéresser aux changements de morphologie des cellules [121, 122] comme nous l'illustrerons ci-après.

Afin que ce travail puisse fournir des éléments de comparaison avec la littérature en général et les travaux sur la PDT traditionnelle en particulier, il nous faut aussi un marquage conventionnel de la mort cellulaire, *i.e.* un test de viabilité largement utilisé et éprouvé. Nous avons, dans un premier temps, préféré une méthode «large spectre» c'est à dire un marqueur indépendant du type de mort et du type de stress. Le bleu trypan répond bien à ces contraintes. En effet, il est connu pour donner une réponse indépendante du type de mort et est largement utilisé pour vérifier la viabilité des cellules comme les tissus [24, 123]. Nous verrons donc ci-dessous que les critères morphologiques peuvent être corrélés à un test d'exclusion au bleu trypan.

Critères morphologiques :

Les expériences d'irradiation ont montré des changements morphologiques des cellules lors des processus suivant le stress induit par le laser. L'interprétation des changements morphologiques au microscope à contraste de phase est délicate et mérite des précautions. En effet, comme son nom l'indique, la technique de contraste de phase ne montre pas seulement une image par transparence des cellules, mais aussi une variation de la phase de l'onde lumineuse diffractée par rapport à l'onde incidente. En pratique, pour un objet transparent de faible épaisseur, une zone sombre est associée à un chemin optique semblable au fond homogène. Inversement, une zone brillante correspond à un allongement du chemin optique : la lumière incidente traverse un milieu d'indice plus grand que le fond, traverse plus de milieu, ou les deux.

Parmi les changements morphologiques notables des cellules, nous en distinguerons deux principaux. Le premier critère est illustré sur la figure 2.5 (b). La cellule semble se détacher des autres pour ensuite s'arrondir. Elle devient finalement plus brillante. Nous avons pu observer les mêmes étapes pendant la mitose. Lors de la division, la cellule perd ses propriétés d'adhérence. C'est pourquoi nous avons *a priori* associé cette morphologie à une perte d'adhérence.

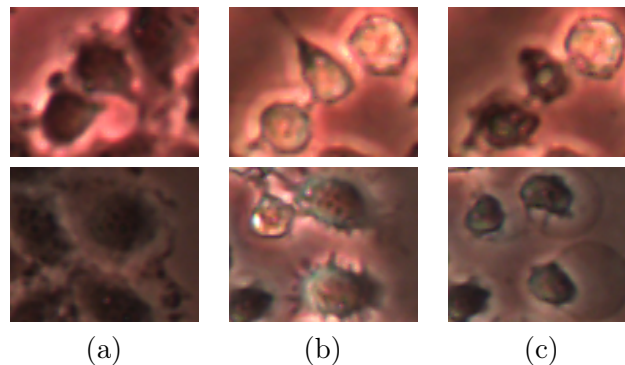


FIG. 2.5 – Evolutions morphologiques des cellules MCF-7 vers la mort cellulaire dans nos expériences d'irradiation. Les images sont réalisées avec un objectif 4× à contraste de phase (a) cellules normales - (b) cellules arrondies, moins adhérentes - (c) cellules mortes.

Le dernier changement est illustré par la figure 2.5 (c). Très brutalement (moins de 5 *min*), la cellule redevient sombre, s'aplatit et ne bouge plus : elle est morte.

Insistons sur le fait que la vidéo est d'une aide précieuse pour l'analyse et le diagnostic de la mort par critère morphologique. En effet, le dernier critère (figure 2.5 (c)) peut sembler arbitraire sur une photo, mais il est, en pratique, indéniable que celui-ci est brutal (moins de 5 *min*) et que plus aucun mouvement de la cellule n'est observé ; contrairement aux cellules voisines (non irradiées).

Précisons que les mêmes changements sont toujours observés dans nos expériences d'irradiation. Pour vérifier l'hypothèse selon laquelle les cellules présentant la morphologie de la figure 2.5 (c) peuvent être déclarées mortes, nous avons utilisé une méthode dite d'exclusion comme le préconise le NCCD [24]. Il s'agit de marquer sélectivement les cellules mortes qui ne peuvent exclure certains

colorants. Le bleu trypan est une molécule diazotée largement utilisée comme test de viabilité cellulaire ou tissulaire, *i.e. in vitro* comme *in vivo* [123].

Correspondance morphologie - bleu trypan :

La figure 2.6 (a) montre un ensemble de cellules après irradiation laser. Elles ont été incubées avec du bleu trypan après l'irradiation, le lecteur intéressé par le protocole pourra se reporter à l'annexe A.2.

Le bleu trypan est un colorant permettant de marquer la perte d'intégrité de la membrane plasmique. Le test d'exclusion au bleu trypan est basé sur la faculté des cellules viables à exclure le colorant alors que les cellules non viables en sont incapables et sont donc colorées en bleu [123].

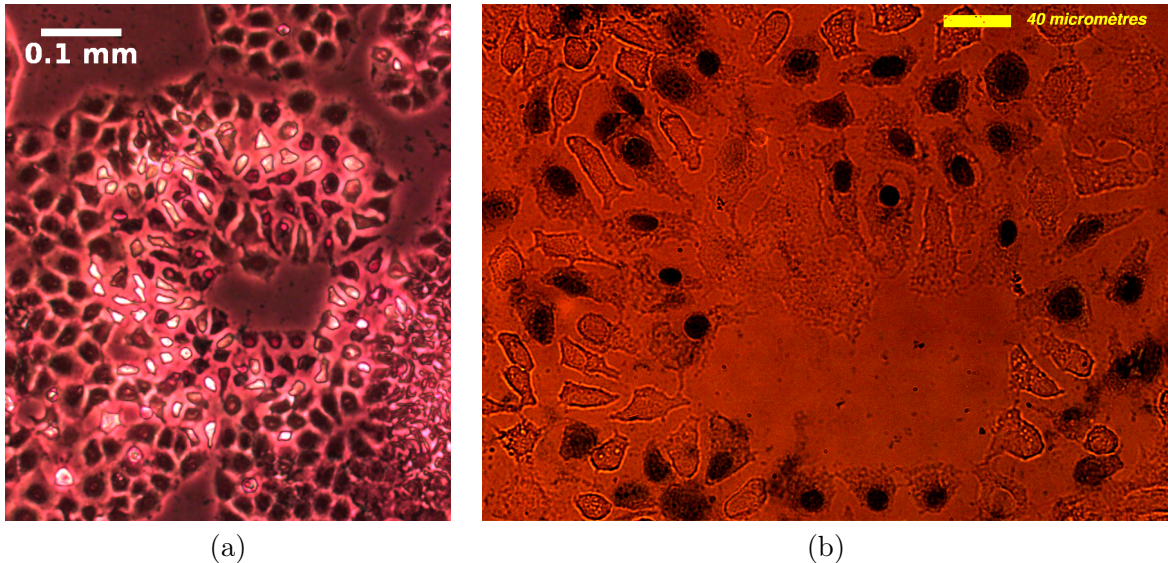


FIG. 2.6 – Cellules MCF-7 après irradiation laser (a) observation 4× à contraste de phase avant coloration -(b) Une partie des mêmes cellules observées à plus fort grossissement (20×) après coloration au bleu trypan.

J'ai pu vérifier que 96% des cellules marquées avec le bleu trypan correspondent à des cellules morphologiquement identiques à celles de la figure 2.5 (c). Réciproquement, 99% des cellules présentant cette morphologie sont marquées au bleu Trypan. Le critère morphologique de la figure 2.5 (c) correspond donc bien à une mort cellulaire.

J'ai, de plus, vérifié qu'aucune cellule morphologiquement comparable à celles de la figure 2.5 (b) n'est marquée au bleu trypan et réciproquement. Ces cellules ne sont donc pas encore mortes. Ces modifications morphologiques de la cellule peuvent être soit liées à des changements conduisant à la mort cellulaire (processus de mort), soit une conséquence des dommages causés par l'irradiation laser. Une analyse plus poussée des expériences de vidéo-microscopie montre que toutes les cellules ayant à un instant la morphologie présentée à la figure 2.5 (b) finissent par mourir.

En conclusion, on peut, avec une bonne précision, utiliser le critère morphologique de la figure 2.5 (c) pour diagnostiquer la mort cellulaire. Dans la suite du manuscrit, c'est donc à ce dernier critère que nous associerons la mort cellulaire. Ce critère (perte d'intégrité membranaire marquée par le bleu trypan) est en accord avec les recommandations du NCCD [24] (cf. paragraphe 1.1.2).

2.2 Développement de lasers de puissance autour de 1270 nm

Comme nous l'avons exposé au paragraphe 1.3.2, nous avons besoin de sources laser puissantes à 1270 nm pour obtenir un effet lié à la création d'oxygène et observable sur les cellules. Il n'existait, à notre connaissance, pas de source à 1270 nm suffisamment puissante et disponible commercialement au début de ce projet. Les expériences préliminaires ont été effectuées à l'aide de diodes laser à 1264 nm délivrant des puissances de plusieurs centaines de milliWatts.

Le projet ayant été initié par les membres de l'équipe « dynamique des lasers Raman à fibres » du laboratoire, la possibilité de développer notre propre source laser fibrée s'est vite imposée.

Historiquement, les Lasers Ramans à Fibre (LRF) ont été développés dans le but de pomper les amplificateurs à fibres dans le domaine des télécommunications [124]. Ce sont des sources versatiles capables, en principe, d'émettre un rayonnement continu dans une large gamme de longueurs d'ondes ($1,1 - 2,1 \mu m$) [125, 126]. Elles présentent l'avantage d'être compactes et faciles d'utilisation.

Pour le développement de notre propre source, plusieurs solutions technologiques ont été envisagées et essayées.

J'ai donc, lors de mon travail de thèse, participé au développement, à la caractérisation et à la réalisation de plusieurs types de Lasers Raman à Fibre (LRF) de puissance. En particulier, dans le cadre du projet européen « NextGenPCF », nous avons développé des lasers utilisant une nouvelle génération de fibres microstructurées hautement non-linéaires. Ce projet a mobilisé les compétences de deux équipes du laboratoire. L'une travaille dans la photo-inscription de réseaux de Bragg⁹ (équipe « photonique ») et l'autre étudie les lasers Raman à fibre (équipe « dynamique des lasers Raman à fibres »). Ce travail a donné lieu à une publication et le lecteur intéressé par plus de détails pourra s'y reporter [127].

De plus, dans le contexte du projet européen « NextGenPCF », un prototype délivrant jusqu'à $5 W$ à $1270 nm$ a été réalisé en collaboration avec la société Osyris. Ce dernier est destiné à des essais cliniques et, peut-être à terme, l'utilisation en thérapie de l'irradiation laser à $1270 nm$ dans le traitement local de maladies malignes.

Cependant, nous ne présenterons dans cette section que la source qui a permis la réalisation de ce travail de thèse, *i.e.* le laser Raman utilisé pour l'irradiation autour de $1270 nm$ d'une population de cellules sous microscope. Il s'agit d'un laser Raman à fibre, accordable, présentant une configuration dite en anneau. Celui-ci délivre une puissance totale de $\sim 2 W$ sur une gamme spectrale allant de $1239 nm$ à $1297 nm$ [128].

Nous commencerons par exposer brièvement le principe du laser Raman. Puis au travers de plusieurs dispositifs récemment proposés dans la littérature, nous exposerons le contexte dans lequel s'est effectué la réalisation de notre laser Raman accordable.

Puis nous présenterons le laser Raman que j'ai réalisé. Son principe de fonctionnement et ses caractéristiques en puissance seront exposées. Nous montrerons finalement que ses propriétés d'accordabilité en font un outil permettant de sonder la transition à $1270 nm$ du dioxygène en phase liquide dans des conditions standard de température et de pression.

2.2.1 Laser Raman à Fibre (LRF) : principe et contexte

Comme tout les lasers, les LRF sont basés sur deux phénomènes principaux : l'amplification de lumière dans un milieu actif et la résonance d'une cavité.

Dans un laser traditionnel le pompage d'un milieu permet l'amplification cohérente d'un bruit de photons par émission stimulée et la cavité résonnante permet l'établissement d'un rayonnement intense et cohérent (spatialement et temporellement) [120]. En pratique, cela signifie que le faisceau laser est intense, directif et quasi-monochromatique.

Diffusion Raman

Les LRF, permettent la conversion de l'énergie d'une onde lumineuse cohérente, dite de pompe à la longueur d'onde λ_p , en une onde lumineuse cohérente, dite Stokes, à une autre longueur d'onde λ_s .

Les gain est obtenu dans les LRF par diffusion¹⁰ Raman stimulée. L'effet Raman résulte d'un

⁹Le réseau de Bragg photo-inscrit sera précisé plus bas dans le paragraphe 2.2.1.

¹⁰La diffusion est un phénomène non résonant. C'est à dire que l'énergie du photon ne correspond pas à un niveau d'énergie de la molécule.

couplage non-linéaire entre la lumière et les vibrations des molécules du milieu dans lequel le rayonnement se propage [129].

Comme l'illustre la figure 2.7 (a), la diffusion Raman est un processus inélastique¹¹, par lequel un photon de pompe est détruit ce qui conduit à l'apparition d'un photon ayant une énergie différente [129]. On distingue, comme l'illustre la figure 2.7 (a), la diffusion Raman Stokes, pour laquelle une partie de l'énergie lumineuse de pompe est dissipée dans les modes de vibration des molécules, de la diffusion Raman anti-Stokes pour laquelle ce sont les modes de vibration qui fournissent de l'énergie. A titre d'exemple, le décalage Raman dans la silice (SiO_2) est de l'ordre de $\sim 13 THz$. Ceci conduit à convertir une onde de pompe à $1064 nm$ en une onde Stokes à $1120 nm$.

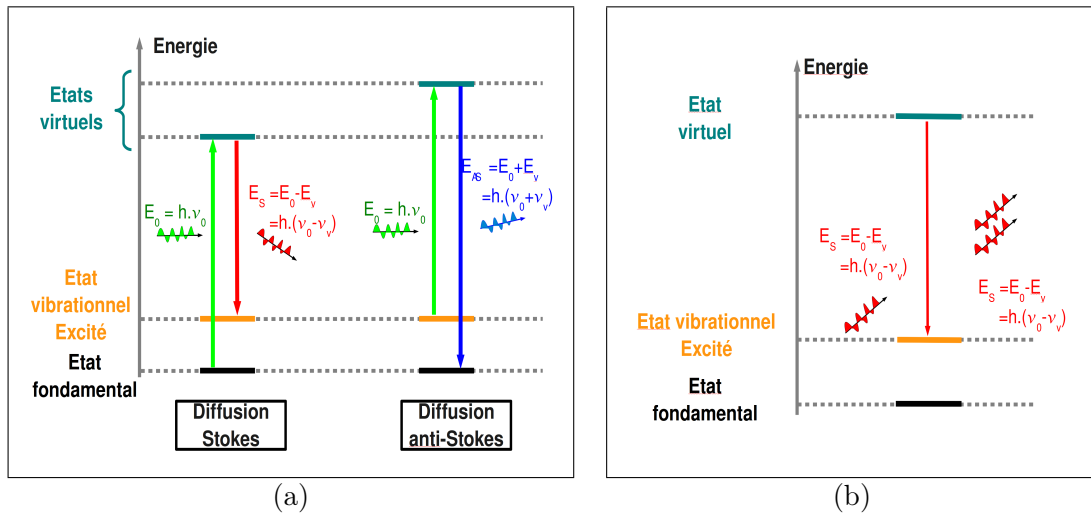


FIG. 2.7 – (a) Représentation schématique de la diffusion Raman - (b) Représentation schématique de la diffusion Raman stimulée

Laser Raman : principe

Comme l'illustre le schéma 2.7 (b), la diffusion Raman peut être stimulée [129]. Dans ce cas, il en résulte deux photons ayant exactement la même direction et la même énergie que le photon incident.

Ce processus est mis à profit dans les LRF : l'onde de pompe à la longueur d'onde λ_p donne naissance à une onde Stokes à la longueur d'onde λ_s . Cette dernière est amplifiée et oscille dans une cavité résonnante.

Comme l'illustre la figure 2.8, on distingue principalement deux types de cavités fibrées : les cavités Fabry-Perot, qui comprennent deux miroirs disposés en vis-à-vis, et les cavités en anneau qui sont réalisées par le re-bouclage de la fibre sur elle-même.

Dans les lasers à fibres, les cavités linéaires de type Fabry-Perot sont souvent réalisées à l'aide de composants directement inscrits dans la fibre optique. On parle alors de miroirs ou de réseaux de Bragg photo-inscrits [130].

Le miroir de Bragg est réalisé grâce à une modulation périodique de l'indice de réfraction le long de la fibre optique. Celle-ci est créée par exposition du coeur de la fibre à une figure d'interférence intense (en général dans le domaine UV) [130]. Ce réseau d'indice conduit à la réflexion d'une fine bande spectrale de l'onde lumineuse incidente par réflexions successives à l'interface entre deux couches d'indices différents [130]. La longueur d'onde dite de Bragg λ_B , c'est à dire autour de laquelle l'onde incidente est réfléchiée, dépend du pas du réseau et de la différence d'indice de réfraction entre deux couches successives [130] : elle est telle que les ondes réfléchies à chaque interface interfèrent constructivement à l'entrée du réseau de Bragg.

¹¹C'est à dire qu'une partie de l'énergie lumineuse est dissipée (ou fournie) par les (aux) modes de vibration des molécules.

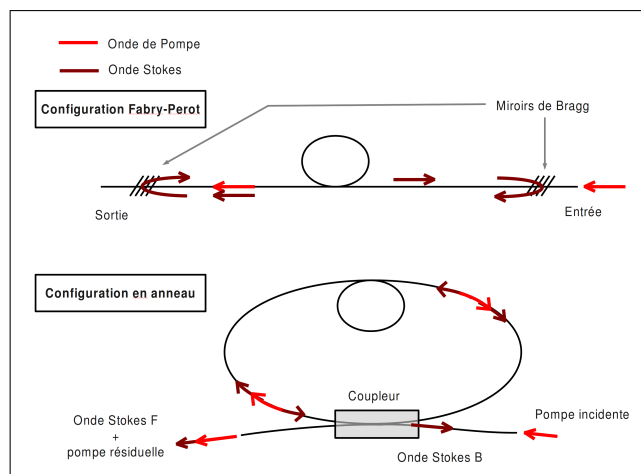


FIG. 2.8 – Représentations schématiques de deux configurations de cavité envisageables pour un LRF.

Dans les LRF, la longueur d'onde de Bragg est choisie pour coïncider avec la longueur d'onde de Stokes λ_s . Dans ce cas, le laser de pompe injecté par une extrémité de la fibre n'est, comme l'illustre la figure 2.8, pas affecté par le réseau de Bragg. Au contraire, l'onde de Stokes est réfléchiée par les miroirs de Bragg et effectue des allers-retours dans la cavité. Le rayonnement Stokes est donc amplifié par diffusion Raman Stimulée. Une partie du rayonnement Stokes peut être prélevée pour l'utilisation grâce à un miroir semi-réfléchissant.

Dans la configuration en anneau, l'onde de pompe est injectée dans la cavité à l'aide d'un coupleur¹², comme l'illustre la figure 2.8. Ceci conduit à la formation de deux ondes Stokes : l'une se propageant dans le même sens que l'onde de pompe (notée F pour « Forward ») et l'autre se propageant dans le sens inverse (notée B pour « Backward »). Ces ondes sont amplifiées par diffusion Raman stimulée en effectuant plusieurs tours dans la cavité. Une partie du rayonnement Stokes est extraite de la cavité à l'aide du coupleur.

Lasers Raman à Fibre Accordables : contexte

Les LRF classiques sont généralement réalisés dans des configurations Fabry-Perot. Il s'agit d'une configuration standard qui permet l'obtention d'un rayonnement laser continu à longueur d'onde fixe dans une gamme spectrale ($1 \mu\text{m}$ - $1,5 \mu\text{m}$ [125,126]) difficilement accessible par d'autres types de sources. Ce type de laser constitue une source fiable et compacte [125] qui est disponible commercialement.

A contrario, les Lasers Raman Fibrés Accordables sont moins répandus. Il n'ont, à notre connaissance, pas été développés pour l'utilisation commerciale.

Cependant, plusieurs techniques ont été testées en laboratoire pour extraire un rayonnement accordable des LRF. Ces techniques utilisent plusieurs géométries de cavité qui montrent des performances diverses en accordabilité comme en puissance. Le lecteur intéressé par la question pourra se reporter à la récente revue à la section 1 de la référence [131]. Ici, nous allons nous contenter d'un bref résumé des techniques utilisées et des performances atteintes dans le domaine.

Les LRF oscillants dans des cavités de type Fabry-Perot (utilisant des miroirs de Bragg inscrits dans des fibres) peuvent être accordés sur plusieurs dizaines de nanomètres en utilisant deux principales techniques. La première consiste à engluer les miroirs de Bragg sur une plaque en plexiglas qui peut alors être mécaniquement pliée pour obtenir une variation du pas du réseau et ainsi, un changement de ses caractéristiques spectrales [132]. En utilisant un laser Ytterbium et une fibre phosphosilicate comme milieu actif, Babin *et al.* ont démontré la possibilité d'accorder leur LRF sur

¹²Un coupleur est un composant d'optique fibré permettant de transférer tout ou partie d'une onde lumineuse se propageant dans une fibre dans une autre fibre optique. Le couplage par ondes évanescentes se fait généralement par juxtaposition des deux fibres.

une gamme de $1258 - 1300 \text{ nm}$ [132]. La seconde technique, utilise une compression purement axiale exercée sur un miroir de Bragg intégré dans un polymère hautement déformable [131]. En utilisant un laser Ytterbium à 1064 nm et une fibre germanosilicate comme milieu Raman actif, Bélanger *et al.* ont signalé la possibilité d'accorder un LRF sur une gamme de $1075 - 1135 \text{ nm}$ [131] par la compression axiale. Ces LRFs délivrent une puissance Stokes de plusieurs Watts avec un rendement autour de 70%.

Dans les cavités en anneau, l'accordabilité est généralement obtenue en ajoutant un filtre sélectif et accordable en longueur d'onde dans la cavité laser. Ce type de LRF en anneau est généralement accordé sur une gamme plus grande que les LRF de type Fabry-Perot [124]. A titre d'exemple, Qin *et al.* ont récemment démontré une accordabilité sur une gamme de $\sim 100 \text{ nm}$ ($1495 - 1600 \text{ nm}$) dans un laser fait avec une fibre de Tellurite [133]. Cependant, les LRF accordables réalisés jusqu'à présent ne délivrent au maximum qu'une puissance Stokes de l'ordre de $\sim 500 \text{ mW}$ avec un rendement de l'ordre de 25%.

2.2.2 Réalisation d'un Laser Raman Fibré accordable

La description schématique du laser que j'ai réalisé est présentée à la figure 2.9. Le laser de pompe est un laser commercial (Manlight ML10-CW-R-OEM-TUNE-1080) accordable entre 1060 et 1100 nm délivrant une onde aléatoirement polarisée d'une puissance maximale de 7 W . L'onde de pompe est injectée dans la cavité depuis le port 1 vers le port 3 du multiplexeur fibré¹³ $1080 \text{ nm}/1280 \text{ nm}$.

Le milieu Raman actif est une fibre phosphosilicate. Dans ce cas, la fibre en silice (SiO_2) est co-dopée au phosphore (P_2O_5) et présente une bande de gain Raman décalée de 40 THz par rapport à l'onde de pompe. Notons que ce décalage est trois fois supérieur à celui obtenu dans des fibres standard de type germanosilicate dont le décalage Raman est de $\sim 13.3 \text{ THz}$.

Avec la fibre phosphosilicate l'onde Stokes est obtenue à la longueur d'onde d'intérêt ($\lambda_s \sim 1270 \text{ nm}$) en une seule cascade Raman pour une onde de pompe Stokes à $\lambda_p \approx 1087 \text{ nm}$.

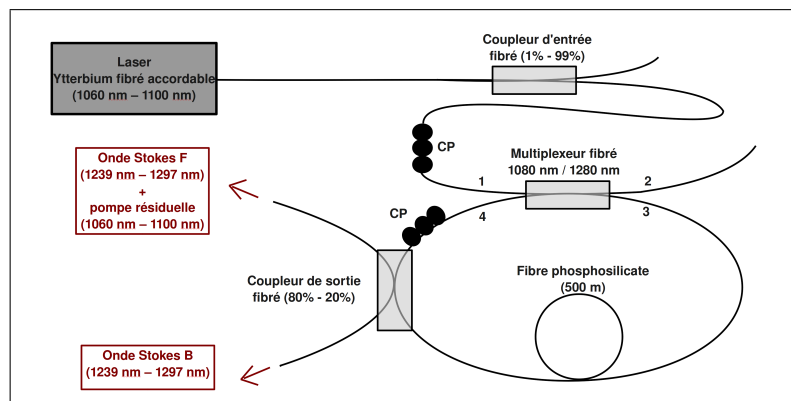


FIG. 2.9 – Représentation schématique de notre LRF en anneau accordable.

Ce LRF oscille dans une cavité en anneau bouclée en soudant la fibre phosphosilicate longue de 500 m sur les ports 3 et 4 du multiplexeur. Ce composant optique permet de séparer les rayonnements à des longueurs d'ondes différentes de manière analogue à un miroir dichroïque : un rayonnement à la longueur d'onde de pompe ($\sim 1087 \text{ nm}$) est transféré sur le port opposé (1-3; 4-2) alors qu'un rayonnement à la longueur d'onde Stokes ($\sim 1270 \text{ nm}$) est directement transmis (4-3).

Ainsi, les pertes de la cavité sont minimales autour de la longueur d'onde de Stokes (1270 nm) et maximales autour de la longueur d'onde de pompe (1087 nm).

¹³Un multiplexeur fibré est un composant optique permettant de séparer des longueurs d'ondes en deux bras distincts à l'image d'un miroir dichroïque dans un montage aérien.

Le gain Raman de la fibre phosphosilicate, étant à cette longueur d'onde de pompe situé lui aussi autour de 1270 nm , on peut aisément imaginer que l'onde Stokes s'établira naturellement dans cette région.

Insistons sur le fait que l'accordabilité n'est pas obtenue par insertion d'un composant sélectif dans la cavité. En changeant la longueur d'onde de pompe, le décalage Raman étant fixe, on obtient un rayonnement Stokes à une autre longueur d'onde. Dans ce laser, l'accordabilité n'est donc limitée que par l'accordabilité du laser de pompe.

Par ailleurs, on observe un effet Raman dû à l'interaction entre l'onde Stokes à 1270 nm avec d'autres molécules (SiO_2) du matériau composant la fibre. L'onde Stokes à 1270 nm joue alors le rôle d'une onde de pompe pour une émission Stokes à 1350 nm . Le gain Raman, associé à SiO_2 , autour de 1350 nm croît avec l'apparition de l'onde à 1270 nm . Comme les pertes de la cavité sont relativement faibles autour de 1350 nm , cette situation conduirait à une émission laser simultanée des deux longueurs d'ondes et même à la disparition de l'onde Stokes à 1270 nm qui nous intéresse. Pour éviter ce problème, nous avons choisi d'accroître les pertes de la cavité pour repousser le seuil d'apparition de l'onde Stokes à 1350 nm au delà du maximum de la puissance de pompe disponible. Ceci peut être fait en insérant dans la cavité un coupleur de ratio d'extraction $80\%/20\%$.

Avec cette géométrie de cavité, le seuil d'onde de pompe nécessaire à l'apparition de l'onde Stokes est situé autour de $\sim 3,5\text{ W}$, mais la fraction de rayonnement Stokes extraite de la cavité est de $\sim 80\%$, ce qui confère au laser un haut rendement.

2.2.3 Résultats : performances du laser

Dans cette configuration, le rapport entre les puissances des ondes Stokes F et B peut être ajusté à l'aide des Contrôleurs de Polarisation (CP) représentés à la figure 2.9. On obtient ainsi une puissance maximum de $\sim 1,6\text{ W}$ soit sur le bras F soit sur le bras B.

Cependant la maximisation de la puissance d'un des deux bras (F ou B) ne conduit pas à l'optimisation de la puissance totale du laser (F et B). La puissance maximale est obtenue lorsque les puissances des ondes Stokes B et F sont comparables. Dans cette dernière situation, le laser délivre une puissance totale de $\sim 2,5\text{ W}$. Les caractéristiques en puissance présentées dans la suite ont été mesurées dans cette dernière situation optimale.

Caractéristique en puissance et spectre optique

La figure 2.10 (a) montre les caractéristiques en puissance du laser. L'onde Stokes B est la seule onde à se propager dans la direction opposée à l'onde de pompe. Sa puissance a donc simplement été mesurée avec un puissance-mètre calibré. En mesurant la densité spectrale de puissance avec un analyseur de spectre optique sur une gamme de longueurs d'ondes comprenant à la fois la pompe et l'onde de Stokes ($1040 - 1300\text{ nm}$), nous avons pu calculer le rapport entre les puissances de pompe et de l'onde Stokes F. Ainsi, en mesurant la puissance totale dans la direction de propagation de la pompe avec un puissance-mètre, il nous a été possible de remonter à la puissance de chacune des ondes.

La figure 2.10 (b) montre les spectres optiques des ondes F et B du laser pour une longueur d'onde de pompe de 1087 nm et une puissance de pompe de 7 W . Dans ces conditions le laser délivre une puissance totale d'environ, $2,5\text{ W}$ soit $\sim 1,2\text{ W}$ sur chacun des bras.

En bleu est représenté le spectre de l'onde Stokes F centré à 1271 nm et en noir celui de l'onde B centré à 1270 nm . Dans les deux cas, la largeur à mi-hauteur (FWHM) est inférieure au nanomètre. Remarquons que ces spectres présentent une forme régulière de cloche contrairement aux LRF oscillant dans des cavités Fabry-Perot qui présentent en général un spectre ayant une structure en double pic [132].

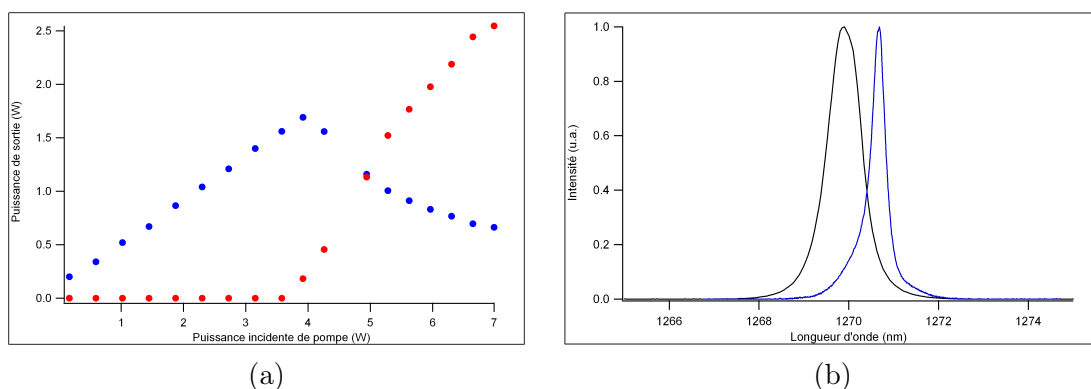


FIG. 2.10 – (a) Caractéristique en puissance du laser mesurée à la sortie du coupleur d’extraction. Pour cette caractéristique, la longueur d’onde de pompe (en bleu) est de 1087 nm et la Stokes (en rouge) est centrée autour de 1270 nm . On observe un seuil à $\sim 3,5\text{ W}$, puissance de pompe pour laquelle le laser démarre. - (b) Spectres optiques de l’onde B en noir et de l’onde F en bleu, pour une puissance de pompe de $\sim 7\text{ W}$.

Accordabilité

Comme le montre la figure 2.11 (a) la longueur d’onde d’émission de la Stokes varie linéairement avec la longueur d’onde de pompe et couvre une gamme de 38 nm allant de 1239 nm à 1297 nm , ce qui est suffisamment large pour sonder la transition qui nous intéresse.

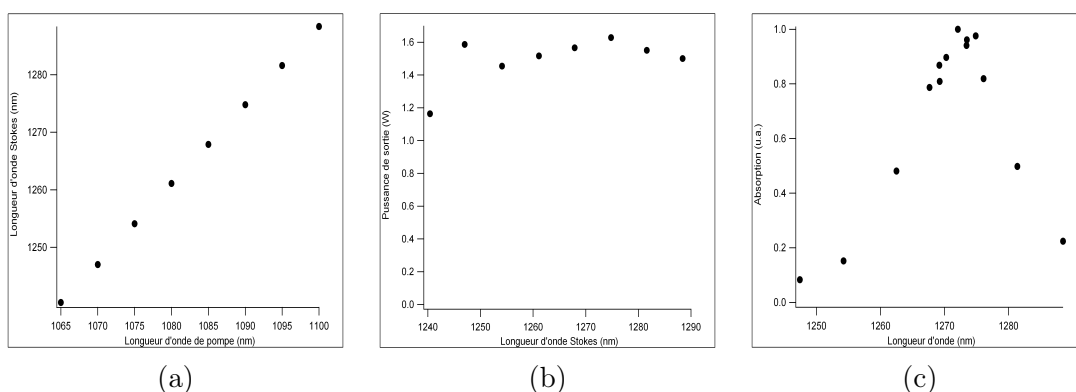


FIG. 2.11 – (a) Longueur d’onde de l’onde Stokes en fonction de la longueur d’onde de pompe du LRF en anneau accordable - (b) Puissance de sortie du laser en fonction de la longueur d’onde de Stokes pour une puissance de pompe de $5,3\text{ W}$ - (c) Spectre d’absorption associé à la transition ${}^3\text{O}_2 \rightarrow {}^1\text{O}_2$ à 1270 nm du dioxygène dissous dans une solution d’acétone mesuré à l’aide du laser accordable par la méthode décrite au chapitre 5.2.3.

Comme le montre la figure 2.11 (b), nous avons pu obtenir une puissance totale de $\sim 1,6\text{ W}$ sur toute la gamme d’accordabilité pour une puissance de pompe incidente de $5,3\text{ W}$. Notons que cette puissance est plus de trois fois plus grande que celle des LRF accordables en anneau avec un filtre intra-cavité publiés précédemment [124, 133].

Une puissance de $2,5\text{ W}$ pourrait être atteinte à l’aide de ce laser sur toute la gamme d’accordabilité. Mais, au-delà d’une puissance de pompe de $5,3\text{ W}$, une infime fraction de l’onde Stokes rétro-réfléchi pourrait être ré-injectée dans le laser de pompe. Cette puissance ré-injectée est amplifiée par le milieu actif du laser de pompe et, au-delà d’une certaine valeur, pourrait endommager le laser de pompe. Pour éviter ces dommages au laser Ytterbium, la quantité de lumière rétro-réfléchi vers le laser de pompe a été continuellement mesurée.

Ce problème conduit à une réduction de la gamme d’accordabilité à $1250 - 1280\text{ nm}$ de notre LRF pour une puissance de pompe de 7 W sans risque d’endommager le laser Ytterbium. L’ajout d’un isolateur optique entre le laser Ytterbium et le multiplexeur devrait permettre dans un futur proche d’étendre cette gamme spectrale.

Cependant, en l’état, ce laser est suffisamment intense pour sonder la transition ${}^3\text{O}_2 \rightarrow {}^1\text{O}_2$ à 1270 nm du dioxygène. La figure 2.11 (c) montre ce spectre d’absorption pour du dioxygène dissous

dans une solution d'acétone saturée en air. Le spectre a été obtenu à l'aide du LRF accordable par la méthode qui sera précisée au paragraphe 5.2.3 et au chapitre 7.

Retenons donc pour l'instant que ce laser nous a permis d'obtenir le spectre d'absorption associé à la transition ${}^3O_2 \rightarrow {}^1O_2$ à 1270 nm du dioxygène dans des solvants organiques [128].

Ce laser possède donc la puissance nécessaire pour observer un effet lié à l'excitation directe à 1270 nm de l'oxygène singulet dans des phases denses dont les propriétés (concentration en dioxygène, section efficace d'absorption) sont comparables à celles de l'eau [109] et donc par extension au milieu vivant. De plus, le laser possède une gamme d'accordabilité suffisante ($\sim 30\text{ nm}$) pour sonder la bande à 1270 nm du dioxygène qui nous intéresse ($\sim 15\text{ nm}$ FWHM).

Chapitre 3

Détermination de l'élévation locale de température induite par le laser

Le système et les méthodes expérimentales étant maintenant décrits, nous allons développer la question de la mesure de température. La densité de puissance laser utilisée pour l'irradiation des cellules est susceptible d'induire un échauffement local qui pourrait conduire à la mort des cellules, comme on l'a expliqué au paragraphe 1.1.3.

C'est l'énergie lumineuse absorbée par le solvant (ici l'eau du milieu de culture) qui est transformée en chaleur. A titre de comparaison, le flux lumineux réchauffant la surface de la terre par temps de soleil est de l'ordre de 100 mW.cm^{-2} (répartis sur tout le spectre) alors que dans nos expériences, l'intensité lumineuse traversant les cellules est de l'ordre de 100 W.cm^{-2} (autour de 1270 nm), soit 3 ordres de grandeurs de plus.

Nous ne pouvons utiliser une simple sonde pour mesurer la température au niveau des cellules. Les thermomètres sont en général trop gros et il serait impossible de distinguer l'échauffement induit dans le milieu, de l'échauffement induit par l'absorption de lumière par la sonde. De plus, dans la plupart des problèmes de Thermique, les échanges aux interfaces influencent fortement les variations du champ de température. Ce qui signifie, dans notre cas, étant données les dimensions du système, que la température dans le plan des cellules peut être très différente de celle quelques millimètres au-dessus. Il nous faut donc une méthode de mesure à la fois *in situ* et non-invasive. Nous avons choisi la microscopie de fluorescence qui permet une mesure résolue spatialement sans perturbation du champ de température.

La méthode de mesure discutée ci-après n'avait jamais été utilisée au sein de l'équipe. Pour confirmer les mesures, j'ai réalisé des simulations numériques de l'équation de diffusion de la chaleur avec un terme source. Ces simulations sont effectuées *ab initio*, c'est-à-dire qu'aucun paramètre n'est ajusté de la mesure de température : je les ai mesurés par des méthodes indépendantes. Cette approche combinée permettra de confirmer une mesure délicate.

Enfin, j'ai pu vérifier expérimentalement que l'échauffement induit par le laser atteint en quelques secondes un état stationnaire. En effet, lorsque l'on allume le laser, une tache lumineuse qui coïncide avec le faisceau laser apparaît au microscope à contraste de phase. Cette modification est due au changement d'indice de réfraction de l'eau avec la température, ce qui induit une modification locale de la phase de la lumière incidente observable par imagerie de contraste de phase. Cette tache se stabilise au bout de quelques secondes. Les mesures effectuées à l'aide de la méthode décrite ci-après ont confirmé cette échelle de temps. La durée du traitement laser étant nettement supérieure à la durée du régime transitoire, nous négligerons donc la variation temporelle de la température et considérerons seulement l'état stationnaire.

Dans un premier temps, nous préciserons les causes de l'échauffement et proposerons une modélisation. Celle-ci nous servira à confronter les résultats expérimentaux aux simulations numériques que j'ai réalisées à l'aide de la méthode des éléments finis et d'un logiciel mathématique dédié à cette technique : `freefem++` [134]. Ensuite, nous nous intéresserons à la méthode de mesure de la

température par microscopie de fluorescence. Nous en présenterons le principe ainsi que quelques précautions nécessaires à une mesure non erronée. Enfin, les résultats seront présentés dans leur ensemble et discutés. Ceci nous permettra d'évaluer les températures atteintes lors de nos expériences d'irradiation et d'en tirer les conséquences.

3.1 Causes de l'échauffement et modélisation

Dans cette section nous allons décrire l'élévation de température induite par le laser. Il ne s'agit pas ici de décrire précisément les simulations numériques. L'objet est plutôt de se convaincre de la nécessité de la mesure ainsi que d'introduire les points essentiels de la modélisation du problème et des simulations. Cette modélisation permettra, comme nous l'avons déjà évoqué, de confirmer la mesure qui sera décrite à la section suivante. En effet, nous verrons que la mesure décrite ci-après présente nombre d'artefacts potentiels susceptibles de conduire à une mesure erronée. L'obtention de valeurs comparables par deux méthodes indépendantes (les mesures et les simulations) confortera notre évaluation de l'élévation de température induite par le laser.

Comme on peut s'en rendre compte dans l'annexe A.1 le milieu de culture est principalement composé d'eau. A 1270 nm, j'ai vérifié que l'eau, comme le milieu de culture, absorbe environ $\sim 10 \text{ \%} \cdot \text{mm}^{-1}$ de l'énergie lumineuse. Cette longueur d'onde correspond à l'extrémité d'une raie de vibration de l'eau [135]. L'essentiel de l'énergie lumineuse absorbée est donc *a priori* dissipée sous forme de chaleur. Nous considérerons que la totalité de l'énergie absorbée par le solvant est un terme source de chaleur. Cette approche est la même que celle utilisée pour décrire l'échauffement induit dans les systèmes de pièges optiques¹ [136, 137]. Ajoutons que la boîte de Petri en polystyrène cristal d'épaisseur $e = 1 \text{ mm}$ absorbe, elle aussi, une partie ($\sim 1 \text{ \%} \cdot \text{mm}^{-1}$) du faisceau laser, nous opterons pour la même description que pour le solvant.

Dans un premier temps, nous exposerons les éléments nécessaires à la description du problème d'échauffement en précisant les notations. Puis, dans le cadre de l'équation de la chaleur, nous proposerons une description formelle du problème et notamment du terme source responsable de l'élévation de température. Nous nous intéresserons enfin aux choix des conditions aux limites nécessaires pour décrire les échanges aux frontières de la boîte de Petri.

3.1.1 Position du problème et notations

La situation est celle décrite au paragraphe 2.1.2. Le faisceau laser traverse l'objectif et irradie les cellules par le dessous.

Comme le montre la figure 2.4 (a) du paragraphe 2.1.2 le diamètre du faisceau varie peu autour de la position des cellules. Nous allons donc considérer sa section ($2w \approx 510 \text{ }\mu\text{m}$) constante au cours de la propagation. Le schéma 3.1 représente la partie du dispositif expérimental qui nous intéresse ici.

Comme le montre la figure 3.1, nous noterons z l'axe de propagation du faisceau laser. Ce faisceau laser traverse le fond de la boîte de Petri d'épaisseur e (mm), de conductivité thermique λ_P ($\text{W} \cdot \text{m}^{-1} \cdot \text{K}^{-1}$) et de coefficient d'absorption linéaire à 1270 nm α_P (m^{-1}). Le rayon de la boîte Petri est noté R_0 , il vaut 1,75 cm. Nous négligerons la présence des cellules dont la faible épaisseur de quelques micromètres influe peu *a priori*. Le faisceau traverse ensuite le milieu de culture, assimilé à de l'eau, d'épaisseur L , de conductivité thermique λ_L et de coefficient d'absorption linéaire à 1270 nm α_L . L'air au-dessus du milieu de culture, ainsi que la boîte de Petri sont contenus dans la chambre de culture miniature et sont donc thermostatés à 37°C. L'air sous la boîte de Petri n'est quant à lui pas contenu dans la chambre, sa température est donc au-delà d'une certaine couche limite, celle de la pièce : 21°C.

¹Les pièges optiques ou pinces optiques utilisent des lasers infra-rouge de puissance pour piéger et manipuler des objets microscopiques diélectriques. Cette méthode utilise la pression de radiation pour piéger, par exemple, des billes de polystyrène dans un gradient de force dipolaire.

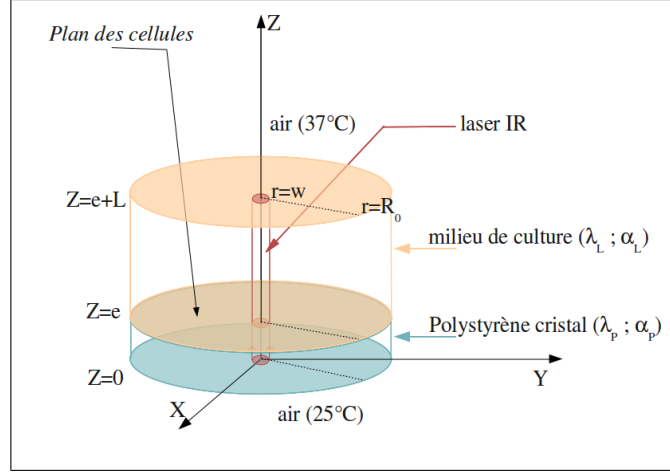


FIG. 3.1 – représentation schématique du dispositif d'irradiation

Les 5 mL de milieu de culture utilisés lors des expériences d'irradiation correspondent à une épaisseur L de 5,2 mm. L'épaisseur e du fond de la boîte de Petri est 1 mm.

La conductivité thermique de la boîte de Petri est $\lambda_P \approx 0,144 \text{ W.m}^{-1}.\text{K}^{-1}$ (donnée du fournisseur). La conductivité thermique de l'eau ne varie que de 5% entre 21°C et 43°C, et vaut : $\lambda_L \approx 0,63 \text{ W.m}^{-1}.\text{K}^{-1}$ à 37°C [138].

J'ai mesuré les coefficients d'absorption linéaire à 1270 nm du milieu de culture² et de la boîte de Petri³. Ils valent respectivement : $\alpha_L \approx 0,11 \pm 0,01 \text{ mm}^{-1}$ et $\alpha_P \approx 0,01 \pm 0,01 \text{ mm}^{-1}$.

3.1.2 Equation de la chaleur

Les phénomènes de transfert thermique peuvent être décrits par une équation de diffusion analogue à la diffusion de particules. Cette équation aux dérivées partielles découle de la loi de Fourier qui stipule que le sens des échanges de chaleur se fait selon l'opposé du gradient de température, c'est à dire que l'énergie est transférée des points chauds vers les zones de basses températures.

A l'état stationnaire, cette équation prend la forme définie par l'équation 3.1 [138] :

$$-\lambda \nabla^2 T(M) = p(M), \forall M \in \Omega \quad (3.1)$$

où $T(M)$ (K) est la température au point M considéré de coordonnées⁴ (r, z) , λ ($\text{W.K}^{-1}.\text{m}^{-1}$) la conductivité thermique du milieu, Ω est le domaine spatial considéré, et $p(M)$ (W.m^{-3}) représente l'énergie dissipée sous forme de chaleur par unité de volume (le terme source).

Ici, Ω représente le volume contenant à la fois le liquide dans lequel sont immergées les cellules et le fond de la boîte de Petri, c'est-à-dire : $\Omega = [0; R_0] \times [0; e + L]$.

Description du terme source

On s'intéresse ici à la forme spatiale du terme source responsable de l'échauffement. Une partie du faisceau laser est absorbée par le milieu de culture et le fond de la boîte de Petri. La puissance absorbée est convertie en chaleur et induit un échauffement. La géométrie du terme source suit

²Le coefficient d'absorption du milieu de culture est obtenu en mesurant la variation de la puissance laser à 1270 nm transmise en fonction de l'épaisseur de liquide. En ajoutant successivement des quantités connues de liquide, la puissance transmise suit une loi exponentielle, le coefficient d'absorption peut alors être obtenu en ajustant cette variation exponentielle par régression linéaire.

³Le coefficient d'absorption du plastique ne peut quant à lui être mesuré par la même méthode que pour le liquide. Celui-ci a été évalué en soustrayant à la puissance incidente total les puissances transmise et réfléchi par l'épaisseur du fond de la boîte de Petri. C'est la variation de la puissance réfléchi avec la polarisation du laser et l'angle de réflexion qui donne l'incertitude sur cette mesure.

⁴La coordonnée angulaire, θ n'intervient pas car le problème est à symétrie cylindrique.

l'évolution spatiale du faisceau. En effet, le phénomène d'absorption est beaucoup plus rapide que le phénomène de diffusion de la chaleur. Comme on l'a déjà évoqué, la propagation du faisceau peut être correctement décrite par les équations des faisceaux gaussiens. Dans le plan transverse l'intensité laser suit la forme d'une gaussienne de rayon de ceinture w . Le faisceau étant peu divergent sur plusieurs millimètres autour du point de focalisation, on peut négliger la dépendance en z du rayon de ceinture w de l'équation (3.2). Notons que cette hypothèse peut être aisément modifiée dans les simulations. L'absorption linéaire de la boîte de Petri et du milieu de culture induit une décroissance exponentielle de l'intensité avec les coefficients d'atténuation $\alpha_P \approx 0,01\text{mm}^{-1}$ et $\alpha_L \approx 0,11\text{mm}^{-1}$ mesurés.

Rappelons que les cellules sont irradiées par le dessous : le laser est incident en $z = 0$ et il se propage dans la direction $z > 0$. Le terme source s'écrit donc :

$$p(r, z) = \begin{cases} p_P \times e^{-\frac{2r^2}{w^2}} \times e^{-\alpha_P z} & \forall z \in [0; e[\\ p_L \times e^{-\frac{2r^2}{w^2}} \times e^{-\alpha_L(z-e)} & \forall z \in [e; L[\end{cases} \quad (3.2)$$

Pour déterminer p_P et p_L , il suffit d'intégrer sur le volume :

$$\int_{r=0}^{+\infty} \int_{\theta=0}^{2\pi} \int_{z=0}^e p(r, z).dr.r.d\theta.dz = \Delta P_P$$

et

$$\int_{r=0}^{+\infty} \int_{\theta=0}^{2\pi} \int_{z=e}^{e+L} p(r, z).dr.r.d\theta.dz = \Delta P_L$$

où $\Delta P_P = P_0(1 - e^{-\alpha_P e})$ et $\Delta P_L = P_0 e^{-\alpha_P e}(1 - e^{-\alpha_P L})$ sont les puissances absorbées respectivement par la boîte de Petri et le milieu de culture.

Si on note P_0 la puissance totale incidente sur la boîte de Petri, on trouve :

$$\begin{aligned} p_P &= \alpha_P \times \frac{P_0}{\pi(\frac{w}{2})^2} \\ p_L &= \alpha_L \times \frac{P_0 e^{-\alpha_P e}}{\pi(\frac{w}{2})^2}. \end{aligned} \quad (3.3)$$

3.1.3 Choix des conditions aux limites

Pour déterminer la solution de l'équation de la chaleur il est nécessaire de définir les conditions aux limites, c'est-à-dire la nature des échanges aux bords du domaine Ω considéré. Mathématiquement, il s'agit de résoudre le problème de Cauchy défini par l'équation 3.5. Physiquement, il s'agit de décrire les échanges avec l'extérieur. La forme du profil sera dominée par la diffusion du terme source, alors que la valeur du maximum de température sera déterminée par la chaleur dissipée à l'extérieur, *i. e.* les conditions aux limites.

Dans le cas des fluides (liquide ou gaz), le choix des conditions aux limites est un problème compliqué. La plupart du temps, une description précise de ces échanges nécessite de revenir à une échelle mésoscopique en tenant compte des mouvements locaux des fluides : la convection naturelle⁵. C'est un domaine de recherche en soi, parfois nommé thermomécanique [139] et nous adopterons une description autre description permettant de décrire la convection naturelle.

Température imposée sur les bords éloignés

La solution la plus simple pour décrire les échanges consiste à imposer la température aux bords (conditions dites de Dirichlet). Ceci revient à négliger une couche limite de fluide dans laquelle le champ de température évolue pour atteindre la température imposée. De manière générale dans les

⁵La convection naturelle ou libre est un mode de transfert de chaleur qui, contrairement à la conduction, est dû à un déplacement de matière : les particules de fluide plus chaudes sont moins denses, elles ont donc tendance à remonter.

problèmes de diffusion, c'est l'échelle spatiale la plus petite qui domine les effets. Cette condition, bien que très restrictive, est la plus employée pour modéliser l'échauffement dans les pièges optiques [136,137] : la température est considérée comme imposée suffisamment loin.

La dimension transverse du terme source de l'échauffement (faisceau laser) est très petite devant le rayon de la boîte de Petri ($w \ll R_0$), on peut aisément imposer la température sur les bords ($T(M) \equiv T_0 \forall M \setminus r = R_0$). De même, l'épaisseur L de liquide est suffisamment grande devant la taille des cellules pour imposer la température à la surface supérieure du milieu de culture ($T(M) \equiv T_0 \forall M \setminus z = e + L$).

En pratique, pour être certain de minimiser l'influence de ces conditions aux limites, j'ai vérifié que dans les simulations numériques une variation des dimensions du volume Ω influence peu la valeur et le profil du champ de température. En effet, diviser ou multiplier par un facteur deux le rayon de la boîte de Petri (R_0) n'influence pas du tout le champ de température dans les simulations numériques. Une variation de l'épaisseur L dans la gamme 3, 5 – 10 mm modifie quant à elle, dans les simulations, de moins de 7% la valeur du maximum de température. Le profil, normalisé au maximum, n'est quant à lui pas modifié. Cette hypothèse simplificatrice est donc applicable à ces deux interfaces ($r \equiv R_0$ et $z \equiv e + L$).

Condition mixte : convection de l'air froid du dessous

En ce qui concerne la face inférieure de la boîte de Petri ($z \equiv 0$), il est physiquement peu crédible d'imposer la température. En effet, l'épaisseur e du fond de la boîte de Petri est trop petite devant la taille de la couche limite.

L'air en dessous de la boîte de Petri n'est pas thermalisé et la conductivité du plastique est suffisamment grande pour dissiper la chaleur à travers cette surface. L'air n'est en général pas un bon conducteur de chaleur⁶ et la convection naturelle (mouvements locaux du fluide) dans l'air est ici le phénomène prépondérant.

Il n'est cependant pas nécessaire de décrire les mouvements locaux du fluide pour cette interface. La convection peut être modélisée par la loi linéarisée suivante [138,140] :

$$-\lambda_P \frac{\partial T(M)}{\partial z} = h(T(M) - T_\infty), \forall M \in \Gamma_1 \quad (3.4)$$

où Γ_1 représente la surface extérieure du fond de la boîte de Petri en contact avec l'air, T_∞ (K) est la température de l'air au-delà d'une certaine couche limite et h ($W.m^{-2}.K^{-1}$) un coefficient de transfert. Il suffit donc de choisir la température T_∞ égale à la température de l'air ambiant, soit 21°C.

Le coefficient d'échange, h ne dépend pas seulement du fluide. Des relations semi-empiriques tabulées permettent sa détermination en fonction de la géométrie du problème, des propriétés thermophysiques du fluide (ici l'air) et de l'écart de température mis en jeu. Le lecteur intéressé par plus de précision sur la détermination de ce coefficient pourra se reporter aux références [138,140]. Dans notre cas, j'ai calculé un coefficient de l'ordre de $h \sim 5W.m^{-2}$. Il s'agit ici de la borne inférieure du coefficient d'échange pour la convection naturelle dans l'air [139]. C'est compréhensible, car la convection aura tendance à évacuer la chaleur par le haut (les particules de fluide chauffées, moins denses, montent) alors que dans notre cas le sens des échanges est du haut vers le bas. C'est le cas le moins favorable pour la dissipation par convection.

Même si c'est peu pertinent du point de vue physique, j'ai choisi d'étudier aussi le cas d'une température imposée à l'extrémité inférieure du fond de la boîte de Petri. Cette condition revient à prendre le coefficient d'échange, h , infiniment grand⁷. Ce cas présente donc l'intérêt de représenter la borne supérieure de la dissipation par convection. En effet, même si en théorie les formules pour

⁶La conductivité thermique de l'air est de l'ordre de 0, 2W.m⁻¹ [110], soit 30 fois inférieure à celle de l'eau.

⁷En effet, le flux de chaleur vers l'extérieur $-\lambda_P \frac{\partial T}{\partial z}$ ne peut être infini.

la détermination du coefficient d'échange sont applicables aux dimensions de notre système, les expériences permettant la tabulation des paramètres pour sa détermination sont effectuées sur des systèmes de dimensions environ dix fois plus grandes.

L'étude des deux cas limites, $h \sim 5W.m^{-2}$ et $h \rightarrow \infty$ doit, comme l'illustre la figure 3.2, permettre d'obtenir un encadrement des échanges entre la boîte de Petri contenant le milieu et l'air en dessous.

Le problème complet

A l'interface entre le liquide et le plastique (plan des cellules), il y a un bon contact thermique. En effet, le liquide épouse bien la forme et les éventuelles micro-aspérités de la boîte de Petri. J'ai donc choisi à cette interface d'imposer la continuité du flux de chaleur.

Les conditions aux limites étant fixées, on obtient une formulation complète du problème d'échauffement donnée par les équations :

$$\begin{cases} -\lambda \nabla^2 T = p & [0; R_0] \times [0; e + L] \\ T = T_0 & \text{sur } \Gamma_0 \\ -\lambda \frac{\partial T}{\partial n} = h(T - T_\infty) & \text{sur } \Gamma_1 \end{cases} \quad (3.5)$$

où Γ_0 représente le contour de la boîte de Petri et la surface de liquide thermalisés par l'incubateur ($r \equiv R_0$ et $z \equiv e$) et, Γ_1 est la surface inférieure de la boîte de Petri en contact avec l'air ($z \equiv 0$).

Remarquons qu'ici la conductivité thermique λ est considérée dans deux matériaux différents. Elle n'est donc pas homogène. De plus, la continuité du flux de chaleur invoquée au paragraphe précédent est ici implicite. Ceci ne pose pas vraiment de problème pour la résolution numérique. Le lecteur intéressé par plus de précision pourra se reporter au paragraphe B.4.1 de l'annexe B.

J'ai utilisé le logiciel d'éléments finis FreeFem++ [134] pour résoudre numériquement ce problème d'équation aux dérivées partielles. Ce logiciel nécessite l'utilisation de la forme variationnelle des équations. Pour le lecteur intéressé l'annexe B présente le détail de cette formulation pour notre problème.

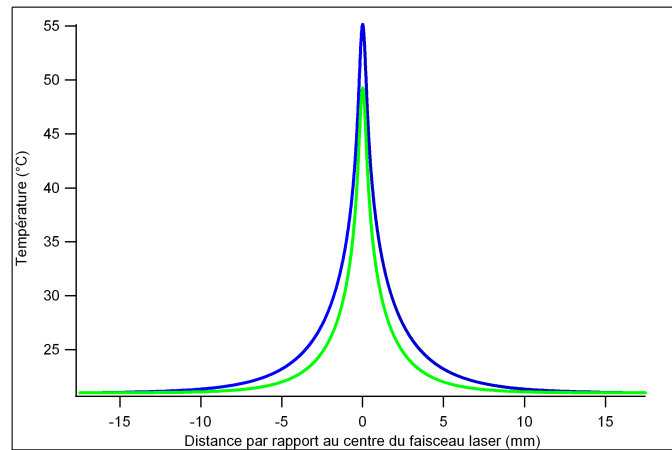


FIG. 3.2 – Simulation numérique de l'échauffement induit par le laser. Dans cette simulation la puissance laser est de 450 mW et la température est imposée au loin à 21°C . En bleu est présentée le résultat pour une condition sur le bord inférieur de la boîte de Petri pour une condition de type mixte (convection avec $h = 5 \text{ W.m}^{-2}$), et la courbe verte est la simulation pour une température imposée (21°C) sur le bord inférieur ($h \rightarrow \infty$).

Les résultats des simulations seront repris en détail plus loin. Pour l'instant, remarquons sur la figure 3.2 que les deux valeurs extrêmes du coefficient h représentent bien deux cas limites. Le maximum de température issu des simulations numériques est comparable (à 5°C près) dans les deux cas.

Nous reviendrons sur ces simulations au paragraphe 3.3 où nous les comparerons aux résultats expérimentaux. Insistons sur le fait que les résultats présentés à la figure 3.2 sont présentés pour une distance r aussi grande que le rayon R_0 de la boîte de Petri, alors qu'expérimentalement nous n'aurons accès qu'à un champ beaucoup plus petit. La distance r est limitée expérimentalement par la taille de la surface sensible de la caméra. En pratique cette distance est de l'ordre de $r \sim 1 \text{ mm}$.

3.2 Mesure de température par microscopie de fluorescence

Dans cette section nous allons développer la question de la mesure de température. Le principe est simple, on utilise un colorant dont l'intensité de fluorescence dépend de la température. Lorsque la température est élevée le colorant fluoresce moins.

En fluide, dans l'idée d'obtenir une information spatio-temporelle sur le champ de température pour l'étude de la convection au-dessus d'une plaque horizontale chauffée, Sakakibara et Adrian ont montré en 1999 que l'utilisation de la rhodamine B est pertinente [141]. Cette technique s'est vite exportée en microfluidique et en microscopie, notamment pour évaluer l'échauffement induit par les lasers utilisés dans les pièges optiques [136, 137]. Notons que, dans sa version originelle [141], la méthode utilise en fait deux colorants [141]. A la rhodamine B s'ajoute un colorant de référence, la rhodamine 110, pour s'affranchir d'éventuels effets de lentilles thermiques.

Dans un premier temps nous décrivons le principe de la mesure à l'aide d'un colorant dont la fluorescence dépend de la température. Puis nous décrivons comment les effets de lentille thermique peuvent induire une mesure erronée et montrerons que l'utilisation d'un colorant de référence permet de s'en affranchir. Ensuite, nous présenterons le dispositif expérimental et préciserons quelques points sur la réalisation pratique de la mesure. L'introduction de la notion de profondeur de champ nous permettra de discuter dans quelle mesure la température mesurée correspond à celle au niveau des cellules sur le fond de la boîte de Petri. Enfin nous présenterons les résultats concernant l'élévation de température induite dans notre système expérimental. Nous obtiendrons ainsi une gamme de puissances dans laquelle on montrera qu'il est possible de compenser l'élévation de température induite par le laser.

3.2.1 Principe de la mesure

La microscopie de fluorescence est désormais une technique bien connue en biologie pour l'observation de molécules au niveau intracellulaire [142]. On l'utilise souvent en greffant un chromophore sur une molécule d'intérêt. On utilise alors une lumière monochromatique pour exciter ce chromophore. Une partie de l'énergie lumineuse absorbée est réémise à une longueur d'onde différente. Comme l'illustre le schéma de la figure 3.3 (a), la séparation des longueurs d'ondes d'excitation et d'émission permet alors l'imagerie avec une résolution spatiale, au mieux, de l'ordre de la longueur d'onde.

La fluorescence est un processus de désactivation radiatif. Un colorant exposé à une onde électromagnétique résonnante absorbe une partie de l'énergie de l'onde. Le champ électromagnétique induit la transition entre l'état fondamental (S_0) du colorant vers son état électronique excité (S_1 ou S_2). Cet état excité peut se désactiver par deux principaux processus.

Comme l'illustre la figure 3.3 (b), le premier processus, rapide, est l'émission d'un photon : la fluorescence. L'énergie du photon réémis dépend de l'écart d'énergie entre le niveau excité et le niveau fondamental. La longueur d'onde de fluorescence est donc indépendante de la longueur d'onde d'excitation. De plus, comme elle est en général précédée par une relaxation vibrationnelle, la fluorescence se fait à une longueur d'onde plus grande que la longueur d'onde d'excitation [142].

Dans le second processus, non-radiatif, le surplus d'énergie est en général dissipé sous forme de chaleur dans le solvant [142]. Le chromophore dans un état excité (S_1 ou S_2) peut aussi se désactiver de manière non-radiative par collision avec le solvant (non représenté sur le schéma 3.3 (b)). Toutes les molécules ayant absorbé un photon ne réémettent donc pas de la lumière par fluorescence.

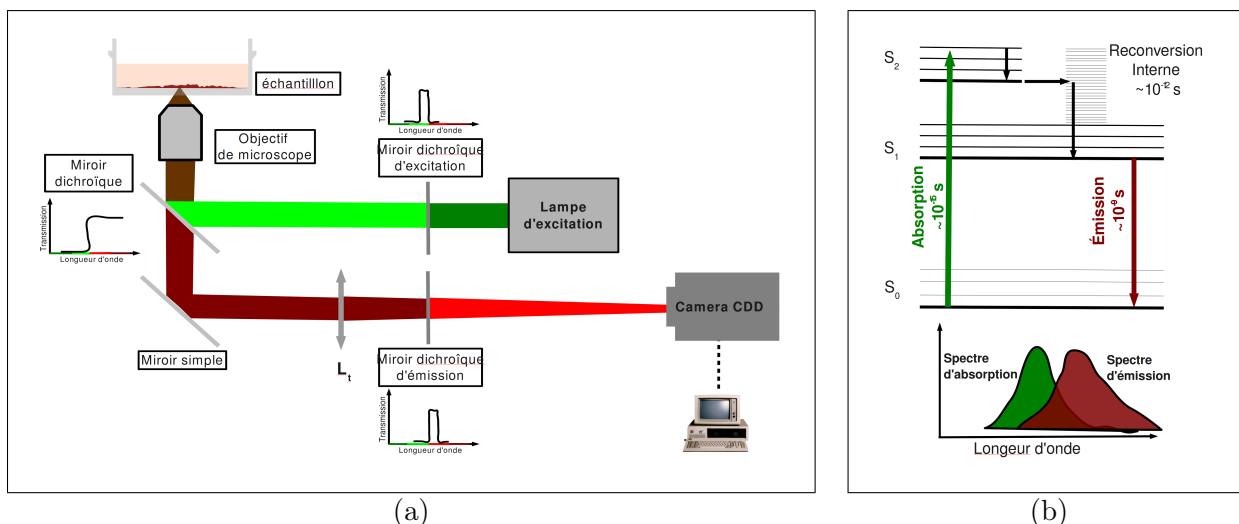


FIG. 3.3 – (a) principe de la microscopie de fluorescence - (b) diagramme de Jablonski simplifié.

Le ratio entre l'énergie lumineuse émise et l'énergie absorbée est appelé l'efficacité quantique (Φ). L'énergie lumineuse par unité de volume, I ($W.m^{-3}$) émise par fluorescence s'écrit donc :

$$I = I_0 \cdot \Phi \cdot [S_0] \cdot \epsilon \quad (3.6)$$

où, I_0 ($W.m^{-2}$) est le flux lumineux d'excitation, $[S_0]$ ($mol.m^{-3}$) la concentration du chromophore et, ϵ un coefficient d'absorption ($mol^{-1}.m^2$).

Pour la plupart des colorants organiques, l'efficacité quantique dépend de la température. Intuitivement, la part de désexcitation non-radiative (collisions avec le solvant) augmente avec l'agitation thermique. C'est à dire que la part de désexcitation radiative (fluorescence) diminue avec la température. Cette dépendance de Φ avec la température est souvent faible. Cependant, pour quelques composés comme la rhodamine B, la variation peut atteindre $\frac{1}{\Phi} \cdot \frac{\partial \Phi}{\partial T} \sim 2\%K^{-1}$, comme le montre la figure 3.4, alors que le coefficient d'absorption varie peu : $\frac{1}{\epsilon} \cdot \frac{\partial \epsilon}{\partial T} \sim 0,05\%.K^{-1}$ [141].

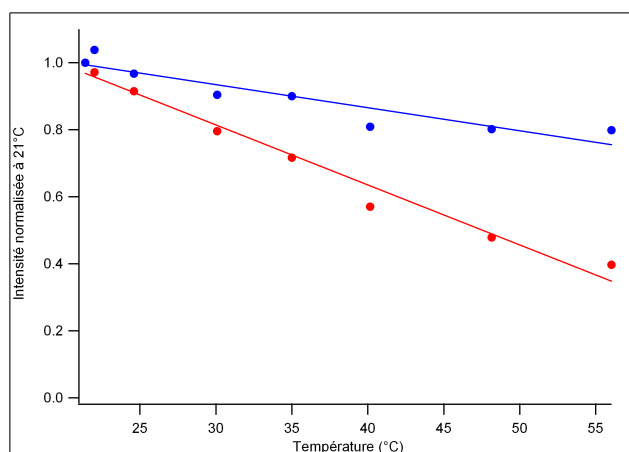


FIG. 3.4 – Intensités de fluorescence de la rhodamine B (en rouge) et de la rhodamine 110 (en bleu), normalisées à leurs valeurs à 21°C, en fonction de la température. Les mesures ont été effectuées à l'aide du dispositif expérimental décrit à la figure 3.8. Les points représentent les valeurs expérimentales et les lignes représentent le meilleur ajustement linéaire. On trouve une décroissance de $1,8\%.K^{-1}$ pour la rhodamine B et de $0,7\%.K^{-1}$ pour la rhodamine 110, en accord avec les valeurs publiées dans la référence [141].

Il est donc possible d'utiliser cette dépendance pour mesurer la température. Il suffit, en présence du faisceau laser, de faire une image du plan des cellules par microscopie de fluorescence d'une solution de rhodamine B dont l'intensité de fluorescence est calibrée en fonction de la température.

A partir d'une image de l'intensité de fluorescence $I(M)$ de la rhodamine B, on peut déterminer la distribution de température $T(M)$.

3.2.2 Effet de lentille thermique

En pratique, l'intensité lumineuse émise par fluorescence et collectée sur la caméra peut varier à cause de plusieurs effets, en particulier par réfraction de lumière au travers du champ de température lui-même. En effet, nous avons pu observer une modification notable de la propagation d'un faisceau laser rouge (633 nm) au travers du milieu de culture en présence du faisceau laser à 1270 nm. Ceci sous-entend un effet de lentille thermique⁸. L'objet du paragraphe suivant est d'illustrer comment ce phénomène doit être pris en compte pour réaliser une mesure du profil de température par le laser.

Origine et ordre de grandeur de l'effet

Pour la plupart des milieux denses, l'indice de réfraction varie de manière significative avec la température. Par exemple, pour l'eau, l'indice de réfraction diminue avec la température : à 633 nm il vaut $n_{20^\circ C} = 1,33211$ à $20^\circ C$ et $n_{40^\circ C} = 1,32972$ à $40^\circ C$ [110]. Comme le montre la figure 3.5 la boîte de Petri présente elle aussi une variation $\frac{\partial n}{\partial T}$ d'indice avec la température.

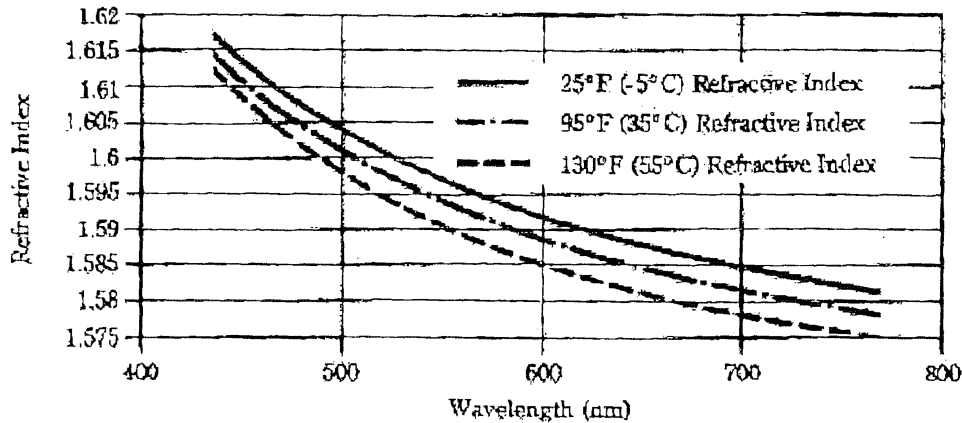


FIG. 3.5 – Variation de l'indice de réfraction de la boîte de Petri en fonction de la température et de la longueur d'onde (données fournies par le constructeur).

Une variation locale de la température du milieu induit donc une variation, elle aussi locale, de l'indice de réfraction qui suit le profil de température. En effet, le développement de Taylor de l'indice de réfraction s'écrit :

$$n(T(M)) \approx n(T_0) + \frac{\partial n}{\partial T} \times (T(M) - T_0) \quad (3.7)$$

Considérons la situation décrite par le schéma 3.6 (a). Supposons une onde plane incidente sur le champ de température de la figure 3.6 (b) supposé établi sur toute l'épaisseur, e , de la boîte de Petri.

L'élévation de température $T(M) - T_0$ est positive au centre ($r \rightarrow 0$) et l'indice de réfraction décroît avec la température ($\frac{\partial n}{\partial T} < 0$). Donc l'indice de réfraction dans la boîte de Petri est plus petit au niveau de l'élévation ($r \rightarrow 0$) de température ($\frac{\partial n}{\partial T} < 0$) qu'au loin ($r \rightarrow \infty$). En d'autres termes, la vitesse de phase est plus grande au centre que sur les bords et les surfaces d'onde se déforment comme illustré à la figure 3.6(a).

Les vecteurs d'onde sont perpendiculaires aux surfaces d'onde. L'épaisseur de la boîte de Petri, chauffée très localement, se comporte donc comme une lentille divergente qui coïncide avec le faisceau

⁸L'effet de lentille thermique domine en ordre de grandeur un potentiel effet Kerr.

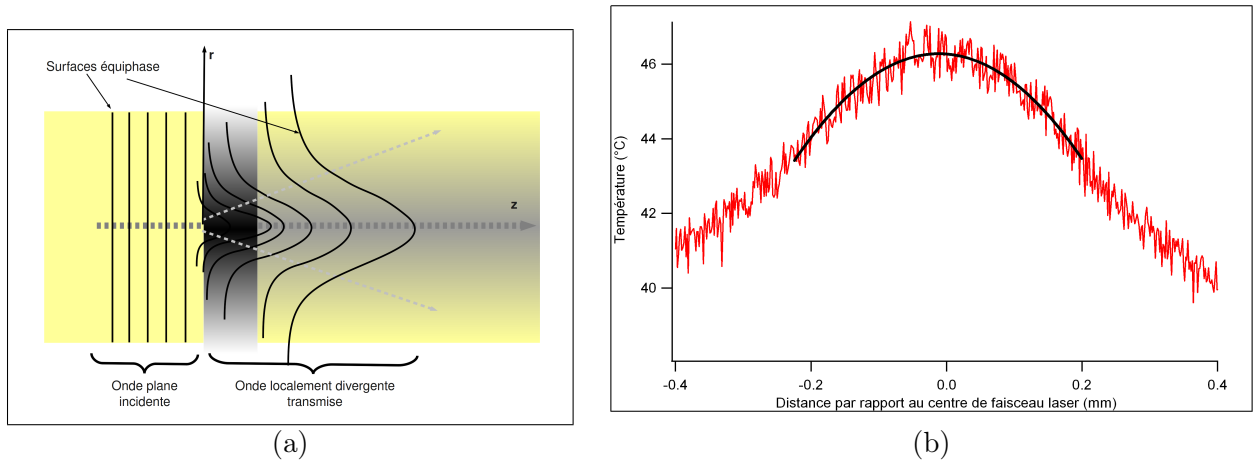


FIG. 3.6 – (a) Représentation schématique de l'effet de lentille thermique - (b) Profil de température mesuré pour une puissance incidente $P_0 \sim 250mW$ du laser à $1270nm$, de diamètre (FWHM) de $300\mu m$: en rouge la courbe expérimentale, en noir le polynôme d'ordre 2 le mieux ajusté par régression linéaire.

laser et ses dimensions. Au centre, au niveau de l'élévation de température, une partie de l'intensité de fluorescence n'est donc pas collectée par l'objectif.

De plus, la propagation de la lumière d'excitation est influencée par ce champ d'indice : la lentille divergente tend à diminuer l'intensité d'excitation dans la zone chaude. Ceci peut conduire à une mesure faussée, car tout se passe comme si le colorant fluorescrait moins au centre du faisceau laser qu'à l'extérieur. On pourrait donc surestimer la température.

Comme le montre la figure 3.6 (b), si l'on ne s'éloigne pas trop du centre du faisceau laser, l'élévation de température peut être bien approximée par une équation du type :

$$\Delta T(r) = T(r) - T_0 = \Delta T_{max} + a.r^2$$

où $a (K.mm^{-2})$ est un coefficient (négatif) ajusté par régression linéaire, ΔT_{max} l'élévation maximale de température et $r (mm)$ la distance par rapport au centre du faisceau laser.

En posant, $n_0 = n(T_0) + \frac{\partial n}{\partial T} \cdot \Delta T_{max}$ et $h^2 = (2.n_0.a.\frac{\partial n}{\partial T})^{-1}$ l'équation 3.7 peut se réécrire :

$$n(r) = n_0 \cdot \left(1 + \frac{r^2}{2.h^2}\right) \quad (3.8)$$

où $h(mm)$ est une longueur caractéristique représentant, à un facteur multiplicatif près, le rayon de courbure des surfaces de même indice de réfraction. La valeur numérique dans le cas du profil de température de la figure 3.6 (b) donne $h \sim 8,4mm$.

On peut montrer qu'une épaisseur $e (mm)$ d'un milieu présentant la variation parabolique d'indice de l'équation 3.8 se comporte comme une lentille de distance focale image f'_{th} définie par (cf. annexe D) :

$$\frac{1}{f'_{th}} = -\frac{e^{\frac{e}{h}} - e^{-\frac{e}{h}}}{2.h} = -\frac{sh(\frac{e}{h})}{h} \quad (3.9)$$

La boîte de Petri, chauffée localement, se comporte donc comme une lentille divergente ($f'_{th} < 0$) dont la focale vaut environ $f'_{th} \sim -35mm$.

Remarques concernant la mise au point et le grandissement

Avant d'aller plus loin, j'aimerais apporter quelques précisions concernant l'influence de cette lentille thermique sur le système d'imagerie. En pratique, nous n'avons pas observé de modification ni du grandissement, ni de la mise au point. Pour comprendre cette observation, intéressons-nous à

la relation de conjugaison des lentilles minces⁹ [143] :

$$\frac{1}{\zeta'} - \frac{1}{\zeta} = \frac{1}{f'} \quad (3.10)$$

où, ζ' et ζ sont respectivement les distances orientées image et objet, et où f' est la distance focale image orientée.

On peut d'abord remarquer que le plan d'observation (plan des cellules) est situé avant la lentille « thermique » ($\zeta < 0$). Ceci conduit, en utilisant la relation 3.10, à une image située, elle aussi, avant la lentille ($\zeta' < 0$). Le plan d'observation est, à la limite, accolé à la lentille thermique ($\zeta \rightarrow 0$). On a donc un plan image, lui aussi, à la limite, accolé à la lentille ($\zeta' \rightarrow 0$).

De plus on montre aisément que le ratio entre la taille de l'objet « secondaire », Y' , formé par la « lentille » thermique, et la taille de l'objet Y s'écrit¹⁰ : $\frac{Y'}{Y} = \frac{\zeta'}{\zeta} = \frac{f'}{\zeta + f'}$. Ce ratio vaut 1 quand l'objet est, à la limite, accolé à la lentille ($\zeta \rightarrow 0$).

La présence de la lentille thermique donne donc naissance à un objet « secondaire », imagé par l'objectif, à limite confondu¹¹ avec l'objet, comme l'illustre la figure 3.7. La position géométrique de l'objet apparaît, pour l'objectif de microscope, inchangé. En d'autres termes, la présence d'un effet de lentille thermique dans le plastique de la boîte de Petri ne modifie pas la mise au point du dispositif. De plus, le grandissement du microscope qui est égal au ratio de la distance entre l'objet et l'objectif et de la distance focale de la lentille de tube [143], est inchangé en présence d'un effet de lentille thermique. Ce qui signifie que l'image géométrique de l'objet n'est pas déformée par effet de lentille thermique.

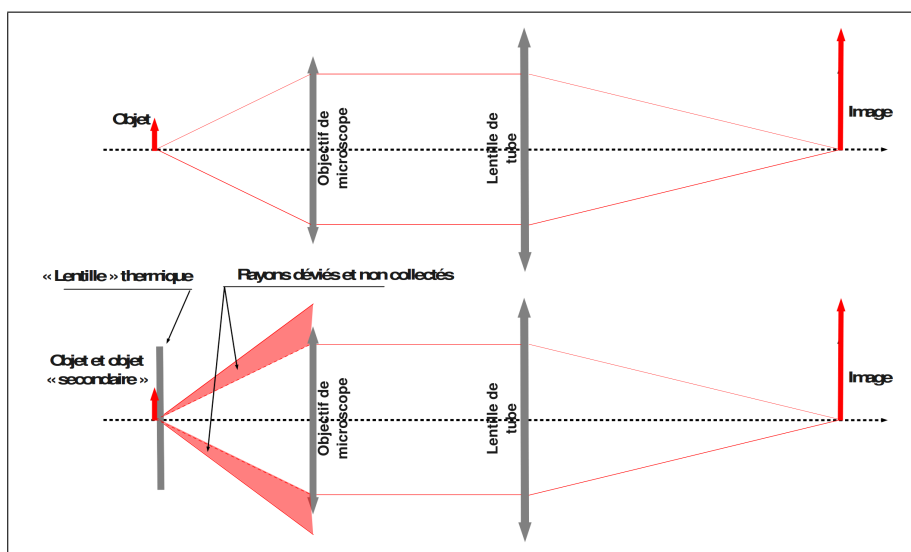


FIG. 3.7 – Représentation schématique de l'influence de la « lentille » thermique sur le système d'imagerie.

En revanche, comme l'illustre la figure 3.7, une partie de la lumière émanant de certains points objets (autour du faisceau laser) n'est pas collectée par l'objectif : l'intensité dans le plan image apparaît localement plus faible.

Solution apportée

Pour éviter ce problème de lentille thermique (moins de fluorescence collectée autour du faisceau laser), il est nécessaire de compenser les variations locales de lumière incidente et émise. Comme

⁹L'utilisation des formules de conjugaison pour les systèmes optiques formant des images quelconques, en optique gaussienne, mènerait aux mêmes conclusions. Mais plus de complexité n'apporterait rien à la discussion.

¹⁰Pour une lentille mince, le grandissement vaut $\gamma = \frac{Y'}{Y} = \frac{\zeta'}{\zeta}$ [143].

¹¹C'est le cas si l'épaisseur de la « lentille » thermique est négligeable devant la distance focale de l'objectif. Dans notre cas, l'épaisseur de la boîte de Petri est de $e = 1 \text{ mm}$ et la distance focale de l'objectif est d'environ $f_o = 45 \text{ mm}$.

l'ont proposé Sakakibara et Adrian [141], on peut utiliser un colorant de référence dont l'efficacité quantique Φ ne dépend pas de la température. En effet, si les propriétés spectrales¹² de cette référence sont semblables à celles de la rhodamine B, les déformations dues au champ de température seront les mêmes. La mesure du ratio des intensités de fluorescence des deux colorants permet donc la détermination du champ de température, $T(M)$ tout en s'affranchissant des aberrations dues aux effets de lentille thermique [141]. Il s'agit d'une mesure différentielle.

TAB. 3.1 – Caractéristiques spectrales de la rhodamine B et de la rhodamine 110 dans l'eau à 20°C. Valeurs extraites des documentations techniques en accord avec les valeurs publiées [141].

colorant	absorption		émission	
	limites (nm) $\sim 5\%$	λ_{max} (nm)	limites (nm) $\sim 5\%$	λ_{max} (nm)
rhodamine 110	400-550	496	490-560	520
rhodamine B	450-600	554	510-650	575

En pratique, nous avons choisi la rhodamine 110 comme référence. Comme le montre le tableau 3.1 qui résume les propriétés spectrales des deux colorants, les longueurs d'ondes d'excitation et d'émission sont suffisamment proches. On peut donc utiliser la même source pour l'excitation des deux colorants pour s'affranchir des effets de lentille thermique. On s'intéresse ici à la mesure au niveau des cellules, c'est à dire un plan infiniment petit juste avant l'épaisseur de la boîte de Petri : l'effet de lentille thermique qui nous intéresse ici est donc celui induit par le plastique. Comme on peut s'en rendre compte à l'aide de la figure 3.5, la variation d'indice du plastique avec la température à 575nm (maximum d'émission de la rhodamine B) est la même qu'à 520 nm (maximum d'émission de la rhodamine 110). La rhodamine 110 est donc un bon candidat en tant que colorant de référence.

3.2.3 Réalisation pratique

J'ai utilisé des solutions de rhodamine B et 110 diluées dans de l'eau distillée pour les mesures de température. L'eau est un bon « modèle » pour évaluer l'échauffement dans le milieu de culture qui en est composé à $\sim 80\%$. En effet, le coefficient d'absorption du milieu à 1270 nm, α_P est le même dans l'eau et dans le milieu de culture.

Dispositif expérimental

Le dispositif expérimental utilisé pour la calibration et la mesure de température est représenté à la figure 3.8. Il est composé essentiellement du miroir dichroïque D_{V-IR} qui permet de réfléchir le laser Infra Rouge (1270 nm) et de transmettre la lumière visible ; ainsi que du miroir dichroïque D_{fluo} qui permet de séparer la lumière d'excitation de la lumière émise par les colorants. La lumière d'excitation provient d'une LED émettant à 470 nm, ce qui coïncide avec les bandes d'absorption des deux colorants. La fluorescence est collectée par le même objectif 4 \times que celui utilisé dans nos expériences d'irradiation. L'image du plan ($z = 0$) est projetée sur la camera CCD à l'aide de la lentille de fin de tube, L_t . Devant la caméra est placé soit le filtre passe-bande, BP_{580} , centré sur le maximum d'émission de la rhodamine B (580 ± 5 nm), soit le filtre BP_{510} , centré sur le maximum d'émission de la rhodamine 110 (510 ± 5 nm). J'ai réalisé un logiciel à l'aide de Labview qui permet la synchronisation de la caméra et de la LED, ainsi que l'acquisition des données. Notons qu'il est nécessaire d'introduire le miroir D_{V-IR} entre l'objectif et le miroir D_{fluo} , car la puissance laser utilisée dans nos expériences endommagerait le miroir.

Pour une mesure calibrée

En pratique, la séparation spectrale des fluorescences des deux colorants est imparfaite. En effet, les maxima d'émission des deux colorants sont proches¹³ et les largeurs des spectres beaucoup plus

¹²Par propriétés spectrales, j'entends longueur d'onde d'excitation et d'émission.

¹³C'est une condition nécessaire pour s'affranchir des effets de lentille thermique.

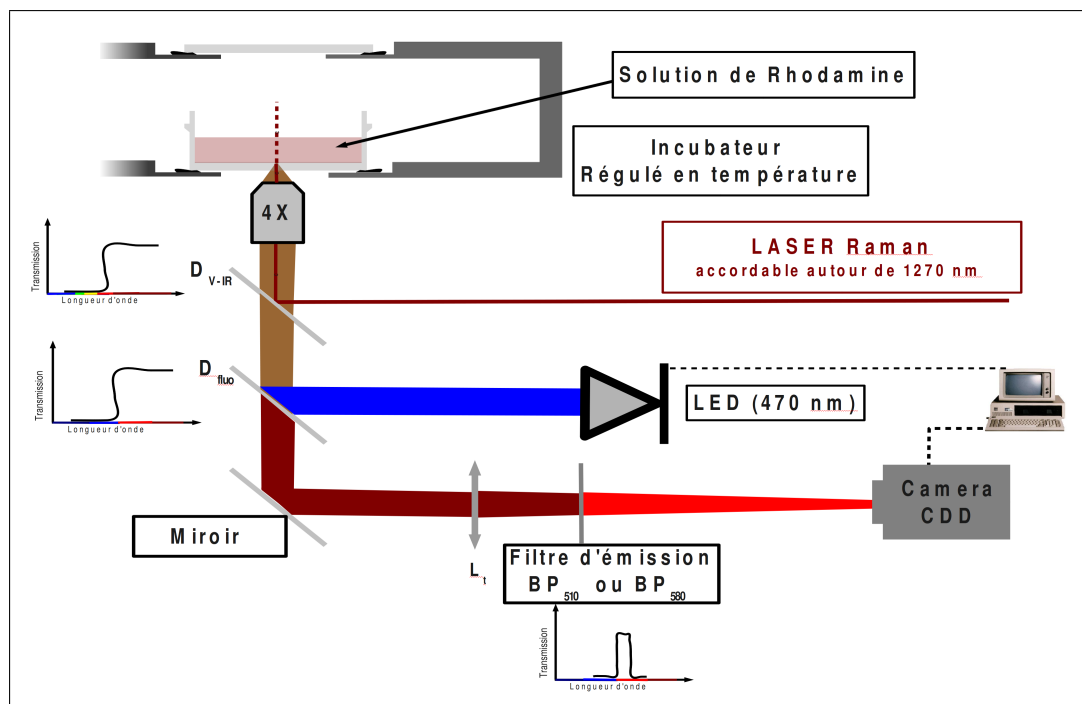


FIG. 3.8 – schéma du dispositif expérimental pour la mesure de température par microscopie de fluorescence

grandes que la gamme de filtrage des filtres interférentiels. Ceci conduit à une mesure qui n'est pas calibrée sur toute la gamme de températures qui nous intéresse. C'est principalement lorsque la fluorescence détectée de la rhodamine B devient négligeable devant celle de la rhodamine 110 que la calibration est impossible.

Dans la méthode originale, Sakakibara et Adrian [141] utilisent une solution mixte de rhodamine B et 110. Ceci permet d'obtenir une information spatio-temporelle au détriment d'une grande gamme dynamique sur la température (~ 15 °C). Dans notre cas, comme on l'a évoqué, nous ne nous intéressons pas à l'évolution temporelle de la température car l'état stationnaire est rapidement atteint.

Il s'est avéré nécessaire de séparer parfaitement les deux colorants pour mesurer l'élévation de température induite par le laser. J'ai donc choisi de travailler sur deux solutions dans deux boîtes de culture séparées, ce qui évite tout problème de séparation spectrale. Pour la mesure comme pour la calibration, deux boîtes, contenant une solution de rhodamine B ou de rhodamine 110, sont placées l'une après l'autre. Une moyenne sur dix images permet de limiter le bruit dû aux fluctuations statistiques de l'émission.

La figure 3.9 présente l'évolution relative en fonction de la température de l'intensité de fluorescence d'une solution de rhodamine B de concentration $[B] \approx 0,30 \text{ mmol.L}^{-1}$ par rapport à une solution de rhodamine 110 de concentration $[110] \approx 0,030 \text{ mmol.L}^{-1}$. Cette variation du ratio des intensités est bien représentée par une droite. La régression linéaire nous donne les coefficients avec une déviation standard de l'ordre de quelques pourcents.

En pratique, j'ai fait dix images successives pour les deux solutions. Ces images sont ensuite moyennées pour chaque colorant et on obtient une image du ratio des intensités à l'aide du logiciel ImageJ [144]. La même procédure est employée en présence du faisceau laser. Ce ratio des intensités étant calibré, il permet de remonter au champ de température. La puissance du laser ne fluctuant que de quelques pourcents pendant le temps d'acquisition des images pour les deux colorants, cette méthode permet de remonter au champ de température stationnaire en présence du faisceau laser.

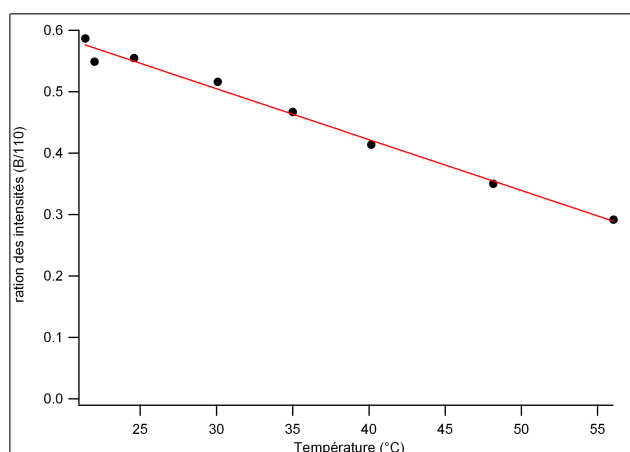


FIG. 3.9 – Evolution en fonction de la température du ratio des intensités de fluorescence de la rhodamine B par rapport à la rhodamine 110. La variation du ratio avec la température est bien représentée par une droite, comme le montre la régression linéaire représentée en rouge.

3.2.4 Notion de profondeur de champ et discussion

Dans tout ce qui précède, nous avons considéré que l'image projetée sur la caméra provenait uniquement du plan des cellules. En réalité, la fluorescence collectée par l'objectif provient d'un volume tridimensionnel situé autour du plan focal objet. L'image du champ de température n'est donc pas celle d'un plan infiniment fin, mais correspond à une moyenne sur une épaisseur que l'on peut évaluer (cf. Annexe C).

Introduction géométrique de la profondeur de champ

Comme l'illustre la figure 3.10, l'image formée par le microscope est la superposition, sur le plan image, d'« imagettes » provenant de plans objets adjacents. Un point situé dans le plan objet donnera dans le plan image une tache suffisamment fine pour être considérée comme ponctuelle. Par contre, les rayons provenant d'un point situé avant ou après le plan de mise au point convergent après ou avant le plan image. Ceci conduit à une tache d'autant plus large que l'on s'éloigne du plan objet. L'« imagette » devient donc de plus en plus floue à mesure que l'on s'éloigne de la mise au point.

En microscopie, comme en photographie, on définit une épaisseur Δz pour laquelle l'image formée est considérée nette : la profondeur de champ. C'est une notion intuitive dont la définition, assez arbitraire, nécessite l'introduction de la limite de résolution. Cette limite de résolution résulte du fait que l'image est limitée par la diffraction : il y a une relation entre le spectre angulaire et la distribution spatiale d'intensité de l'onde lumineuse. Dans notre cas, c'est l'objectif de microscope qui est l'ouverture limitante.

Contribution des plans précédant le plan focal objet et conclusions

Pour évaluer la contribution en un point du plan image des plans objets précédant le plan des cellules, on peut se représenter une succession d'objets ponctuels en « file indienne » selon l'axe optique. En effet, les objets situés dans le plan transverse à une distance plus grande que la limite de résolution r_l seront résolus et contribueront donc de manière négligeable au point géométrique considéré. Dans le cas de lumière incohérente, il suffit de sommer les intensités de chaque point source.

Nous n'allons pas ici entrer dans les détails, mais le lecteur intéressé pourra se reporter à l'annexe C. On peut montrer, qu'avec notre objectif $4\times$ d'ouverture numérique 0,13, **90% de l'énergie lumineuse en un point géométrique du capteur provient, en pratique, d'une épaisseur**

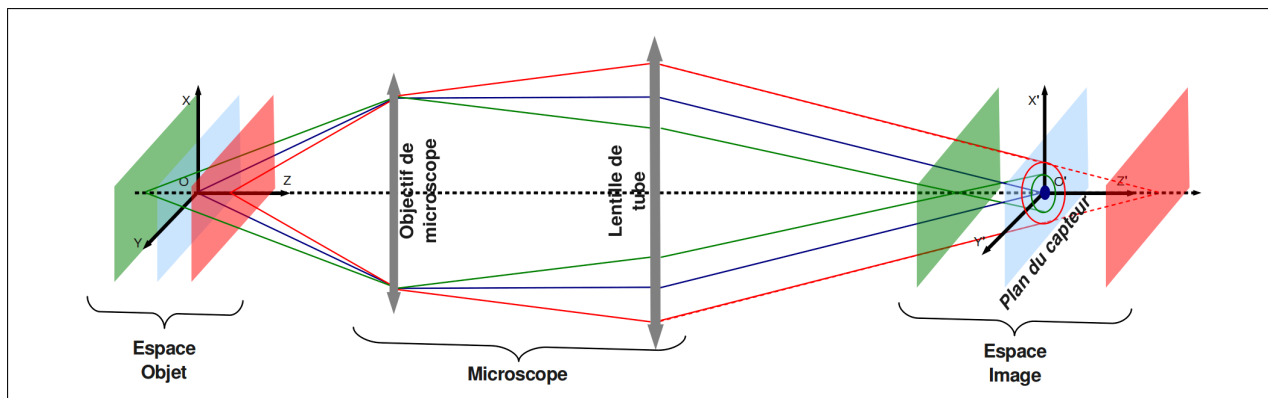


FIG. 3.10 – Définition géométrique de la profondeur de champ.

d'environ $70 \mu m$ située au-dessus du plan $z = 0$, alors qu'un modèle théorique simple prévoit environ $180 \mu m$.

Le champ de température mesuré est donc une moyenne, pondérée par un facteur de forme (expression C.6), du champ de température des plans au-dessus des cellules. J'ai pu vérifier que, dans les simulations, la valeur et le profil du champ de température varie de moins de 2% sur une épaisseur de $500 \mu m$. Ceci s'explique par le fait que le terme source varie peu sur une distance de plusieurs millimètres : le faisceau laser a une longueur de Rayleigh¹⁴ comparable à la profondeur de champ. On peut donc considérer que la mesure de température par la méthode décrite ci-dessus est acceptable pour évaluer la température perçue par les cellules.

3.3 Résultats

Dans cette section nous allons présenter les résultats concernant la détermination de l'élévation de température induite par laser. Ceux-ci nous serviront à évaluer la part des effets thermiques dans les expériences d'irradiation et à déterminer une zone de puissance pour laquelle le stress thermique peut être compensé. Dans un premier temps, nous discuterons les résultats et en particulier le relativement bon accord entre théorie et expérience. Ensuite, nous tirerons les conclusions concernant nos expériences d'irradiation.

3.3.1 Comparaison expérience/théorie

Les mesures présentées ici ont été effectuées avec l'étuve thermalisée à température ambiante : $21^\circ C$. Ceci permet de minimiser l'élévation de température induite par le laser et autorisera donc l'utilisation de puissance laser plus élevées. Pour les simulations, j'ai donc imposé la même température sur les bords extérieurs et pour la condition mixte $T_0 = T_e = 21^\circ C$.

Profil

Comme le montrent les figure 3.11 et 3.12, on trouve un bon accord, pour la forme comme pour la valeur du maximum, entre les mesures et les simulations jusqu'à $265 mW$. Au delà de $350 mW$, l'accord est moins bon même si l'écart reste dans la marge d'erreur expérimentale, comme le montre la figure 3.12. Les possibilités quant à l'imperfection du modèle seront discutées au paragraphe suivant.

On peut remarquer que les deux types de conditions aux limites choisies pour la face inférieure de la boîte de Petri donnent un bon encadrement de la valeur expérimentale. L'incertitude sur la température est de l'ordre de $2^\circ C$: la température maximale peut être déterminée à $\pm 1^\circ C$ près.

¹⁴La longueur de Rayleigh est une longueur caractéristique représentant la divergence d'un faisceau gaussien [143].

Cette incertitude est principalement due aux fluctuations de la fluorescence de chacun des colorants ainsi qu'au bruit intrinsèque de la caméra.

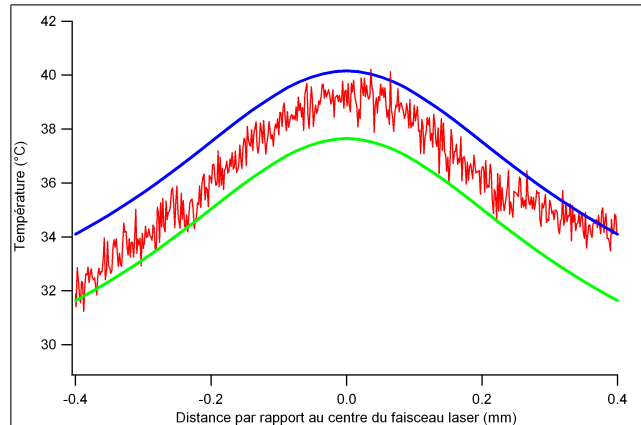


FIG. 3.11 – Profil de température pour une puissance laser de 265 mW : en rouge le profil expérimental, en vert simulation pour une condition de type température imposée sur le fond de la boîte de Petri, en bleu simulation pour une condition de type mixte sur le fond de la boîte de Petri.

Evolution du maximum de température en fonction de la puissance laser

Pour nos expériences d'irradiation nous avons besoin d'évaluer l'élévation maximale de température pour une puissance laser donnée. Expérimentalement comme dans les simulations, la variation du maximum est linéaire avec la puissance, comme le montre la figure 3.12.

On trouve une augmentation maximale de l'ordre de $\frac{\partial T}{\partial P_0} \approx 60^\circ\text{C.W}^{-1}$. C'est une valeur environ six fois plus grande que l'élévation trouvée par Erwin et ses collaborateurs [137] dans des expériences de piège optique.

Cette différence s'explique par le fait que la géométrie du faisceau laser est très différente. En effet, notre faisceau laser est peu focalisé pour irradier une population suffisante de cellules. Le terme source de chaleur est étalé sur toute l'épaisseur de la boîte de Petri et est étendu sur toute l'épaisseur de liquide : la dissipation par diffusion se fait principalement autour d'un « cylindre » défini par le faisceau laser. Alors que dans les expériences de piège optique, le faisceau laser est focalisé et le terme source est très localisé : la dissipation par diffusion se fait radialement dans toute les directions.

Remarquons que si l'on porte l'incubateur à 37°C ($T_0 = 37^\circ\text{C}$), l'ensemble des courbes (expérimentale et théoriques) est translaté vers le haut ($T \rightarrow 37^\circ\text{C}$ quand $P_0 \rightarrow 0$). Dans le cas des simulations pour lesquelles la température est imposée sur la face inférieure de la boîte de Petri, la pente reste inchangée ($\sim 60^\circ\text{C.W}^{-1}$) et la température en l'absence de faisceau laser ($P_0 = 0$) est de (37°C).

Par contre, dans les simulations considérant un échange par convection sur la face inférieure de la boîte de Petri ($T_e = 21^\circ\text{C}$ et $T_0 = 37^\circ\text{C}$), la température en l'absence de faisceau laser est d'environ $36,5^\circ\text{C}$ et la pente est inchangée.

La variation expérimentale reste, quant à elle, toujours comprise entre les deux cas limites théoriques.

Explication potentielle de l'écart entre l'expérience et le modèle

Même si l'accord reste raisonnable, on observe une tendance non représentée par les simulations numériques. Au delà de 350 mW , le taux d'accroissement de la température, $\frac{\partial T}{\partial P_0}$, ne semble pas constant : les deux derniers points semblent « s'affaisser » légèrement. J'ai observé cette même tendance pour une étuve thermalisée à 37°C .

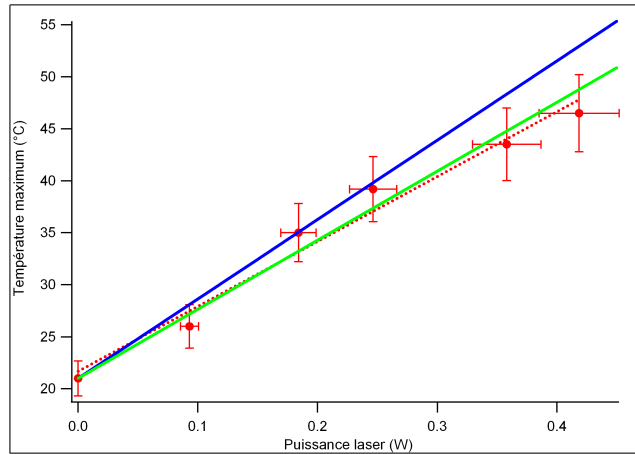


FIG. 3.12 – Evolution du maximum d’élévation de température dans une solution d’eau distillée avec la puissance laser à 1270 nm : en rouge les données expérimentales, en vert la simulation pour une condition de type température imposée sur le fond de la boîte de Petri, en bleu simulation pour une condition de type mixte sur le fond de la boîte de Petri. La régression linéaire des points expérimentaux, représentée en pointillés rouges, donne une pente de $\frac{\partial T}{\partial P_0} \approx 60^\circ\text{C}\cdot\text{W}^{-1}$ pour le faisceau laser qui a un diamètre à mi-hauteur (FWHM) d’environ $300\ \mu\text{m}$ dans nos expériences.

Précisons tout d’abord que la mesure du coefficient d’absorption à 1270 nm , α_P , de la boîte de Petri est délicate, car pour une épaisseur d’ 1 mm , la valeur de ce dernier est de l’ordre des coefficients de réflexion de Fresnel. Ceci explique la grande incertitude ($\alpha_P \approx 0,01 \pm 0,01\text{ mm}^{-1}$) sur ce coefficient. Cependant, cette incertitude n’explique pas l’accord aux basses puissances et le désaccord aux fortes puissances.

L’hypothèse d’une dissipation par convection dans le fluide peut être écartée car nous n’avons pas observé de mouvement local du fluide aux puissances laser considérées. Reste alors, à ma connaissance, une possibilité. L’effet de lentille thermique, dont nous nous sommes affranchis pour la mesure par microscopie de fluorescence, peut agir sur la propagation du faisceau laser à 1270 nm .

En pratique, nous n’avons pas observé de divergence du faisceau laser juste après propagation dans la boîte de Petri seule. Par contre, pour une épaisseur de liquide au-delà de 3 mm , on peut observer un élargissement du faisceau et un élargissement du profil en intensité du faisceau à une distance d’environ 10 cm de la surface du liquide. Ces changements donnent une figure stationnaire au-delà de quelques secondes, durée comparable à celle du transitoire pour l’établissement du champ de température.

Il est donc possible que la propagation du faisceau laser (terme source) soit influencée par le champ de température auquel le faisceau laser donne lui-même naissance. Quand la puissance augmente, le faisceau diverge et la densité de puissance convertie en chaleur diminue. Ceci conduirait donc, qualitativement, à une pente $\frac{\partial T}{\partial P_0}$ plus petite lorsque l’effet de lentille thermique modifie significativement la propagation du faisceau laser à 1270 nm responsable de l’échauffement.

3.3.2 Conclusions : peut-on éviter le stress thermique ?

Afin d’éviter un stress hyperthermique pendant les expériences d’irradiation, nous pouvons compenser l’élévation de température en ne thermalisant pas la chambre de culture miniature à 37°C mais à 21°C pendant l’irradiation. Ceci conduit à minimiser l’élévation de température. C’est pourquoi j’ai présenté dans le paragraphe précédent les mesures effectuées pour une étuve à température ambiante. Enfin, pour maintenir les conditions physiologiques normales après l’irradiation, la chambre de culture est thermalisée à 37°C dès la fin de celle-ci.

On peut travailler à une température de 39°C sans atteindre le seuil de mort cellulaire (cf. paragraphe 1.1.3). D’après les mesures reportées à la figure 3.12, on peut donc utiliser une puissance laser de 250 mW , en atteignant pas le seuil de mort cellulaire.

TAB. 3.2 – Gammes de puissances, gammes de températures et stress cellulaire associé.

Puissances (W)	Intensités ($W.cm^{-2}$)	Températures ($^{\circ}C$)	Nature du stress cellulaire -
0 – 0,25	0 – 250	30 – 39	pas de stress
0,25 – 0,35	250 – 350	39 – 42	stress réversible
> 0,35	> 350	> 43	stress <i>a priori</i> fatal

De plus, dans la littérature, le stress thermique induit à $42^{\circ}C$ est réversible au niveau des mécanismes de transcription [61,62]. En effet, à cette température on observe une localisation en granules nucléaires de la protéine HSF1¹⁵ qui promeut la transcription de protéines chaperons nécessaires à la défense de la cellule. Si le stress est arrêté, les granules se dissocient et la cellule survit. On peut donc supposer qu'à $42^{\circ}C$ le stress induit n'est pas suffisant pour « dépasser » les mécanismes de protection des macromolécules et n'est, par conséquent, pas fatal. J'ai pu vérifier cette hypothèse en plaçant des cellules MCF-7 pendant trois heures entre 42 et $43^{\circ}C$, je n'ai pas observé de mort cellulaire et la croissance des cellules était normale.

Ainsi pour une puissance comprise entre 250 et 350 mW , le stress thermique est réversible et ne conduit pas à la mort, pour une durée d'exposition inférieure à 3 heures. Par contre, au-delà de $43^{\circ}C$, ce qui correspond à une puissance laser supérieure à 350 mW , l'hyperthermie est *a priori* fatale mais reste très dépendante du temps d'exposition à une température donnée [50]. Ces considérations sont résumées dans la table 3.2.

¹⁵Heat Shock Factor 1

Chapitre 4

Mort cellulaire induite par excitation directe de l'oxygène singulet à 1270 nm

Maintenant que la question de l'élévation de température induite par le laser est maîtrisée nous allons nous intéresser à l'effet de l'irradiation laser à 1270 nm sur une population de cellules *in vitro*. La mesure *in situ* du champ de température a permis de montrer qu'avec notre dispositif expérimental on peut, dans une certaine gamme de puissances laser, compenser l'élévation de température en thermalisant l'incubateur à une température inférieure à 37 °C. Il est donc possible, dans une certaine gamme, de s'affranchir du stress hyperthermique inhérent à l'utilisation d'un laser.

Rappelons que l'objet de cette première partie du travail est de confirmer ou d'infirmer l'hypothèse selon laquelle il est possible, sans photo-agent, de créer suffisamment d'oxygène singulet par excitation directe à 1270 nm via la transition $^3O_2 \longrightarrow ^1O_2$ du dioxygène pour induire la mort cellulaire.

L'oxygène singulet étant pratiquement impossible à détecter directement en cellule dans notre cas, nous verrons que les propriétés spectrales de la transition $^3O_2 \longrightarrow ^1O_2$ et la présence de dioxygène nous ont permis de répondre à la question posée. Puis, dans un second temps, nous précisons certains effets sur les cellules ayant subi une irradiation laser à 1270 nm.

4.1 Mort cellulaire induite par irradiation laser à 1270 nm : preuves du rôle central de l'oxygène singulet

Cette section présente l'un des principaux résultats de mon travail de thèse. Nous allons montrer qu'il est possible d'obtenir la mort *in vitro* d'une population de cellules par excitation optique directe de l'oxygène singulet à 1270 nm, c'est-à-dire sans agent photo-sensibilisant.

Les expériences d'irradiation de cellules MCF-7 décrites ci-dessous ont été réalisées avec le dispositif expérimental décrit à la section 2.1. Pour mémoire, ce dispositif associé à la source laser accordable que j'ai réalisée permet l'irradiation d'une centaine de cellules. Les cellules non-irradiées de la même boîte de culture permettent un contrôle du bon déroulement des expériences. L'évolution de la population de cellules est suivie par vidéo-microscopie de contraste de phase à l'aide d'un objectif 4×, pendant et jusqu'à trois jours après l'irradiation.

Le chapitre précédent a montré que nous pouvons évaluer l'élévation de température par une méthode thermométrique de ratio des fluorescences des rhodamines B et 110. Nous montrerons donc, dans un premier temps, que l'irradiation à 1270 nm de cellules MCF-7 conduit à la mort des cellules dans une gamme de puissances qui ne génèrent pas de stress hyperthermique. Puis, l'oxygène singulet étant pratiquement impossible à détecter dans notre cas, nous verrons qu'il est possible de corrélérer les effets de mort cellulaire avec les propriétés spectrales du dioxygène dissous. Ensuite, nous étudierons l'influence de la concentration en dioxygène dissous sur la mort cellulaire induite par irradiation à 1270 nm. Ceci nous permettra d'écarter l'hypothèse d'autres espèces réactives responsables de la mort cellulaire autour 1270 nm et montrera que la mort est due à l'excitation directe de l'oxygène

singulet. Enfin, des expériences complémentaires corroborent cette proposition.

4.1.1 Mort cellulaire induite par irradiation laser à 1270 nm

Les figures 4.1 (a), (b), (c) et (d), montrent des cellules avant et 30 h après une irradiation durant 3 h à une puissance $P_0 \approx 110 \pm 10 \text{ mW}$, ce qui correspond à une intensité maximale au centre du faisceau $I_{max} \approx 108 \pm 10 \text{ W.cm}^{-2}$. L'intensité moyenne, dans une zone de rayon $r < 200 \mu\text{m}$ est donc d'environ¹ $I_{moy} \approx 25 \pm 2,5 \text{ W.cm}^{-2}$.

Pour ces expériences, l'étuve est maintenue à 30°C pendant l'irradiation, la température maximale atteinte dans la zone d'irradiation est donc d'environ $\sim 36^\circ\text{C}$ ($60 \text{ }^\circ\text{C.W}^{-1}$ cf. figure 3.12). Après l'irradiation, l'ensemble des cellules est maintenu à 37°C pour conserver des conditions physiologiques normales.

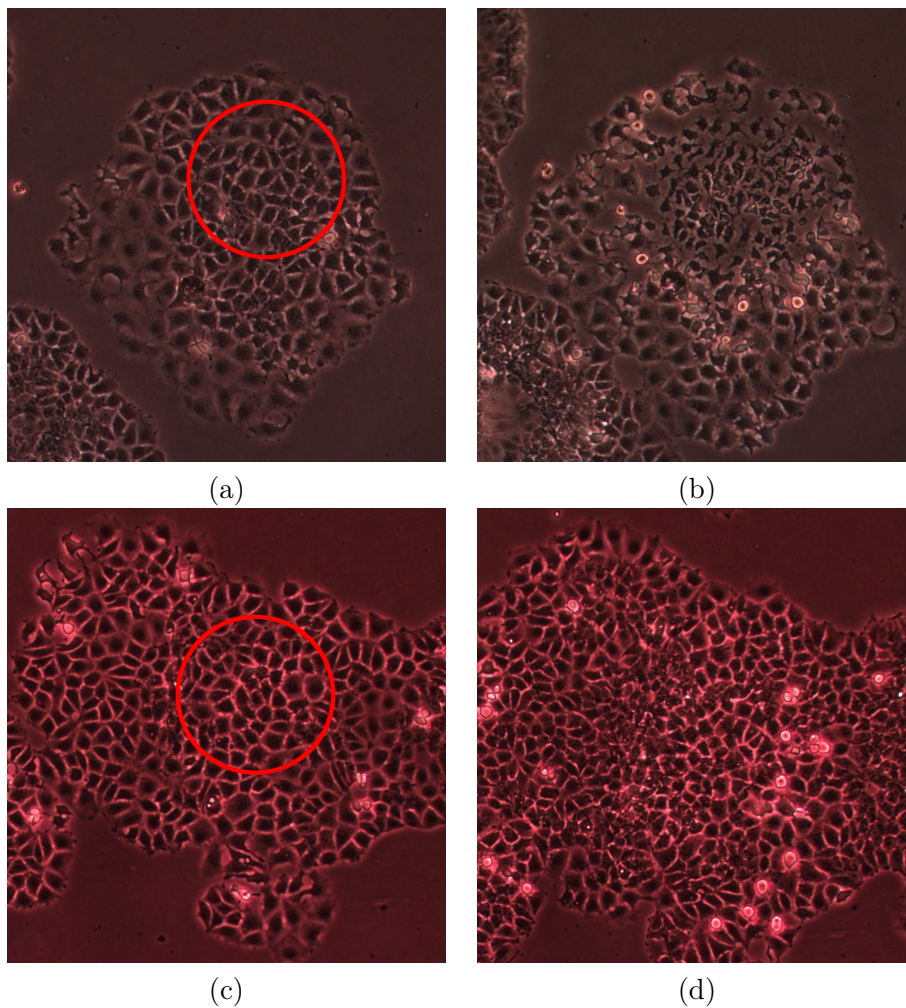


FIG. 4.1 – Cellules MCF-7 observées au microscope 4× à contraste de phase et irradiées pendant 3 h à une puissance d'environ $P_0 \approx 110 \pm 10 \text{ mW}$ (soit une intensité maximale de $I_{max} \approx 108 \text{ W.cm}^{-2}$ au centre du faisceau laser), le cercle rouge sur les figure (a) et (c) représente le diamètre FWHM ($300 \mu\text{m}$) du faisceau laser. Dans ces expériences, l'incubateur est maintenu à 30°C pendant l'irradiation et la température maximale atteinte est donc de $\sim 36^\circ\text{C}$. **En haut**, cellules irradiées à **1270 nm** (a) avant irradiation et (b) les mêmes cellules 30 h après irradiation. **En bas**, cellules irradiées à **1247 nm** (c) avant irradiation et (d) les mêmes cellules 30 h après l'irradiation.

Comme le montrent les images des figures 4.1 (a) et (b), l'effet de l'irradiation laser à 1270 nm sur les cellules est indéniable. On observe la mort de la totalité des cellules dans un disque de $r \approx 200 \mu\text{m}$ autour du centre du faisceau laser alors que les cellules non-irradiées survivent et

¹L'intensité moyenne est calculée en supposant un profil gaussien (cf. figure 2.4 (b)) pour le faisceau laser.

continuent à se diviser 30 h après l'irradiation. Par contre, comme le montrent les figures 4.1 (c) et (d), il n'y a pas d'effet sur des cellules irradiées à 1247 nm.

Les figures 4.2 (a), (b), (c) et (d), montrent des cellules MCF-7 dans les mêmes conditions d'irradiation laser que celles présentées à la figure 4.1 ($P_0 \approx 110 \text{ mW} - 3 \text{ h}$), mais ici l'incubateur est maintenu à 37°C pendant l'irradiation. L'échauffement induit par le faisceau laser est donc cette fois au maximum de $\sim 43 \pm 2^\circ\text{C}$ dans la zone d'irradiation.

Dans ces conditions, on observe, comme pour les expériences présentées aux figures 4.1, que toute les cellules comprises dans un disque de rayon $r \approx 200 \mu\text{m}$ autour du faisceau laser sont mortes $\sim 30 \text{ h}$ après l'irradiation à 1270 nm. Alors qu'aucun effet n'est observé pour les cellules irradiées à 1247 nm.

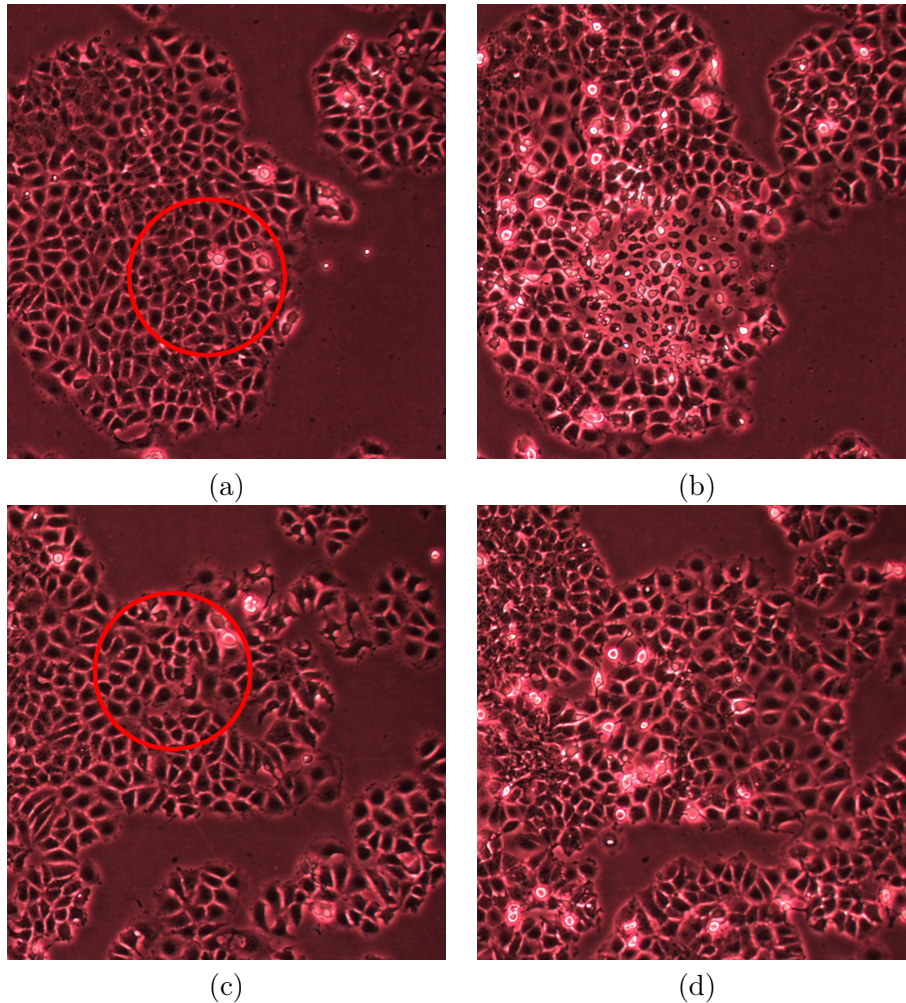


FIG. 4.2 – Cellules MCF-7 observées au microscope $4\times$ à contraste de phase irradiées pendant 3 h à une puissance d'environ $P_0 \approx 110 \pm 10 \text{ mW}$ (soit une intensité maximale de $I_{max} \approx 108 \text{ W.cm}^{-2}$ au centre du faisceau laser), le cercle rouge sur les figure (a) et (c) représente le diamètre FWHM ($300 \mu\text{m}$) du faisceau laser. Dans ces expériences, l'incubateur est maintenu à 37°C pendant l'irradiation et la température maximale atteinte est donc de $\sim 43^\circ\text{C}$. **En haut**, cellules irradiées à **1270 nm** (a) avant irradiation et (b) les mêmes cellules 30 h après l'irradiation. **En bas**, cellules irradiées à **1247 nm** (c) cellules avant irradiation et (d) les mêmes cellules 30 h après l'irradiation.

Nous avons par ailleurs pu vérifier que l'exposition des cellules MCF-7 dans l'incubateur pendant 3 h à une température de $42,5 \pm 1^\circ\text{C}$, sans irradiation, ne conduit pas à la mort cellulaire. En effet, dans l'expérience présentée à la figure 4.3 le stress hyperthermique de 3 h a été induit en maintenant l'incubateur à $42,5^\circ\text{C}$ et sans procéder à une irradiation. Ces figures montrent les cellules avant [4.3 (a)] et après exposition [4.3 (b)] au stress hyperthermique. Aucune mort cellulaire n'a été observée.

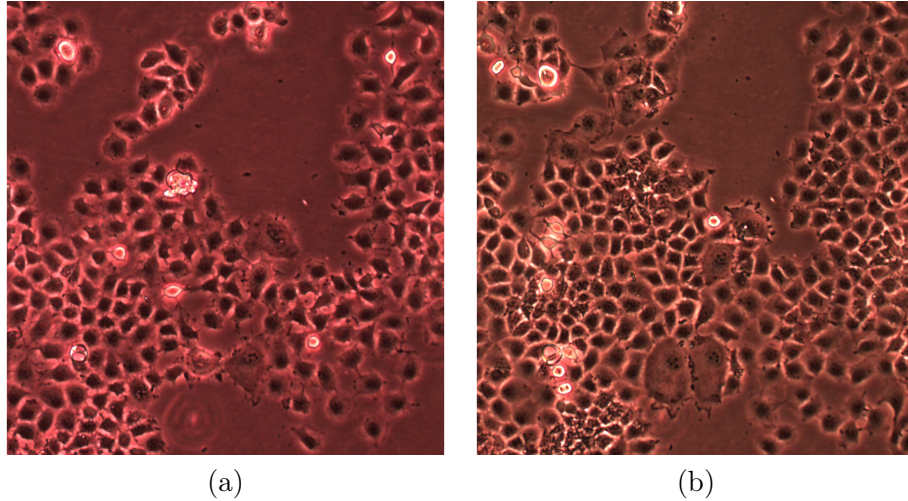


FIG. 4.3 – Cellules MCF-7 observées au microscope $4\times$ à contraste de phase après une exposition dans l’incubateur à un stress hyperthermique de 3 h à $42,5\text{ }^\circ\text{C}$. (a) Les cellules avant le stress et (b) les mêmes cellules 30 h après l’hyperthermie. Pour les cellules MCF-7, aucune mort cellulaire n’est observée consécutivement à un tel stress hyperthermique.

4.1.2 Spectre d’action de l’irradiation laser autour de 1270 nm

Nous allons présenter le spectre d’action de la mort cellulaire autour de 1270 nm réalisé à l’aide du laser accordable présenté au chapitre 2. La longueur d’onde centrale d’émission du laser a été mesurée avant chaque expérience à l’aide d’un analyseur de spectre optique. Dans chaque cas, un spectre d’une largeur à mi-hauteur (FWHM) inférieure à 1 nm analogue à ceux présentés à la figure 2.10 (b) est mesuré.

Résultats expérimentaux

La figure 4.4 (a) montre le spectre d’action de l’irradiation laser autour de 1270 nm . Plus précisément, la figure 4.4 (a) présente la dépendance en longueur d’onde de la fraction de cellules mortes dans une zone de rayon $r \approx 200\text{ }\mu\text{m}$ autour du centre du faisceau laser.

La mort est induite par une irradiation de trois heures à une puissance $P_0 \approx 110 \pm 10\text{ mW}$, soit une intensité maximale au centre du faisceau $I_{max} \approx 108 \pm 10\text{ W.cm}^{-2}$. L’intensité moyenne, dans la zone considérée ($r < 200\text{ }\mu\text{m}$) est donc d’environ $I_{moy} \approx 25 \pm 2,5\text{ W.cm}^{-2}$.

Pour ces expériences, l’étuve est maintenue à 37°C . Dans ces conditions, une irradiation à 110 mW conduit à un maximum de température dans la zone d’irradiation d’environ $43 \pm 2\text{ }^\circ\text{C}$ d’après la méthode de mesure décrite au paragraphe 3.3.1. Le stress thermique ainsi produit est *a priori* réversible et non-fatal, comme l’ont confirmé les expériences préliminaires à $42,5 \pm 1\text{ }^\circ\text{C}$ (sans irradiation) pour lesquelles nous n’avons pas observé de mort cellulaire.

Discussion

La dépendance en longueur d’onde de la mort cellulaire illustrée à la figure 4.4 (a) est une signature forte de la création d’oxygène singulet. Le maximum ($1270 \pm 2\text{ nm}$ et la largeur du spectre ($\sim 15\text{ nm}$) coïncident avec les caractéristiques spectrales de l’émission de l’oxygène singulet associée à la transition $^1\text{O}_2 \longrightarrow ^3\text{O}_2$ dans l’eau ainsi que dans un milieu vivant *in vitro* et *in vivo* [82–85].

Ce spectre d’action est aussi à comparer au spectre d’absorption associé à la transition depuis l’état fondamental vers le premier état électronique singulet $^3\text{O}_2 \longrightarrow ^1\text{O}_2$ du dioxygène dissous en solution dans des conditions standard de température et de pression. La courbe noire de la figure 4.4 représente ce spectre d’absorption dans l’éthanol obtenu grâce à la méthode qui sera décrite au chapitre 5.2.3.

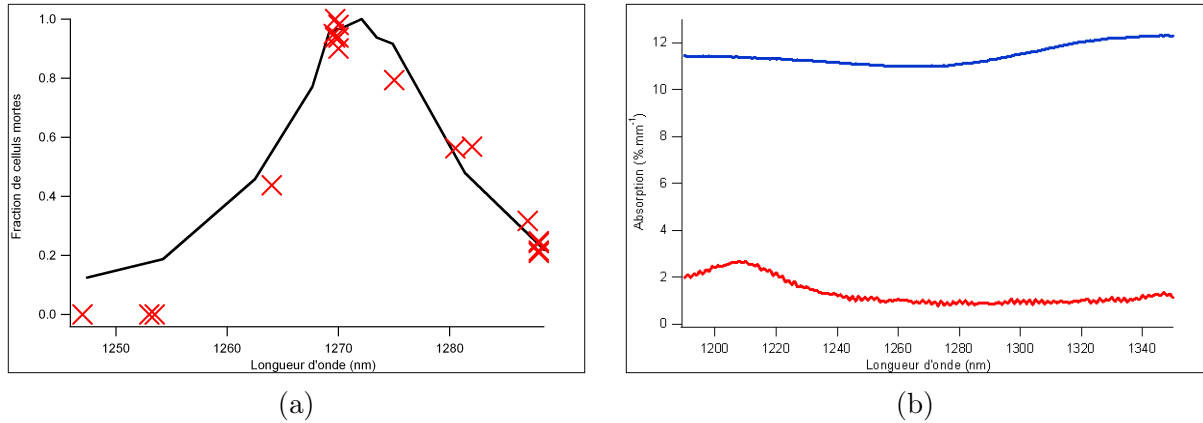


FIG. 4.4 – (a) En rouge la fraction de cellules mortes dans une zone $r \approx 200 \mu\text{m}$ autour du centre du faisceau laser pour une irradiation de $3h$ à $I_{\text{moy}} \approx 25 \text{ W.cm}^{-2}$, en noir le spectre d'absorption normalisé au maximum correspondant à la transition ${}^3\text{O}_2 \longrightarrow {}^1\text{O}_2$ du dioxygène dissous dans l'éthanol. Ce dernier spectre a été obtenu à l'aide de la méthode décrite au chapitre 5.2.3. - (b) Spectre d'absorption du milieu de culture des cellules, en bleu et en rouge de la boîte de Petri, les mesures ont été réalisées dans un spectromètre (PERKIN ELMER, Lambda 19).

On observe une très bonne corrélation entre le spectre d'action de l'irradiation laser sur les cellules et le spectre d'absorption du dioxygène associé à la transition ${}^3\text{O}_2 \longrightarrow {}^1\text{O}_2$. Il semble donc que la mort cellulaire soit induite par la création d'oxygène singulet par excitation directe *via* la transition ${}^3\text{O}_2 \longrightarrow {}^1\text{O}_2$ à 1270 nm .

Discrimination des effets thermiques : La figure 4.4 (b) montre les spectres d'absorption du matériau utilisé pour la fabrication de la boîte de Petri et du milieu de culture. Ces spectres ne présentent pas de variation significative autour de 1270 nm .

L'énergie lumineuse du laser absorbée par le milieu de culture et la boîte de Petri est convertie en chaleur (cf. chapitre 3.1.2). La figure 4.4 (b) montre que les coefficients d'absorption de la boîte de Petri et du milieu de culture sont très peu dépendants de la longueur d'onde sur une gamme spectrale allant de 1240 à 1300 nm . Donc, les effets thermiques sont, sur cette même plage, indépendants de la longueur d'onde et la mort cellulaire à 1270 nm n'est pas due à un stress hyperthermique.

De plus, la comparaison des expériences présentées aux figures 4.2 (b) et 4.1 (b) me permet d'affirmer que le spectre d'action de la figure 4.4 (a) est dénuée de toute influence cumulée des effets thermiques ($\sim 43 \text{ }^\circ\text{C}$) et du stress oxydant induit par irradiation laser à 1270 nm . En effet, le résultat sur la survie d'une population irradiée à 1270 nm pendant 3 h à environ 110 mW est quantitativement comparable à une irradiation pour laquelle le laser n'induit pas de stress hyperthermique :

- lorsque la population irradiée est maintenue à une température qui n'induit pas de stress thermique (incubateur à $30 \text{ }^\circ\text{C}$, figures 4.1 (a) et (b)), on observe la mort cellulaire dans un disque de rayon $r \approx 200 \mu\text{m}$;
- lorsqu'une partie de la population irradiée est portée à une température supérieure à $40 \text{ }^\circ\text{C}$ (incubateur à $37 \text{ }^\circ\text{C}$, figures 4.2 (a) et (b)), on observe exactement le même rayon d'action ($r \approx 200 \mu\text{m}$).

On peut donc conclure que (i) la mort cellulaire induite par irradiation laser à 1270 nm n'est pas due à un stress hyperthermique et que (ii) en-deçà de $43 \text{ }^\circ\text{C}$ un stress hyperthermique de 3 h n'est pas impliqué (même par un effet cumulé à l'irradiation) dans la mort cellulaire des cellules MCF-7.

Discrimination d'un autre mécanisme de création d'oxygène singulet : L'hypothèse d'une autre espèce réactive impliquée dans la mort cellulaire sera écartée au paragraphe suivant. Je voudrais tout d'abord discuter d'un autre effet potentiel. Les travaux de Singh et ses collaborateurs ont

suggéré que, dans de l'eau soumise à de très hautes pressions ($\sim 100 \text{ atm}$) contenant du dioxygène, l'oxygène singulet peut être créé par transfert d'énergie entre l'eau dans un état vibrationnel excité et le dioxygène dans l'état fondamental [145]. Dans nos expériences, il paraît peu probable que l'oxygène singulet soit créé par ce type de mécanisme.

En effet, il n'existe pas, à notre connaissance, de mode de vibration de l'eau dont l'énergie puisse correspondre à 1270 nm . Les deux bandes de vibration de l'eau les plus proches sont centrées à 1210 nm et à 1449 nm et leurs largeurs sont de l'ordre de $\sim 100 \text{ nm}$ [135]. Il n'y a donc pas d'état excité de l'eau expliquant un effet résonant à 1270 nm sur une largeur de l'ordre de $\sim 15 \text{ nm}$.

Deuxièmement, Singh *et al.*, dans leurs expériences dans l'eau à très haute pression, étudient deux cas. Le premier utilise une irradiation à une longueur d'onde de 990 nm . Celle-ci correspond à une transition de vibration de l'eau. Le second cas à 1064 nm coïncide avec la transition autour de 1070 nm vers le premier état vibrationnel excité de l'oxygène singulet (${}^3O_2(v=0) \rightarrow {}^1O_2(v=1)$) mais ne résonant avec aucune vibration de l'eau [135]. Ils remarquent que la production d'oxygène singulet est moins efficace à 1064 nm que dans le cas de la résonance avec la transition de vibration de l'eau (990 nm). De plus, ils constatent que l'efficacité de production par transfert d'énergie de vibration de l'eau vers le dioxygène décroît avec l'énergie de vibration, c'est-à-dire lorsque la longueur d'onde augmente. Enfin, ils estiment à au moins deux tiers la part d'oxygène singulet produite par excitation directe [145] dans le cas d'irradiation à 1064 nm : la création d'oxygène singulet par excitation directe à 1064 nm est plus efficace que le transfert d'énergie des vibrations de l'eau loin d'une résonance.

La transition radiative, en solvant, vers l'état vibrationnel $v=0$ de l'oxygène singulet (${}^3O_2(v=0) \rightarrow {}^1O_2(v=0)$) à 1270 nm est, à cause du facteur de Franck-Condon², cent fois plus probable que la transition ${}^3O_2(v=0) \rightarrow {}^1O_2(v=1)$ à 1070 nm [100]. On peut donc considérer que, loin d'une résonance pour la vibration des molécules d'eau (ce qui est le cas à 1270 nm), la part d'oxygène singulet créé par transfert d'énergie de vibration des molécules d'eau est négligeable.

Conclusions Cette série d'expériences montre que l'irradiation laser à 1270 nm conduit à la mort des cellules. Le spectre d'action de l'irradiation laser a pu être corrélé au spectre d'absorption de l'oxygène singulet en phase liquide dans différents solvants à température et pression standard. Les hypothèses d'un effet dû à une élévation de température induite par le laser ou à l'excitation de modes de vibration de l'eau ont pu être écartées. Nous avons donc *a priori* un effet lié à l'oxygène singulet, ceci sera confirmé au paragraphe suivant.

4.1.3 Influence de la concentration en dioxygène dissous

Bien qu'il n'existe pas, à notre connaissance, d'autre espèce réactive que l'oxygène singulet activable à 1270 nm et présentant un spectre similaire à celui présenté à la figure 4.4 (a), nous avons conduit une deuxième série d'expériences permettant de confirmer que le dioxygène est bien impliqué dans la mort cellulaire à 1270 nm .

Pour les expériences présentées à la figure 4.5, nous avons modifié la concentration en dioxygène dissous dans le milieu de culture. Pour ce faire, nous avons maintenu la boîte contenant le milieu de culture et les cellules sous une atmosphère normale ($5\%CO_2 - 21\%O_2 - 74\%N_2$), ou inerte (hypoxie : $5\%CO_2 - 95\%N_2$), ou enrichie en dioxygène (hyperoxie : $5\%CO_2 - 95\%O_2$).

Pour les expériences de la figure 4.5, les cellules ont été irradiées pendant $1 \text{ h } 30 \text{ min}$ (à 1270 nm) avec une puissance laser de $P_0 \approx 205 \pm 5 \text{ mW}$, soit une intensité maximale de $I_{max} \approx 200 \pm 5 \text{ W.cm}^{-2}$ et une intensité moyenne dans la zone considérée ($r \approx 300 \mu\text{m}$) d'environ $I_{moy} \approx 67 \text{ W.cm}^{-2}$, dans une étuve à température ambiante (21°C). La température maximale atteinte dans la zone d'irradiation est donc, comme le montre la figure 3.12, de l'ordre de 35°C .

²Le facteur de Franck Condon est une intégrale de recouvrement entre les fonctions d'onde de deux niveaux vibrationnels qui pondère la probabilité de transition entre deux sous-niveaux vibrationnels.

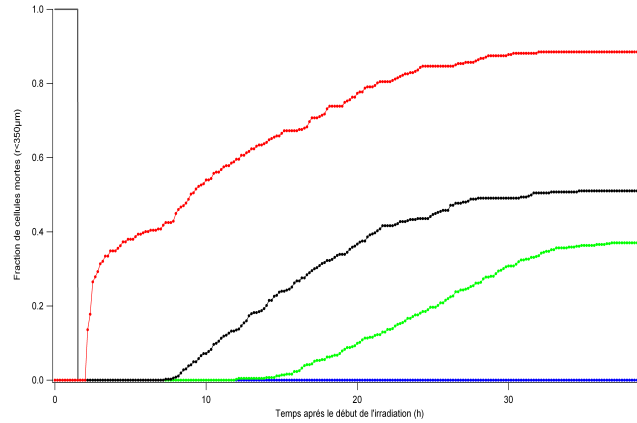


FIG. 4.5 – Influence de la concentration en dioxygène dissous dans le milieu de culture sur l'évolution temporelle de la fraction de cellules mortes dans une zone de rayon $r < 300 \mu\text{m}$ pour une irradiation laser à 1270 nm à une puissance laser de $\sim 200 \text{ mW}$ (soit un intensité moyenne dans une zone de rayon $r = 300\mu\text{m}$, $I_{\text{moy}} \approx 67 \text{ W.cm}^{-2}$) pendant $1 \text{ h } 30 \text{ min}$. La courbe rouge est l'expérience en hyperoxie, la courbe bleue celle en hypoxie, la verte celle dans les conditions normales et la courbe noire correspond à une atmosphère normale soufflée dans le milieu de culture. Enfin, la courbe en forme de créneau en trait plein noir représente la durée de l'irradiation.

Dans les trois cas, pour accélérer l'établissement de l'équilibre du milieu avec l'atmosphère, nous avons fait buller le même gaz dans le liquide pendant trente minutes. Les boîtes de Petri contenant les cellules ont été laissées, selon le cas, sous atmosphère normale, inerte ou enrichie en dioxygène, pendant trois heures avant et pendant l'irradiation.

La variation de la concentration en dioxygène dissous a pu être observée dans des solutions d'eau distillée soumises aux mêmes protocoles à l'aide d'une sonde de dioxygène dissous calibrée. Dans le cas de l'hypoxie cette concentration chute à un niveau non détectable par la sonde (moins de 1% de la concentration dans les conditions standard). Et dans le cas de l'hyperoxie la concentration en dioxygène dissous dans l'eau est élevée d'au moins un facteur deux par rapport à la concentration standard. Enfin, remarquons que dans le cas du bullage d'un mélange dans les proportions normales de l'air, une augmentation de la concentration en dioxygène dissous a été observée.

La pression partielle en dioxygène intracellulaire pour des cellules en culture est la même que celle dans le milieu de culture [146]. De plus, pour des cellules laissées en hypoxie, la concentration intracellulaire de dioxygène dissous chute de près de 90% en une heure, à cause de la respiration [111]. Il est donc clair que le protocole ci-dessus conduit, dans le cas de l'hypoxie, à une élimination ou au moins à une forte diminution du dioxygène intracellulaire et, dans le cas de l'hyperoxie, à une augmentation de la concentration intracellulaire de dioxygène dissous.

On observe sur la figure 4.5 qu'il n'y a pas de mort cellulaire en l'absence de dioxygène et que la fraction de cellules mortes dans la zone irradiée augmente avec à la concentration d'oxygène dissous. De plus, il me semble intéressant de remarquer que dans le cas de l'hyperoxie, la mort cellulaire apparaît bien plus tôt ($\sim 2\text{h}$ au lieu de $\sim 10\text{h}$ dans les conditions normales). La cinétique et la fraction de cellules mortes en hyperoxie sont comparables à une expérience dans laquelle on aurait doublé le temps ou la puissance d'irradiation.

Conclusions : Nos expériences ont montré qu'un rayonnement laser à 1270 nm peut induire la mort des cellules MCF-7. Le spectre d'action sur les cellules de l'irradiation laser est fortement corrélé aux spectres d'absorption et d'émission associé à la transition ${}^3\text{O}_2 \longrightarrow {}^1\text{O}_2$ à 1270 nm du dioxygène dans différents solvants à température et pression standard.

En outre, le nombre de cellules mortes dans la zone d'irradiation est lié à la concentration de dioxygène dissout dans le milieu de culture. En particulier le phénomène de mort cellulaire n'est pas observé en hypoxie et l'hyperoxie tend à accroître les effets cytotoxiques de l'irradiation laser à 1270 nm .

L'influence des effets thermiques et celle d'un mécanisme de production d'oxygène singulet par transfert de l'énergie de vibration des molécules d'eau ont pu être écartées.

On peut donc conclure que la mort cellulaire par irradiation laser à 1270 nm est due à la création d'oxygène singulet par excitation directe, sans photo-agent, *via* la transition ${}^3\text{O}_2 \longrightarrow {}^1\text{O}_2$ du dioxygène.

4.1.4 Expériences complémentaires

Nous allons ici nous intéresser à deux types d'expériences complémentaires. Dans les premières nous montrerons que la mort cellulaire induite par excitation directe de l'oxygène singulet à 1270 nm n'est pas propre à la lignée MCF-7. Les secondes concernent une vérification que nous avons voulu effectuer concernant l'influence potentielle du support de culture des cellules. Nous présenterons donc les résultats d'irradiation de cellules MCF-7 cultivées dans des boîtes de Petri en verre.

Non-influence du type cellulaire

Nous avons utilisé une autre lignée de cellules cancéreuses de mammifères pour les expériences d'irradiation : PC12. C'est une lignée de cellules de rat qui présente la particularité, qui ne nous intéresse pas ici, d'arrêter sa croissance et de se différencier en neurone en présence de certains facteurs de croissance [147].

En ce qui nous concerne, nous voulions simplement vérifier que l'effet de mort cellulaire induite par excitation directe de l'oxygène singulet n'est pas une spécificité du type de tissu ou de l'espèce.

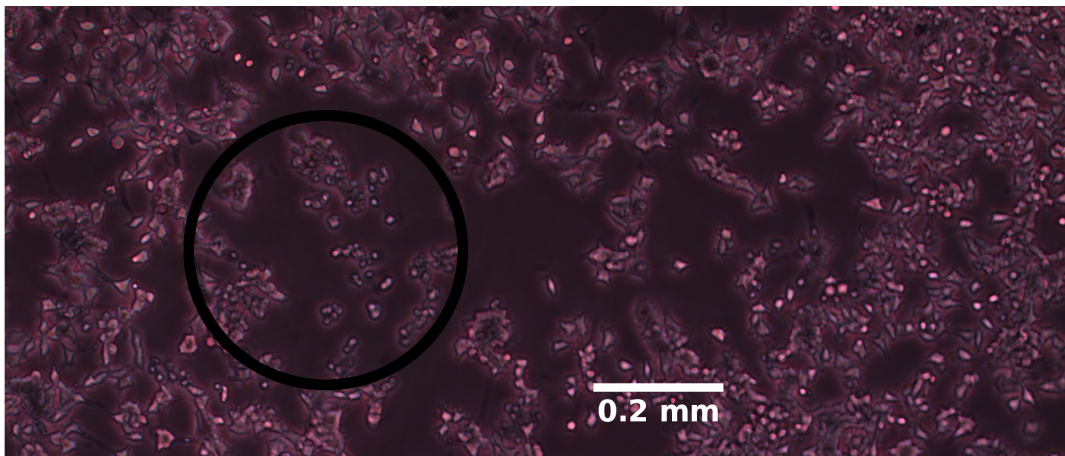


FIG. 4.6 – Cellules PC12 au microscope $4\times$ à contraste de phase, observées 35 h après une irradiation de 3 h à 1270 nm avec une puissance de $115 \pm 5\text{ mW}$.

La figure 4.6 montre les cellules PC12 après une irradiation à 1270 nm de 3 h à $115 \pm 5\text{ mW}$ environ 35 h après l'irradiation. On peut remarquer que les cellules dans la zone irradiée sont mortes et présentent une morphologie comparable à celle des MCF-7 irradiées, alors que les cellules non-irradiées sont normales. Notons, que pour PC12 comme pour MCF-7, aucun effet n'a été observé à 1250 nm .

Non-influence du support de culture

Les pièges ou « pinces » optiques sont apparus comme un outil puissant pour la biologie, la biochimie ou la biophysique. Elles utilisent un laser, souvent infra-rouge, intense et finement focalisé pour piéger et manipuler des objets d'une taille comprise entre 10 nm et $10\text{ }\mu\text{m}$. Ces objets peuvent être aussi des cellules vivantes [148].

Plusieurs auteurs ont signalé que des dommages pouvaient être induits aux cellules ou biomolécules ainsi manipulées. En particulier, à 1064 nm , la formation d'espèces réactives de l'oxygène a

été démontrée [149]. En 2009, Landry *et al.* en ont proposé une interprétation [150]. D'après eux, des billes de polystyrène servant à arrimer des brins d'ADN ainsi piégées agissent comme un agent photo-sensibilisant en PDT. Ils ont, en effet, montré la création d'oxygène singulet grâce au « Singlet Oxygen Sensor Green », une molécule commerciale qui fluoresce en présence d'oxygène singulet. Par contre, l'effet n'est pas observé en remplaçant les billes de polystyrène par des billes en verre. Ils suggèrent que le polystyrène est le seul candidat pour agir comme un photoagent à cause « des nombreuses orbitales Π de la molécule et de son caractère aromatique ». Le verre, lui, ne présente pas ces caractéristiques [150].

Les boîtes de Petri que nous utilisons sont fabriquées à partir de polystyrène cristal. Malgré la signature forte que présente le spectre d'action que nous avons obtenu, nous avons voulu vérifier que la mort cellulaire dans nos expériences n'est pas induite par le mécanisme proposé par Landry et ses collaborateurs.

Nous avons donc irradié des cellules MCF-7 cultivées sur des boîtes de Petri en verre. Remarquons, pour écarter tout doute concernant l'implication d'une autre molécule, que nous n'avons pas utilisé de collagène pour faire adhérer les cellules sur les boîtes de Petri en verre : aucun agent n'a, en fait, été ajouté.

La figure 4.7 montre des cellules MCF-7 après une irradiation à 1270 nm de 3 h à $115 \pm 5\text{ mW}$. Notons que le verre absorbe beaucoup plus que la boîte de Petri en plastique : pour des puissances incidentes comparables, la puissance déposée sur les cellules dans les expériences sur du verre est inférieure d'environ 15% à celle des expériences réalisées sur plastique.

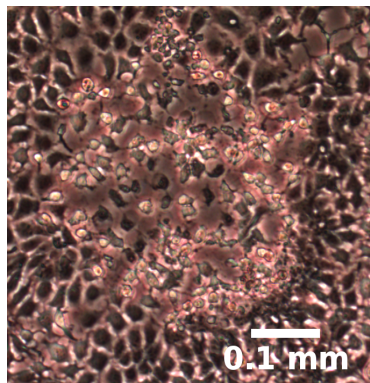


FIG. 4.7 – Cellules MCF-7, cultivées sur des boîtes de Petri en verre sans collagène, observées au microscope $4\times$ à contraste de phase, 35 h après une irradiation de 3 h à 1270 nm avec une puissance de $115 \pm 5\text{ mW}$.

L'effet de mort cellulaire observé par irradiation à 1270 nm est quantitativement comparable (mêmes dimensions de la zone d'effet) que les cellules soient placées dans des boîtes de Petri en verre ou en plastique. Bien que les effets thermiques soient *a priori* plus forts dans le verre que dans le plastique (plus forte absorption), aucun effet n'a été observé à 1250 nm dans le verre comme dans le plastique. On peut donc en conclure que la mort cellulaire n'est pas, dans nos expériences d'irradiation à 1270 nm , induite par le mécanisme proposé par Landry *et al.*.

4.1.5 Synthèse des résultats et conclusions

Le spectre d'action de l'irradiation laser sur la mort cellulaire dans la gamme $1240\text{-}1290\text{ nm}$ présente un maximum à 1270 nm et une largeur de 15 nm ce qui est comparable aux caractéristiques du spectre d'absorption du dioxygène en phase dense. La mort cellulaire induite par le laser à 1270 nm est corrélée à la quantité d'oxygène dissous dans le milieu de culture. La mort cellulaire induite par irradiation laser à 1270 nm est donc, *a priori*, due à la création par excitation directe d'oxygène singulet *via* la transition ${}^3\text{O}_2 \longrightarrow {}^1\text{O}_2$.

De plus, le spectre associé aux effets thermiques ne présente pas, quant à lui, cette variation autour de 1270 nm . et nous avons montré que l'irradiation laser à 1270 nm de cellules *in vitro*

conduit à la mort cellulaire dans une gamme de puissances n'induisant pas de stress hyperthermique. Pour une élévation de température maximale de $\sim 43\text{ }^{\circ}\text{C}$, les effets de l'irradiation à 1270 nm sont quantitativement comparables aux effets d'une irradiation à 1270 nm , pour laquelle l'élévation de température n'implique pas de stress hyperthermique ($\sim 37\text{ }^{\circ}\text{C}$). Dans les expériences présentées ci-dessus, l'influence du stress thermique dans la mort cellulaire est donc négligeable devant les effets liés à la création d'oxygène singulet.

L'hypothèse de l'existence d'éventuels de modes d'excitation de l'oxygène singulet autres que par absorption d'un photon à 1270 nm (transfert par vibration et présence d'une molécule photosensibilisante dans le support de culture) ont pu être écartées. Par ailleurs, la mort cellulaire est observable sur au moins deux types cellulaires (MCF-7 et PC12).

Nous pouvons donc affirmer qu'il est possible, au moins *in vitro*, d'induire la mort cellulaire par excitation directe à 1270 nm de l'oxygène singulet sans agent-photosensibilisant.

Dans la suite nous allons étudier l'effet de la création d'oxygène singulet sans *PS* par irradiation laser pour diverses puissances et divers temps d'irradiation à 1270 nm . Les mesures *in situ* présentées au chapitre 3 nous permettent d'affirmer que l'élévation de température induite par le laser peut être compensée en thermalisant l'incubateur à une température plus basse que $37\text{ }^{\circ}\text{C}$. Cependant, dans notre système expérimental, au-delà d'une puissance de $P_0 \approx 350\text{ mW}$, l'élévation de température maximale due au laser au niveau des cellules dépasse $43\text{ }^{\circ}\text{C}$ pour l'incubateur maintenu à sa température minimale (température ambiante : $21\text{ }^{\circ}\text{C}$). Ceci peut conduire à un stress hyperthermique à priori fatal.

Insistons sur le fait qu'aucune mort cellulaire n'a été observée suite à une irradiation à 1247 nm . A cette longueur d'onde, l'élévation de température due au laser est *a priori* la même qu'à 1270 nm , car les coefficients d'absorption sont quasiment identiques à 1270 et 1247 nm dans la boîte de Petri comme dans le milieu de culture (figure 4.4 (b)). L'irradiation par un rayonnement à 1247 nm constitue donc un « bon témoin » thermique. L'utilisation de cette longueur d'onde (1247 nm) nous permettra de vérifier l'implication du stress thermique dans la mort cellulaire à 1270 nm pour des puissances conduisant à une élévation de température supérieure à $42\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Dans la suite de ce manuscrit, nous ne présenterons donc plus le spectre d'action dans sa totalité. L'irradiation laser à 1270 nm sera accompagnée d'une autre expérience de contrôle à 1247 nm (dans les mêmes conditions) pour évaluer la part de stress hyperthermique dans la mort cellulaire.

4.2 Effets biologiques sur les cellules MCF-7 de l'excitation directe à 1270 nm de l'oxygène singulet

Dans cette section nous nous intéressons aux effets de la création d'oxygène singulet sur des cellules biologiques. Contrairement à la PDT traditionnelle, l'oxygène singulet produit à 1270 nm n'est pas localisé dans un compartiment cellulaire particulier (pas de *PS* localisé).

A ce stade, l'effet de l'oxygène singulet peut donc être de nature intracellulaire comme extracellulaire : dans nos expériences d'irradiation, la mort cellulaire peut provenir de dommages par de l'oxygène singulet produit à l'extérieur comme à l'intérieur de la cellule. Nous présenterons, dans un premier temps, une expérience permettant de considérer qualitativement le rôle de l'oxygène singulet pouvant être créé hors de la cellule.

L'oxygène singulet étant l'agent cytotoxique majeur en PDT, plusieurs auteurs se sont attachés à déterminer la concentration cumulée d'oxygène singulet (dose) nécessaire pour induire la mort cellulaire. Après avoir étudié l'influence sur la mort cellulaire du temps et de la puissance d'irradiation à 1270 nm , nous proposerons donc une évaluation de cette dose minimale dans le cas de l'excitation directe sans *PS*.

Enfin, la détermination du type de mort cellulaire induit par l'irradiation laser à 1270 nm constitue une première étape dans l'élucidation des mécanismes de réponse de la cellule liés au stress induit par création directe de l'oxygène singulet sans *PS*. Nous évoquerons donc, dans une dernière

section, quelques tests biologiques qui nous permettront de confirmer l'induction de dommages à la cellule. A terme, ces tests devraient conduire à des précisions concernant le(s) type(s) de mort cellulaire impliqué(s) dans nos expériences *in vitro*.

4.2.1 Influence d'un « quencher » extracellulaire de l'oxygène singulet : les dommages sont-ils causés par excitation directe intra-cellulaire ?

Etant donné le faible libre parcours moyen par diffusion, L_{diff} , d'une molécule de dioxygène dans l'état singulet ($L_{diff} \sim 125 \text{ nm}$ dans l'eau sans aucune interaction avec une biomolécule [151]), il est peu probable que les dommages proviennent de l'extérieur de la cellule. En effet, si l'on considère la cellule sphérique de rayon $R_c \approx 30 \text{ }\mu\text{m}$, l'oxygène singulet extra-cellulaire pouvant atteindre la membrane, est compris dans une coque sphérique de rayon $R_c + L_{diff} \approx 30.125 \text{ }\mu\text{m}$ soit dans un volume environ 100 fois plus petit que le volume de la cellule.

Pour le vérifier, nous avons utilisé une espèce permettant de désactiver l'oxygène singulet : un « quencher » physique. C'est-à-dire que la collision entre les deux molécules induit la désexcitation du dioxygène vers son état fondamental. Une solution de BSA³, composée d'albumine et de dérivés, est un bon candidat pour la désactivation de l'oxygène singulet extra-cellulaire, premièrement parce que les molécules qui la composent sont, *a priori*, incapables d'entrer dans la cellule et deuxièmement, parce que l'albumine est un « bon quencher » de l'oxygène singulet [152].

Quantitativement, la désactivation de l'oxygène singulet par un « quencher » est décrite par la constante bimoléculaire d'interaction, k_s ($s^{-1}.mol^{-1}.L$) entre les deux molécules. Le lecteur intéressé par plus de précisions pourra se reporter à la section 5.1.2. Mais l'évaluation de la part d'oxygène singulet créé qui est désactivée par la BSA nécessite de comparer k_s à la constante bimoléculaire de réaction k_{ox} conduisant à des dommages au niveau des cellules. C'est une donnée difficilement accessible à ce stade du travail. Nous allons donc dans la suite de ce paragraphe proposer une évaluation de la diminution, en présence d'une quantité connue de BSA extracellulaire, du volume dans lequel l'oxygène singulet créé hors de la cellule peut atteindre la membrane plasmique.

La constante d'interaction entre l'albumine et l'oxygène singulet n'a pas, à ma connaissance, été déterminée dans l'eau. Par contre, sa valeur dans l'eau lourde est de l'ordre de $\sim 2-5.10^8 \text{ s}^{-1}.mol^{-1}.L$ [152]. Cette valeur conduirait, en théorie, à une diminution d'environ un facteur 2 – 3 du temps de vie moyen, τ_Δ , de l'oxygène singulet dans l'eau pour une concentration de BSA de $[BSA] \approx 10^{-3} \text{ mol}.L^{-1}$.

D'autre part, Niedre *et al.* ont signalé une diminution d'un facteur 10 sur le temps de vie de l'oxygène singulet dans de l'eau contenant une concentration de $[BSA] \approx 0,6.10^{-3} \text{ mol}.L^{-1}$ [82].

Connaissant le temps de vie de l'oxygène singulet $\tau_\Delta = k_s^{-1}$, on peut estimer le libre parcours moyen, L_{diff} , d'une molécule de dioxygène dans l'état singulet à l'aide d'une expression tirée de l'équation de diffusion [151] :

$$L_{diff} = \sqrt{2.D.\tau_\Delta} \quad (4.1)$$

où D ($m^2.s^{-1}$) est la constante de diffusion de l'oxygène singulet dans l'eau.

Ainsi, pour une diminution de τ_Δ d'un facteur 10 ($[BSA] \approx 0,6.10^{-3} \text{ mol}.L^{-1}$) le libre parcours moyen est diminué d'un facteur 3,1. Dans ces conditions, si l'on considère toujours la cellule sphérique, le volume dans lequel l'oxygène singulet produit hors de la cellule peut atteindre la membrane, est réduit d'un facteur $(3,1)^3 \approx 30$.

La figure 4.8 montre l'évolution de la fraction de cellules mortes dans une zone de rayon $r \approx 250 \text{ }\mu\text{m}$ autour du faisceau laser. Pour les deux expériences, la puissance laser à 1270 nm est de $115 \pm 5 \text{ mW}$ et l'irradiation a duré 3 heures. Pour l'expérience présentée en rouge sur la figure 4.8, j'ai ajouté au milieu de culture une solution de BSA ($[BSA] \approx 0,93.10^{-3} \text{ mol}.L^{-1}$). Dans ces conditions on s'attend à réduire le temps de vie de l'oxygène singulet τ_Δ au moins autant que la

³BSA est un acronyme pour Bovine Serum Albumine.

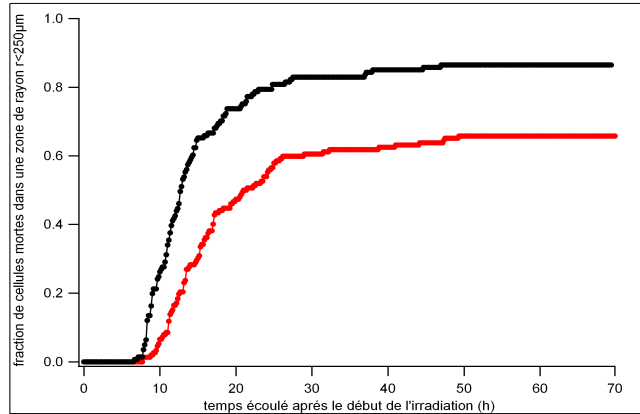


FIG. 4.8 – Comparaison de la cinétique de mort cellulaire dans une zone de rayon $r < 250 \mu\text{m}$ pour une irradiation 115 mW pendant 3 heures. La courbe noire correspond à une expérience dans des conditions normales, la courbe rouge à une expérience dans un milieu contenant BSA ($[BSA] \approx 0,93.10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$).

valeur annoncée par Niedre *et al.* pour une concentration inférieure. Le volume dans lequel l'oxygène singulet créé hors de la cellule pourrait atteindre la membrane et conduire à des dommages à la cellule est donc au moins réduit d'un facteur ~ 30 .

Il semble que la fraction de cellules mortes deux jours après l'irradiation soit diminuée par l'ajout de BSA. Cependant la mort cellulaire n'est pas inhibée par l'ajout d'un « quencher » extracellulaire de l'oxygène singulet et la fraction de cellules mortes dans une zone de $250 \mu\text{m}$ reste non négligeable ($\sim 60\%$). De plus, la fraction de cellules mortes n'est diminuée que d'un quart ($80\%/60\%$). Il semble donc que les dommages soient causés majoritairement par de l'oxygène singulet intracellulaire.

Des expériences complémentaires, dans lesquelles on fera varier la concentration de BSA, devraient permettre, dans un futur proche, de clarifier cette question.

4.2.2 Éléments de dosimétrie : dose seuil d'oxygène singulet

Nous allons maintenant nous intéresser à la dosimétrie de l'effet cytotoxique de l'oxygène singulet sur des cellules MCF-7s. Pour cela nous allons utiliser la définition proposée par Patterson et ses collaborateurs, c'est-à-dire la concentration cumulée d'oxygène singulet créé [86]. En excitation directe cette dose est directement proportionnelle à la puissance laser et au temps d'irradiation.

Mise en évidence d'un effet de seuil

Pour la dernière série d'expériences, l'étuve a été maintenue, pendant le temps de l'irradiation, à température ambiante (21°C). Ceci conduit à minimiser l'élévation de température au niveau des cellules.

Ces irradiations à 1270 nm comprennent des puissances allant de 60 à $\sim 500 \text{ mW}$ pour des temps d'irradiation de 15 min à 3 h .

La figure 4.9 présente la fraction de cellules MCF-7 mortes (35 h après le début de l'irradiation) dans une zone de rayon $r < 300 \mu\text{m}$ en fonction de la densité d'énergie lumineuse totale (fluence) moyenne ($\text{W.cm}^{-2}.\text{h}$) déposée sur les cellules. Cette grandeur est définie par le produit de l'intensité moyenne (W.cm^{-2}) dans une zone de rayon $r < 300 \mu\text{m}$ autour du centre du faisceau laser et du temps d'irradiation (h).

Sur la figure 4.9, on peut remarquer que la fraction de cellule mortes dans varie linéairement avec la densité d'énergie moyenne et qu'aucune mort cellulaire n'est observée en-deçà d'une densité d'énergie moyenne de $25 \text{ W.cm}^{-2}.\text{h}$ et que la fraction de cellules mortes croît de manière quasi-linéaire avec l'énergie laser totale à 1270 nm déposée sur les cellules.

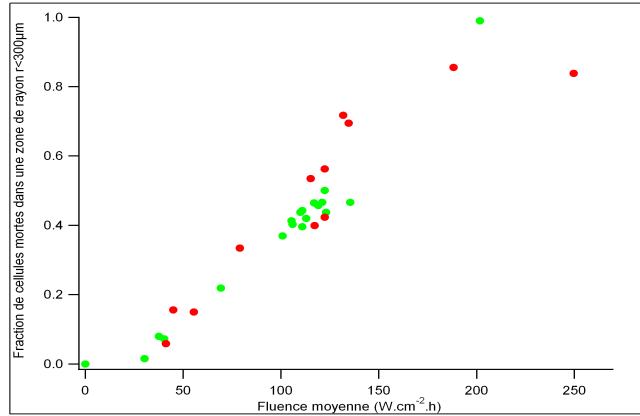


FIG. 4.9 – Evolution de la fraction de cellules (MCF-7) mortes (35 h après le début de l’irradiation) dans une zone de rayon $r < 300 \mu\text{m}$ autour du centre du faisceau laser en fonction de la densité d’énergie lumineuse à 1270 nm ($\text{W.cm}^{-2}.\text{h}$) moyenne reçue par les cellules. Dans ces expériences, l’incubateur est maintenu à une température ambiante de 19 à $21 \text{ }^\circ\text{C}$ pendant l’irradiation. En rouge sont représentées les expériences pour lesquelles la température dépasse localement 42°C et en vert les autres expériences.

Influence des effets thermiques : A l’aide des résultats présentés au chapitre 3, on peut estimer le maximum de température perçue par les cellules irradiées. Les expériences pour lesquelles l’élévation de température dépasse localement 43°C ($500 \text{ mW} > P_0 > 350 \text{ mW}$) sont représentées en rouge sur la figure 4.9. Remarquons que dans ces conditions on observe la même tendance pour la situation où la température locale excède 43°C et la situation où celle-ci est inférieure à 43°C .

Même si aucune différence significative n’est observée sur la figure 4.9, nous avons conduit une autre série d’expériences pour vérifier que le stress hyperthermique seul n’induit pas la mort cellulaire à haute puissance (points en rouge, $500 \text{ mW} > P_0 > 350 \text{ mW}$).

Dans les expériences représentées en rouge sur la figure 4.9, la durée d’exposition à l’irradiation n’excède pas 1 h .

Dans un premier temps, nous avons vérifié que l’irradiation laser de cellules MCF-7 à 1247 nm à une puissance de 500 mW pendant 1 h n’induit pas de mort cellulaire⁴. Dans ces conditions, la température maximum au centre du faisceau laser est évaluée, à l’aide de la méthode thermométrique présentée au chapitre 3, à $\sim 49 \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$.

Dans un second temps, à l’aide de l’incubateur, nous avons exposé les cellules MCF-7 à un stress hyperthermique :

- 100% des cellules MCF-7 ayant subi un stress hyperthermique à $49 \text{ }^\circ\text{C}$ de 1 h sont mortes $\sim 30 \text{ h}$ après l’exposition,
- seulement quelques pourcents des cellules exposées à une température de $48 \text{ }^\circ\text{C}$ pendant 1 h sont mortes $\sim 30 \text{ h}$ après l’exposition.

Pour un temps d’exposition donné, la fraction de cellules mortes par stress hyperthermique est très sensible à la température.

L’ensemble de ces expériences me permet donc de conclure que dans les expériences présentées en rouge sur la figure 4.9, le stress hyperthermique seul ne conduit pas à la mort cellulaire.

Détermination du seuil : La figure 4.9 permet de déterminer une dose d’irradiation laser à 1270 nm seuil en deçà de laquelle la mort cellulaire n’est pas observée. En effet, pour une densité d’énergie moyenne de $25 \text{ W.cm}^{-2}.\text{h}$ à 1270 nm aucune mort cellulaire n’apparaît.

Rappelons que l’intensité laser déposée sur les cellules n’est pas uniforme dans un rayon de $300 \mu\text{m}$ autour du centre du faisceau. En effet, comme le montre la figure 2.4 (b) l’intensité est

⁴Insistons sur le fait que, comme le montre le profil de température 3.11, la température n’est pas uniforme sur toute la zone considérée : seules quelques cellules sont portées au delà de 43°C .

maximale au centre et décroît de manière gaussienne à mesure que l'on s'en éloigne. Donc l'intensité lumineuse reçue n'est pas la même pour toutes les cellules lors d'une même expérience.

La dose seuil moyenne ($25 \text{ W.cm}^{-2}.h$), déterminée d'après la figure 4.9, correspond, dans notre système expérimental⁵, à une densité d'énergie lumineuse maximale seuil de $D_s^a \approx 100 \text{ W.cm}^{-2}.h$.

Cette densité d'énergie limite peut aussi être observée spatialement sur les images des expériences d'irradiation. En effet, la figure 4.1 (b) montre qu'au-delà d'une certaine distance par rapport au centre du faisceau, l'irradiation n'a plus d'effet sur les cellules. Les cellules mortes les plus éloignées du centre du faisceau ont reçu une énergie lumineuse à 1270 nm juste suffisante pour conduire à leur mort. Au-delà, la dose n'induit pas la mort des cellules. La dose limite ainsi définie à partir du rayon d'action de l'irradiation laser à 1270 nm vaut⁶, $D_s^b \approx 100 \pm 20 \text{ W.cm}^{-2}.h$. Cette valeur est en accord avec le seuil, D_s^a , déterminé d'après la variation linéaire de la figure 4.9.

Evaluation de la concentration cumulée d'oxygène singulet minimale

La concentration cumulée d'oxygène singulet créé s'écrit comme l'intégrale de son taux de production sur le temps d'irradiation. Cette définition est la même que celle utilisée par Patterson et ses collaborateurs [86]. Il s'agit de la concentration totale d'oxygène singulet créé ayant ou non réagi.

Dans le cas de l'excitation directe, le taux de production, Γ (s^{-1}), est quasi-invariant dans le temps et la concentration d'oxygène singulet cumulée s'écrit :

$$[{}^1O_2]_{cum} = \int_0^{T_{irr}} \Gamma . dt = \Gamma \times T_{irr} = \sigma_{1270} \cdot \frac{I}{h.\nu} \cdot [{}^3O_2] \cdot T_{irr} \quad (4.2)$$

où T_{irr} est le temps d'irradiation (h), σ_{1270} la section efficace d'absorption (cm^2) conduisant à la production d'oxygène singulet, I l'intensité lumineuse ($W.cm^{-2}$) à 1270 nm , $[{}^3O_2]$ la concentration de dioxygène dans l'état fondamental ($mol.L^{-1}$). h est la constante de Planck et ν la fréquence d'une radiation à 1270 nm donc $h.\nu$ représente l'énergie (J) d'un photon à cette longueur d'onde.

La section efficace d'absorption associée à la transition du dioxygène vers son état singulet est de l'ordre de $\sigma_{1270} \sim 10^{-23} cm^{-2}$ dans l'eau [109]

La concentration en dioxygène dans les cellules est sensiblement égale à la concentration de dioxygène dissous dans le milieu de culture [146]. Cette dernière peut être estimée à partir de la concentration de dioxygène dissous dans l'eau à $25^\circ C$ qui vaut $[{}^3O_2] \approx 200 \mu mol.L^{-1}$ [110]. Lee Koo *et al.* ont mesuré la concentration de dioxygène dissous dans des macrophages. Ils trouvent une valeur environ deux fois plus grande de $[{}^3O_2]$ à savoir $\sim 433 \mu mol.L^{-1}$ [111].

Ainsi, à partir de la densité d'énergie seuil, D_s , déterminée précédemment, on peut donner un encadrement de la concentration cumulée d'oxygène singulet créé minimale nécessaire à la mort des cellules ($[{}^1O_2]_{seuil}$). On trouve entre $[{}^1O_2]_{seuil} \approx 4,6 \pm 0,7$ et $[{}^1O_2]_{seuil} \approx 9,2 \pm 1,4 \text{ mmol.L}^{-1}$ selon la valeur choisie pour la concentration de dioxygène. Cette valeur seuil est à comparer avec les estimations de la littérature données en *PDT* pour la dose minimale en utilisant différentes méthodes dosimétriques (fluorescence du *PS* ou détection de l'oxygène singulet à 1270 nm), différents types cellulaires et différents photo-agents. Ces valeurs sont reportées à la table 4.1. Remarquons que certaines valeurs sont définies par l'existence d'une dose seuil (comme nous l'avons définie) alors que d'autres sont associées à une diminution du nombre de cellules saines de $\frac{1}{e} \sim 30\%$.

⁵La densité d'énergie lumineuse est le produit du temps d'irradiation par l'intensité lumineuse à 1270 nm reçue par les cellules. La valeur moyenne de l'intensité laser dans la zone considérée est déterminée par le calcul pour un faisceau dont le profil en intensité est gaussien. De même, par le calcul on peut déterminer pour notre système expérimental l'intensité maximale (au centre du faisceau) déposée sur les cellules. La grandeur D_s^a correspond à la densité d'énergie lumineuse maximale (au centre) qui serait reçue par les cellules situées au centre du faisceau laser pour une irradiation d' $1 h$ avec un faisceau dont l'intensité laser moyenne dans la zone considérée serait de 25 W.cm^{-2} .

⁶La valeur D_s^b est déterminée en évaluant la moyenne de la densité d'énergie limite observée spatialement (limite de la zone d'action) pour les expériences résumées à la figure 4.9.

TAB. 4.1 – Exemples de doses minimale d’oxygène singulet calculées en PDT. (*) Cas de cellules cultivées sous forme tridimensionnelle (sphéroïdes). Le terme « fluo. » désigne la méthode de dosimétrie qui utilise l’analyse de la fluorescence du *PS* pour déterminer la concentration cumulée d’oxygène singulet. Le terme « phospho. » désigne la méthode de dosimétrie qui utilise la phosphorescence à 1270 *nm* pour déterminer la concentration cumulée d’oxygène singulet.

$[^1O_2]_{seuil}$ (<i>mmol.L</i> ⁻¹)	<i>PS</i>	dosimétrie	cellules	définition du seuil	référence
	-	-	-	-	-
1,52 ± 0,28	mTHPC	fluo.	MLL	$\frac{1}{e} \sim 30\%$	[86]
0,07	ALA - PpIX	phospho.	AML5	$\frac{1}{e} \sim 30\%$	[83]
0,19	Hematoporphyrin	fluo.	TA-3	$\frac{1}{e} \sim 30\%$	[153]
12,1 ± 1,2	Photofrin	fluo.	EMT6 (*)	seuil	[89]
7,9 ± 2,2	mTHPC	fluo.	colo 26 (*)	seuil	[154]
4,6 à 9,2	-	-	MCF-7	seuil	ce travail

Etonnamment, bien qu’il s’agisse d’un seuil et non d’une valeur à $\frac{1}{e}$, la dose minimale que nous avons estimée se situe dans la gamme haute des valeurs disponibles dans la littérature. Il est probable que d’autres effets cytotoxiques, liés au photoagent, soient à prendre en compte selon le type cellulaire et la nature du *PS*. Il me semble aussi qu’il faille tenir compte de la quantité d’oxygène singulet ayant réagi plutôt que la quantité totale d’oxygène singulet produite ainsi que du type cellulaire. Dans ce dernier cas, les données sont difficilement comparables mais confirment un ordre de grandeur en bon accord avec les résultats précédemment publiés.

Précisons cependant que plusieurs auteurs utilisent la concentration de dioxygène dissous dans le milieu (environ deux fois inférieure à la valeur déterminée dans les macrophages) pour évaluer cette dose limite. C’est la concentration dans les macrophages qui donne la borne supérieure de notre estimation.

4.2.3 Tests complémentaires pour le diagnostic de la mort cellulaire

Morphologiquement, après l’irradiation laser à 1270 *nm*, nous n’avons pas observé de gonflement de la cellule, caractéristique de la nécrose [26]. Par contre, nous avons pu observer une légère réduction du volume cellulaire qui pourrait être associée à l’apoptose [34], mais nous n’avons pas observé la formation de corps apoptotiques, caractéristiques de ce type de mort [34]. Et, comme nous l’avons déjà évoqué, les vacuoles formées lors de l’autophagie ne peuvent être distinguées des vésicules que par microscopie électronique [37].

Insistons sur le fait que ces changements morphologiques peuvent être subtils et leur identification nécessite par conséquent un oeil averti. Nous avons donc réalisé des tests permettant de déterminer des changements morphologiques au niveau moléculaire liés à la mort cellulaire. Cette étude devrait permettre, à terme, de clarifier les voies par lesquelles la mort cellulaire est induite par excitation directe à 1270 *nm* de l’oxygène singulet.

Image du noyau - fragmentation de l’ADN

Comme l’illustre la figure 4.10 (a), nous avons pu observer la fragmentation de l’ADN 24 *h* post-irradiation. Cette fragmentation confirme la mort cellulaire [24]. C’est en effet une conséquence générale de l’apoptose comme de la nécrose [34].

Pour cette expérience, les cellules ont été irradiées à 1270 *nm* à une puissance de 470 *mW*⁷ pendant 45 *min*. L’ADN est observé par microscopie de fluorescence grâce à une incubation au Hoechst 33258. Il s’agit d’un intercalant de l’ADN qui permet la visualisation de la chromatine [155]. La figure 4.10 (b) présente les noyaux de cellules non-irradiées à titre de comparaison.

Remarquons que la fragmentation de l’ADN a pu être observée pour plusieurs conditions d’irradiation à forte puissance ($P_0 \approx 450$ *mW*) comme à plus basse puissance ($P_0 \approx 100$ *mW*). C’est, dans

⁷Le diamètre à mi-hauteur (FWHM) du faisceau laser est toujours de 300 μm .

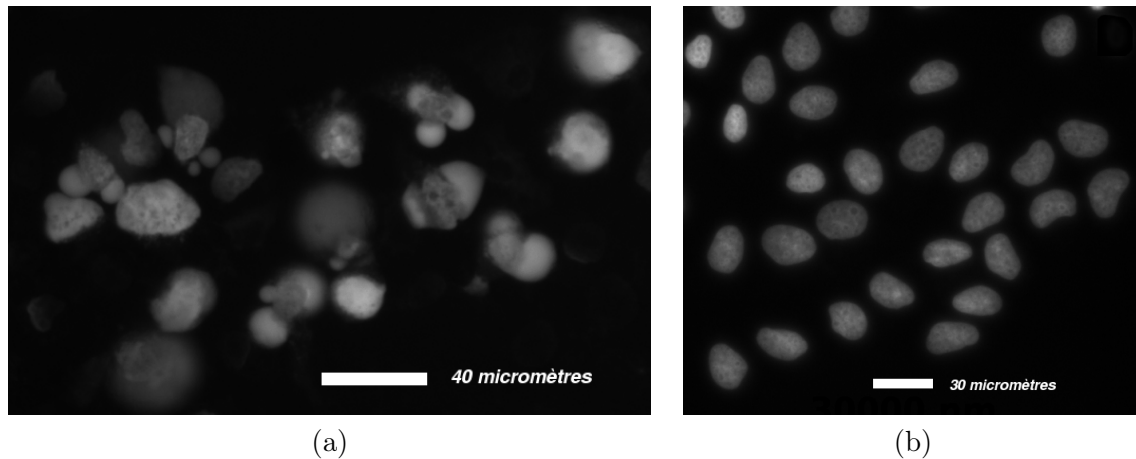


FIG. 4.10 – Images (objectif $20\times$) par microscopie de fluorescence et coloration au Hoechst 33258 de l'ADN de cellules MCF-7 (a) irradiées pendant 45 min à 470 mW - (b) cellules non irradiées (hors du faisceau laser).

nos expériences, un phénomène tardif (20 à 30 h post-irradiation). Une étude quantitative précise permettra prochainement de déterminer si toutes les cellules marquées au bleu Trypan (mortes) présentent cette morphologie quels que soient la puissance et le temps d'irradiation.

Enfin, la fragmentation de l'ADN est observée à la fois dans la nécrose et l'apoptose [34]. Ce critère ne permet donc pas de discriminer les deux types de mort cellulaire.

Tests à l'annexine V et au iodure de Propidium

Comme on l'a déjà évoqué, la membrane de la cellule est composée de phospholipides [1, 156]. Parmi ceux-ci on distingue les phosphatidylsérines qui sont des phospholipides dont le groupement phosphate est associé à un acide aminé, la sérine [156]. Dans les cellules normales de mammifères, cette molécule est généralement localisée du côté intracellulaire de la membrane. Elle présente une charge totale négative et participe donc à la polarisation électrique de la membrane plasmique responsable de la régulation des quantités d'ions et de molécules polaires entre le cytoplasme et le milieu extracellulaire [156].

Lors des premières étapes de l'apoptose, on observe une perte de l'asymétrie structurale et de la polarité de la membrane plasmique, c'est-à-dire une perte du potentiel transmembranaire de la cellule qui expose alors des résidus de phosphatidylsérine [157, 158]. Cette dépolarisation membranaire joue un rôle important dans la reconnaissance et l'évacuation des cellules apoptotiques par les macrophages [157, 158].

In vitro, la présence de résidus de phosphatidylsérine peut être mise en évidence par l'utilisation d'une molécule, l'annexine-V, à laquelle est greffé un chromophore pour la visualiser en microscopie de fluorescence par exemple. L'annexine-V est une molécule qui interagit fortement et de manière spécifique avec les résidus de phosphatidylsérine [159]. Couplée à un chromophore cette molécule permet donc de marquer et reconnaître, par microscopie de fluorescence par exemple, la perte de l'asymétrie membranaire, qui peut être associée à l'apoptose précoce [157–161].

Cette perte de l'asymétrie de la membrane plasmique n'est pourtant pas propre à l'apoptose. Elle peut être observée suite à une mort par nécrose [158, 161]. C'est pourquoi le test à l'Annexine-V est souvent combiné à un marquage à l'aide d'une autre molécule, l'iodure de Propidium [158, 160, 161]. L'iodure de Propidium est un intercalant de l'ADN non vital auquel la membrane des cellules saines est imperméable, alors qu'il est rapidement intégré par les cellules présentant une perte d'intégrité de la membrane [160–162]. La perte d'intégrité membranaire (perméabilisation) est observée dès les premières étapes de la nécrose [34]. Ce marqueur est souvent proposé dans les kits commerciaux comme complément à l'Annexine-V pour différencier les cellules apoptotiques des cellules nécrotiques. Les résultats de ce test commercial se fait de la manière suivante [160–162] :

- les cellules saines ne sont marquées positivement par aucun des colorants,

- les cellules marquées positivement à l’Annexine-V et au iodure de Propidium sont considérées comme nécrotiques,
- les cellules uniquement marquées par l’Annexine-v sont considérées apoptotiques.

Cependant, des travaux ont montré que dans les stades tardifs de l’apoptose, il est aussi possible d’observer l’intégration de l’iodure de Propidium [160]. Ces travaux suggèrent donc la nécessité d’une étude cinétique pour la distinction de la nécrose et de l’apoptose à l’aide de ce test [160].

A ce stade du travail, nous n’avons pas effectué une telle étude cinétique. Nous ne pouvons donc distinguer pour l’instant une mort de type nécrose d’une mort de type apoptose.

On peut cependant remarquer que, comme l’illustre la figure 4.11, près de 90% des cellules exposées à une irradiation à 1270 nm à une puissance de $P_0 \approx 200 \text{ mW}$ pendant 3 h répondent positivement à l’Annexine-V (traduisant une dépolarisation de la membrane) et au iodure de Propidium (traduisant une perméabilisation de la membrane) dans une zone de $\sim 200 \mu\text{m}$ autour du faisceau laser. Les $\sim 10\%$ de cellules simultanément négatives aux deux tests sont, quant à elles, positives au test à l’Annexine-V seulement. La figure 4.12 montre les mêmes cellules observées à un plus fort grossissement.

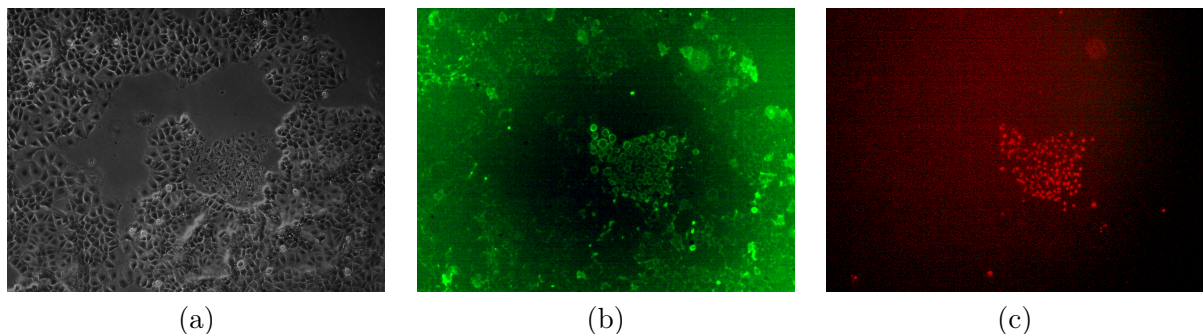


FIG. 4.11 – Images au microscope ($4\times$) de cellules MCF-7 24 h après avoir été exposées à une irradiation à 1270 nm d’une puissance de $P_0 \approx 200 \text{ mW}$ (soit une intensité moyenne de $I_{moy} \approx 67 \text{ W.cm}^{-2}$ dans une zone de rayon $r = 300 \mu\text{m}$) pendant 1h30min. Les cellules ont été analysées à l’aide d’un kit commercial Annexine V - iodure de propidium (Roche). Pour les deux colorants, la longueur d’onde d’excitation était 488 nm. Pour l’annexine V la longueur d’onde d’émission était 515 nm ; pour le iodure de propidium l’émission était observée à l’aide d’un filtre coloré rouge. (a) image de contraste de phase de l’ensemble des cellules - (b) image montrant la localisation de l’Annexine-V caractéristique de la dépolarisation de la membrane - (c) image montrant le marquage à l’iodure de Propidium traduisant la perte de l’intégrité membranaire.

Cette étude doit être poursuivie en effectuant le même test à plusieurs dates post-irradiation, comme le suggère [160]. L’étude cinétique des tests à l’Annexine V - iodure de Propidium pourra être complétée par une observation en microscopie électronique pour diagnostiquer une éventuelle autophagie.

De plus, il est probable que la réponse cellulaire et le type de mort soient conditionnés par la dose d’oxygène singulet comme cela a pu être observé en PDT [163]. La discrimination d’un type de mort devra donc se faire dans plusieurs gammes de paramètres d’irradiation laser à 1270 nm.

Ajoutons enfin qu’il pourrait être intéressant d’effectuer le test de viabilité Annexine V - iodure de Propidium après irradiation laser à 1270 nm sur un autre type cellulaire. En effet, il est connu que la lignée MCF-7s présente une déficience dans l’expression de la caspase 3 [164], une protéine nécessaire à l’exécution des changements morphologiques de l’apoptose [165].

4.2.4 Conclusions

Nous avons montré à la section 4.1 que la mort cellulaire induite par irradiation laser à 1270 nm est due à la création d’oxygène singulet par excitation directe *via* la transition radiative $^3O_2 \longrightarrow ^1O_2$.

Dans cette seconde section, nous avons pu vérifier que la mort cellulaire induite par irradiation laser à 1270 nm est *a priori* majoritairement due à de l’oxygène singulet créé à l’intérieur de la cellule (cf. 4.2.1).

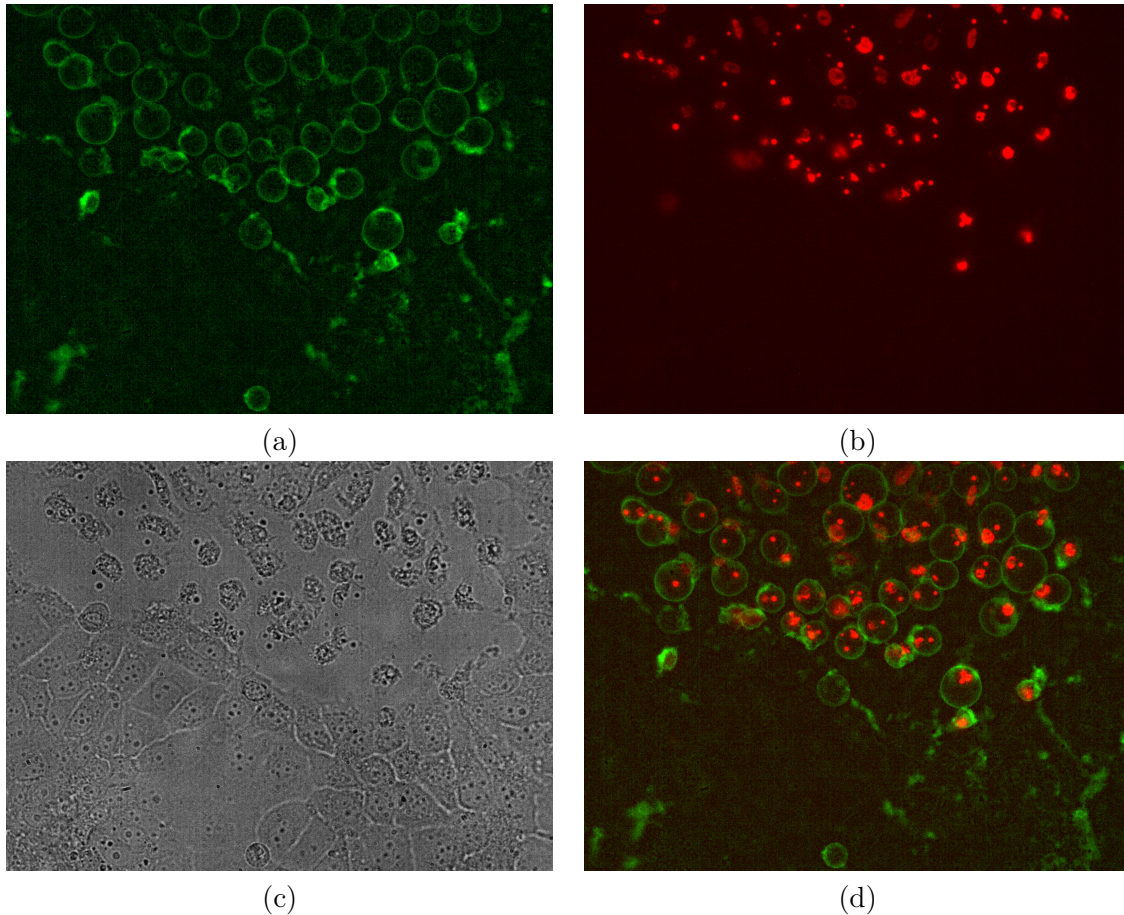


FIG. 4.12 – Images au microscope ($20\times$) des mêmes cellules MCF-7 que celles de la figure 4.11 (24 h après irradiation à 1270 nm à une intensité $I_{moy} \approx 67\text{ W.cm}^{-2}$ dans une zone de rayon $r = 300\ \mu\text{m}$ pendant $1\text{h}30\text{min}$). En haut, (a) images montrant la localisation de l’Annexine V - (b) images montrant la pénétration du iodure de Propidium. en bas, (c) images en lumière blanche par transmission des cellules - (d) images fusionnées de l’Annexine V et du iodure de Propidium.

De plus, nous avons étudié l’influence de la dose d’oxygène singulet créé sur la mort de cellules MCF-7. Nous avons en particulier constaté que le nombre de cellules mortes est proportionnel à la densité d’énergie lumineuse à 1270 nm totale ($\text{W.cm}^{-2}.\text{h}$) déposée sur les cellules (définie par le produit du temps d’irradiation (h) et de l’intensité laser W.cm^{-2} reçue par les cellules). Ce résultat confirme que, contrairement à la PDT traditionnelle, le taux de production d’oxygène singulet est indépendant de la puissance laser utilisée.

Enfin, nous avons déterminé la dose minimale d’irradiation à 1270 nm nécessaire à la mort des cellules MCF-7 *in vitro*. Elle vaut $D_s \approx 100\text{ W.cm}^{-2}.\text{h}$. Cette valeur correspond à une concentration cumulée d’oxygène singulet minimale pour induire la mort cellulaire en bon accord avec les valeurs estimées en PDT traditionnelle.

La valeur de D_s que nous avons obtenue doit être comparée aux expériences *in vivo* menées par Yusupov *et al.* [114]. Dans leurs expériences sur des basaliomes humains, cette équipe a obtenu la rémission complète des tumeurs pour une irradiation à $\sim 1262\text{ nm}$ pour des doses comprises entre 150 et 250 J.cm^2 [114]. Cette valeur est ~ 1000 fois inférieure à la dose seuil $D_s \approx 100\text{ W.cm}^{-2}.\text{h}$ nécessaire à la mort cellulaire par irradiation laser à 1270 nm , sans effet thermique, que nous avons obtenue.

Dans ces conditions, il ne me semble pas possible d’affirmer que les effets observés par Yusupov *et al.* soient liés à une mort cellulaire induite directement par la seule création d’oxygène singulet par irradiation laser à 1270 nm .

Plusieurs hypothèses sont envisageables pour expliquer les effets de l’irradiation autour de \sim

1270 nm observés *in vivo*. D'une part, il est possible que l'oxygène singulet induise la création d'ERO secondaires de plus longue durée de vie [78] ou conduise à une réponse immunitaire [71, 72]. Ces deux voies sont susceptibles d'éradiquer la tumeur. D'autre part, étant donnée la puissance laser utilisée par Yusupov *et al.*, l'implication d'effets thermiques est à considérer.

Concernant ce dernier point, insistons sur le fait que les effets thermiques induits par irradiation laser à 1247 nm sont comparables à ceux induits à 1270 nm. Nous avons, de plus, pu montrer que l'irradiation laser à 1247 nm ne conduit pas à la mort des cellules MCF-7 dans une gamme d'intensité exempte de stress hyperthermique. A l'issue de ce travail, il me semble donc qu'une étude systématique *in vivo* associant l'utilisation de lasers à 1270 nm et à 1247 nm doit permettre de déterminer la part de stress hyperthermique dans le traitement des tumeurs par irradiation laser autour de 1270 nm.

Deuxième partie

Détection optique et études des interactions de l'oxygène singulet produit par excitation directe

Chapitre 5

Introduction et contexte de la deuxième partie :

La première partie de ce travail de thèse a permis de démontrer qu'il est possible de créer une quantité suffisante d'oxygène singulet, sans photo-agent par excitation optique directe de la transition ${}^3O_2 \longrightarrow {}^1O_2$ à 1270 nm du dioxygène, pour induire la mort cellulaire.

Cette possibilité doit permettre, en milieu vivant, d'obtenir des informations quantitatives qui sont, en PDT traditionnelle, difficile à obtenir à cause des nombreuses interactions du *PS* avec les substrats biologiques ou avec l'oxygène singulet auquel il lui a même donné naissance. En particulier, nous avons pu constater que l'excitation directe à 1270 nm, conduit à une évaluation du taux de production d'oxygène singulet, au moins en relatif, plus aisée que lorsque cette espèce est créée à l'aide d'un *PS*. En effet, le nombre de cellules mortes par irradiation laser à 1270 nm varie, contrairement à la PDT traditionnelle, linéairement avec le temps et la puissance d'irradiation.

Ce travail de thèse s'inscrit dans un projet ambitieux et nouveau au laboratoire PhLAM qui doit conduire, à terme, à l'étude par microscopie optique des interactions de l'oxygène singulet dans la cellule. Pour cela la détection de l'oxygène singulet semble être un outil nécessaire. Cette détection doit corroborer et compléter le travail effectué sur une population de cellules *in vitro*.

Par exemple, la détection de la phosphorescence à 1270 nm de l'oxygène singulet permet, au moins en laboratoire, d'effectuer une dosimétrie précise de la PDT [82–84]. Une telle détection résolue en temps à l'échelle de la cellule unique a permis de dégager un comportement de l'oxygène singulet dans le cytoplasme jusqu'alors inconnu¹ [92,93].

Cependant, même en solution macroscopique et homogène, la détection de l'oxygène singulet reste délicate [92,105]. En cellule, le grand nombre de partenaires biochimiques potentiels de l'oxygène singulet et l'inhomogénéité² du milieu peuvent conduire à une interprétation des résultats délicate voire ambiguë [92,105,166]. Dans ces conditions, des expériences en solution (homogènes et maîtrisées³) peuvent guider ou aider dans l'interprétation des résultats, même si le lien entre les deux environnements n'est pas direct.

C'est à ces aspects qu'est consacrée la seconde partie de mon travail de thèse. J'ai pu, lors de ce travail mettre en place des dispositifs permettant la détection optique de l'oxygène singulet et l'étude des interactions de cet état en phase dense. On pourrait formuler une question servant de guide à cette deuxième partie du travail de la manière suivante : est-il possible, en solution à température et pression standard, de mettre en place une méthode optique de détection de l'oxygène singulet produit par excitation directe (sans photo-agent) ? Si oui, peut-on, avec cette méthode, suivre les

¹Les travaux d'Ogilby et ses collaborateurs ont mis en évidence un comportement en cellule très différent de celui attendu d'après les expériences en solution. Leurs mesures montrent que (i) le temps de vie de l'oxygène singulet dans le cytoplasme est proche de celui dans le solvant inerte et que (ii) environ $\sim 30\%$ de l'oxygène singulet créé dans le cytoplasme peut diffuser hors de la cellule [92,93].

²Par inhomogénéité j'entends, par exemple, que la cellule est structurée en différents compartiments. Chaque compartiment a une composition chimique qui lui est propre.

³On peut, par exemple, envisager de complexifier graduellement par ajout de molécules permettant de mimer les effets biologiques.

interactions de cette espèce avec des réactifs potentiels et, à terme, conduire une étude de l'oxygène singulet en milieu vivant ?

Ce chapitre (chapitre 5) est consacré à un préambule bibliographique concernant les interactions de l'oxygène singulet en phase dense. Ce chapitre nous permettra de présenter les méthodes de détection de l'oxygène singulet en solution et servira à mettre en évidence les difficultés inhérentes à cette détection. Ceci nous conduira, à la fin de ce chapitre, à proposer deux méthodes de détection de l'oxygène singulet.

Dans le chapitre 6 nous envisagerons la détection de la phosphorescence à 1270 nm pour de l'oxygène singulet excité sans photo-agent *via* une transition radiative du dioxygène conduisant à la formation de l'état singulet. Nous constaterons que cette voie n'est pas réalisable et nous montrerons alors que l'on peut mettre en place une méthode indirecte utilisant un piège chimique de l'oxygène singulet.

Celle-ci sera présentée au chapitre 7. Cette méthode nous a servi, par exemple, à obtenir le spectre d'absorption à 1270 nm du dioxygène dissous en solution. C'est ce même spectre qui nous a permis de mettre en évidence l'implication de l'oxygène singulet dans la mort cellulaire induite *in vitro* par irradiation laser à 1270 nm (cf. 4.1).

5.1 Propriétés physico-chimiques de l'oxygène singulet en phase dense : dépendance avec l'environnement proche de la molécule

Cette section est consacrée à la description des processus pouvant conduire à la désactivation de l'oxygène singulet en phase dense. Ceux-ci nous permettront de mettre en évidence les processus qui peuvent entrer en compétition avec les réactions entre l'oxygène singulet et des macromolécules en cellules.

Il ne s'agit pas ici d'entrer dans les détails mais de donner un aperçu des mécanismes mis en jeu. Ceci nous permettra de garder à l'esprit les efficacités relatives des différents processus et de comprendre les difficultés inhérentes à la détection de l'oxygène singulet en phase dense.

Nous nous intéressons, en particulier, à la production d'oxygène singulet sans photo-agent *via* des transitions radiatives naturelles du dioxygène. De telles transitions radiatives sont interdites à l'ordre dipolaire électrique. Nous présenterons donc, dans un premier temps, les transitions radiatives entre les trois premiers états électroniques du dioxygène en mettant l'accent sur l'influence du solvant en phase dense. Nous verrons en particulier que la présence d'une autre molécule conduit à l'augmentation des probabilités de transitions radiatives entre ces trois états.

Dans un second temps, nous évoquerons les possibles processus de désactivation non-radiatifs de l'oxygène singulet en phase dense. Nous verrons que pour ces processus, la nature du solvant détermine leur efficacité.

5.1.1 Transitions radiatives entre les trois premiers états électroniques du dioxygène : influence du solvant en phase dense

Transitions interdites pour la molécule isolée

Nous nous intéressons ici à la molécule de dioxygène isolée, c'est-à-dire en l'absence d'interaction avec d'autres molécules. En pratique, cette hypothèse n'est évidemment jamais vérifiée mais elle reflète le cas des phases gazeuses diluées des plus hautes couches de l'atmosphère ou le cas d'expériences en laboratoire à basse pression.

La figure 5.1 résume les diverses transitions entre les trois premiers niveaux électroniques du dioxygène et les longueurs d'ondes associées.

Remarquons que le second état électronique du dioxygène, $b^1\Sigma_g$ est aussi un état singulet. Pour plus de clarté, dans la suite nous représenterons les états par leur notation spectroscopique. Ainsi,

la transition à 1270 nm entre l'état fondamental et le premier état électronique excité (l'oxygène singulet noté jusqu'ici 1O_2), jusqu'ici écrite $^3O_2 \rightarrow ^1O_2$ sera désignée par : $X^3\Sigma_g^- \rightarrow a^1\Delta_g$ ou simplement $X \rightarrow a$.

Les transitions entre les trois premiers états électroniques du dioxygène sont interdites⁴ à l'ordre dipolaire électrique [81, 98, 99, 168].

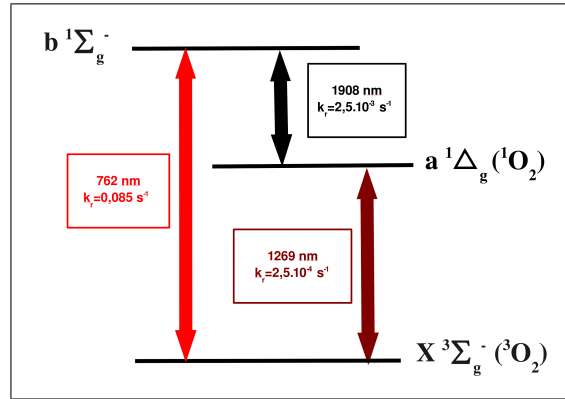


FIG. 5.1 – Représentation schématique des transitions entre les trois premiers niveaux électroniques du dioxygène.

Cependant, ces transitions ont été observées, en émission comme en absorption, dans les plus hautes couches de l'atmosphère et en phases gazeuses en laboratoire [81, 99]. Il faut prendre en compte des interactions d'ordres supérieurs, par nature plus faibles, et le couplage spin-orbite⁵ pour décrire les transitions radiatives entre ces états [81, 98, 99, 168, 169]. La transition $b^1\Sigma_g^+ \rightarrow a^1\Delta_g$ est de nature quadripolaire électrique, alors que les transitions $b^1\Sigma_g^+ \rightarrow X^3\Sigma_g^-$ et $a^1\Delta_g \rightarrow X^3\Sigma_g^-$ sont dipolaires magnétiques [81, 98, 99, 168, 169].

En pratique, les probabilités de transitions entre ces états du dioxygène sont très faibles. A titre d'exemple, le taux d'émission spontanée, k_r , vaut $2,5 \cdot 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ pour la transition $a \rightarrow X$ [81]. Cette valeur conduit à un temps de vie radiatif de $\tau_r = \frac{1}{k_r} \approx 67 \text{ min}$ pour la molécule isolée. L'oxygène singulet est donc une espèce métastable : sa désactivation nécessite l'implication d'autres processus que les transitions radiatives.

La molécule perturbée : influence du solvant sur les transitions radiatives

On s'intéresse ici à la molécule non-isolée, c'est à dire en interaction avec d'autres atomes ou molécules. Cette situation correspond, en pratique, à des phases plus denses comme par exemple les phases liquides dans lesquelles le dioxygène de l'air est dissous.

La collision avec d'autres atomes ou molécules induit une modification du nuage électronique qui, de manière générale, rend les transitions de la figure 5.1 plus probables en émission et en absorption [81, 169–171]. A titre d'exemple, le taux d'émission spontanée pour la transition $a \rightarrow X$ vaut $k_r \sim 1,8 \text{ s}^{-1}$ dans l'anisole, valeur à comparer avec $k_r \sim 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ pour la molécule isolée [81].

Lors de la collision, il se forme un complexe de collision $M-O_2$ qui modifie la configuration électronique du dioxygène [172]. Les transitions acquièrent alors un caractère permis à l'ordre dipolaire électrique [81, 169–171]. Notons que cette perturbation peut induire un décalage dans les niveaux d'énergie. Ceci se traduit par le fait que les transitions sont légèrement décalées ($\sim 1 \text{ nm}$) vers le rouge [81] et que les longueurs d'ondes centrales des spectres d'émission et d'absorption peuvent différer légèrement ($\sim 1 \text{ nm}$) [170, 171].

⁴En effet, les règles de sélection des transitions dipolaires électriques ($\Delta L = 0; \pm 1 - \Delta S = 0 - g \leftrightarrow u$ [167]) ne sont pas vérifiées. Par exemple, pour la transition $a \rightarrow X$ à 1270 nm, il n'y a pas conservation du spin ($\Delta \neq 0$) et violation de la règle concernant le nombre quantique L ($\Delta L = 2$) [98, 99, 168].

⁵Il s'agit d'une interaction entre le moment cinétique orbital et la résultante de spin conduisant à la levée partielle de dégénérescence des états. [81]

Ces propriétés particulières ont fait, depuis plus de 40 ans, de l'oxygène singulet un objet d'étude sur le plan théorique (modélisation de l'influence du solvant) comme sur le plan expérimental (obtention de données permettant de confirmer ou d'infirmer la théorie) [92].

Malgré l'effet du solvant sur les transitions radiatives qui nous intéressent, les probabilités de transition restent faibles. A titre d'exemple, la section efficace d'absorption du dioxygène associée à la transition $a \rightarrow X$ à 1270 nm vaut, dans l'eau à température et pression standard, $\sigma_{1270} \sim 10^{-23} \text{ cm}^2$ [109]. Cette valeur est à comparer avec la section efficace ($\sigma_{PS} \sim 10^{-18} \text{ cm}^2$) d'un photo-agent dans les mêmes conditions.

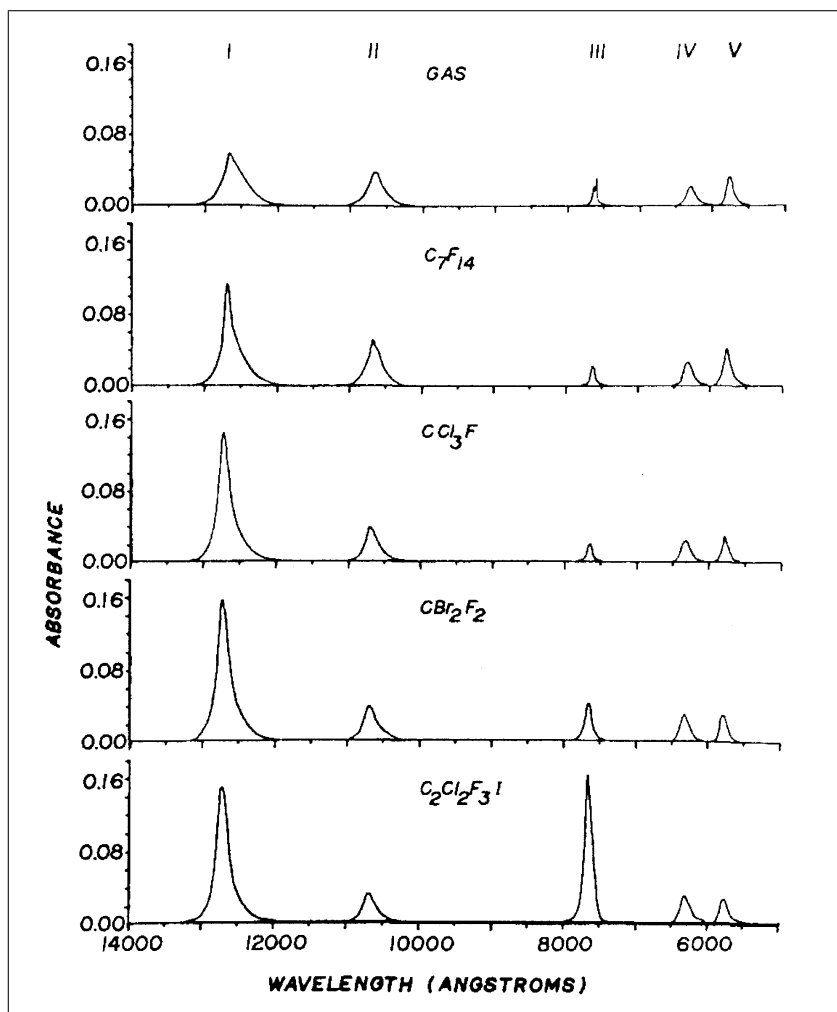


FIG. 5.2 – Spectre d'absorption du dioxygène dans différents solvants en phase gazeuse à haute pression. Les intensités ont été normalisées à la concentration de dioxygène. La bande *I* est associée à la transition $X \rightarrow a$ à 1270 nm, la bande *III* est associée à la transition $X \rightarrow b$ à 765 nm. La figure est extraite de [100] avec l'aimable permission de « American Institute of Physics », copyright 1973.

Insistons sur le fait que, comme l'illustre la figure 5.2, les probabilités de transition sont très dépendantes du solvant considéré. Le rapport entre les bandes $X \rightarrow a$ et $X \rightarrow b$ peut varier d'un facteur 10 entre deux solvants différents [100]. De même, pour une même transition, on peut observer une dispersion sur plusieurs ordres de grandeurs des valeurs de la section efficace ou du taux d'émission spontanée [81].

5.1.2 Désactivation non-radiative de l'oxygène singulet

La faible probabilité de désactivation du dioxygène dans l'état singulet $a \ ^1\Delta_g$ par émission d'un photon (transition $a \rightarrow X$) laisse place en phase dense à des processus non-radiatifs de désactivation [81].

En effet, le taux d'émission spontanée de l'oxygène singulet dans l'eau de $k_r \approx 0,11 \text{ s}^{-1}$ [173] conduit à un temps de vie radiatif⁶ de $\tau_r \approx 9 \text{ s}$, alors que le temps de vie de cet état est en réalité, même en l'absence de réactif, de $3,5 \mu\text{s}$ [92,105]. Ceci suggère l'implication de mécanismes physiques de désactivation non-radiative dus aux collisions avec le solvant.

L'ajout d'espèce(s) chimique(s) susceptible(s) de réagir avec l'oxygène singulet contribue à diminuer encore le temps de vie de cette espèce [166].

Mécanismes physiques de désactivation : dépendance avec le partenaire d'interaction

En phase dense, l'oxygène singulet peut se désactiver par collision avec le solvant ou une autre molécule : on parle alors de désactivation (« quenching ») physique. Nous ne présenterons pas ici les mécanismes en détail, mais le lecteur intéressé par la question pourra se reporter à la très complète revue de Claude Schweitzer et Reihnard Schmidt [81].

On distingue, dans l'ordre décroissant d'efficacité, trois principaux processus [81,166] :

- par transfert d'énergie par interaction électronique-vibrationnelle⁷ ;
- par transfert de charge⁸ ;
- par transfert d'énergie par interaction électronique-électronique⁹.

Dans le premier processus (interaction électronique-vibrationnelle), l'énergie électronique de l'oxygène singulet est convertie en énergie de vibration, transférée aux liaisons terminales d'autres molécules [81]. Bien que le moins efficace, il est cependant important car, dans la plupart des solvants inertes en phase liquide, c'est ce mécanisme qui limite le temps de vie de l'oxygène singulet [81,166].

Pour ce processus, plus l'énergie associée aux modes de vibration du solvant est grande, plus la constante bimoléculaire de désactivation associée à ce processus, k_{e-v} , est élevée [176] et plus le temps de vie de cet état en solution τ_Δ est court. C'est ce qui explique, en particulier, l'influence de l'isotope D de l'hydrogène H sur le temps de vie de l'oxygène singulet dans l'eau (H_2O) ou l'eau lourde (D_2O). En effet, le temps de vie de l'oxygène singulet est ~ 20 fois plus grand dans l'eau lourde D_2O que dans l'eau H_2O [92], car le deutérium, plus lourd, implique une fréquence de vibration plus petite.

Insistons sur le fait que, de manière générale quel que soit le processus de désactivation, le temps de vie de l'oxygène singulet en phase dense est très dépendant du partenaire d'interaction. Le temps de vie de l'oxygène singulet varie sur au moins 5 ordres de grandeur en solution : de $\tau_\Delta \approx 3,5 \mu\text{s}$ [81,92,109] dans l'eau à $\tau_\Delta \approx 100 \text{ ms}$ dans le Freon [176].

Généralités sur la réactivité de l'oxygène singulet : un oxydant puissant mais sélectif

Les réactions les plus fréquemment utilisées en synthèse et impliquant l'oxygène singulet, $a \text{ } ^1\Delta_g$, sont certainement les éne-additions sur une chaîne carbonée qui conduisent à la formation d'hydro-péroxydes ou endopéroxydes [177], comme l'illustre la figure 5.3.

En milieu vivant, il est probable que ce genre de réactions (figure 5.3) soient les plus fréquentes. Dans tous les cas, l'oxygène singulet est connu pour réagir avec les lipides, les acides-aminés, les protéines et les peptides [178] et l'ADN en solution [179].

De manière générale, l'oxygène singulet réagit avec des chaînes carbonées insaturées, c'est-à-dire présentant des liaisons doubles. Plusieurs auteurs s'accordent pour le considérer comme un oxydant puissant, mais aussi régio-sélectif et stéréo-spécifique [177]. C'est-à-dire que la réaction aura lieu

⁶C'est-à-dire le temps de vie qu'aurait l'état excité $a \text{ } ^1\Delta_g$ s'il n'y avait pas d'autre processus de désactivation.

⁷Dans ce mécanisme, l'énergie de l'état électronique excité du dioxygène transfère son énergie aux vibrations des molécules.

⁸Dans ce mécanisme, il se forme un complexe de collision, stabilisé par un transfert de charge, qui, lors de sa séparation conduit au changement d'état des deux molécules.

⁹Dans ce mécanisme, les nuages électroniques des deux molécules interagissent pour conduire au transfert d'énergie. Ce mécanisme, initialement proposé par Förster [174], est à la base de techniques de microscopie comme le transfert de fluorescence (FRET) [175].

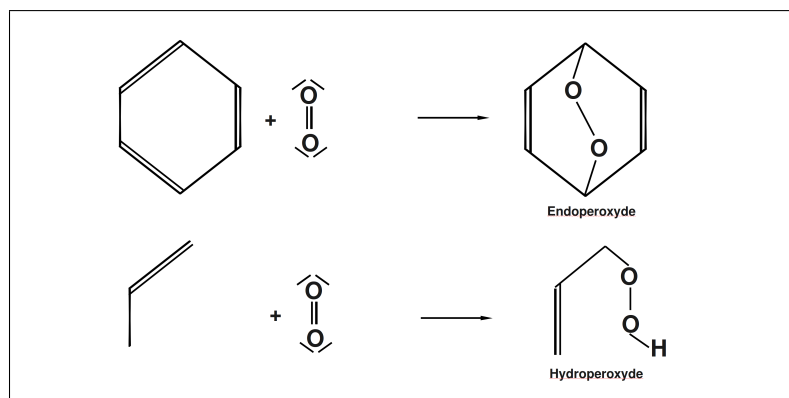


FIG. 5.3 – Exemples de réaction de l’oxygène singulet avec une chaîne carbonée insaturée menant à la formation d’endo, ou d’hydropéroxydes.

pour des orientations relatives des orbitales moléculaires particulières et sur des régions spécifiques de la molécule cible.

Cette constatation est corroborée par les travaux d’Ogilby et ses collaborateurs à l’échelle de la cellule unique [92, 93, 180]. Il ont en effet montré que le temps de vie de l’oxygène singulet dans le cytoplasme tend vers sa valeur dans l’eau pure [92, 93, 180]. De plus, ils montrent que, dans leurs expériences, environ 30% de l’oxygène singulet créé dans le cytoplasme peut diffuser hors de la cellule [92, 93]. Ceci suggère que, dans le cytoplasme, l’oxygène singulet semble plus sélectif que réactif, *i.e.*, l’oxygène singulet ne réagit pas avec tous les composants cellulaires mais avec certaines cibles privilégiées [92, 180].

D’un point de vue cinétique, cette sélectivité se traduit par une vitesse de réaction très dépendante de la cible [152]. La vitesse de réaction s’écrit :

$$V = k_{ox} \cdot [R] \cdot [^1O_2] \quad (5.1)$$

où V est la vitesse de réaction ($mol.L^{-1}.s^{-1}$), $[R]$ la concentration ($mol.L^{-1}$) de réactif (espèce cible), $[^1O_2]$ la concentration en dioxygène et k_{ox} la constante bimoléculaire de la réaction ($mol^{-1}.L.s^{-1}$).

La valeur de k_{ox} s’étale, en solution, sur une gamme allant de 10^4 à $10^9 mol^{-1}.L.s^{-1}$ pour les molécules d’intérêt biologique [152]. La valeur $\sim 10^9 - 10^{10}$ étant une limite dite de diffusion [92], c’est-à-dire que la réaction se fait si rapidement que la vitesse de réaction n’est limitée que par les vitesses de diffusion de l’oxygène singulet et de la molécule cible.

5.2 Détection de l’oxygène singulet en phase dense

Maintenant que les interactions de l’oxygène singulet en phase dense sont décrites, nous allons nous intéresser aux moyens envisageables pour détecter cet état en phase dense et obtenir une mesure de sa réactivité. Nous nous restreindrons aux méthodes optiques pour, à terme, les envisager en microscopie.

Avant de préciser les moyens de détection, nous préciserons quels sont les paramètres pertinents pour la compréhension et l’étude des interactions de l’oxygène singulet au niveau moléculaire. Cette discussion nous conduira à dégager deux principales méthodes de détection.

La première, directe, consiste en la détection résolue en temps de la phosphorescence à $1270 nm$ de l’oxygène singulet par comptage de photons.

Cette dernière technique est cependant peu sensible et conduit à des rapports signal sur bruit en général faibles. Nous envisagerons donc une seconde méthode, quant à elle indirecte, qui consiste en l’utilisation d’une molécule présentant une forte interaction avec l’oxygène singulet.

5.2.1 Grandeurs physiques pertinentes pour l'étude de l'oxygène singulet en milieu vivant

Taux de production et section efficace d'absorption

Le taux de production d'oxygène singulet par excitation directe *via* la transition $a \rightarrow X$ à 1270 nm est lié à la section efficace d'absorption, σ_{1270} (cm^2). Celle-ci est très dépendante du solvant et donc de l'environnement moléculaire proche du dioxygène (cf. 5.1.1). Il est donc possible que le taux de production dans, par exemple, le noyau et le cytoplasme soient très différents. Une estimation de σ_{1270} dans différents compartiments cellulaires permettrait de hiérarchiser les compartiments touchés dans la mort cellulaire induite par excitation directe de l'oxygène singulet à 1270 nm (cf. partie I). L'estimation de cette grandeur présente donc un intérêt pour l'élucidation des mécanismes conduisant à la mort cellulaire dans les expériences d'irradiation présentées dans la partie I.

Constante bimoléculaire de réaction

La constante bimoléculaire de réaction, k_{ox} ($mol^{-1}.L.s^{-1}$), permet d'évaluer la vitesse de réaction de l'oxygène singulet avec un réactif (cf. 5.1). En solution homogène, elle représente la fraction d'oxygène singulet réagissant en une seconde avec une mole d'un réactif donné. En milieu vivant elle permet donc l'estimation de la quantité de dommages causés à une espèce donnée.

De plus, la cinétique des premières réactions qui se déroulent près du lieu de production de l'oxygène singulet joue un rôle prépondérant dans la détermination de la réponse cellulaire au stress oxydant induit par l'oxygène singulet [78]. La mesure *in situ* de k_{ox} doit conduire à une meilleure compréhension des mécanismes et voies de signalisation engendrés par l'oxygène singulet.

Ajoutons que la valeur de k_{ox} est dépendante de la viscosité du milieu (solvant ou compartiment cellulaire) : plus le milieu est visqueux, plus la diffusion est limitée, et plus k_{ox} est faible [118]. Des travaux ont pu mettre en évidence que la viscosité « apparente » du cytoplasme augmente pendant les processus qui conduisent à la mort cellulaire induite par PDT [94]. Cette variation modifie quantitativement et qualitativement le comportement des biomolécules au cours de la mort cellulaire [92,94]. Une mesure résolue spatialement et temporellement de k_{ox} donnerait accès à une mesure de ces changements de viscosité.

Temps de vie

Comme on l'a déjà évoqué, il existe en phase dense de nombreux mécanismes conduisant à la désactivation de l'oxygène singulet. Ceux-ci sont additifs et sont liés au temps de vie de cet état par la relation [81,92,152,166] :

$$\frac{1}{\tau_{\Delta}} = k_s + k_{nr} \cdot [Q] + k_{ox} \cdot [R] \quad (5.2)$$

où k_s est la constante de désactivation (s^{-1}) de l'oxygène singulet dans le solvant considéré (qui tient compte des processus radiatifs et non radiatifs : $k_s = k_r + k_{e-v}$), k_{ox} et k_{nr} sont respectivement des constantes bimoléculaires ($mol^{-1}.L.s^{-1}$), de réaction et de désactivation physique de l'oxygène singulet et, $[R]$ et $[Q]$ sont les concentrations ($mol.L^{-1}$) d'un réactif et d'un « quencher » physique respectivement. Cette relation traduit le nombre et l'efficacité des interactions de l'oxygène singulet dans un milieu donné.

Le temps de vie comme sonde de l'environnement : La constante k_s est très dépendante du solvant et donc de l'environnement proche du dioxygène singulet (cf. section 5.1.2 et 5.1.1). L'estimation du temps de vie de l'oxygène singulet dans différents compartiments cellulaires est donc une mesure de l'inhomogénéité de la cellule.

Le temps de vie comme évaluation de la réactivité : En milieu vivant, il existe nombre de « quenchers » physiques ou chimiques de l'oxygène singulet [92, 166] et la relation 5.2 se ré-écrit :

$$\frac{1}{\tau_{\Delta}} = k_s + k_{nr}^{(1)} \cdot [Q_1] + k_{ox}^{(1)} \cdot [R_1] + \dots + k_{nr}^{(n)} \cdot [Q_n] + k_{ox}^{(n)} \cdot [R_n]$$

où $[Q_i]$ et $[R_i]$ sont les différents « quenchers » physiques ou chimiques de l'oxygène singulet et, $k_{nr}^{(i)}$ et $k_{ox}^{(i)}$ les constantes bimoléculaires associées à l'interaction avec l'espèce R_i ou Q_i .

Le temps de vie de l'oxygène singulet permet donc, au moins qualitativement, d'évaluer la réactivité de l'oxygène singulet dans un milieu donné.

L'eau comme cas limite : La cellule est composée majoritairement d'eau ($\sim 70\%$ en masse [1]). Le reste de la masse est essentiellement due aux protéines ($\sim 18\%$ [1]), aux lipides et sucres ($\sim 7\%$ [1]). Si l'on considère arbitrairement que toutes les protéines ont la masse de HSP70, une protéine chaperon de $70 \text{ KDa} \approx 1,16 \cdot 10^{-19} \text{ g}$ [181], on montre qu'il y a environ 10^4 molécules d'eau pour 1 protéine¹⁰.

Il semble donc raisonnable de considérer l'eau comme un solvant dans la cellule. Le temps de vie de l'oxygène singulet tendra, à la limite pour laquelle il n'y a pas ou peu d'interaction, vers son comportement dans l'eau [92].

5.2.2 Détection de la phosphorescence à 1270 nm

Nous venons de voir que le temps de vie de l'oxygène singulet, τ_{Δ} dépend du solvant dans lequel il est créé mais aussi des espèces avec lesquelles il réagit (relation 5.2). Sa mesure permet dans un milieu dense et complexe d'obtenir une information, au moins qualitative, sur sa réactivité : plus τ_{Δ} est court plus l'oxygène singulet réagit.

La mesure optique du temps de vie de l'oxygène singulet en phase dense est effectuée en détectant la faible phosphorescence de cet état, *i.e.* la désexcitation de l'oxygène singulet par émission d'un photon à 1270 nm *via* la transition $a \rightarrow X$.

Dans ce cas, le dioxygène est excité dans l'état $a^1\Delta_g$ à l'aide d'un photo-agent et une fois dans cet état, il a une probabilité faible d'émettre spontanément un photon à 1270 nm .

Principe

Comme l'illustre la figure 5.4, l'absorption d'un photon en général dans le visible (par exemple 630 nm) par l'agent photosensibilisant (PS), initialement dans son état fondamental (S_0) conduit au passage de celui-ci dans un état excité. Par reconversion interne et croisement inter-système, des processus non-radiatifs, une partie des molécules PS se retrouve dans l'état excité triplet T_1 qui peut alors transférer son énergie au dioxygène environnant et retourner dans l'état fondamental S_0 . Le dioxygène passe alors dans l'état excité singulet ($O_2[a^1\Delta_g]$).

Le PS dans l'état triplet (T_1) peut aussi se désexciter par collision avec d'autres molécules environnantes ou le solvant. Ainsi, tous les processus de désexcitation de l'état T_1 , lui confèrent, bien cet état soit métastable, un temps de vie τ_T court¹¹ en phase dense.

L'oxygène singulet ainsi créé peut, comme on l'illustre la figure 5.4, se désactiver de plusieurs manières. Les processus les plus probables sont non-radiatifs et l'énergie est transférée au solvant par collision ou à une autre molécule par réaction chimique. Cependant, il y a une probabilité (faible) que l'oxygène singulet se désexcite de façon radiative par émission d'un photon à 1270 nm *via* la transition $a \rightarrow X$.

¹⁰Cette représentation est bien sûr fautive car la cellule n'est pas homogène et présente des structures formées par des macromolécules, mais l'objet est ici d'avoir un ordre de grandeur limite.

¹¹En solution, τ_T est inférieur à la microseconde [82].

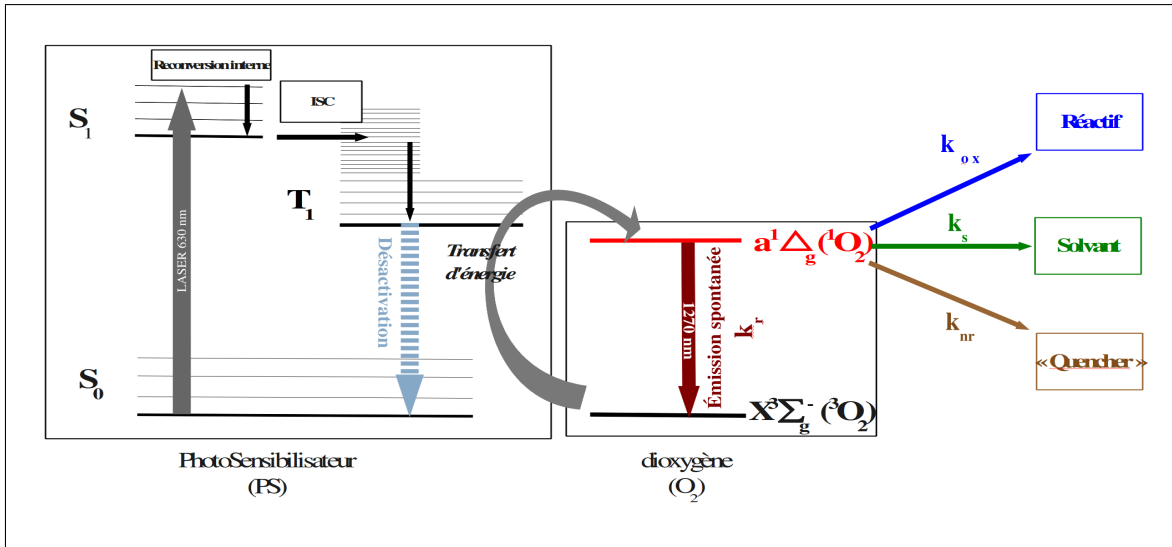


FIG. 5.4 – Diagramme représentant la production d'oxygène singulet avec un agent photosensibilisant.

En phase dense, bien que la probabilité de transition soit augmentée par certains solvants, les processus de désactivation sont plus nombreux et la part de désexcitation radiative est inhibée par les autres voies de désactivation.

A titre d'exemple, remarquons que le ratio des taux de désactivation vaut $\frac{k_r}{k_s} \sim 10^{-6}$ [92] dans l'eau et que cette valeur est encore plus petite en présence de « quenchers » physiques ou chimiques. Ainsi, si l'on espère exciter instantanément $\sim 10^8$ molécules de dioxygène dans l'état singulet, en un temps de vie, ~ 100 photons seront réémis dans toutes les directions de l'espace.

Ce faible signal conduit à l'utilisation d'une technique de comptage de photons à l'aide d'un photomultiplicateur. Il s'agit d'un détecteur possédant un faible bruit et un gain suffisamment grand pour permettre la détection de quelques voire un seul photon.

Temps de vie de l'oxygène singulet en milieu vivant

Pour la mesure du temps de vie de l'oxygène singulet, la détection de la phosphorescence à 1270 nm de cet état se fait de manière résolue en temps. On utilise alors une impulsion laser pour exciter le PS et conduire à la formation d'oxygène singulet. Si l'impulsion est suffisamment courte on peut sonder la réponse impulsionnelle du système $PS - O_2$ et l'intensité de la phosphorescence dépend de τ_Δ et de τ_T .

Cette technique a été rendue possible dans des milieux denses et complexes comme le vivant, grâce à l'apparition de détecteurs à semi-conducteurs très sensibles dans l'infra-rouge proche.

Ainsi, plusieurs auteurs ont pu rapporter les valeurs du temps de vie de l'oxygène singulet τ_Δ dans des solutions à pression et température standard [105]. Dans des solutions contenant des molécules susceptibles de réagir avec l'oxygène singulet, ces mesures ont permis la détermination des constantes k_{ox} de réactions [152].

Plus récemment, des expériences en milieu vivant ont pu être réalisées dans des solutions contenant des cellules [82,182] ou *in vivo* [83,84]. Les valeurs de τ_Δ reportées dans ces expériences varient sur une large gamme allant de $\sim 0,01 \mu s$ à $3,5 \mu s$, sa valeur dans l'eau pure [82,92,182]

Une telle mesure, pour la première fois résolue spatialement à l'échelle de la cellule, a récemment permis de mettre en évidence un comportement de l'oxygène singulet dans le cytoplasme jusqu'alors non considéré en milieu vivant [92,93]. Il semble, en effet, que l'oxygène singulet ne soit pas dans la cellule une espèce aussi réactive qu'attendue [92,93].

Le chapitre 6 est consacré à l'étude d'une possibilité alternative de détection de la phosphorescence résolue en temps de l'oxygène singulet. Nous envisagerons, en effet, la possibilité d'exciter

directement l'oxygène singulet *via* une des transitions radiatives de la figure 5.1 pour créer l'oxygène singulet et de détecter sa phosphorescence à 1270 nm.

5.2.3 Détection indirecte de l'oxygène singulet

Une autre méthode de détection, indirecte, consiste en l'utilisation d'une molécule sonde susceptible d'interagir avec l'oxygène singulet. De manière générale, si les caractéristiques spectrales de la sonde sont modifiées par réaction avec l'oxygène singulet, celle-ci permet d'observer optiquement la création de l'oxygène singulet.

Le « Singlet Oxygen Sensor Green »

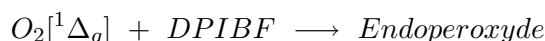
A titre d'exemple, citons une possibilité basée sur un changement des caractéristiques spectrales du produit de la réaction d'une sonde avec l'oxygène singulet. On peut envisager de construire une molécule qui fluoresce en présence d'oxygène singulet. De ce type de sonde, la plus connue est certainement le marqueur commercial « Singlet Oxygen Sensor Green » (SOSG) [106]. Il fonctionne à l'aide de deux molécules.

La première est fluorescente en l'absence de la seconde. Elle émet de la lumière grâce à un chromophore et est donc observable par microscopie de fluorescence standard. La seconde, lorsqu'elle est dans son état initial, désactive rapidement le chromophore. Elle inhibe donc la fluorescence de la première molécule qui ne fluoresce pas dans des conditions normales.

Lorsque la seconde molécule réagit avec l'oxygène singulet, le mécanisme de désactivation n'est plus possible et on observe donc la fluorescence en présence d'oxygène singulet [92]. Précisons que cette molécule peut créer son propre oxygène singulet à la manière d'un photo-agent, [107] suggérant ainsi des précautions nécessaires et quelques limitations.

Réaction avec le 1,3-diphénylisobenzofuran (DPIBF)

Depuis longtemps, le 1,3-diphényl-iso-benzofuran (DPIBF) est connu pour réagir avec l'oxygène singulet [183]. Cette réaction conduit à la formation d'endopéroxydes.



La constante bimoléculaire de réaction, k_{ox} ($mol^{-1}.L.s^{-1}$), entre l'oxygène singulet et ce piège varie entre 10^7 et 10^{10} selon le solvant. Cette constante représente la fraction de DPIBF réagissant avec une mole par unité de volume de 1O_2 pendant une seconde. Il s'agit là d'une valeur particulièrement élevée [152], rendant le piège utilisable pour doser l'oxygène singulet créé en faible quantité.

DPIBF est parfois utilisé en cellule pour sa forte affinité avec l'oxygène singulet. Il est alors tantôt utilisé comme désactivateur de l'oxygène singulet pour inhiber ses effets cytotoxiques [184, 185] et tantôt comme sonde pour mettre en évidence l'implication de l'oxygène singulet dans un processus biochimique [79, 186].

Le piège, DPIBF, présente une bande d'absorption autour de 410 nm. La concentration de piège $[T]$ est reliée à l'énergie lumineuse transmise par la loi de Beer-Lambert (5.3) :

$$A = \log_{10}\left(\frac{1}{t}\right) = \epsilon_{\lambda} \cdot [T] \cdot L \quad (5.3)$$

où A est l'absorbance, ϵ_{λ} ($mol^{-1}.L.m^{-1}$) le coefficient d'absorption molaire¹² à la longueur d'onde λ de la substance absorbante, $[T]$ ($mol.L^{-1}$) la concentration de l'espèce absorbante et t (%) est la fraction de lumière transmise après une propagation dans une longueur L (m) de milieu.

Contrairement à DPIBF, l'endopéroxyde résultant de la réaction 7.1 est incolore. On peut donc, en mesurant la variation d'absorbance à 410 nm d'une solution, en déduire la quantité de DPIBF

¹²Le coefficient d'absorption molaire est proportionnel à la section efficace d'absorption.

ayant réagi avec l'oxygène singulet. En divisant par le temps d'irradiation, on en déduit le taux de photo-oxygénation lié au taux de production d'oxygène singulet.

En 2003, Krasnovsky *et al.*, ont appliqué cette méthode à l'oxygène singulet photo-activé par excitation directe à 1270 nm [103, 108] dans des solutions saturées en air¹³. Ils ont montré qu'il est possible de déterminer la section efficace d'absorption du dioxygène à 1270 nm en mesurant, avant et après irradiation, l'absorbance d'une solution contenant du dioxygène dissous et DPIBF.

Leurs travaux donnent, **pour la première fois** dans des conditions standard de température et de pression, une estimation de la section efficace (σ_{1270}) ainsi que le spectre d'absorption associé à la transition $X \rightarrow a$ à 1270 nm du dioxygène dans différents solvants organiques [103, 108, 187, 188].

Cette méthode de détection, simple et efficace, permet l'étude en solution des transitions radiatives impliquant l'oxygène singulet. De plus, elle permet de mimer l'effet de l'oxygène singulet dans un milieu complexe s'approchant du vivant, DPIBF jouant le rôle d'une biomolécule avec laquelle réagirait l'oxygène singulet. Le chapitre 7 est consacré à une étude de la cinétique de réaction entre l'oxygène singulet et DPIBF qui est complémentaire des travaux de Krasnovsky *et al.*

¹³Le terme solution saturée en air signifie que la solution est en équilibre avec l'air (gaz pour lequel la pression partielle est de 20% de la pression totale)

Chapitre 6

Détection résolue en temps de la phosphorescence de l'oxygène singulet : expériences de comptage de photons

Le temps de vie de l'oxygène singulet donne accès à une information sur l'environnement proche de la molécule et sur sa réactivité. Dans des solutions macroscopiques à température ambiante, la mesure de ce temps de vie est basée sur la détection de la phosphorescence à 1270 nm, d'intensité extrêmement faible, associée à la transition $a^1\Delta_g \rightarrow X^3\Sigma_g^-$ du dioxygène. Dans ce cas l'oxygène singulet est créé à l'aide d'un photo-agent et la phosphorescence de cet état à 1270 nm est détectée par comptage de photons (cf. paragraphe 5.2.2).

Comme on l'a déjà évoqué (cf. paragraphe 5.2.2), cette technique a permis la détection de l'oxygène singulet dans un milieu vivant. Elle a, par exemple, été utilisée pour la dosimétrie de la PDT *in vitro* [82] comme *in vivo* [83,84], ainsi que pour l'étude de la réactivité de l'oxygène singulet dans la cellule [93,182].

En pratique, même en solution macroscopique homogène, l'interprétation du signal de phosphorescence pour mesurer le temps de vie de l'oxygène singulet nécessite des précautions particulières [105].

L'évolution temporelle de l'intensité de phosphorescence (proportionnelle à la concentration instantanée de l'oxygène singulet) dépend de deux échelles de temps : τ_T et liée aux interactions du *PS* et τ_Δ liée aux interactions de l'oxygène singulet [105]. La mesure du temps de vie de l'oxygène singulet nécessite donc l'analyse d'une cinétique multi-exponentielle.

De manière générale, le temps le plus court est le temps de montée du signal et le plus long est le temps de décroissance [105]. L'ajout d'un « quencher » physique ou chimique conduit à la diminution du temps de vie de l'oxygène singulet τ_Δ : on peut alors observer une « inversion » de la cinétique si le temps de vie de l'oxygène singulet devient plus court que celui du photo-agent [105].

L'analyse du signal et l'attribution de chaque échelle de temps (τ_T et τ_Δ) à l'espèce chimique à laquelle elle est associée, est donc relativement délicate car τ_T et τ_Δ ne sont *a priori* pas connus et peuvent être du même ordre de grandeur [92,105].

Pour s'affranchir de la détermination de τ_T , nous avons envisagé de produire l'oxygène singulet par excitation directe et de détecter sa phosphorescence à 1270 nm. Cette possibilité permettrait d'obtenir un signal ne dépendant que des paramètres intrinsèques de l'oxygène singulet et ne nécessiterait donc pas de connaître *a priori* les caractéristiques du photo-agent.

Cette possibilité constituerait ainsi une méthode non-invasive de détection de l'oxygène singulet, dont la production ne serait pas conditionnée par un *PS*, l'objet étant à terme d'utiliser cette méthode pour la détection de l'oxygène singulet dans un milieu vivant comme la cellule.

Ajoutons que dans l'équipe, historiquement, cette approche était aussi destinée à compléter les travaux présentés dans la première partie du manuscrit. En effet, nous voulions obtenir par cette méthode une signature de la création d'oxygène singulet ainsi qu'une évaluation de la quantité d'oxygène singulet créé par excitation directe.

Nous commencerons donc par préciser les moyens envisageables pour produire l'oxygène singulet sans photo-agent et procéder à la détection de la phosphorescence à 1270 nm de cet état.

J'ai pu, lors de ce travail de thèse, mettre en place un dispositif permettant la détection en solution macroscopique de la phosphorescence à 1270 nm de l'oxygène singulet. Ce dispositif, qui n'existait pas au laboratoire au début de ce projet, sera donc présenté.

Malheureusement, nous n'avons pu obtenir un signal de phosphorescence suffisamment intense pour être détecté sans utilisation d'un photo-agent. La calibration du dispositif expérimental sur un signal d'oxygène singulet produit à l'aide d'un photo-agent et ses limites de détection seront donc dans un second temps discutées. Enfin, nous exposerons les conclusions et perspectives de cette partie du travail de thèse.

6.1 Objectifs : mesure du temps de vie de l'oxygène singulet produit par excitation directe

Dans cette section nous allons présenter les possibilités pour produire l'oxygène singulet sans photo-agent *via* une transition radiative naturelle du dioxygène et détecter de la phosphorescence à 1270 nm de cet état excité.

Trois principaux schémas sont envisageables pour l'excitation et la détection directe de l'oxygène singulet. Ils sont résumés à la figure 6.1. Dans tous les cas, le but est d'exciter le dioxygène dans l'état $a^1\Delta_g$ pour détecter ensuite la phosphorescence à 1270 nm.

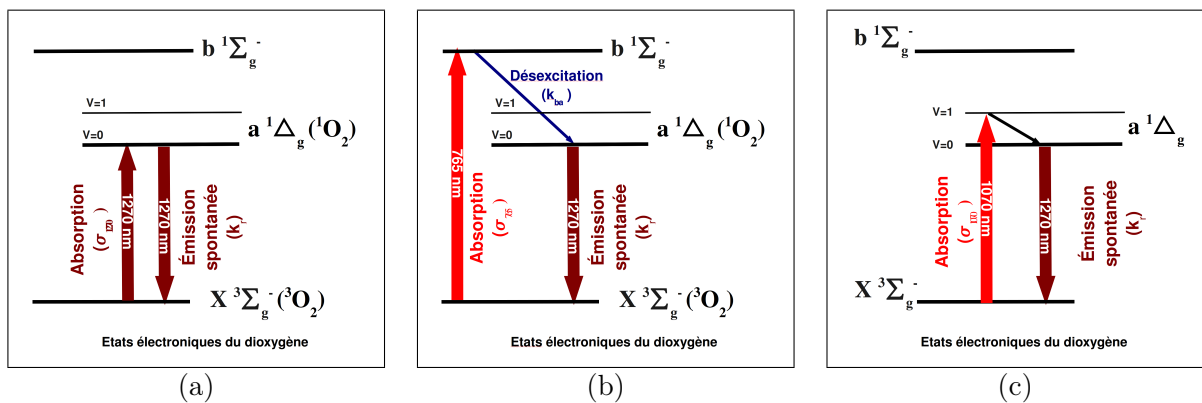


FIG. 6.1 – Les trois principaux schémas d'excitation et de détection directe de l'oxygène singulet envisageables.

Excitation directe à 1270 nm Le premier schéma consiste en l'excitation et la détection directe à 1270 nm (figure 6.1 (a)). Bien que ce schéma soit le plus efficace, cette possibilité est rendue délicate par le fait que la longueur d'onde d'excitation est la même que la longueur d'onde d'émission. Il n'est donc pas possible de simplement utiliser des filtres interférentiels pour séparer les longueurs d'ondes. Nous avons donc, dans un premier temps, écarté cette alternative.

Excitation du second état électronique excité à 765 nm Le second schéma (figure 6.1 (b)), bien que moins efficace, permet une séparation aisée des longueurs d'ondes de pompe et d'émission.

Il consiste en l'excitation directe du second état électronique excité du dioxygène par absorption d'un photon à 765 nm. Cet état se désexcite rapidement ($\sim 10^{-12}$ s) par « quenching » physique vers l'état singulet $a^1\Delta_g$ dans la plupart des solvants [81]. Presque toutes les molécules de cet état se désexcitent vers l'oxygène singulet [81] : l'efficacité quantique de production d'oxygène singulet¹ est de l'ordre de ~ 1 .

¹C'est à dire le ratio entre le nombre de photons absorbés et le nombre de molécules excitées dans l'état singulet.

Ainsi produites, les molécules dans l'état $a^1\Delta_g$ peuvent se désexciter par, entre autre, émission d'un photon à 1270 nm. La séparation de la longueur d'onde de pompe à 765 nm et de la phosphorescence à 1270 nm de l'oxygène singulet peut alors être aisément réalisée à l'aide de filtres interférentiels.

Insistons sur le fait que la section efficace d'absorption du dioxygène à 765 nm correspondant à la transition $X^3\Sigma_g^+ \rightarrow b^1\Sigma_g^-$ n'est, à notre connaissance, publiée que pour très peu de solvants. A titre d'exemple, dans CCL_4 , le taux de production d'oxygène singulet à 765 nm est, ramené à la même intensité lumineuse, seulement 3,5 fois inférieur au taux de production à 1270 nm associé à la transition $X^3\Sigma_g^+ \rightarrow a^1\Delta_g$ [103].

Excitation du premier état vibrationnel excité de l'oxygène singulet à 1070 nm Enfin, le dernier schéma (figure 6.1 (c)) est le moins efficace. Il consiste en l'excitation à 1070 nm du premier état vibrationnel excité ($v = 1$) de l'état $a^1\Delta_g$ du dioxygène [100]. Une fois dans cet état vibrationnel excité, le dioxygène se désexcite rapidement de manière non-radiative dans l'état $a^1\Delta_g$ ($v = 0$) [108]. On peut alors envisager de détecter la désexcitation de l'état $a^1\Delta_g$ ($v = 0$) par émission d'un photon à 1270 nm.

Pour la transition $X^3\Sigma_g^+ \rightarrow a^1\Delta_g$ ($v = 1$) à 1070 nm, comme pour la transition $X^3\Sigma_g^+ \rightarrow b^1\Sigma_g^-$ à 765 nm, la section efficace n'est publiée que pour très peu de solvants. Dans CCL_4 le taux de production d'oxygène singulet à 1070 nm est environ 100 fois inférieur au taux de production associé à la transition $X^3\Sigma_g^+ \rightarrow a^1\Delta_g$ ($v = 0$) à 1270 nm [108].

Signalons que ce schéma a permis la détection résolue en temps de la phosphorescence de l'oxygène singulet en phase dense à très basse température (77 K) pour des concentrations de dioxygène allant de 21% à 100% [189]. De plus, ce dernier schéma d'excitation a permis la détection résolue spectralement mais pas temporellement du dioxygène piégé dans une matrice solide de silice [190]. Dans les deux cas, un laser Nd-YAG délivrant des impulsions d'environ 100 mJ d'une durée de l'ordre de 1 ns à 1064 nm a été utilisé.

6.2 Dispositif expérimental

Le dispositif que j'ai mis en place est destiné à la détection de la phosphorescence à 1270 nm de l'oxygène singulet dans des solutions macroscopiques. Il permet l'utilisation de plusieurs longueurs d'ondes pour l'excitation de l'oxygène singulet.

Il est donc possible grâce à ce dispositif, d'une part, d'effectuer la calibration du dispositif (c'est à dire, la mesure du temps de vie de l'oxygène singulet et l'évaluation du nombre de molécules de dioxygène dans l'état singulet détectées) en utilisant une solution contenant un photo-agent. D'autre part, une fois la calibration effectuée, nous pourrions essayer les différents schémas d'excitation envisagés dans des solutions ne contenant pas de PS.

Pour cette étude de faisabilité (excitation et détection directe), nous avons choisi de travailler dans des solutions de méthanol. Ce choix est motivé par le fait que les conditions sont plus favorables dans le méthanol que dans l'eau, tout en restant comparables. En effet, dans le méthanol, le temps de vie de l'oxygène singulet est $\sim 10 \mu s$, à comparer aux 3,5 μs de l'eau [152]. De plus le taux d'émission spontanée de l'oxygène singulet à 1270 nm est environ 3 fois plus grand dans le méthanol que dans l'eau [173].

Nous commencerons par présenter le dispositif expérimental dans son ensemble. Le dispositif optique et la méthode d'acquisition seront exposés. Puis, nous présenterons un dispositif permettant d'augmenter le rapport signal sur bruit des expériences en comptage de photons. Nous exposerons pourquoi celui-ci n'a pas été retenu. Ceci nous conduira à dégager un aspect limitant de la méthode de détection par comptage de photon : la densité de puissance permettant l'excitation de l'oxygène singulet est bornée par le seuil de dommage du détecteur.

6.2.1 Dispositif expérimental

Comme nous l'avons déjà évoqué, la probabilité d'émission spontanée d'un photon par l'oxygène singulet est extrêmement faible ($\frac{k_r}{k_s} \sim 10^{-6}$ [92] dans l'eau). Il est donc nécessaire d'utiliser un détecteur très sensible pour réaliser une technique dite de comptage photon. Le photomultiplicateur (PM) est souvent utilisé à cet effet.

Principe du photomultiplicateur

Comme l'illustre la figure 6.2 (a), un photomultiplicateur (PM) est composé d'un matériau photoélectrique (la photocathode), d'un étage d'amplification composé de dynodes, et il est terminé par une anode. L'arrivée d'un photon sur la photocathode peut induire l'émission d'un électron. Cet électron est placé dans un champ électrique intense, il est donc accéléré et guidé vers la première dynode. Par émission secondaire, son arrivée sur la première dynode induit l'émission de deux électrons qui sont accélérés jusqu'à la deuxième dynode. Au bout de n dynodes le signal ainsi amplifié est collecté par l'anode de sortie à laquelle on associe une résistance de charge pour convertir le courant en tension.

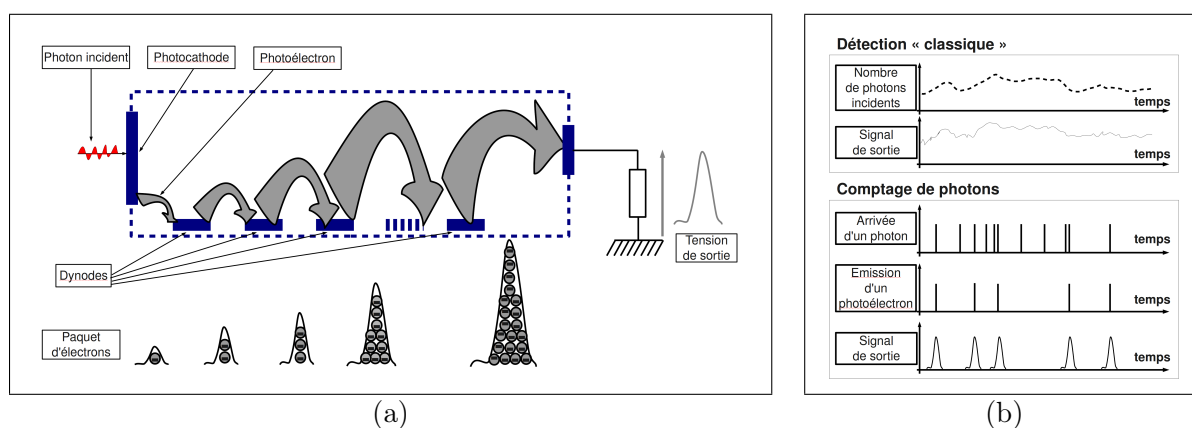


FIG. 6.2 – (a) Représentation schématique d'un PM, (b) représentation schématique du signal de sortie d'un photomultiplicateur : comparaison entre le comptage de photon et un régime « continu ».

Comme l'illustre la figure 6.2 (b), contrairement aux méthodes de détection traditionnelles, en comptage de photons le signal est reconstruit à partir d'événements discrets associés à l'arrivée d'un photon.

Pour notre PM (Hamamatsu H10330A-45), le gain, G , est d'environ $G \sim 10^6$ à 1300 nm . Ce qui signifie qu'un photo-électron donnera naissance à une impulsion électrique d'environ $\sim 10^6$ électrons.

Si la charge à la sortie de l'anode est de $R = 50 \Omega$, on obtient, avec ce détecteur, une impulsion électrique correspondant à la détection d'un photon d'une largeur temporelle de l'ordre de $\sim 1 \text{ ns}$ et d'une amplitude de $V_0 \approx 8 \text{ mV}$.

Précisons cependant que l'efficacité quantique, c'est-à-dire le nombre de photo-électrons émis par rapport au nombre de photons incidents, reste faible pour les détecteurs dans cette gamme spectrale. A titre d'exemple, le PM dont nous disposons a une efficacité quantique de 2%. Donc sur ~ 100 photons incidents ~ 2 seront détectés.

Dispositif optique : laser et système d'imagerie

Le dispositif que j'ai mis en place pour la détection de la phosphorescence de l'oxygène singulet est composé, comme l'illustre le schéma de la figure 6.3 (a), d'un laser impulsif, dit de pompe, dont le faisceau d'un diamètre d'environ 3 mm traverse une cuve en quartz² (Hellma). Cette cuve contient la solution qui est laissée en équilibre avec l'air avant le début de l'expérience et qui est

²Les dimensions de la cuve sont $1 \text{ cm} \times 2 \text{ cm} \times 5 \text{ cm}$.

ensuite hermétiquement fermée au début de l'expérience. La cuve en quartz peut contenir, selon l'expérience, divers solvants dans lesquels peut être dilué (ou pas) un photo-agent.

A l'aide d'une lentille de focale 19 mm , la lumière émise par phosphorescence est collectée pour être imagée sur la photocathode par la lentille du PM (de focale $\sim 20\text{ mm}$).

Des filtres interférentiels passe-bande de largeur à mi-hauteur de 10 nm (Spectrogon) et des filtres passe-haut³ (Thorlabs) permettent la suppression de la lumière de pompe et la transmission de la lumière à 1270 nm collectée et projetée sur le PM.

Le photomultiplicateur est sensible sur une gamme de longueurs d'onde allant de 900 à 1400 nm .

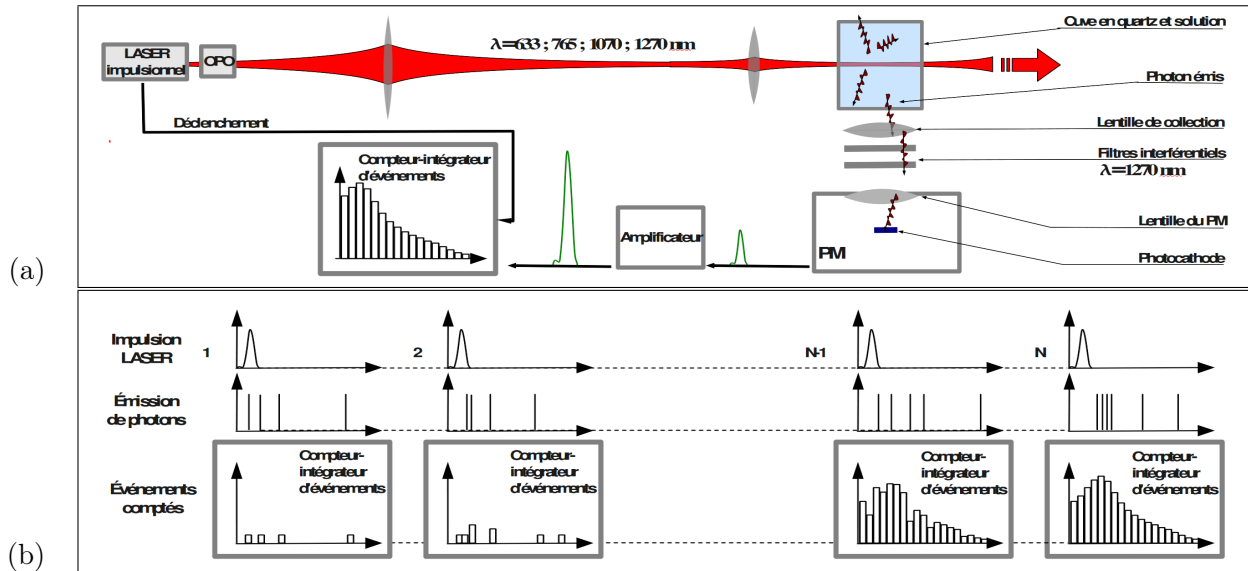


FIG. 6.3 – (a) Schéma du dispositif expérimental pour la détection optique directe de l'oxygène singulet - (b) diagramme illustrant la reconstruction du signal de phosphorescence par comptage de photons.

Pour calibrer notre dispositif par détection de l'oxygène singulet à 1270 nm créé à l'aide d'un photo-agent et être en mesure de tester les différents schémas d'excitation envisagés, nous avons choisi d'utiliser un oscillateur paramétrique optique (OPO). Ce type de système permet, grâce à un couplage non-linéaire entre la lumière et un cristal, de convertir un faisceau laser UV en deux faisceaux laser, nommés signal et idler, tous deux accordables spectralement.

Le laser de pompe est un laser de type Q-switch pompé par une lampe à décharge (Continuum - Surelite II) délivrant des impulsions à 355 nm d'une largeur temporelle de l'ordre de $\sim 5\text{ ns}$ avec un taux de répétition de 10 Hz . Ce laser pompe un OPO (Continuum - Surelite Plus). A la sortie de l'OPO on dispose d'impulsions, sur une gamme allant de 400 nm à 2000 nm , d'une énergie de 15 à 40 mJ suivant la longueur d'onde.

Il est donc possible d'utiliser ce dispositif pour exciter le dioxygène dans l'état singulet $a^1\Delta_g$ via un photo-agent à $\sim 633\text{ nm}$, ou directement par absorption d'un photon à $1270, 1070$ ou 765 nm .

Notons que la durée des impulsions ($\sim 5\text{ ns}$) est suffisamment courte pour sonder la réponse impulsionnelle du système $PS - O_2$ car les échelles de temps associées au photo-agent et à l'oxygène singulet ($\sim \mu\text{s}$) sont bien plus longues. Le taux de répétition des impulsions laser est relativement lent (10 Hz), mais les lasers impulsifs disposant d'un taux de répétition plus élevé ont en général une énergie par impulsion nettement plus faible. Les transitions qui nous intéressent étant très peu probables nous avons préféré une grande énergie crête au confort⁴ que représente un taux de répétition plus élevé.

³Il s'agit de filtres transmettant les longueurs d'ondes supérieures à la longueur d'onde de coupure (1100 nm).

⁴En pratique, il est nécessaire d'utiliser ~ 1000 impulsions pour reconstruire un signal. Avec un taux de répétition de 10 Hz , l'opération dure 100 s alors qu'avec un taux de répétition de 20 kHz , l'opération est réalisée en 2 s .

Acquisition des données

A chaque impulsion, quelques photons sont collectés et imagés sur le PM. Pour chaque photon détecté, le PM émet une impulsion électrique qui est amplifiée (amplificateur $\times 5$ Stanford - SRS445A). L'instant d'arrivée des photons (par rapport à l'impulsion laser) est alors enregistré par compteur-intégrateur d'événements (Stanford SR43 multichannel - scaler). Ce dernier appareil est déclenché par l'impulsion laser (à une fréquence de 10 Hz).

Le compteur-intégrateur d'événements dispose de plusieurs fenêtres temporelles de durées variables (5 ns à 1 ms) qui permettent donc l'enregistrement du signal de phosphorescence avec une résolution temporelle d'au mieux 5 ns . On obtient ainsi un histogramme résumant le nombre de photons détectés dans chaque fenêtre temporelle.

Comme l'illustre le diagramme 6.3 (b), on peut répéter l'opération plusieurs fois et ainsi reconstruire le signal de phosphorescence qui est proportionnel à la concentration instantanée d'oxygène singulet. Ce signal croît après l'arrivée de l'impulsion et décroît sur une échelle de temps comparable au temps de vie moyen de l'oxygène singulet dans le solvant considéré.

6.2.2 Collecter plus de photons : un compromis entre signal et saturation du détecteur

Outre la relativement faible efficacité quantique des PM dans l'infrarouge ($\sim 2\%$), la détection de la phosphorescence de l'oxygène singulet en solution est limitée par le fait que seule une faible fraction des photons émis est collectée.

En effet, comme l'illustre la figure 6.4, les montages traditionnels de détection de la phosphorescence de l'oxygène singulet en solution utilisent une lentille (lentille de collection) pour collecter les photons à 1270 nm émis. L'image est alors envoyée à l'infini et focalisée par une lentille (lentille du PM) sur la photocathode.

L'angle solide dans lequel les photons sont collectés est alors défini par le diamètre de l'ouverture d'entrée du PM et la distance focale de la lentille de collection. Pour une lentille de focale $f_c = 19\text{ mm}$ et une ouverture de diamètre $D = 20\text{ mm}$, l'angle solide de collection pour le dispositif de la figure 6.4 (a) vaut $\Omega_L \approx 0,72\text{ sr}$. Ainsi, la fraction de photons émis dans le volume imagé qui est collectée par le dispositif vaut $\frac{\Omega_L}{4\pi} \approx 0,06$: seulement 6% des photons émis sont collectés par le dispositif de la figure 6.4 (a).

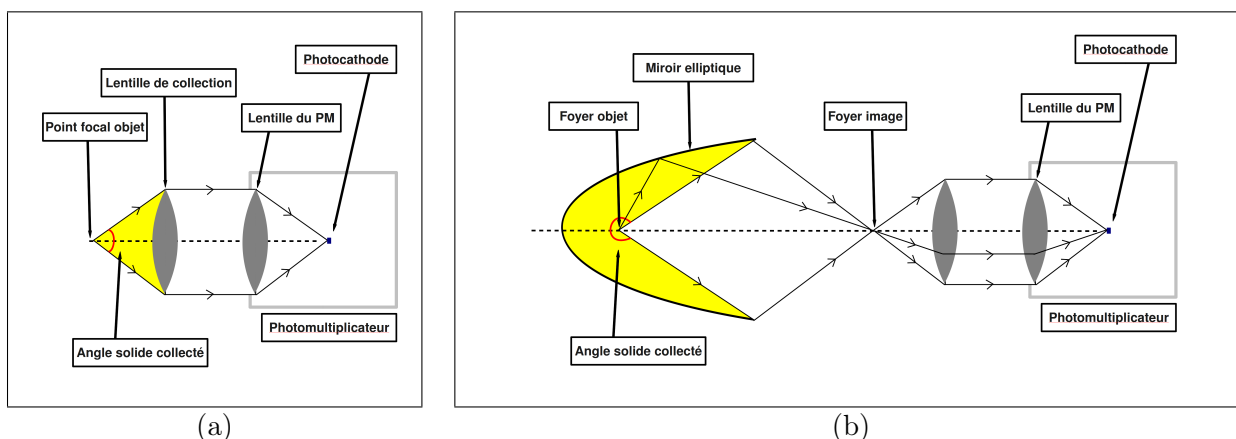


FIG. 6.4 – Représentation schématique de l'angle solide collecté dans les dispositifs de détection de la phosphorescence de l'oxygène singulet (a) dispositif « traditionnels » et (b) dispositif avec miroir elliptique.

Pour améliorer l'efficacité de collection, une méthode simple consiste en l'utilisation d'un miroir elliptique. Comme l'illustre la figure 6.4 (b), les rayons issus d'un foyer (objet) d'un miroir elliptique convergent tous vers le second foyer (image) [143]. Ainsi, l'angle solide collecté est en théorie ~ 14 fois supérieur à celui du dispositif de la figure 6.4 (a). En pratique, j'ai pu vérifier que le signal obtenu

à l'aide du miroir elliptique est ~ 10 fois supérieur à un montage traditionnel. Le dispositif de la figure 6.4 (b) est principalement limité par le coefficient de réflexion du miroir elliptique ($\sim 80\%$) et les trous nécessaires à l'introduction de la cuve en quartz et au passage du faisceau, mais reste plus efficace en terme de collection que le dispositif « traditionnel ».

Cependant, la présence d'un signal électrique parasite à la sortie du PM (*a priori* d'origine lumineuse) coïncidant temporellement avec l'impulsion laser d'excitation et ayant d'une largeur temporelle de l'ordre de ~ 20 ns rend ce dispositif inutilisable. En effet, ce signal parasite est suffisamment intense pour saturer le PM⁵ et, plus grave, peut conduire à un courant électrique crête susceptible d'endommager le détecteur.

L'origine de ce signal n'a pu être clairement identifiée. Il est probable que celui-ci soit dû à la superposition de plusieurs effets dont la diffusion de l'impulsion de pompe par le solvant.

En effet, ce signal est indépendant de la longueur d'onde de pompe (765 nm, 633 nm ou autre) et croît avec l'énergie de l'impulsion de pompe.

Dans les expériences pour lesquelles l'oxygène singulet est produit à l'aide d'un photo-agent, la diminution de la concentration du PS contribue à limiter significativement, mais pas totalement, le signal parasite.

Enfin, plus étonnamment, l'introduction de filtres interférentiels censés éliminer la longueur d'onde de pompe ne conduit à la réduction de cet effet parasite que partiellement : au-delà d'une certaine limite, l'introduction de filtres supplémentaires n'a pas d'effet.

En pratique, l'utilisation d'un miroir elliptique n'est donc *a priori* pas utile. Car, dans des conditions expérimentales données, le signal est limité par la puissance de pompe elle-même limitée par ce signal parasite susceptible d'endommager le PM. Nous n'avons donc finalement pas utilisé ce dispositif.

6.3 Calibration et limite de détection du dispositif

Le dispositif étant maintenant décrit nous allons nous intéresser aux expériences permettant de nous assurer que la technique est maîtrisée. Pour cela, nous avons réalisé la détection de la phosphorescence à 1270 nm de l'oxygène singulet et la mesure du temps de vie dans cet état dans le méthanol. Dans ces expériences, l'oxygène singulet est formé grâce à un photo-agent excité à 633 nm et la phosphorescence est séparée de la lumière de pompe par des filtres interférentiels.

Nous verrons donc dans un premier temps que les valeurs des temps de vie du photo-agent et de l'oxygène singulet dans le méthanol sont en accord avec les données de la littérature. Dans un second temps, nous verrons que la quantité de signal obtenue est comparable à la valeur attendue d'après les données de la littérature. Ceci nous conduira à préciser le rapport signal sur bruit de cette expérience et à évaluer la limite de détection du dispositif.

6.3.1 Détection de l'oxygène singulet excité à l'aide d'un photo-agent

Pour vérifier le bon fonctionnement de notre dispositif expérimental (figure 6.3) nous avons réalisé la détection de la phosphorescence à 1270 nm de l'oxygène singulet créé à l'aide d'un photo-agent par le mécanisme présenté à la figure 5.4.

La figure 6.5 montre le signal de phosphorescence reconstruit après 1200 impulsions laser par le compteur-intégrateur d'événements. Cette expérience a été réalisée avec l'aluminium-chloro tétra-sulphoné phtalocyanine (*AlS₄Pc*, Sigma Aldrich) comme photo-agent, dilué dans du méthanol pur (99% Sigma Aldrich) à une concentration de $[S_0] \approx 0,45 \mu\text{mol.L}^{-1}$. La longueur d'onde de pompe était de 633 nm pour une énergie par impulsion de 138 μJ à l'entrée de la cuve en quartz.

⁵La saturation du PM conduit à la détection d'événements ne correspondant pas à l'émission d'un photon plusieurs microsecondes après la saturation.

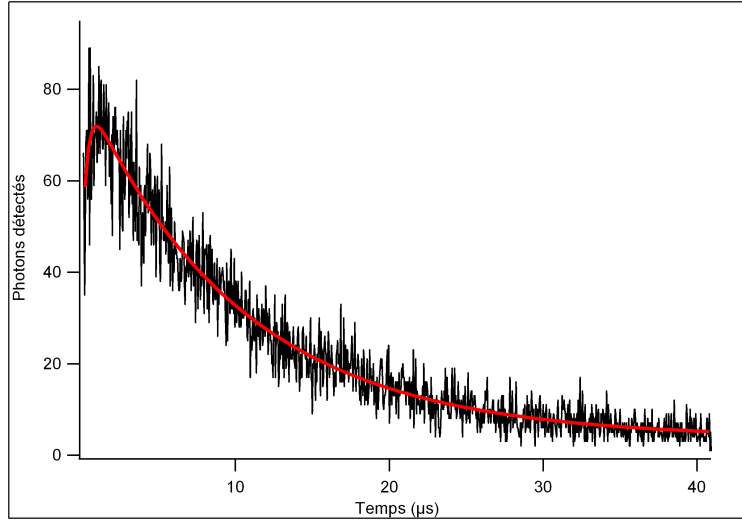


FIG. 6.5 – Signal de phosphorescence à 1270 nm de l'oxygène singulet pour ALS_4Pc ($[S_0] \approx 0,45 \mu mol.L^{-1}$) dilué dans le méthanol, excité à 633 nm pour 1200 impulsions de 138 μJ .

L'évolution temporelle des concentrations des différentes espèces chimiques présentes dans la solution peut être décrite par les équations suivantes [82] :

$$\frac{d[S_1]}{dt} = I(t) \cdot \sigma_{PS} \cdot [S_0] - \frac{1}{\tau_S} \cdot [S_1] \quad (6.1)$$

$$\frac{d[T_1]}{dt} = \frac{\Phi_T}{\tau_S} \cdot [S_1] - \frac{1}{\tau_T} \cdot [T_1] \quad (6.2)$$

$$\frac{d[{}^1O_2]}{dt} = \frac{\Phi_\Delta}{\Phi_T \cdot \tau_T} \cdot [T_1] - \frac{1}{\tau_\Delta} \cdot [{}^1O_2] \quad (6.3)$$

où $I(t)$ est l'intensité lumineuse de pompe à 633 nm ($photons.s^{-1}.cm^{-2}$), σ_{PS} la section efficace d'absorption (cm^2) du PS , $[S_0]$, $[S_1]$ et $[T_1]$ représentent les concentrations ($mol.L^{-1}$) du photo-agent dans les états respectivement fondamental, singulet excité et triplet excité, $[{}^1O_2]$ représente la concentration d'oxygène singulet créé ($mol.L^{-1}$), τ_S et τ_T sont les temps de vie (s) du photo-agent dans les états respectivement singulet et triplet, τ_Δ est le temps de vie (s) de l'oxygène singulet dans le solvant considéré, et enfin, Φ_T et Φ_Δ sont les efficacités quantiques de production de l'état triplet du photo-agent et d'oxygène singulet.

En posant $I(t) = N \cdot \delta(t)$, où N est le nombre de photons incidents par impulsion laser et par unité de surface et $\delta(t)$ la distribution de Dirac, on montre que, si $\tau_S \ll \tau_T$, l'évolution de la concentration d'oxygène singulet s'écrit :

$$[{}^1O_2](t) = N \cdot \sigma_{PS} \cdot [S_0] \cdot \Phi_\Delta \cdot \frac{\tau_\Delta}{\tau_T - \tau_\Delta} \cdot \left\{ \exp\left(-\frac{t}{\tau_T}\right) - \exp\left(-\frac{t}{\tau_\Delta}\right) \right\} \quad (6.4)$$

L'impulsion laser étant très brève devant les autres échelles de temps ($\tau_{imp} \sim 5 ns$, $\tau_{imp} \ll \tau_T$ et $\tau_{imp} \ll \tau_\Delta$), elle est bien représentée par la fonction de Dirac, $\delta(t)$, et la concentration instantanée d'oxygène singulet est donc décrite par l'équation 6.4. Le signal de phosphorescence, $n_{1270}(t)$ ($s^{-1}.L^{-1}$), c'est-à-dire le nombre de photons émis à 1270 nm par unités de temps et de volume, est proportionnel à la concentration instantanée d'oxygène singulet :

$$n_{1270}(t) = k_r \cdot [{}^1O_2](t) \cdot N_A \quad (6.5)$$

où k_r est le coefficient d'émission spontanée de l'oxygène singulet dans le solvant considéré (s^{-1}) et N_A le nombre d'Avogadro (mol^{-1}).

La courbe rouge représente le meilleur ajustement d'une fonction doublement exponentielle du type de l'équation 6.4 où τ_{Δ} , τ_T et l'amplitude sont des paramètres libres. On trouve $\tau_T \approx 0,32\mu s$ et $\tau_{\Delta} \approx 10,2\mu s$ en bon accord avec les valeurs précédemment publiées [82]. Ce résultat prouve le bon fonctionnement du système de détection. De plus, l'ajout d'un « quencher » (NaN_3) de l'oxygène singulet induit une diminution du temps de vie de l'oxygène singulet. A forte concentration ($[NaN_3] > 1 \text{ mol.L}^{-1}$) le signal de phosphorescence est complètement atténué. Ceci nous assure que le signal détecté provient de la désexcitation radiative de l'oxygène singulet [82].

6.3.2 Calibration et limite de détection

Pour nous assurer de notre bonne maîtrise de la chaîne de détection, nous allons comparer l'intensité du signal de phosphorescence attendue à celle effectivement détectée. Ceci nous permettra de préciser le rapport signal sur bruit (RSB) de notre dispositif et nous conduira à définir la limite de détection de celui-ci.

Le nombre total, par impulsion laser, de molécules de dioxygène excitées dans l'état $^1\Delta_g$ est donné par :

$$N_{1O_2} = N \cdot \sigma_{PS} \cdot [S_0] \cdot \Phi_{\Delta} \cdot N_A \cdot V \quad (6.6)$$

où V (L) est le volume de solution imagé sur la photocathode du PM.

Le nombre total de photons émis après une seule impulsion laser, N_p , est l'intégrale sur le temps de l'équation 6.5 :

$$N_p = \int_0^{\infty} n_{1270}(t) dt = N \cdot \sigma \cdot [S_0] \cdot \Phi_{\Delta} \cdot k_r \cdot N_A \cdot V \times \tau_{\Delta}. \quad (6.7)$$

Les distances focales de la lentille de collection et du PM étant identiques, le grandissement transverse du dispositif vaut ~ 1 [143]. La taille de la photocathode est de 1 mm . Les points du plan objet, dont l'image est projetée sur la photocathode, sont donc situés dans une surface de $S \approx 1 \text{ mm}^2$ autour de l'axe optique. Par ailleurs, on peut déterminer une expression analytique approchée donnant la contribution sur la photocathode des points selon l'axe optique et légèrement défocalisés dans le plan objet de la lentille de collection [143, 191, 192]. Dans les conditions expérimentales, seuls les points situés sur une distance $L \approx 1 \text{ mm}$ contribuent de manière significative. Le volume imagé sur la photocathode est donc : $V = S \times L \approx 1 \text{ mm}^3$.

Expérimentalement, il faut tenir compte de l'efficacité de collection, $e_c = \frac{\Omega_L}{4\pi} \approx 6\%$ (calculée), de la transmission des composants optiques $T_o \approx 22\%$ (mesurée), de l'atténuation de l'impulsion de pompe due à la propagation dans la solution $T_s \approx 50\%$ (mesurée) et, enfin, de l'efficacité quantique du détecteur qui vaut 2% à 1270 nm (donnée du constructeur).

En prenant $\sigma_{PS} \approx 6.10^{-16} \text{ cm}^2$ (cf. [193]), $N \approx 7,6.10^5 \text{ cm}^{-2}$ ($138 \mu J$ à 633 nm pour un faisceau d'environ 3 mm de diamètre), $\Phi_{\Delta} \approx 0,4$ (cf. [104]) et $k_r \approx 0,315 \text{ s}^{-1}$ dans le méthanol (cf. [81, 173]), on trouve environ $N_p \approx 20$ photons par impulsion. Ce qui correspond à $\sim 5.10^{11}$ molécules dans l'état $a^1\Delta_g$ dans le volume de solution de 1 mm^3 imagé.

En pratique, le nombre de photons détectés dans les $40 \mu s$ suivant l'impulsion laser est de ~ 20400 (après soustraction du bruit) pour 1200 impulsions, soit ~ 17 photons par impulsion. Nous avons donc un bon accord entre la valeur expérimentale (~ 17 photons) et la valeur (~ 20 photons) attendue d'après des paramètres de la littérature ou déterminés indépendamment.

On peut donc estimer la limite de détection du dispositif. Dans les conditions citées précédemment, le rapport signal sur bruit est de $RSB \approx 10$. Ceci conduit à une limite de détection pour notre dispositif ($RSB = 1$) de $\sim 5.10^{10}$ molécules de dioxygène dans l'état singulet $a^1\Delta_g$ dans le volume de solution imagé.

6.4 Excitation directe de l'oxygène singulet et détection de la phosphorescence à 1270 nm

Nous avons pu réaliser la détection de l'oxygène singulet créé *via* l'excitation à 633 nm d'un photo-agent. Cette expérience nous a permis d'évaluer le temps de vie de cet état dans le méthanol à température ambiante ($\sim 10 \mu s$) valeur en accord avec les données précédemment publiées [82]. De plus, une limite de détection de $\sim 5.10^{10}$ molécules de dioxygène dans l'état singulet $a^1\Delta_g$ dans un volume dans $1 mm^3$ de solution a pu être évaluée pour notre système expérimental.

Dans un premier temps, nous considérerons donc un à un les schémas d'excitation présentés à la figure 6.1. Ceci nous permettra de mettre en évidence le fait que la détection de la phosphorescence résolue en temps de l'oxygène singulet créé par excitation directe n'est pas réalisable avec le dispositif mis en place. Enfin, des perspectives concernant la détection de l'oxygène singulet en solution par excitation directe seront évoquées.

6.4.1 Excitation directe de l'oxygène singulet

Excitation directe à 1270 nm

Dans un premier temps, nous avons écarté cette possibilité, car les longueurs d'ondes d'excitation et de détection sont les mêmes. En effet, la lumière de pompe diffusée risque d'endommager ou au mieux de saturer le PM.

Notons qu'on peut envisager de défléchir ou de couper la lumière collectée, issue de l'impulsion de pompe et arrivant sur le PM, à l'aide d'un modulateur optique. Un tel modulateur permettrait d'atténuer ou de défléchir la lumière collectée par le dispositif d'imagerie pendant le temps de l'impulsion seulement. Ceci empêcherait la lumière de l'impulsion de pompe diffusée par le solvant d'endommager le détecteur et permettrait d'observer le signal de phosphorescence.

Cependant, tous les modulateurs disponibles commercialement que nous avons envisagés au début de ce travail de thèse ne présentaient pas **simultanément** un taux suffisant d'atténuation de la pompe suffisant **et** une bande passante suffisante devant les échelles de temps considérées ($\sim 1 \mu s$). Enfin, la mise en place de ce type de montage induirait des pertes au travers du modulateur principalement et conduirait à diminuer d'au moins un facteur 5 le signal de phosphorescence.

Excitation du second état électronique excité à 765 nm

Nous présentons ici le cas de l'excitation directe à 765 nm. Pour cette expérience, le faisceau laser à 765 nm d'un diamètre de 3 mm irradie la cuve en quartz contenant une solution de méthanol pur. Nous avons limité l'énergie de l'impulsion à 10 mJ par impulsion. Dans ces conditions, le courant crête est égal à la limite spécifiée par le constructeur.

Notre tentative de détection de la phosphorescence à 1270 nm de l'oxygène singulet créé par excitation directe à 765 nm (schéma de la figure 6.1 (b)) a été vaine dans le méthanol.

Insistons sur le fait que la section efficace associée à la transition $X^3\Sigma_g^+ \longrightarrow b^1\Sigma_g^-$ du dioxygène dissous dans le méthanol n'est, à notre connaissance, pas publiée. Nous avons donc déterminé *a posteriori*⁶, à l'aide d'une solution de DPIBF irradiée à 765 nm (cf. section 5.2.3), le taux de production d'oxygène singulet à cette longueur d'onde dans le méthanol. On trouve : $\sigma_{765} \times \Phi_{b-a} \approx 2.10^{-24} cm^2$, où σ_{765} (cm^2) est la section efficace d'absorption associée à la transition radiative $X^3\Sigma_g^+ \longrightarrow b^1\Sigma_g^-$ du dioxygène et Φ_{b-a} est l'efficacité quantique associée à la transition non-radiative $b^1\Sigma_g^- \longrightarrow a^1\Delta_g$.

Nous allons évaluer ici le nombre de molécules excitées dans le volume de $1 mm^3$ de solution imagé sur la photocathode. Ceci nous permettra de confirmer que dans les conditions expérimentales utilisées, ce nombre se situe en-deçà de la limite de détection.

⁶Chronologiquement, la détection à l'aide du piège DPIBF a été mise en place après la mise en place du système de détection de la phosphorescence de l'oxygène singulet.

L'évolution des populations entre les états $b^1\Sigma_g^-$ et $a^1\Delta_g$ du dioxygène a une forme analogue aux équations 6.1, 6.2 et 6.3. A l'aide du même traitement mathématique, on montre que le nombre de molécules par impulsion dans un volume V (L) dans l'état singulet excité s'écrit :

$$N_p = N \cdot \sigma_{765} \cdot \Phi_{b-a} \cdot [{}^3O_2] \cdot V \cdot N_A \quad (6.8)$$

où N est le nombre de photons à 765 nm incidents par unité de surface et par impulsion (cm^{-2}), $[{}^3O_2]$ la concentration $mol.L^{-1}$ en dioxygène dans l'état fondamental dissous dans la solution, σ_{765} (cm^2) est la section efficace d'absorption à 765 nm du dioxygène, Φ_{b-a} est l'efficacité quantique de production d'oxygène singulet, V (L) le volume de solution imagé et, N_A le nombre d'Avogadro (mol^{-1}).

En prenant, $N \approx 5,4 \cdot 10^{17} cm^{-2}$ (10 mJ par impulsion à 765 nm pour un diamètre de $\sim 3 \text{ mm}$), $[{}^3O_2] \approx 2,2 \cdot 10^{-3} mol.L^{-1}$ (calculé d'après la constante de Henry référencée dans [110]) et $V \approx 10^{-6} L$ (le volume imagé), on trouve un nombre de molécules dans l'état excité $a^1\Delta_g$ de $N_p \approx 10^8$, soit largement inférieur à la limite de détection ($5 \cdot 10^{10}$) de notre système de détection.

Excitation du premier état vibrationnel excité de l'oxygène singulet à 1070 nm

La section efficace d'absorption à 1070 nm du dioxygène n'est, à ma connaissance, pas publiée. Mais, dans plusieurs solvants, le taux de production d'oxygène singulet est environ ~ 30 fois plus faible à 1070 nm qu'à 765 nm .

Nous n'avons pas réalisé cette expérience car ce schéma est encore moins efficace que celui impliquant l'excitation par absorption d'un photon à 765 nm . La phosphorescence de l'oxygène singulet n'est donc *a priori* pas détectable dans le méthanol avec ce dispositif.

6.4.2 Conclusions et Perspectives

Nous avons montré que la détection de la phosphorescence de l'oxygène singulet créé par excitation directe dans des solutions saturées en air à température ambiante est, dans notre dispositif expérimental, irréalisable.

Insistons sur le fait que la section efficace associée à la transition $X^3\Sigma_g^+ \rightarrow b^1\Sigma_g^-$ du dioxygène dissous dans le méthanol n'était pas connue et a été déterminée lors de ce travail de thèse. Le rapport entre les sections efficaces d'absorption à 1270 nm et à 765 nm dans le méthanol est 6 fois inférieur à celui publié dans CCL_4 [103]. Nous attendions donc une valeur plus grande.

De plus, nous envisageons la possibilité d'augmenter la quantité de signal de phosphorescence en focalisant le laser et en collectant plus de photons à l'aide d'un miroir elliptique. Ceci aurait conduit, dans le schéma d'excitation impliquant l'absorption d'un photon à 765 nm , à un RSB d'au moins 1. Mais cela n'a pu être réalisé à cause d'un signal parasite susceptible d'endommager le détecteur (cf. 6.2.2).

Evoquons l'acquisition récente au laboratoire d'une photodiode à avalanche dédiée au comptage de photons (ID quantique id201). Ce détecteur possède une efficacité quantique environ 40 fois supérieure au PM utilisé et son seuil de dommages (1 mW) est bien plus grand que celui du PM. L'intensité laser est donc *a priori* moins limitée⁷ avec ce détecteur.

Ainsi, en amenant le faisceau laser à un diamètre de 1 mm (au lieu de 3 mm), on augmenterait la densité de puissance d'un facteur ~ 10 et le RSB serait alors proche de 1 avec ce détecteur pour le schéma d'excitation de la figure 6.1 (b).

La photodiode à avalanche est, de plus, fenêtrable sur des durées de l'ordre de la nanoseconde, ce qui signifie que le gain du détecteur peut être coupé pendant la durée de l'impulsion. On peut alors réaliser la détection à l'aide du schéma de la figure 6.1 (a) (par excitation à 1270 nm) *a priori*

⁷L'intensité est proportionnelle au ratio de l'énergie de l'impulsion par la surface du faisceau laser. On peut, avec la photodiode à avalanche, envisager de focaliser plus le laser et utiliser toute l'énergie par impulsion disponible ($\sim 20 \text{ mJ}$).

500 fois plus efficace que le schéma de la figure 6.1 (b) (à 765 nm). On devrait, avec ce nouveau dispositif, en focalisant le laser à 1270 nm, dépasser la limite de détection actuelle.

On peut donc envisager, dans des solutions macroscopiques à température ambiante, de détecter la phosphorescence à 1270 nm de l'oxygène singulet.

Cependant, en milieu vivant, le *RSB* attendu, même avec l'aide d'un détecteur type photodiode à avalanche, reste faible. En effet, la présence de signaux parasites dus à la diffusion de la lumière de pompe par les composants de la cellule et l'autofluorescence des cellules conduirait à un *RSB* encore plus petit. De plus, les puissances crêtes ($> 1 \text{ MW.cm}^2$) nécessaires pour réaliser cette détection par excitation directe risque d'endommager l'objectif de microscope et les cellules. Cette technique de détection me semble donc irréalisable dans des cellules.

Ce résultat, bien qu'infructueux, nous a permis de maîtriser un dispositif délicat de mesure du temps de vie de l'oxygène singulet créé à l'aide d'un photo-agent. Avant ce travail de thèse, cette expertise n'existait pas dans l'équipe, nous disposons donc maintenant d'un dispositif permettant l'étude du temps de vie en solution (pure ou contenant des cellules en suspensions) de l'oxygène singulet créé à l'aide d'un photo-agent.

C'est, de plus, un résultat encourageant pour, à terme, mettre en place une telle détection à l'échelle d'une seule cellule [92,93].

Enfin, la photodiode à avalanche semble un outil prometteur pour permettre la détection de la phosphorescence à 1270 nm de l'oxygène singulet **excité à l'aide d'un photo-agent** à l'échelle de la cellule unique, et ainsi contribuer à augmenter le rapport signal sur bruit dans des expériences pour lesquelles le temps de vie de l'oxygène singulet serait mesuré dans différents compartiments cellulaires.

Chapitre 7

Etude Cinétique de la réaction de DPIBF avec l'oxygène singulet en solution

A plusieurs reprises au cours de ce travail de thèse, nous avons besoin d'une estimation de la section efficace d'absorption à 1270 nm, σ_{1270} , associée à la transition $X \rightarrow a$ du dioxygène. Cette donnée n'est pas répandue dans la littérature et il existe, à ma connaissance, très peu d'études concernant l'estimation des paramètres spectroscopiques des transitions radiatives $X \rightarrow a$ et $X \rightarrow b$ conduisant à la formation de l'oxygène singulet dans des solutions à température et pression standard.

L'une d'elles a été conduite par l'équipe de R.V. Ambartzumian et A.A. Krasnovsky Jr [103, 108, 109, 187, 188]. En effet, comme nous l'avons évoqué dans la section 5.2.3, ils ont montré qu'il est possible, grâce à des pièges chimiques spécifiques à l'oxygène singulet tels que DPIBF, d'obtenir les estimations de ces paramètres spectroscopiques dans divers solvants organiques [188].

Ces résultats fournissent une méthode simple et efficace qui s'inscrit aussi bien dans l'analyse de l'influence du solvant sur les transitions radiatives entre les trois premiers états électroniques du dioxygène [103, 188], que dans une étude visant à mimer les effets de l'oxygène singulet dans un milieu dense comme la cellule [108, 187].

Cependant, les valeurs des sections efficaces d'absorption associées aux transitions radiatives du dioxygène qui nous intéressent, ne sont publiées que pour très peu de solvants.

De plus, il reste à ce jour des questions non résolues pour la détermination des paramètres spectroscopiques de transition $X \rightarrow a$ du dioxygène dissous dans l'eau et l'eau lourde [109]. En effet, la solubilisation de DPIBF dans l'eau ou l'eau lourde nécessite l'utilisation d'agents tensioactifs¹ et conduit à la formation de deux pseudo-phases. Ceci rend l'interprétation des résultats délicate et une conclusion définitive n'a pas pu être formulée à ce jour.

Pour ces deux raisons, nous avons décidé de mettre en place une expérience analogue à celle proposée par Krasnovsky *et al.*. Notre étude, basée sur la mesure de la vitesse de disparition de DPIBF, doit conduire à déterminer, en plus de la section efficace d'absorption σ_{1270} , la valeur de la constante de réaction, k_{ox} , entre l'oxygène singulet et DPIBF. L'estimation de cette dernière constante doit permettre de compléter les questions restées en suspens pour la détection de l'oxygène singulet *via* DPIBF.

Dans une première section, nous présenterons le contexte et les motivations de cette partie du travail. En particulier, nous préciserons les travaux déjà réalisés pour la détection de l'oxygène singulet avec piège chimique et exposerons comment une étude de la cinétique de réaction est réalisable.

Dans un second temps, nous présenterons le dispositif expérimental que nous avons mis en place pour une telle étude résolue dans le temps. La détermination de σ_{1270} dans différents solvants organiques ainsi que du spectre d'absorption associé à la transition $X \rightarrow a$ du dioxygène nous permettront de vérifier le bon fonctionnement du dispositif.

¹Les agents tensioactifs sont des molécules modifiant la tension de surface entre deux phases, on parle parfois d'agent « mouillant ». On les utilise pour solubiliser deux phases *a priori* non miscibles.

Enfin, dans une dernière section, nous exposerons les résultats obtenus par l'étude de la cinétique de réaction entre DPIBF et l'oxygène singulet.

7.1 Contexte et motivations

Cette section est destinée à présenter de manière détaillée le contexte de cette partie du travail. Ceci nous servira à préciser ce que nous attendons d'une étude de la cinétique de réaction entre DPIBF et l'oxygène singulet.

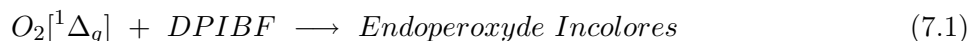
Nous présenterons donc dans un premier temps le contexte au travers du travail de Krasnovsky *et al.*. Nous précisons pourquoi des expériences complémentaires sont nécessaires pour l'interprétation des données dans l'eau et l'eau lourde.

Nous proposerons, dans un second temps, une méthode s'appuyant sur une étude de la cinétique de réaction entre DPIBF et l'oxygène singulet. En particulier nous exposerons comment une telle étude peut, à notre avis, compléter les travaux déjà effectués.

Ceci nous conduira, enfin, à préciser en quoi une étude dans deux pseudo-phases constitue pour nous un premier pas un système plus complexe analogue à la cellule.

7.1.1 Principe de détection de l'oxygène singulet avec DPIBF

Depuis 2003, Krasnovsky *et al.* ont montré qu'il est possible de doser l'oxygène singulet créé par excitation directe à 1270 nm grâce à une substance chimique, DPIBF, capable de piéger le dioxygène dans l'état singulet par la réaction [103, 108, 187, 188] :



Les endopéroxydes ainsi formés étant incolores, cette équipe a montré que l'on peut, en mesurant la variation d'absorbance à 410 nm de la solution, évaluer le taux de production d'oxygène singulet par irradiation laser à 1270 nm. La vitesse de disparition de DPIBF est liée au taux de production d'oxygène singulet par irradiation laser à 1270 nm par la relation [103, 108, 187, 188] :

$$V_{ox} \approx \frac{k_{ox} \cdot \Gamma \cdot [T]_0}{k_s + k_{ox} \cdot [T]_0} \quad (7.2)$$

où V_{ox} ($mol.L^{-1}.s^{-1}$) est la vitesse de disparition de DPIBF, Γ ($mol.L^{-1}.s^{-1}$) est le taux de production d'oxygène singulet (lié à la section efficace à 1270 nm), k_{ox} la constante bimoléculaire de réaction entre DPIBF et l'oxygène singulet, $k_s = \frac{1}{\tau_{\Delta}}$ est le taux de désactivation de l'oxygène singulet dans le solvant considéré et $[T]_0$ la concentration initiale en DPIBF.

Krasnovsky *et al.* ont ainsi, pour la première fois, mesuré le spectre d'absorption associé à la transition $X \longrightarrow a$ du dioxygène dissous dans divers solvants organiques à température ambiante et évalué la section efficace d'absorption dans ces conditions standard [103, 108, 188].

Dans les solvants organiques, la section efficace d'absorption σ_{1270} et le taux d'émission spontanée vérifient la relation d'Einstein entre l'émission et l'absorption. On a [81, 171, 173] :

$$\sigma_{1270} \propto n^2 \cdot k_r \quad (7.3)$$

où n est l'indice de réfraction du solvant. Krasnovsky *et al.* trouvent une variation relative avec le solvant entre les sections efficaces mesurées dans leurs expériences et les valeurs déjà publiées des taux d'émission spontanée en accord avec la relation 7.3 ($\frac{\sigma_{1270}}{n^2 \cdot k_r} \approx cste$) dans tous les solvants organiques étudiés [188].

7.1.2 Questions non-résolues concernant la détermination de la section efficace d'absorption à 1270 nm du dioxygène dans l'eau

Plus récemment, cette équipe s'est intéressée à l'excitation directe à 1270 nm de l'oxygène singulet dans l'eau (H_2O) et l'eau lourde (D_2O) [109, 188]. Cette tâche est plus délicate pour deux raisons principales.

En premier lieu, la concentration en dioxygène dissous est environ 10 fois plus faible dans l'eau que dans les solvants organiques [110]. Il en résulte un taux de production de l'oxygène singulet dans l'eau qui est proche de la limite de détection de la méthode avec de faibles puissances laser ($\sim 150 \text{ mW}$ à 1270 nm) [188]. Ce problème peut être en partie contourné grâce au laser de puissance que nous avons développé (cf. section 2.2).

A cette première limitation vient s'ajouter la non-solubilité du piège dans l'eau. En effet, DPIBF présente des parties hydrophobes qui provoquent sa cristallisation dans l'eau à température ambiante au bout d'un temps court [188]. Il faut alors utiliser un agent tensioactif pour permettre la solubilisation du piège [109]. L'utilisation d'un agent tensioactif conduit à la formation dans la solution de deux pseudo-phases. La présence de ces deux phases complexifie quelque peu l'interprétation des résultats.

7.1.3 Influence des micelles dans la détermination de la section efficace dans l'eau

Pour la solubilisation de DPIBF dans l'eau et l'eau lourde, on peut utiliser des dispersions de dodecylsulfate de sodium (SDS) [188], un tensioactif lipidique comme le savon.

Cette méthode de solubilisation entraîne, contrairement aux solvants organiques, la présence de deux pseudo-phases : une phase aqueuse et une phase dite de micelles.

La transition radiative $X \rightarrow a$ du dioxygène dissous est très dépendante du solvant considéré (cf. 5.1.1). La section efficace d'absorption à 1270 nm n'est pas la même dans la phase aqueuse et dans la phase de micelles. Le taux de production d'oxygène singulet et par conséquent la vitesse de disparition du piège dans de telles solutions présentent donc deux contributions (une pour chaque pseudo-phase).

Krasnovsky *et al.* proposent la relation 7.4, linéaire par rapport à la fraction volumique de SDS, pour décrire la contribution de chaque pseudo-phase à la section efficace d'absorption totale de la solution [109, 188].

$$\alpha = (1 - f_{mic}) \cdot \sigma_{aq} \cdot [O_2]_{aq} + f_{mic} \cdot \sigma_{mic} \cdot [O_2]_{mic} \quad (7.4)$$

où $[O_2]_{aq}$ et $[O_2]_{mic}$ sont les concentrations en dioxygène dissous dans les phases aqueuse et de micelles, α représente la fraction d'énergie lumineuse absorbée (à 1270 nm) par unité de longueur conduisant à la formation d'oxygène singulet, σ_{aq} et σ_{mic} sont les sections efficaces d'absorption à 1270 nm du dioxygène respectivement dans les phases aqueuse et de micelles, f_{mic} est la fraction volumique de micelles dans la solution, et $1 - f_{mic}$ est la fraction volumique d'eau.

A l'équilibre, il existe une relation liant les concentrations de dioxygène dissous dans les deux pseudo-phases. Cette relation s'écrit [109, 188, 194] :

$$[O_2]_{mic} = K_{eq} \cdot [O_2]_{aq} \quad (7.5)$$

où K_{eq} est la fraction relative de la concentration en dioxygène dissous dans la phase de micelles par rapport à la phase aqueuse à l'équilibre. Cette constante a été déterminée dans [194].

Ainsi, en remplaçant dans l'équation 7.4, il vient :

$$\alpha = \sigma_{app} \cdot [O_2]_{aq} = \{(1 - f_{mic}) \cdot \sigma_{aq} + f_{mic} \cdot \sigma_{mic} \cdot K_{eq}\} \cdot [O_2]_{aq} \quad (7.6)$$

où σ_{app} est la section efficace apparente à 1270 nm du dioxygène dissous dans la solution. La relation 7.6 est linéaire avec la fraction volumique de micelles, f_{mic} , et il suffit alors de faire varier expérimentalement cette dernière pour déterminer la section efficace dans l'eau, σ_{aq} .

Etonnamment, Krasnovsky *et al.* trouvent, dans leurs expériences, une valeur de la section efficace d'absorption à 1270 nm de l'eau (σ_{aq}) trois fois supérieure à la valeur attendue. En effet, la relation d'Einstein (7.3) liant la section efficace d'absorption et le taux d'émission spontanée n'est pas vérifiée pour l'eau [109]. Les auteurs proposent alors deux hypothèses pouvant expliquer cette différence.

La première, qu'ils écartent *a priori*, est que l'approximation qu'ils utilisent pour décrire la cinétique de consommation du piège (relation 7.2) « n'est pas suffisante pour décrire le système », ou que la valeur de k_{ox} (déterminée par une relation théorique la reliant à la viscosité macroscopique de la solution) ne décrit pas bien l'interaction entre l'oxygène singulet et le piège [109]. Remarquons que k_{ox} pourrait être déterminée par la mesure du temps de vie de l'oxygène singulet (détection de la phosphorescence) dans des solutions dans lesquelles on modifie progressivement la fraction volumique de micelles. Mais cette tentative n'a rien donné à cause d'un faible rapport signal sur bruit [109].

La seconde hypothèse est que la solubilisation du dioxygène ou la présence de micelles augmente la probabilité de transition en absorption à cause des « charges négatives des micelles » ou d'un effet « de perturbation dû à la dissolution du dioxygène » [109]. Cette perspective s'inscrirait dans l'étude de l'effet du solvant sur les transitions radiatives du dioxygène. D'autres expériences sont donc nécessaires pour permettre une conclusion définitive [109].

7.1.4 Motivations et objectifs

L'estimation de la section efficace d'absorption σ_{1270} de la transition $X \rightarrow a$ du dioxygène se fait, dans les expériences décrites précédemment, en mesurant l'absorbance de DPIBF dans un spectromètre. En pratique, la concentration en DPIBF est évaluée en mesurant l'absorbance de la solution autour de 405 nm dans un spectromètre préalablement à l'irradiation laser à 1270 nm . Puis, après l'irradiation de $\sim 10\text{ min}$, la solution est agitée et l'absorbance est de nouveau mesurée [108]. Le taux de production d'oxygène singulet, lié à la section efficace σ_{1270} , est alors donné par la relation 7.2.

On obtient ainsi une estimation de la section efficace d'absorption σ_{1270} dans différents solvants organiques² avec une incertitude de l'ordre de $\pm 30\%$ [103].

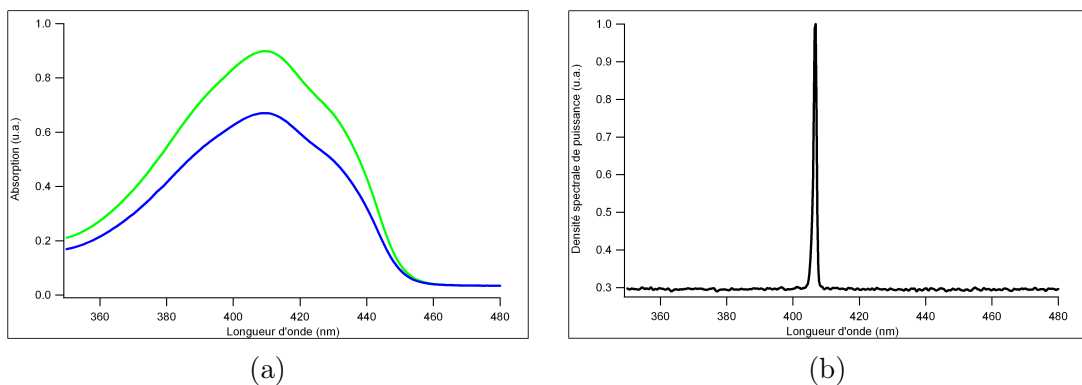


FIG. 7.1 – (a) Spectre d'absorption, mesuré dans un spectromètre (PERKIN ELMER, Lambda 19), de DPIBF dissous dans une solution de 5 mL d'éthanol. En vert le spectre avant irradiation et en bleu après une irradiation laser à 1270 nm pour une puissance d'environ 300 mW pendant 20 min (diamètre du faisceau $\sim 1,6\text{ mm}$). - (b) Spectre du laser (Roithner Laser) mesuré à l'aide d'un analyseur de spectre optique calibré.

Comme l'illustre la figure 7.1 (a) nous avons pu vérifier que le maximum du spectre d'absorption de DPIBF n'est pas décalé après création d'oxygène singulet par irradiation laser à 1270 nm . De plus, la forme normalisée au maximum d'absorption de ce spectre n'est pas modifiée par la présence ou la réaction avec l'oxygène singulet créé par excitation directe à 1270 nm . Ces résultats suggèrent

²Excluons pour l'instant D_2O et H_2O .

que l'on peut évaluer la variation de concentration de DPIBF simplement en mesurant la variation d'absorbance de la solution à une seule longueur d'onde coïncidant avec le spectre d'absorption de DPIBF. Un laser dont nous disposons émettant autour de 406 nm et dont le spectre est présenté à la figure 7.1 (b), convient pour cette mesure.

L'utilisation de ce laser permet, pendant l'irradiation à 1270 nm d'une solution, de mesurer dans le temps la variation d'absorbance due à la disparition de DPIBF dissous dans la solution (cf. figure 7.3). On peut alors, contrairement à l'expérience présentée dans le paragraphe 7.1.1, mesurer continûment la concentration de DPIBF et réaliser l'étude de la cinétique de la réaction entre DPIBF et l'oxygène singulet créé par irradiation laser à 1270 nm.

Intérêt d'une étude cinétique

L'étude de la vitesse de disparition du piège (DPIBF) présente plusieurs avantages.

Premièrement, elle permettra de vérifier l'hypothèse qui stipule que la vitesse de disparition de DPIBF est constante lors des premières minutes de l'irradiation (relation 7.2).

De plus, une telle mesure résolue dans le temps donne accès à plus de points expérimentaux, alors que, dans l'expérience présentée au paragraphe 7.1.1, on ne mesure que deux valeurs (avant et après irradiation) [108]. L'incertitude sur la mesure décroît avec le nombre de mesures, N , comme $\sim \frac{1}{\sqrt{N}}$. L'expérience résolue en temps doit donc conduire à une mesure plus précise.

Enfin, en plus de l'information sur la section efficace d'absorption σ_{1270} du dioxygène à 1270 nm (*via* le taux de production d'oxygène singulet), la vitesse de disparition de DPIBF contient une information concernant la constante bimoléculaire de réaction k_{ox} . En effet, la vitesse de réaction n'est pas constante. Intuitivement, elle est maximale au début de l'irradiation et diminue progressivement jusqu'à s'annuler à la limite où tout le DPIBF de la solution est consommé (il n'y a plus de réaction quand il n'y a plus de piège). Ce changement de vitesse est relié à la constante de réaction k_{ox} (relation 7.11).

En d'autres termes, l'étude de la cinétique de disparition de DPIBF en présence d'oxygène singulet excité directement à 1270 nm devrait conduire à des informations à la fois sur le taux de production d'oxygène singulet, Γ , mais aussi sur la constante bimoléculaire, k_{ox} de réaction entre les deux espèces.

Cette étude peut donc compléter les expériences de Krasnovsky *et al.* dans des solutions aqueuses contenant deux pseudo-phases. En particulier, on devrait pouvoir confirmer ou infirmer les valeurs de k_{ox} utilisées par cette équipe (celles-ci étant obtenues par le calcul par une relation liant k_{ox} à la viscosité macroscopique des solutions [109, 188]).

DPIBF - SDS : un environnement proche de la cellule

La substance utilisée pour solubiliser DPIBF dans l'eau ou l'eau lourde est un surfactant lipidique comme le savon : le dodécylsulfate de sodium (SDS). Cette molécule, de formule brute $CH_3(CH_2)_{11}OSO_3Na$, est composée d'une chaîne de 12 carbones au bout de laquelle est attachée un groupement sulfate. La chaîne carbonée est hydrophobe (non miscible à l'eau) alors que le groupement sulfate est hydrophile (miscible à l'eau). Dans l'eau, la forme stable de ces molécules est une pseudophase nommée micelle. Les molécules se rassemblent exposant leurs têtes hydrophiles à l'eau et laissant les parties hydrophobes à l'intérieur, formant ainsi des structures d'un diamètre de l'ordre du nanomètre, comme l'illustre la figure 7.2. Le piège DPIBF, non soluble dans l'eau, est *a priori* contenu dans les micelles.

La membrane de la cellule biologique est quant à elle composée de phospholipides [1]. Ce sont aussi des molécules amphiphiles³ dont la tête hydrophile est constituée d'un groupement phosphate. En présence d'eau, les phospholipides s'assemblent aussi en micelles [156], mais la membrane plasmique est structurée sous forme d'une bicouche [156], comme l'illustre la figure 7.2.

³Une molécule est dite amphiphile lorsqu'elle possède à la fois un groupement hydrophile et un groupement hydrophobe.

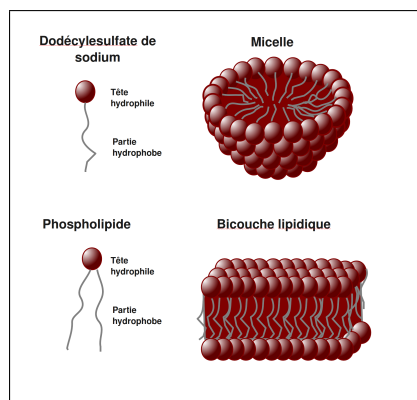


FIG. 7.2 – Représentation schématique des dispersions de SDS et de la bicouche lipidique composant la membrane cellulaire.

Même si l’analogie n’est pas complète, la solution aqueuse de DPIBF dissout à l’aide de SDS, nous semble un bon modèle de départ pour une étude de la réactivité de l’oxygène singulet dans un milieu plus complexe et plus proche de la cellule. Dans cette analogie DPIBF jouerait le rôle d’une molécule cible de l’oxygène singulet, alors que SDS mimerait la membrane plasmique.

7.2 Dispositif expérimental pour le suivi cinétique de la réaction entre DPIBF et l’oxygène singulet

Maintenant que le contexte et les objectifs sont précisés nous allons nous intéresser aux moyens mis en oeuvre pour suivre dans le temps l’évolution de la concentration de DPIBF réagissant avec l’oxygène singulet.

Nous commencerons donc par présenter le dispositif expérimental mis en place à cette occasion. Nous montrerons en particulier que ce dispositif permet de suivre la concentration de DPIBF avec un bon rapport signal sur bruit. Enfin la calibration de cette méthode sera exposée.

7.2.1 Dispositif expérimental

Comme l’illustre la figure 7.3, le dispositif expérimental, assez simple, consiste essentiellement en deux faisceaux lasers, se croisant perpendiculairement dans une cuve en quartz contenant la solution de DPIBF. Le premier laser, à 1270 nm , induit la création d’oxygène singulet en excitant le dioxygène dissous dans la solution. Le second laser, de sonde, dont la longueur d’onde correspond à une bande d’absorption ($\sim 406\text{ nm}$) de DPIBF permet de mesurer les variations d’absorbance de la solution et donc de mesurer la concentration instantanée de DPIBF à l’aide de la relation 5.3.

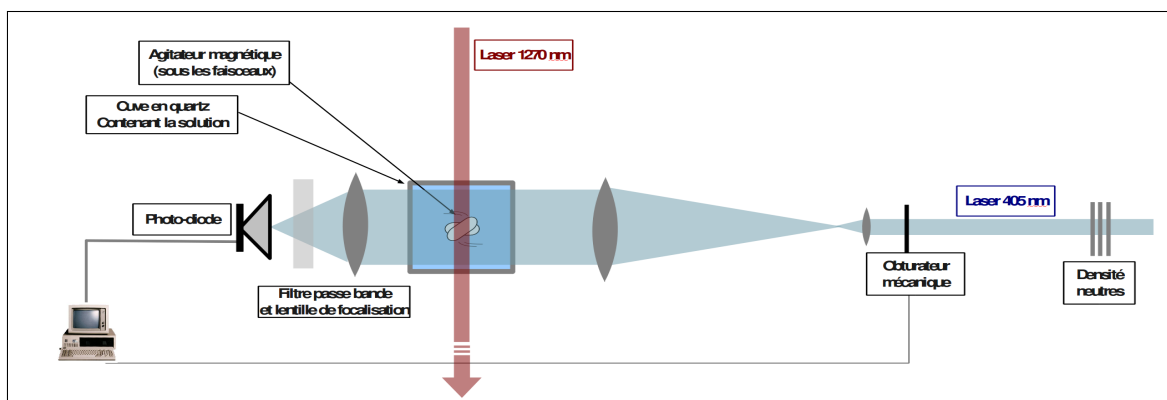


FIG. 7.3 – Représentation schématique du dispositif expérimental permettant le suivi cinétique de la réaction de DPIBF avec l’oxygène singulet créé par excitation directe à 1270 nm .

Le faisceau du laser infrarouge (1270 nm) d'excitation de l'oxygène singulet a un diamètre d'environ 3 mm et traverse donc la cuve en quartz (Hellma), dont les dimensions sont : 1 cm × 1 cm × 5 cm.

La solution est homogénéisée à l'aide d'un agitateur magnétique dont le barreau ne mesure que deux millimètres d'épaisseur. Ce barreau placé au fond de la cuve ne perturbe par la propagation des deux faisceaux.

Le laser à 406 nm, d'un diamètre initial de ~ 1 mm, est agrandi à l'aide d'un montage de type télescope. Son diamètre est ajusté pour recouvrir toute la cuve en quartz à l'exception bien sûr de l'agitateur magnétique. L'intensité du laser de sonde est, au niveau de la cuve, raisonnablement homogène sur toute la surface. Ce dernier permet donc la mesure de la variation d'absorbance moyenne de toute la solution.

L'intensité du laser de sonde est mesurée à l'aide d'une photodiode reliée à la carte d'acquisition d'un ordinateur. Afin d'éviter le photoblanchiment de la solution induit par la radiation à 406 nm, ce laser est périodiquement coupé par un obturateur mécanique. Et, pour la même raison, les expériences sont réalisées dans le noir. Des caches opaques ont été disposés autour du dispositif à cet effet.

L'ouverture périodique de l'obturateur et l'acquisition du signal de la photodiode sont contrôlés par un programme Labview que nous avons réalisé. Un jeu de filtres de densités neutres permet l'atténuation du faisceau. Le temps d'ouverture et la période temporelle de l'ouverture de l'obturateur, ainsi que la puissance du laser sonde sont ajustés de manière à rendre le photoblanchiment négligeable tout en évitant la saturation de la photodiode à la limite où la concentration en piège est nulle. En pratique, ces paramètres sont ajustés pour obtenir un signal, juste au-dessus du bruit au début de l'expérience ($[T] = [T]_0$, l'absorption est maximale) et juste en-dessous du niveau de saturation du détecteur dans le solvant sans piège ($[T] \approx 0$, l'absorption est minimale).

7.2.2 Suivi temporel de la réaction entre DPIBF et l'oxygène singulet créé par irradiation laser à 1270 nm

La figure 7.4 (a) montre la cinétique expérimentale de consommation du piège DPIBF dans l'acétone (99,9% Sigma Aldrich) pour une concentration initiale de $[T]_0 \approx 50 \mu\text{mol.L}^{-1}$. Le coefficient d'absorption molaire à ~ 405 nm a été mesuré à l'aide d'un spectromètre ((PERKIN ELMER, Lambda 19). Il permet d'évaluer la concentration en piège, $[T]$, et vaut $\epsilon_{405} \approx 2,3 \cdot 10^4 \text{ mol}^{-1} \cdot \text{L} \cdot \text{cm}^{-1}$ en accord avec la littérature [109]. La puissance laser à 1270 nm était, pour cette expérience, de 300 mW et était stable sur toute la durée de l'expérience.

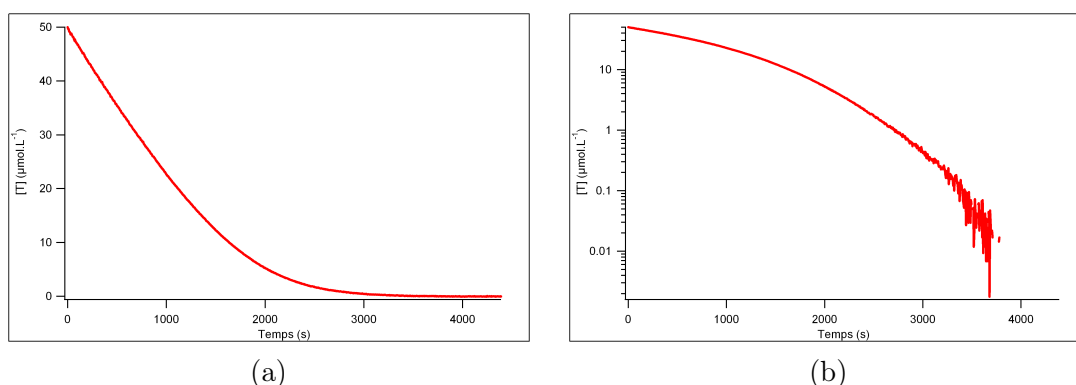


FIG. 7.4 – (a) Courbe expérimentale de décroissance de DPIBF dans l'acétone par réaction avec l'oxygène singulet excité à 1270 nm. - (b) La même courbe expérimentale en échelle semi-logarithmique.

Insistons sur le fait que la figure 7.4 (a) présente une courbe expérimentale. Le faible bruit dans ces expériences est principalement dû à la stabilité du laser de sonde et au fait que la cinétique est lente : les fluctuations parasites rapides sont filtrées par la faible bande-passante de la photodiode.

Enfin, remarquons dès maintenant que la décroissance du piège n'est pas exponentielle. La figure 7.4 (b) montre la courbe expérimentale (figure 7.4 (a)) représentée cette fois en échelle semi-logarithmique.

La vitesse est approximativement linéaire pendant les premières minutes de l'irradiation (confirmant ainsi l'hypothèse de [103, 188], cf. relation 7.2), puis la constante de temps diminue pour s'annuler lorsque tout le piège est consommé.

7.2.3 Calibration : spectres et sections efficaces d'absorption de l'oxygène singulet des différents solvants organiques

Pour vérifier le bon fonctionnement de notre dispositif expérimental, nous avons mesuré, à l'aide de la relation 7.2, la section efficace d'absorption à 1270 nm du dioxygène dissous dans divers solvants.

A titre d'exemple intéressons-nous à l'expérience dans l'acétone présentée à la figure 7.4 (a). La figure 7.5 (a) présente, en rouge, la variation de $[T]$ pendant la même expérience⁴ mais cette fois sur les première minutes seulement de l'irradiation. La courbe noire représente le résultat de l'ajustement par une droite de l'évolution de la concentration $[T]$.

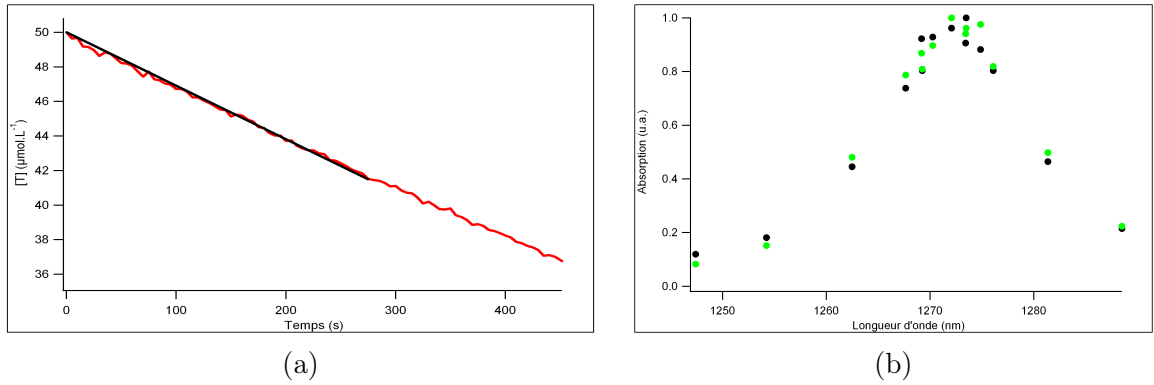


FIG. 7.5 – (a) Courbe expérimentale de décroissance de DPIBF dans l'acétone par réaction avec l'oxygène singulet excité à 1270 nm pour une irradiation à une puissance de 300 mW. La concentration initiale en DPIBF était de $[T]_0 \approx 50 \mu\text{mol.L}^{-1}$. - (b) Spectre d'absorption associé à la transition $X \rightarrow a$ à 1270 nm du dioxygène dissous dans l'acétone (en noir) et dans l'éthanol (en vert).

L'ajustement donne $V_{ox} = -\frac{d[T]}{dt} \approx 2,94 \cdot 10^{-2} \mu\text{mol.L}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$, soit $V_{ox} \approx 2,94 \cdot 10^{-8} \text{mol.L}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$.

A l'aide de la relation 7.2, en prenant $k_{ox} \approx 11 \cdot 10^8 \text{mol}^{-1} \cdot \text{L} \cdot \text{s}^{-1}$ [188], $[T]_0 \approx 50 \cdot 10^{-6} \text{mol.L}^{-1}$, et $k_s \approx 2 \cdot 10^4 \text{s}^{-1}$ [152], on obtient le taux de production d'oxygène singulet : $\Gamma \approx 3,99 \cdot 10^{-8} \text{mol.L}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$.

Ce taux de production est lié à la section efficace d'absorption par la relation :

$$\Gamma = \frac{I_{1270} \cdot K \cdot \sigma_{1270}}{S_c} \cdot [{}^3\text{O}_2]_d \quad (7.7)$$

où, $[{}^3\text{O}_2]_d$ est la concentration en dioxygène dissous dans le solvant, σ_{1270} est la section efficace d'absorption (cm^2) du dioxygène à 1270 nm, S_c est la surface (cm^2) de solution transverse à la propagation du faisceau d'excitation, I_{1270} est le nombre de photons par unité de temps (s^{-1}) à 1270 nm incidents sur la solution et K est un coefficient rendant compte de l'atténuation du faisceau laser à 1270 nm par absorption du solvant⁵.

En prenant, $S_c \approx 1,4 \text{cm}^2$, $I_{1270} \approx 1,9 \cdot 10^{18} \text{s}^{-1}$ (300mW à 1270 nm), $K \approx 0,98$ (mesuré) et $[{}^3\text{O}_2]_d \approx 2,4 \cdot 10^{-3} \text{mol.L}^{-1}$ [110, 118], on obtient donc la section efficace d'absorption à 1270 nm du dioxygène dans l'acétone : $\sigma_{1270} \approx 1,24 \cdot 10^{-23} \text{cm}^2$.

⁴C'est à dire dans l'acétone irradiée avec une puissance de 300 mW à 1270 nm, pour une concentration initiale en piège de $[T]_0 \approx 50 \mu\text{mol.L}^{-1}$

⁵Il s'écrit : $K = \frac{1}{\alpha_s \cdot L} \{1 - \exp(-\alpha_s \cdot L)\}$, où, α_s est le coefficient d'absorption linéaire (m^{-1}) du solvant, L (m) la longueur de cuve traversée par le laser d'excitation. Ainsi, $\frac{I_{1270} \cdot K}{S_c}$ représente le flux moyen de photons ($\text{photons} \cdot \text{s}^{-1} \cdot \text{cm}^{-2}$) traversant la cuve.

Cette valeur est environ deux fois plus grande que celle obtenue par Krasnovsky *et al.*. Comme le montre la table 7.1, nous avons observé une section efficace deux fois plus grande que celles obtenues par cette équipe dans tous les solvants organiques étudiés.

TAB. 7.1 – Valeurs des sections efficaces obtenues dans différents solvants organiques et comparaison avec les valeurs obtenues par [188]

solvant	Ethanol	Méthanol	Acétone
σ_{1270} en cm^2 ($\pm 6\%$)	$2,1 \cdot 10^{-23}$	$1,5 \cdot 10^{-23}$	$1,2 \cdot 10^{-23}$
σ_{1270} d'après [188] en cm^2 ($\pm 30\%$)	$1 \cdot 10^{-23}$	$0,68 \cdot 10^{-23}$	$0,65 \cdot 10^{-23}$

Nous n'avons pas d'explication concernant l'écart entre nos mesures et celles de Krasnovsky *et al.*. La variation relative des sections efficaces d'absorption à 1270 nm dans les différents solvants organiques étudiés est cependant la même que celle issue des données de Krasnovsky *et al.* (cf. table 7.1). Insistons sur le fait que cette équipe a signalé (cf. [103]) avoir obtenu des valeurs deux fois plus petites que les données extrapolées des phases gazeuses à hautes pressions dans CCl_4 [100, 195]. Il semble donc que les sections efficaces que nous avons déterminées soient en très bon accord avec ces dernières données [100, 195].

De plus, signalons que nous obtenons le même taux de photo-oxygénation de DPIBF à l'aide du dispositif décrit à la figure 7.3 et en mesurant la variation d'absorbance dans un spectromètre avant et après l'irradiation laser⁶.

Enfin, précisons que les valeurs publiées par Krasnovsky *et al.* sont estimées avec une erreur relative de l'ordre de $\pm 30\%$. Dans leurs expériences, l'erreur expérimentale est principalement limitée par la détermination de la concentration en piège, l'évaluation de la puissance laser et par la répétabilité des expériences [103, 108, 187]. En ce qui nous concerne, l'incertitude sur la mesure est estimée à $\sim \pm 6\%$. Celle-ci est principalement due à la détermination de la concentration en DPIBF et aux fluctuations du laser⁷.

Par ailleurs, le spectre d'absorption, associé à la transition $X \rightarrow a$ (figure 7.5 (b)), que nous avons obtenu dans différents solvants, présente des caractéristiques en très bon accord avec les données de la littérature. Le maximum est situé à 1272 ± 2 nm et la largeur à mi-hauteur est de ~ 15 nm (cf. référence [188]).

7.3 Résultats : détermination simultanée de deux paramètres importants

Le dispositif expérimental présenté dans la section précédente nous a permis de valider l'hypothèse selon laquelle la vitesse de disparition du piège, DPIBF, est constante pendant les premières minutes de l'irradiation. Les valeurs des sections efficaces σ_{1270} obtenues dans les différents solvants organiques étudiés présentent un très bon accord avec les données extrapolées des phases gazeuses à hautes pressions [100, 195] et un accord raisonnable, au moins en relatif, avec les valeurs publiées dans la référence [188].

Nous allons maintenant présenter les résultats obtenus grâce à une étude cinétique plus poussée de la réaction de DPIBF et l'oxygène singulet. Nous montrerons, dans un premier temps, que la mesure de la vitesse de disparition de DPIBF en présence d'oxygène singulet produit par excitation directe à 1270 nm permet, en plus de l'évaluation de σ_{1270} , la mesure de la constante bimoléculaire de réaction, k_{ox} , entre les deux réactifs.

Ce résultat doit conduire à préciser les expériences déjà réalisées dans des solutions aqueuses contenant deux pseudo-phases (cf. 7.1.3). Nous présenterons donc, dans un second temps, les perspectives concernant cette partie du travail de thèse.

⁶C'est à dire en employant la même méthode que Krasnovsky *et al.*

⁷La régression linéaire donne les coefficients avec une précision de l'ordre de $\sim 0,1\%$.

7.3.1 Etude de la cinétique de réaction

Les réactions ayant lieu dans la cuve sont de deux types. L'absorption du dioxygène de la radiation à 1270 nm conduit à la formation d'oxygène singulet. L'oxygène singulet peut alors réagir avec DPIBF (réaction 7.1) pour conduire à la formation d'endopéroxydes.

Modélisation :

L'évolution des espèces chimiques interagissant au sein de la cuve peut être décrite par les équations suivantes :

$$\frac{d[{}^1O_2]}{dt} = \Gamma - k_s \cdot [{}^1O_2] - k_{ox} \cdot [{}^1O_2] \cdot [T] \quad (7.8)$$

$$\frac{d[T]}{dt} = -k_{ox} \cdot [{}^1O_2] \cdot [T] \quad (7.9)$$

où $[{}^1O_2]$ et $[T]$ sont les concentrations ($mol.L^{-1}$) d'oxygène singulet et de DPIBF respectivement, k_s (s^{-1}) est le taux de désactivation de l'oxygène singulet (tenant compte des processus radiatifs et non-radiatifs) dans le solvant considéré, k_{ox} est la constante bimoléculaire ($mol^{-1}.L^{-1}$) de réaction entre l'oxygène singulet et le piège et, enfin, Γ est le taux de production d'oxygène singulet ($mol.L^{-1}.s^{-1}$) dans la solution (donné par la relation 7.7).

A l'instant initial, les échelles de temps associées aux variations de concentration d'oxygène singulet sont rapides devant celles liées au piège. En effet, la concentration en DPIBF est de $[T]_0 \approx 50 \mu mol.L^{-1}$, la constante bimoléculaire d'interaction est de l'ordre de $k_{ox} \sim 10^8 mol^{-1}.L^{-1}$ [152] et le temps de vie de l'oxygène singulet dans les solvants considérés est de l'ordre de $\tau_\Delta = k_s^{-1} \sim 10 \mu s$ [152]. Ainsi la constante de désactivation totale de l'oxygène singulet vaut :

$$k = k_s + k_{ox} \cdot [T]_0 \approx 5.10^3 s^{-1},$$

soit une constante de temps inférieure à la milliseconde. Alors qu'expérimentalement l'échelle de temps liée à la variation du piège est de l'ordre de $\tau_T \sim 10^4 s$ ($k_T \sim 10^{-4} s^{-1}$), comme le montre la figure 7.4. Dans ces conditions, on peut donc considérer que l'état quasi-stationnaire est toujours atteint pour l'oxygène singulet. Ainsi, la concentration d'oxygène singulet, $[{}^1O_2]$, suit adiabatiquement la concentration en piège, $[T]$. En annulant la dérivée de l'équation 7.8, on obtient :

$$[{}^1O_2] = \frac{\Gamma}{k_s + k_{ox} \cdot [T]}. \quad (7.10)$$

En remplaçant l'expression 7.10 dans l'équation 7.9, on trouve que la vitesse de disparition du piège s'écrit en fonction de la concentration instantanée en piège, $[T](t)$:

$$V_{disp}(t) = - \frac{d[T]}{dt}(t) = \frac{\Gamma \cdot [T]}{\frac{k_s}{k_{ox}} + [T]}. \quad (7.11)$$

Vitesse de disparition de DPIBF

Expérimentalement, la vitesse de disparition de DPIBF peut être déterminée au cours de l'expérience en différentiant numériquement la courbe expérimentale d'évolution de $[T]$ (figure 7.4).

Ainsi, s'il est possible d'observer la cinétique de décroissance du piège sur une gamme de concentrations suffisante, on peut obtenir, par ajustement de l'expression 7.11 sur la vitesse expérimentale de disparition du piège, une estimation des coefficients Γ et $\frac{k_s}{k_{ox}}$. La courbe rouge de la figure 7.6 montre la vitesse de disparition de DPIBF dans l'acétone de l'expérience de la figure 7.4. La courbe noire représente le meilleur ajustement par régression linéaire de l'expression 7.11 à l'aide du logiciel Igor pro ©. On trouve $\Gamma \approx 3,7.10^{-8} mol.L^{-1}.s^{-1}$ et $\frac{k_s}{k_{ox}} \approx 13,5 \mu mol.L^{-1}$.

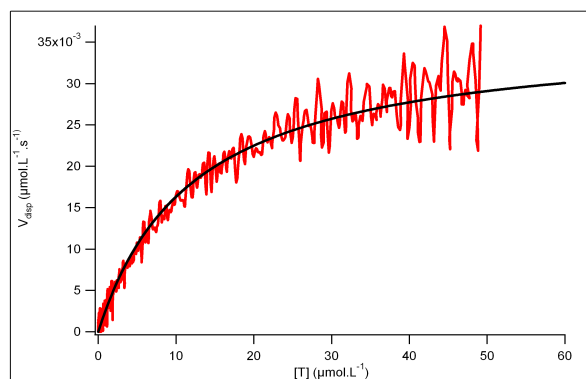


FIG. 7.6 – En rouge, la courbe expérimentale présentant la vitesse de disparition du piège en fonction de la concentration en piège dans l’acétone, pour une concentration initiale de $[T]_0 \approx 50 \mu\text{mol.L}^{-1}$ irradiée à 1270 nm pour une puissance de 300 mW . En noir est représenté le meilleur ajustement de l’expression 7.11

En prenant $k_s \approx 2.10^4$ dans l’acétone [109, 152], on trouve la constante bimoléculaire de réaction $k_{ox} \approx 1,4.10^9 \text{ mol}^{-1}.\text{L}.\text{s}^{-1}$. Cette valeur présente un bon accord avec la valeur utilisée par Krasnovsky *et al.* Elle n’a, à ma connaissance, pas été publiée dans l’acétone (cf. [109, 152]).

De plus, avec $S_c \approx 1,4 \text{ cm}^2$, $I_{1270} \approx 1,9.10^{18} \text{ s}^{-1}$ (300 mW à 1270 nm), $K \approx 0,98$ et $[^3\text{O}_2]_d \approx 2,410^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$ [110, 118], on trouve $\sigma_{1270} \approx 11,5.10^{-23} \text{ cm}^2$. Cette valeur est en accord avec les résultats présentés à la table 7.1.

7.3.2 Conclusions et perspectives

Comme nous l’avons démontré au paragraphe précédent, nous avons pu, grâce à une méthode simple et efficace, estimer simultanément la valeur de la section efficace σ_{1270} d’absorption du dioxygène et la valeur de la constante de réaction de DPIBF avec l’oxygène singulet, k_{ox} .

Les valeurs obtenues présentent un accord raisonnable avec les résultats précédemment publiés dans la littérature tant pour σ_{1270} que pour k_{ox} .

Insistons sur le fait que l’analyse de la vitesse de disparition du piège, $[T]$, a permis de réduire le nombre de paramètres *a priori* nécessaires pour déterminer la section efficace de production d’oxygène singulet à 1270 nm .

Cette méthode n’a, à notre connaissance, jamais été proposée dans la littérature pour la détermination de la constante bimoléculaire de réaction entre DPIBF et l’oxygène singulet (k_{ox}) en solution (cf. [152]) et donne pour la première fois une mesure de k_{ox} dans l’acétone (cf. [152, 188]). Ce résultat (méthode cinétique) devrait faire l’objet d’une publication.

Vers une étude en milieu micellaire...

A l’heure à laquelle j’écris ce manuscrit, les études dans d’autres solvants organiques et dans l’eau contenant diverses concentrations de SDS et, bien sûr, DPIBF, sont encore en cours.

Notre hypothèse de travail est que la cinétique de la réaction est une signature forte et qu’elle permet de vérifier que les interactions sont bien comprises. Nous espérons donc, en solution contenant deux pseudo-phases, confirmer ou infirmer les valeurs de k_{ox} utilisées par Krasnovsky *et al.* [109, 188]. Rappelons que la constante bimoléculaire de réaction en fonction de la fraction volumique est déterminée, dans leurs travaux, par une relation liant k_{ox} à la viscosité macroscopique de la solution et que cette valeur n’a pu être déterminée expérimentalement.

L’étude cinétique doit donc conduire à une détermination de la section efficace à 1270 nm en phase aqueuse. Ce travail, complémentaire à celui de Krasnovsky *et al.* devrait permettre d’aider l’interprétation de leurs résultats dans l’eau et l’eau lourde (cf. 7.1.3).

...pour arriver à la cellule

Nous envisageons d'étendre cette étude cinétique à l'excitation directe de l'oxygène singulet intracellulaire. En effet, il est possible d'incuber des cellules biologiques avec DPIBF [184, 186]. Il est donc *a priori* possible d'estimer la valeur de Γ (reliée à σ_{1270}) et $\frac{k_s}{k_{ox}}$ dans différents compartiments de la cellule contenant DPIBF.

Enfin, remarquons qu'en cellule, une cible biologique de l'oxygène singulet peut jouer le rôle de DPIBF. Une telle étude quantitative, réalisée en cellule pour l'oxygène singulet produit avec un photo-agent, nécessiterait de tenir compte de l'interaction du *PS* dans l'état excité avec la molécule cible [79] et de l'interaction du *PS* avec l'oxygène singulet [89].

Alors que par excitation directe à 1270 *nm*, le système épuré du photo-agent doit permettre de s'affranchir des interactions liées au *PS* et donc de faciliter l'analyse des données.

A titre d'exemple, l'anti-oxydant NAD(P)H⁸ semble un bon candidat pour l'étude de la réaction de l'oxygène singulet créé en cellule. Son implication dans la protection des autres molécules contre l'oxygène singulet créé dans la mitochondrie a été mise en évidence [79]. Cette molécule a un rôle de « barrière » anti-oxydante [79]. Cette espèce présente des bandes d'absorption (~ 340 *nm*) et d'émission (~ 460 *nm*) naturelle qui permettent sa visualisation par microscopie de fluorescence dans des hépatocytes⁹.

⁸NA(D)PH est une molécule réductrice qui participe au métabolisme des cellules. Son principal rôle est de fournir un électron dans les réactions de synthèse, mais c'est aussi un anti-oxydant [40].

⁹Les hépatocytes sont des cellules de foie qui ont une grande activité énergétique et qui sont, par conséquent, riches en NAD(P)H [79, 156].

Conclusions

Dans la première partie de ce manuscrit nous nous sommes intéressés à l'effet sur des cellules biologiques d'une radiation lumineuse dont l'énergie coïncide avec l'écart d'énergie entre l'état fondamental et le premier état électronique excité du dioxygène, l'oxygène singulet. Celui-ci est considéré comme l'agent cytotoxique majeur de la photothérapie dynamique et, dans ce traitement du cancer, l'oxygène singulet est traditionnellement créé *via* l'activation par la lumière d'un agent photosensible.

Bien que la transition ${}^3O_2 \longrightarrow {}^1O_2$ soit interdite à l'ordre dipolaire électrique, nous avons démontré que l'irradiation laser à 1270 nm peut, au moins *in vitro*, conduire à la mort des cellules irradiées et que la mort cellulaire est due à la production sans photo-agent d'oxygène singulet. A notre connaissance, ce travail montre pour la première fois que l'oxygène singulet peut être créé en milieu vivant sans utiliser d'intermédiaire réactionnel comme le photo-agent et que cette quantité est suffisante pour conduire à un effet biologique comme la mort cellulaire.

En PDT traditionnelle, l'utilisation d'un tel intermédiaire peut rendre l'interprétation de l'effet cytotoxique de l'oxygène singulet complexe voire incomplète. Nous pensons que l'excitation directe de l'oxygène singulet sans photo-agent ouvre des perspectives intéressantes pour la compréhension des effets et du rôle de l'oxygène singulet en milieu vivant.

En particulier, l'utilisation d'une irradiation laser à 1270 nm doit permettre *in vitro*, par comparaison à des expériences utilisant un photo-agent, de différencier la part due à l'oxygène singulet de la part due au photo-agent (type I *versus* type II) dans la mort cellulaire.

Pour démontrer l'implication de l'oxygène singulet dans la mort cellulaire dans nos expériences d'irradiation, nous avons mis en place, entre autres, une méthode de thermométrie *in situ* qui nous a permis d'estimer l'élévation de température induite par le laser.

Par ailleurs, l'exposition à un stress hyperthermique dans diverses conditions des cellules MCF-7 a montré une forte sensibilité de la mort cellulaire par rapport à la température et à la durée du stress¹⁰.

L'implication du stress hyperthermique dans l'éradication de tumeurs *in vivo* par irradiation laser à 1270 nm [114] reste ouverte. L'étude d'effets synergiques ou antagonistes d'un stress oxydant et d'un stress hyperthermique semble donc pertinente. Je pense que les méthodes expérimentales que nous avons mises en place peuvent contribuer à une telle étude. Pour ce faire, remarquons que le laser accordable que nous avons conçu permet, simplement en changeant la longueur d'onde, de faire varier le rapport entre un stress thermique et un stress oxydant.

A l'échelle d'une ou quelques cellules, on peut, par exemple, s'intéresser au recrutement du facteur de transcription HSF1 qui promeut la transcription de protéines chaperons telles que Hsp70 lorsque la cellule est soumise à un stress hyperthermique [61]. De même, le stress oxydant induit par l'oxygène singulet en PDT peut conduire à la transcription de protéines chaperons (dont Hsp70) [196].

Enfin, il me semble que la méthode non-invasive de production de l'oxygène singulet que nous proposons peut donner un aperçu de mécanismes de réponse de la cellule à l'oxygène singulet. On peut, par exemple, s'intéresser à l'interaction de l'oxygène singulet avec des anti-oxydants endogènes ou à la formation d'ERO secondaires. De telles réponses cellulaires peuvent avoir une dépendance spatiale à l'échelle de la cellule (échelle moléculaire, échelle de l'organite ou échelle de la cellule) [151] ou à l'échelle inter-cellules [93, 197, 198].

A l'échelle de plusieurs cellules, des travaux ont montré que des cellules non-photosensibilisées peuvent répondre à un traitement par PDT [197] : on parle d'effet « bystander ». Ces réponses ne sont, *a priori*, pas transmises par communication inter-cellulaire et peuvent être véhiculées par l'intermédiaire de l'oxygène singulet diffusant au travers de la membrane [92, 93] ou d'ERO secondaires générés sur le lieu de production [198].

¹⁰Rappelons que 100% de mort cellulaire est observée pour une exposition à 49 °C pendant 1 h, alors qu'à 48 °C pour le même temps seulement ~ 5% des cellules ne meurent.

Le système expérimental que nous avons développé permet de s'intéresser à une population de cellules. Il s'agit d'une échelle intermédiaire entre la tumeur *in vivo* et la cellule unique qui semble pertinente pour l'étude d'un effet de type « by stander ».

A l'échelle de la cellule unique, on peut envisager de produire l'oxygène singulet dans la mitochondrie à l'aide d'un laser à 1270 nm focalisé. Une telle étude menée à l'aide d'un *PS* nécessiterait de synthétiser ou de choisir un *PS* s'accumulant préférentiellement dans la mitochondrie. Et la réponse serait alors issue de deux espèces cytotoxiques.

Afin de pouvoir conduire, à terme, une étude quantitative de ces phénomènes nous avons souligné l'importance de la détection et, dans ce contexte, nous avons proposé deux méthodes de détection de l'oxygène singulet créé sans photo-agent permettant l'étude des interactions de cette espèce avec des molécules composant la cellule. Les deux possibilités ont été étudiées dans des solvants à pression et température ambiantes pour dégager les difficultés et évaluer la faisabilité en cellule.

La première technique associe l'excitation, sans photo-agent, du dioxygène dans l'état singulet (à 765 nm, 1070 nm et 1270 nm) et la détection de sa phosphorescence à 1270 nm par comptage de photons résolue en temps. Cette détection permet la mesure du temps de vie de l'oxygène singulet. Nous avons mis en place un dispositif permettant de tester cette méthode. La calibration de ce dispositif nous a conduit à écarter cette possibilité pour l'étude en milieu vivant au vu des densités de puissance nécessaires. Cependant nous avons pu estimer que l'utilisation d'un détecteur fenêtrable et possédant une meilleure efficacité doit conduire à la réalisation de cette détection en solution.

Enfin, la seconde méthode utilise un piège chimique, DPIBF, réagissant avec l'oxygène singulet. Nous avons conduit une étude cinétique de la réaction entre ces deux espèces. Nous avons ainsi pu montrer qu'il est possible en solution de simultanément mesurer la quantité d'oxygène singulet produite par excitation directe à 1270 nm et de quantifier l'interaction de l'oxygène singulet avec le piège. Insistons sur le fait que ceci a été effectué en ne détectant qu'une seule des deux espèces (DPIBF).

Ce résultat a permis, en particulier, l'estimation de la valeur de la constante de réaction k_{ox} entre DPIBF et l'oxygène singulet dans l'acétone. Cette valeur n'était jusqu'à présent pas publiée et c'est, à notre connaissance, la première fois qu'une telle étude cinétique est proposée pour l'étude des réactions impliquant l'oxygène singulet. Ces travaux doivent permettre de compléter des études concernant la création d'oxygène singulet *via* la transition $X \longrightarrow a$ à 1270 nm dans des solutions aqueuses contenant deux pseudo-phases. Ils constituent un premier pas vers l'étude d'un système non-homogène, plus complexe, pour, à terme, étudier les réactions de l'oxygène singulet en cellule.

Annexes

Annexe A

Protocole de culture cellulaire et de coloration des cellules

A.1 Culture cellulaire

A.1.1 Cellules MCF-7

La lignée épithéliale de cancer du sein MCF-7 a été fournie par ATCC. Ces cellules sont cultivées en routine et en monocouche en présence de milieu de culture « Minimum Essential Medium Eagle - Earle's BBS » complété avec 10% de sérum de veau foetal, 2 mM de L-Glutamine et 40 U/ml de pénicilline-Streptomycine.

Ces cellules sont cultivées à 37°C en atmosphère humide dans un incubateur à 5% de CO₂ et 95% d'air. Le milieu est renouvelé toutes les 48 heures.

A.1.2 Cellules PC12

La lignée de Phéochromocytome PC12 a également été fournie par ATCC. Cette lignée provient d'un cancer endocrinien de la glande médullo-surrénale et représente dans ce travail un autre type cellulaire appartenant de surcroît à un autre type de mammifère : le rat. Ces cellules sont cultivées dans du milieu « Dulbecco's modified Eagle's medium » à 4,5 g/L de glucose et contenant 10% de sérum de veau foetal, 5% de sérum de cheval, 2 mM de L-glutamine et les antibiotiques.

Les conditions de culture sont les mêmes que celles précédemment décrites pour MCF-7.

A.2 Coloration et marquage

A.2.1 Test d'exclusion au bleu Trypan

La mort cellulaire après irradiation au laser a été analysée par incubation des cellules en présence du colorant de synthèse bleu Trypan.

Ce dernier est soluble dans l'eau et diffuse très rapidement au travers des membranes plasmiques lésées de cellules mortes, celles-ci sont alors visibles en bleu au microscope photonique inversé. Ce colorant diffuse très lentement au travers des membranes intactes des cellules viables et ces dernières sont, en plus, capables de l'exclure, elles sont réfringentes au microscope.

Après irradiation, les cellules sont rincées avec un tampon physiologique PBS et incubées avec une solution de bleu Trypan à 0,2% puis observées au microscope.

A.2.2 Visualisation du noyau au Hoechst 33258

Cette molécule est un intercalant de l'ADN qui fluoresce sous excitation UV à 350 nm (émission à 460 nm).

Il est utilisé en biologie afin d'observer les noyaux des cellules. Il permet notamment la visualisation d'une éventuelle fragmentation de l'ADN.

Dans notre étude, après irradiation, les cellules sont rincées au PBS, puis incubées à l'obscurité en présence d'une solution de Hoechst ($1 \mu\text{g.ml}^{-1}$) pendant 10 minutes à température ambiante. Après deux rinçages délicats au PBS, les cellules sont observées en microscopie à fluorescence sous excitation UV.

A.2.3 Test Annexine V - Iodure de Propidium

Le Iodure de Propidium est un agent intercalant des acides nucléiques, couramment utilisé comme marqueur fluorescent de l'ADN (excitation à 488 nm , émission à 617 nm). Il marque la perte de l'intégrité membranaire.

Les annexines sont une famille de protéines capables de se fixer avec une bonne affinité aux phosphatidylsérines. Dans les cellules normales, les phosphatidylsérines sont situées à l'intérieur de la cellule. Lors de la mort cellulaire, on observe une inversion des feuilletts lipidiques de la membrane plasmique. La cellule expose alors les phosphatidylsérines à l'extérieur de la cellule et permet la fixation des annexines. Nous avons utilisé une annexine fusionnée à la FITC (Fluorescéine Isothiocyanate) qui permet la visualisation par microscopie de fluorescence (excitation à 488 nm , émission à 520 nm).

Dans notre étude, nous avons utilisé le kit de marquage IP/Annexine V de chez Roche Applied Science et suivi le protocole d'utilisation tel qu'il est recommandé par le constructeur pour cellules adhérentes.

Annexe B

Le problème de Poisson avec conditions aux limites mixtes : formulation faible et résolution numérique de l'équation de la chaleur

La solution de l'équation de Poisson pour des conditions aux limites données n'est souvent pas analytique. Ceci va nous conduire à résoudre notre problème de diffusion de la chaleur numériquement, par la méthode des éléments finis, à l'aide d'un logiciel dédié : FreeFem++ [134]. Ce logiciel impose d'utiliser la formulation faible (ou variationnelle) des équations aux dérivées partielles qui, souvent, représente la conservation d'une grandeur physique globale comme par exemple l'énergie.

Les éléments mathématiques présentés ici sont une particularisation de l'analyse variationnelle des équations aux dérivées partielles à l'équation de la chaleur. Le lecteur intéressé par l'analyse de ce type d'équations et l'approximation pour la résolution numérique pourra se reporter à l'ouvrage [199]. Ma compréhension de ce formalisme mathématique et l'application à l'équation de la chaleur qui est maintenant un « cas d'école » a été fortement aidée par la lecture du cours de Laurent-Gengoux de l'école Centrale de Paris [200].

Cette section très technique présente le formalisme utilisé pour résoudre numériquement le problème d'échauffement présenté au chapitre 3. La situation est celle décrite au schéma 3.1, un laser traverse la boîte de Petri en plastique et le milieu de culture. Une partie de l'énergie est convertie en chaleur.

Dans un premier temps, nous exposerons quelques théorèmes et définitions nécessaires à l'obtention de la formulation faible, pour ensuite appliquer cette formulation à l'équation de la chaleur avec terme source. Nous verrons alors comment certaines conditions aux limites peuvent être incluses dans la formulation du problème. Puis nous proposerons une interprétation géométrique de la formulation, afin d'évoquer la question de l'existence d'une solution et de présenter succinctement la méthode de Ritz-Galerkin d'approximation des solutions. Enfin nous exprimerons le problème qui nous intéresse sous cette forme.

B.1 Préambule mathématique :

Nous présentons ici quelques éléments de mathématiques qui nous serviront à établir une formulation faible d'un problème d'équations aux dérivées partielles.

B.1.1 Formule de Stokes :

On note $\vec{x} \cdot \vec{y}$ le produit scalaire canonique sur \mathbb{R}^N .

Théorème B.1.1. Soient u et v des fonctions définies sur un domaine $\Omega \subset \mathbb{R}^N$, et $\vec{\Phi}$ un champ de vecteur de Ω . Enfin, \vec{n} est le vecteur normal unitaire orienté vers l'extérieur en tout point du

bord Γ de Ω .

$$\int_{\Omega} \vec{\Phi} \cdot \vec{\nabla} v d\Omega = \int_{\Omega} -\vec{\nabla} \cdot \vec{\Phi} v d\Omega + \int_{\Gamma} \Phi_n v d\Gamma \quad (\text{B.1})$$

, où Φ_n est le produit scalaire $\vec{\Phi} \cdot \vec{n}$.

B.1.2 Espace Hilbertien :

Un espace hilbertien est la généralisation en dimension infinie d'un espace euclidien.

Définition B.1.2.1. Un espace **pré-hilbertien** est un \mathbb{K} -espace vectoriel muni d'un produit scalaire. Dans le cas où \mathbb{K} est \mathbb{R} (respectivement \mathbb{C}), ce produit scalaire est euclidien (respectivement hermitien) et définit une norme euclidienne (respectivement hermitienne).

Définition B.1.2.2. Un espace **complet** est formellement défini par la convergence des suites de Cauchy vers un élément de cet espace. Intuitivement, c'est un espace pour lequel il ne manque pas d'élément. Par exemple, l'ensemble des réels \mathbb{R} est un espace complet pour la mesure habituelle. Alors que l'ensemble \mathbb{Q} des rationnels n'est pas un espace complet¹.

Définition B.1.2.3. Un espace **hilbertien** est un espace pré-hilbertien complet.

B.1.3 Théorème de Lax-Milgram :

Ce théorème nous servira à formuler des problèmes bien posés (existence et unicité de la solution). Soit V un espace de Hilbert².

Théorème B.1.2. Si $\mathcal{L}(u)$ est une forme linéaire continue et, $a(u, v)$ une forme bilinéaire, continue et coercive³, alors le problème :

$$\begin{cases} u \in V \\ \forall v \in V, a(u, v) = \mathcal{L}(v) \end{cases} \quad (\text{B.2})$$

admet⁴ une solution unique.

B.2 Forme variationnelle du problème de Poisson :

Dans cette section nous allons établir la formulation faible du problème de Poisson (équation stationnaire de la chaleur avec terme source), pour un jeu de conditions aux limites mixtes. On distinguera ici deux types de conditions aux limites. Sur une partie des bords la température est imposées par l'extérieur (conditions de Dirichlet), sur d'autres la convection impose une relation entre température et flux de chaleur (conditions de Fourier).

B.2.1 Le problème aux dérivées partielles :

On note λ la conductivité thermique ($W.K^{-1}.m^{-1}$) supposée homogène, h un coefficient de transfert ($W.m^{-2}$) moyen dû à la convection, $u \in C^2(\Omega)$ le champ de température, et p la puissance volumique ($W.m^{-3}$) déposée dans le milieu. La puissance volumique est ici un terme source non homogène. u_0 et u_{∞} sont des constantes.

¹La suite $\forall a \in \mathbb{R}^+ / u_0 = 1 \text{ et } \forall n > 0 u_{n+1} = \frac{1}{2}(u_n + \frac{a}{u_n})$ est de Cauchy sur \mathbb{Q} et converge vers \sqrt{a} . Elle diverge donc dans \mathbb{Q} .

²Il faut bien noter ici que, dans notre cas, V sera un espace de fonctions. Le produit scalaire défini ici ne sera pas le produit scalaire canonique comme dans la formule de Stokes mais un produit scalaire de deux fonctions.

³c'est-à-dire : $\exists \alpha > 0, \forall u \in V, |a(u, u)| \geq \alpha \langle u, u \rangle$

⁴remarque : Si la forme $a(u, v)$ est symétrique, c'est le fait que l'espace V soit complet qui implique l'existence de la solution.

Soient, Ω un domaine borné de \mathbb{R}^3 , Γ son contour et, Γ_0 et Γ_1 des parties du contour tels que $\Gamma = \Gamma_0 \cup \Gamma_1$. Le problème de diffusion, s'écrit :

$$\begin{cases} -\lambda \nabla^2 u = p & \text{sur } \Omega \\ u = u_0 & \text{sur } \Gamma_0 \\ -\lambda \frac{\partial u}{\partial n} = h(u - u_\infty) & \text{sur } \Gamma_1 \end{cases} \quad (\text{B.3})$$

B.2.2 Formulation faible :

En multipliant à gauche l'équation (B.3) par une fonction v , appartenant à un espace que nous définirons ensuite, et en intégrant sur tout le volume Ω , on obtient :

$$\iiint_{\Omega} -\lambda \nabla^2 u v d\Omega = \iiint_{\Omega} p v d\Omega$$

En posant $\vec{\Phi} = \vec{\nabla} u$ dans la formule de Stokes (B.1), il vient⁵ :

$$\iiint_{\Omega} \lambda \vec{\nabla} u \cdot \vec{\nabla} v d\Omega - \iint_{\Gamma} \lambda \vec{\nabla} u \cdot \vec{n} d\Gamma = \iiint_{\Omega} p v d\Omega \quad (\text{B.4})$$

En choisissant v une fonction nulle sur la partie Γ_0 du bord, il reste :

$$\iiint_{\Omega} \lambda \vec{\nabla} u \cdot \vec{\nabla} v d\Omega - \iint_{\Gamma_1} \lambda \vec{\nabla} u \cdot \vec{n} d\Gamma_1 = \iiint_{\Omega} p v d\Omega \quad (\text{B.5})$$

Enfin, en utilisant la dernière condition au bord Γ_1 du problème (B.3) :

$$\iiint_{\Omega} \lambda \vec{\nabla} u \cdot \vec{\nabla} v d\Omega + \iint_{\Gamma_1} h u v d\Gamma_1 = \iiint_{\Omega} p v d\Omega + \iint_{\Gamma_1} h u_\infty v d\Gamma_1 \quad (\text{B.6})$$

C'est la formulation faible (ou variationnelle) du problème. On peut remarquer qu'en prenant $v \equiv 1$ dans l'équation (B.4), on trouve une relation traduisant la conservation du flux de chaleur. De plus, la formulation (B.6) garde un sens quand la conductivité λ est constante par morceau comme nous le verrons plus loin. Enfin, notons que la condition aux limites de type Fourier a pu être incluse dans l'équation (B.6).

Définition B.2.2.1. Soit U_0 , l'ensemble des fonctions $C^2(\Omega)$ telles que : $u|_{\Gamma_0} = u_0$.

Définition B.2.2.2. Soit V_0 , l'ensemble des fonctions $C^1(\Omega)$ telles que : $v|_{\Gamma_0} = 0$.

En posant,

$$\begin{aligned} a(u, v) &= \iiint_{\Omega} \lambda \vec{\nabla} u \cdot \vec{\nabla} v d\Omega + \iint_{\Gamma_1} h u v d\Gamma_1 \\ \mathcal{L}(v) &= \iiint_{\Omega} p v d\Omega + \iint_{\Gamma_1} h u_\infty v d\Gamma_1 \end{aligned}$$

le problème (B.3) peut s'écrire sous la forme abstraite :

$$\begin{cases} u \in U_0 \\ \forall v \in V_0, a(u, v) = \mathcal{L}(v) \end{cases} \quad (\text{B.7})$$

⁵notons que l'utilisation de la formule de Stokes impose à v d'être au moins $C^1(\Omega)$

B.2.3 Equivalence des deux formulations :

La démonstration se décline en plusieurs temps. Premièrement, il est évident que les équations (B.3) impliquent la forme faible (B.6). Ensuite, la proposition (B.8) ci-dessous permet, en réutilisant la formule de Stokes,⁶ (B.1) à l'équation (B.6) de retrouver la première équation du système (B.3), car l'intégrale sur le bord disparaît.

Proposition B.2.1.

$$\forall v \in C_0^1(\Omega), \iiint_{\Omega} gvd\Omega = 0 \Rightarrow g \equiv 0 \quad (\text{B.8})$$

Enfin, sachant maintenant que u est bien solution de (B.3), en appliquant une fois encore la formule de Stokes et en utilisant la propriété (B.8), on vérifie que l'intégrale sur le bord Γ_1 est nulle. Ce qui montre que la formulation (B.6) implique la condition limite de Fourier.

B.3 Interprétation de la formulation faible : que peut-on en tirer ?

Après avoir donné une interprétation géométrique de la forme faible, nous évoquerons rapidement les questions liées à l'existence et l'unicité d'une solution aux problèmes (B.3 et B.6), puis nous introduirons une méthode d'approximation des solutions par éléments finis. Enfin, nous traiterons le cas d'une conductivité non-uniforme, pour montrer que la forme faible reste la même.

B.3.1 Interprétation algébrique :

Nous avons pu établir une formulation abstraite (B.7) équivalente au problème de Poisson avec conditions aux limites mixtes. La forme bilinéaire $a(u, v)$ est symétrique et définie positive⁷, elle définit donc un produit scalaire. Dans ce contexte, la solution u du problème s'interprète comme un vecteur de V_0 qui représente la forme linéaire $\mathcal{L}(v)$ par le produit scalaire ainsi défini.

En dimension finie, c'est un problème matriciel, toute forme linéaire peut être représentée ainsi : il y a toujours une solution. En dimension infinie, l'existence d'une unique solution reste vraie dans un espace de Hilbert.

C'est cette interprétation algébrique qui, comme nous allons le voir, permettra de discuter de manière générale l'existence d'une solution unique et sera à la base d'une méthode efficace d'approximation des solutions par éléments finis.

B.3.2 Existence et unicité de la solution :

Nous avons pu, grâce à la forme (B.7), écrire le problème de la chaleur sous une forme analogue à l'expression (B.2) du théorème de Lax-Milgram (B.1.2). Nous ne pouvons cependant pas conclure sur l'existence. En effet, l'espace des fonctions V_0 n'est pas complet pour la norme définie par le produit scalaire $a(u, v)$ et même la plupart des normes usuelles sur les espaces de fonctions. Ce n'est donc pas un espace de Hilbert.

Il faudrait donc compléter l'espace V_0 pour notre produit scalaire. Cependant, celui-ci est équivalent à certains produits scalaires naturels qui définissent les espaces de Sobolev qui, physiquement, sont des espaces d'énergie finie. Un exposé, même incomplet, nous conduirait à des développements mathématiques que nous voulons éviter ici et qui, je dois l'avouer dépassent le cadre de mes compétences. Retenons simplement que les espaces H^1 et $H_0^1(\Omega)$ définis par (B.3.2.1 et B.3.2.2) sont adaptés à notre problème [199].

Proposition B.3.1. $\forall u, v \in V_0, (u, v) = \int_{\Omega} \nabla u \nabla v + uv d\Omega$ est un produit scalaire.

Soit $\|u\|_{H^1} = \sqrt{(u, u)}$ la norme associée.

⁶on pose ici encore $\vec{\Phi} = \vec{\nabla} u$.

⁷ie. $\forall u \neq 0, a(u, u) > 0$.

Définition B.3.2.1. L'espace de Sobolev $H^1(\Omega)$ est le compété $C^1(\Omega)$ pour la norme $\|u\|_{H^1}$.

Définition B.3.2.2. L'espace de Sobolev $H_0^1(\Omega)$ est le compété V_0 pour la norme $\|u\|_{H^1}$.

Remarquons que seule l'existence est remise en cause en dimension infinie. En effet, l'unicité est assurée par le fait que $a(u, v)$ soit définie positive : on peut montrer que si u_1 et u_2 sont solutions, alors $a(u_1 - u_2, u_1 - u_2) = 0$.

B.3.3 Application à la méthode des éléments finis : Méthode de Ritz-Galerkin

Fort de l'interprétation géométrique de la formulation faible du problème, on peut maintenant aisément décrire une méthode d'approximation de notre problème aux limites. Il s'agit de la méthode de Ritz-Galerkin, qui consiste à restreindre l'espace des fonctions V_0 à un sous-espace de dimension finie et à résoudre un problème devenu matriciel. Soit V_h un sous-espace de V_0 de dimension finie. Ici, h est un paramètre qui mesure *a priori* la précision. Une approximation $u_h \in V_h$ de la solution u du problème (B.6) est la projection de u sur V_h au sens de la norme définie par le produit scalaire $a(u, v)$.

En pratique, pour des problèmes dont la solution est régulière dans un domaine carré ou cubique, on utilise un sous-espace de polynômes orthogonaux. A titre d'exemple, une fonction quelconque peut être bien approchée par des fonctions affines par morceaux : pour s'en convaincre on peut remarquer qu'une courbe peut-être approchée de façon stable par un polyèdre. On choisira alors un espace de polynômes par morceaux sur des partitions du domaine : c'est la méthode des éléments finis. On découpera donc le domaine en éléments (triangles) et le paramètre h sera la hauteur du plus grand triangle.

Reste alors une petite difficulté technique, on s'est jusqu'alors intéressé à des espaces de fonctions continues. Or dans notre sous-espace V_h , les fonctions seront continues mais seulement dérivables par morceaux. Pour « s'en sortir », on peut définir V_0 comme un ensemble de fonctions continues et dérivables dans chaque sous domaine. La formule de Stokes reste alors applicable dans chaque partition indépendamment. Et il suffit de vérifier que les intégrales sur les bords s'annulent deux à deux (à la manière du paragraphe B.4.1) pour conduire à la même forme faible.

B.4 Retour sur notre problème d'échauffement :

B.4.1 Cas de grandeurs définies par morceaux :

Dans notre problème, décrit par la figure (3.1), il y a discontinuité de la conductivité λ à l'interface plastique-liquide. Celle-ci est prise en compte en considérant l'équation de diffusion dans deux sous-domaines Ω_P et Ω_L et en tenant compte de la continuité du flux de chaleur à l'interface γ qui s'écrit :

$$-\lambda_L \vec{\nabla} u \cdot \vec{n} = \lambda_P \vec{\nabla} u \cdot \vec{n} \quad (\text{B.9})$$

où λ_L est la conductivité thermique du liquide et λ_P est la conductivité thermique du plastique.

Les développements qui suivent permettent aussi de montrer que l'on peut choisir, pour l'espace des solutions, un espace de fonctions définies par morceaux seulement. Soit Ω_L et Ω_P deux partitions d'un domaine Ω .

On a :

$$\iiint_{\Omega} -\lambda \nabla^2 u v d\Omega = \iiint_{\Omega_L} -\lambda \nabla^2 u v d\Omega_L + \iiint_{\Omega_P} -\lambda \nabla^2 u v d\Omega_P = \iiint_{\Omega} p v d\Omega$$

On peut toujours appliquer le théorème de Stokes (B.1) à chacun des sous-domaines Ω_1 et Ω_2 . La seule différence avec l'équation (B.5) est l'ajout de deux intégrales sur la frontière γ . En tenant compte de l'égalité du flux sur ce bord (équation B.9), ce terme disparaît et on obtient la forme faible usuelle (B.6) en prenant $\Omega = \Omega_1 \cup \Omega_2$.

Pour la résolution numérique, il faudra juste, pour le calcul de la matrice dite de raideur, tenir compte des valeurs variables des coefficients. Ce que fait le logiciel FreeFem++.

B.4.2 Passage en coordonnées cylindriques : prise en compte de la symétrie du problème

Notre problème d'échauffement présente une symétrie par rapport à l'axe (Oz). Les coordonnées cylindrique s'impose donc comme le bon choix de coordonnées. On montre que dans ce système de coordonnées :

$$\begin{aligned}\vec{\nabla} u \cdot \vec{\nabla} v &= \frac{\partial u}{\partial x} \frac{\partial v}{\partial x} + \frac{\partial u}{\partial y} \frac{\partial v}{\partial y} + \frac{\partial u}{\partial z} \frac{\partial v}{\partial z} \\ &= \frac{\partial u}{\partial r} \frac{\partial v}{\partial r} + \frac{1}{r^2} \frac{\partial u}{\partial \theta} \frac{\partial v}{\partial \theta} + \frac{\partial u}{\partial z} \frac{\partial v}{\partial z}\end{aligned}$$

Par symétrie, la solution u du problème ne dépend pas de l'angle θ , on obtient donc en définitive pour notre problème d'échauffement :

$$\left\{ \begin{array}{l} \text{trouvez } u \in H^1(\Omega) \text{ tel que :} \\ \forall v \in H_0^1(\Omega), \\ \int_0^{R_0} \int_0^{e+L} \lambda \left(\frac{\partial u}{\partial r} \frac{\partial v}{\partial r} + \frac{\partial u}{\partial z} \frac{\partial v}{\partial z} \right) r dr dz + \int_0^{R_0} h u v r dr = \int_0^{R_0} \int_0^{e+L} p v r dr dz + \int_0^{R_0} h u_\infty v r dr \end{array} \right. \quad (\text{B.10})$$

où,

- Ω est le cylindre de rayon R_0 et de hauteur $e + L$;
- λ est la conductivité thermique qui prend les valeurs λ_P pour $z < e$ et λ_L pour $z > e$;
- et, p le terme source défini à la section 3.1.2.

Annexe C

Profondeur de champ et contribution des plans au-dessus du plan objet en microscopie de fluorescence

Nous allons nous intéresser à la contribution sur l'image des plans au-dessus du plan des cellules (plan $z = 0$ de la figure 3.1), les plans situés en dessous ne fluorescent pas car il n'y a pas de colorant dans l'épaisseur de plastique.

Dans tout ce qui suit, pour plus de clareté, les lettres suivies du symbole *prime* feront référence à des variables de l'espace image, alors que les lettres non-accollées du symbole *prime* seront associées aux variables de l'espace objet, comme illustré à la figure C.1.

C.1 Introduction géométrique de la profondeur de champ

Comme l'illustre la figure C.1, l'image formée par le microscope est la superposition, sur le plan image, d'« imagettes » provenant de plans objets adjacents. Un point situé dans le plan objet donnera dans le plan image une tache suffisamment fine pour être considérée comme ponctuelle. Par contre, les rayons provenant d'un point situé avant ou après le plan de mise au point convergent après ou avant le plan image. Ceci conduit à une tache d'autant plus large que l'on s'éloigne du plan objet. L'« imagette » devient donc de plus en plus floue à mesure que l'on s'éloigne de la mise au point.

En microscopie, comme en photographie, on définit une épaisseur Δz pour laquelle l'image formée est considérée nette : la profondeur de champ. C'est une notion intuitive dont la définition, assez arbitraire, nécessite l'introduction de la limite de résolution. Cette limite de résolution résulte du fait que l'image est limitée par la diffraction : il y a une relation entre le spectre angulaire et la distribution spatiale d'intensité de l'onde lumineuse. Dans notre cas, c'est l'objectif de microscope qui est l'ouverture limitante.

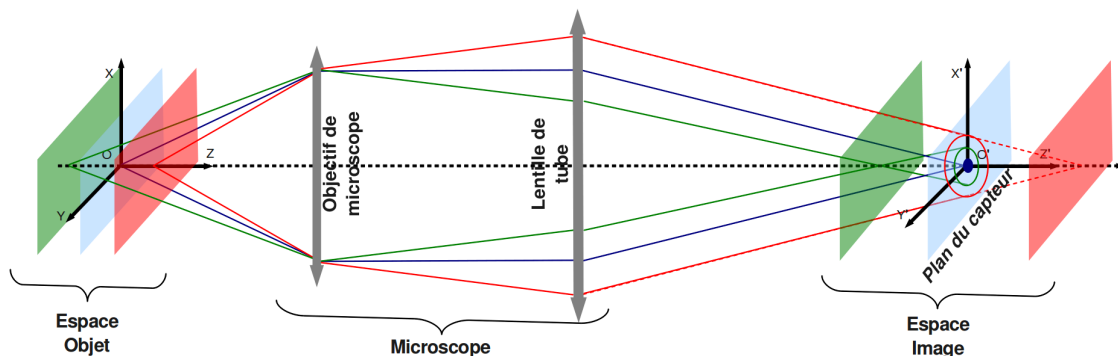


FIG. C.1 – Définition géométrique de la profondeur de champ.

C.2 Limite de résolution

Comme l'illustre la figure C.2, un point source, de coordonnées $(x_0; y_0)$ dans le plan focal objet, donne naissance à une onde sphérique qui converge vers le point image géométrique $(x'_1 = M.x_0; y'_1 = M.y_0)$ dans le plan focal image, où M est le grandissement du microscope. Cette onde sphérique est limitée par la diffraction au travers de l'ouverture limitante qui est ici la pupille d'entrée de l'objectif de microscope. Dans l'approximation paraxiale, l'amplitude lumineuse autour du point géométrique image considéré est simplement la figure de diffraction de Fraunhofer de la pupille limitante, et l'image est une convolution de l'image prévue par l'optique géométrique et une réponse impulsionnelle déterminée par l'ouverture limitante [191].

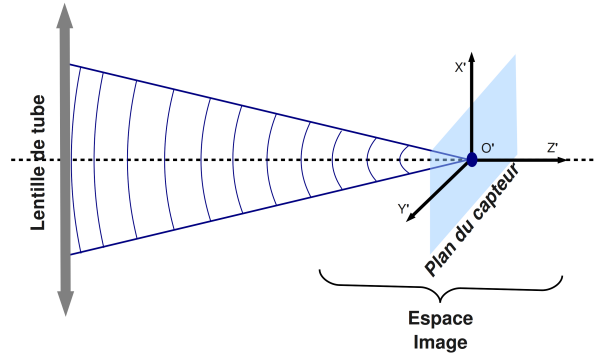


FIG. C.2 – Représentation schématique de l'onde issue d'un point source convergent vers le point image géométrique de celui-ci.

Dans ce qui suit, nous allons considérer la lumière émise par fluorescence comme spatialement incohérente¹ et donc travailler avec l'intensité plutôt qu'avec l'amplitude du champ lumineux. Dans ce cas, la réponse impulsionnelle, Point Spread Function (PSF) en anglais, est simplement la distribution d'intensité de la figure de diffraction de Fraunhofer [143, 191, 201]. Dans le cas d'une ouverture circulaire, comme c'est le cas pour l'objectif de microscope, cette figure est connue sous le nom de disque de Airy. L'intensité est, dans le plan image, proportionnelle à [143, 191, 192, 201, 202] :

$$PSF'_{2D}(r') = 4. \left(\frac{J_1 \left(\frac{\pi.a}{\lambda f_o} \cdot \frac{r'}{M} \right)}{\frac{\pi.a}{\lambda f_o} \cdot \frac{r'}{M}} \right)^2$$

où J_1 la fonction de Bessel de première espèce d'ordre 1, r' la distance au point image géométrique considéré, f_o la distance focale de l'objectif, λ la longueur d'onde d'émission et a le diamètre de l'ouverture.

Il est courant d'introduire l'ouverture numérique de l'objectif qui est une donnée du constructeur :

$$ON = n_0 \cdot \sin(\alpha) \approx \frac{a}{2.f_o} \quad (C.1)$$

La PSF-2D est alors définie dans le plan image par l'équation C.2 qui est représentée à la figure C.3 dans le cas de notre objectif 4x :

$$PSF'_{2D}(r') = 4. \left(\frac{J_1 \left(\frac{2\pi}{\lambda} \cdot ON \cdot \frac{r'}{M} \right)}{\frac{2\pi}{\lambda} \cdot ON \cdot \frac{r'}{M}} \right)^2 \quad (C.2)$$

¹C'est à dire que les phase relatives des ondes lumineuses émises en deux point différents sont statistiquement indépendantes. La réponse du système diffractant est donc linéaire en intensité et les intégrales de superposition se résument à des sommes en intensités.

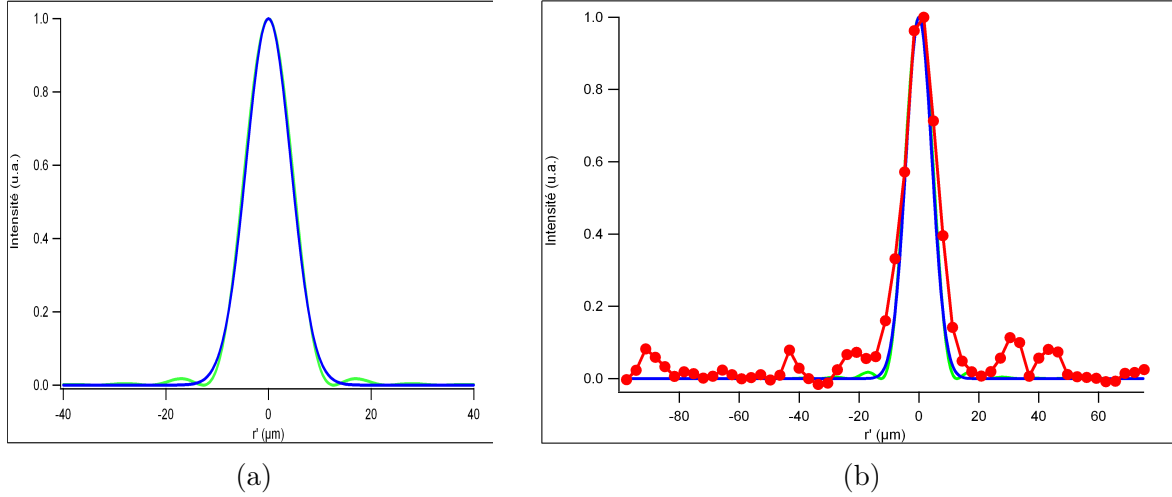


FIG. C.3 – (a) En vert : disque de Airy, PSF-2D image d'un objectif $4\times$ d'ouverture numérique 0,13 pour une lumière émise par fluorescence à la longueur d'onde $\lambda = 675\text{nm}$, en bleu : approximation gaussienne de la PSF-2D. - (b) En rouge : PSF-2D expérimentale pour le même objectif à 675nm , en vert : profil de Airy théorique, en bleu : approximation gaussienne de la PSF-2D.

Ainsi, un point source dans le plan objet sera perçu dans le plan image comme une figure de diffraction qui présente des minima et des maxima. La distance r'_l par rapport au point image ($x'_1; y'_1$) du premier minimum d'intensité permet d'évaluer la limite de résolution du système optique. Dans le cas de notre objectif $4\times$, on ne peut résoudre, pour une lumière émise à la longueur d'onde 675 nm , un détail plus petit que² :

$$r_l = \frac{r'_l}{M} = 0,61 \cdot \frac{\lambda}{ON} \approx 3,16\mu\text{m}$$

La PSF-2D peut être déterminée expérimentalement en faisant l'image d'un objet fluorescent plus petit que la limite théorique de diffraction. Pour ce faire, j'ai utilisé des billes fluorescentes de dimension calibrée d'un micromètre de diamètre. La lumière d'excitation était une LED émettant à 633 nm . Les billes émettent à une longueur d'onde de 675 nm . La figure C.3 (b) présente une comparaison des PSF-2D expérimentale et théorique.

C.3 Influence de la défocalisation

Comme nous l'avons évoqué au début de ce paragraphe, l'image d'un point situé à une distance z avant (respectivement après) le plan focal objet est situé à une distance z' avant (respectivement après) le plan focal image. Si la défocalisation z est suffisamment faible, on peut montrer à l'aide de considérations géométriques que la relation entre z et z' s'écrit [192] :

$$z' \approx \frac{M^2}{n} \cdot z \quad \forall z \ll \frac{n \cdot L}{M^2} \quad (\text{C.3})$$

où n est l'indice de réfraction dans l'espace objet et L (mm) la distance focale de la lentille de fin tube. Dans le microscope Olympus, cette distance vaut $L = 180\text{ mm}$.

Ainsi, toujours dans le cas des faibles défocalisations ($z' \ll L$), un objet ponctuel placé à une distance z avant le plan focal objet donnera naissance à la figure de diffraction définie par la relation C.2 centrée en son point image géométrique, et ce à une distance z' avant le plan focal image. Cette onde lumineuse se propagera jusqu'au capteur situé dans le plan focal image, pour donner une tâche floue, comme illustré à la figure C.4.

L'intensité sur le capteur varie comme l'inverse de la surface de la tâche. L'enjeu est donc ici d'évaluer la taille de la tâche de diffraction après une propagation sur une distance z' , c'est-à-dire depuis le point de focalisation jusqu'au plan du capteur.

²Le premier zéro de la figure de Airy vaut environ 3,83.

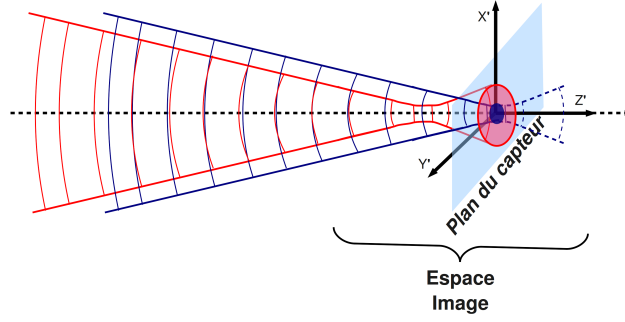


FIG. C.4 – représentation schématique de l'effet de défocalisation.

Il n'existe pas à ma connaissance de formulation analytique permettant de décrire de façon satisfaisante la propagation de la figure de diffraction de Airy. Cependant, à l'aide de simulations numériques, Zhang et ses collaborateurs ont montré que la PSF-2D d'un objectif de microscope peut être bien approximée par une fonction gaussienne d'expression³ [202] :

$$PSF'_{2D} \approx e^{-\frac{r'^2}{2\sigma_0'^2}} \quad (C.4)$$

où σ_0' est une longueur caractéristique, telle que : $\sigma_0' \approx \frac{r'_l}{2,90}$ [202]. Comme on peut s'en rendre compte sur les figures C.3 (a) et (b) l'approximation gaussienne représente bien les PSF-2D expérimentales et théoriques.

L'équation de propagation paraxiale est une bonne approximation pour décrire la propagation dans le cas des faibles ouvertures numériques [143, 191, 192, 202], comme c'est le cas pour notre objectif 4× où $ON = 0,13$. Une onde lumineuse vérifiant l'équation paraxiale et présentant un profil gaussien d'intensité est régi par l'équation des faisceaux gaussiens [120]. On a donc :

$$\sigma'(z') = \sigma_0' \cdot \sqrt{1 + \left(\frac{z'}{z'_R}\right)^2} \quad (C.5)$$

où $\sigma'(z')$ est le rayon à 60% du maximum de la figure de diffraction propagée sur une distance z' , et z'_R est la longueur de Rayleigh qui vaut $z'_R = \frac{4\pi \cdot \sigma_0'^2}{\lambda}$.

Dans ces conditions, l'intensité relative sur le capteur d'un point situé à une distance z du plan focal objet par rapport à un point non-défocalisé est directement proportionnelle au ratio des surfaces, et s'écrit :

$$\frac{I'}{I_0} = \frac{\sigma_0'^2}{\sigma'^2} = \frac{1}{1 + \left(\frac{z'}{z'_R}\right)^2} = \frac{1}{1 + \left(\frac{z}{z_R}\right)^2} \quad (C.6)$$

avec $z_R = \frac{z'_R}{G_1}$.

En pratique, on peut comparer la tendance donnée par le modèle simple que je viens d'explicitier avec la réalité expérimentale, en réalisant encore une fois l'image des billes fluorescentes et en balayant la position du capteur autour du plan de mise au point. Le résultat est présenté à la figure C.5 (a). Par ailleurs, il existe une solution analytique, $PSF_z(r' = 0, z')$, permettant de décrire la PSF selon l'axe optique ($r = 0$) du microscope [143, 191, 192]. Elle prend la forme d'un sinus cardinal élevé au carré. Celle-ci est aussi représentée à la figure C.5 (a). Cependant, cette fonction n'est pas intégrable, ou au moins pas analytiquement⁴, et ne nous permettra donc pas d'aller plus avant.

³L'erreur est, au sens des moindres carrés, de moins de 1%.

⁴En effet, il y a un problème mathématique en zéro et il faudrait alors passer à la série entière.

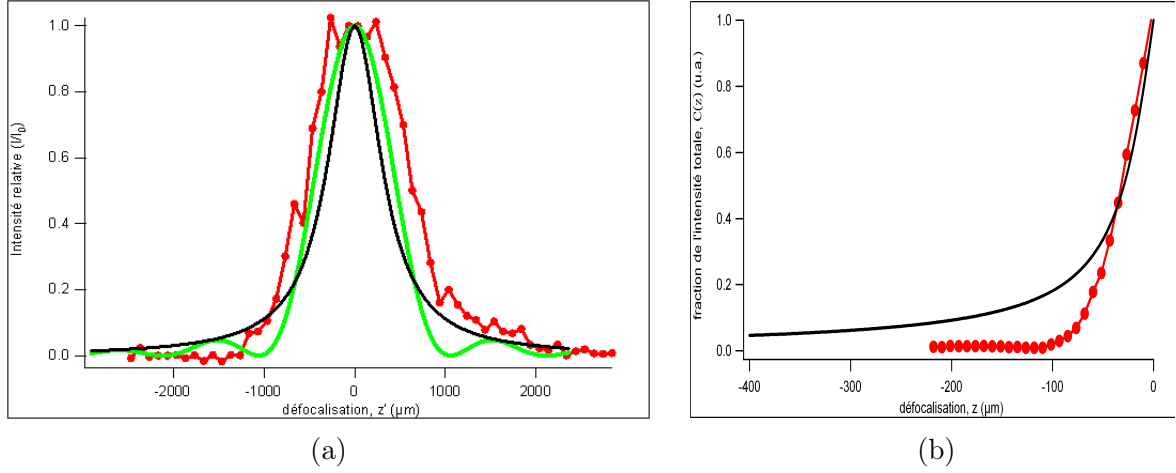


FIG. C.5 – (a) En rouge : intensité relative sur la caméra de l’image d’un objet ponctuel émettant à 675 nm en fonction de la défocalisation, en noir : expression théorique dérivée du modèle simple (eq. C.6), en vert : solution approchée pour la PSF longitudinale du microscope (PSF_z) [143, 191, 192] - (b) Contribution relative des plans précédant le plan focal objet, en rouge : courbe expérimentale intégrée à partir de la courbe de la figure (a) et en noir : expression théorique définie par l’expression C.7.

C.4 Contribution des plans précédant le plan focal objet et conclusions

Pour évaluer la contribution en un point du plan image des plans objets précédant le plan des cellules, on peut se représenter une succession d’objets ponctuels en « file indienne » selon l’axe optique. En effet, les objets situés dans le plan transverse à une distance plus grande que la limite de résolution r_l seront résolus et contribueront donc de manière négligeable au point géométrique considéré. Dans le cas de lumière incohérente, il suffit de sommer les intensités de chaque point source. La contribution relative $C(z)$ des plans infiniment loin jusqu’à un plan à une position z donnée s’écrit donc comme le ratio des intégrales de recouvrement suivant :

$$C(z) = \frac{\int_{-\infty}^z I'(z) dz}{\int_{-\infty}^0 I'(z) dz} = \frac{\int_{-\infty}^z \frac{1}{1+(\frac{z}{z_R})^2} dz}{\int_{-\infty}^0 \frac{1}{1+(\frac{z}{z_R})^2} dz} = 1 + \frac{2}{\pi} \arctan\left(\frac{z}{z_R}\right) \quad (\text{C.7})$$

La figure C.5 (b) présente cette contribution en fonction de la défocalisation z dans le plan objet. Expérimentalement, la contribution $C(z)$ (courbe C.6 (b)) a été calculée à partir de la courbe expérimentale présentée à la figure C.6 (a). On peut se rendre compte que 90% de l’énergie lumineuse en un point géométrique du capteur provient d’une épaisseur d’environ $70 \mu\text{m}$ en pratique, alors que le modèle théorique prévoit environ $180 \mu\text{m}$.

Annexe D

Distance focale équivalente à la propagation dans un milieu d'indice parabolique : focale de la « lentille » thermique

Nous allons ici déterminer la distance focale équivalente d'un milieu présentant une variation quadratique de l'indice de réfraction. Nous commencerons par établir l'équation de propagation d'un rayon. Puis l'équation sera résolue pour une longueur e de milieu. Enfin, à l'aide du formalisme des matrices ABCD nous déterminerons la focale équivalente d'une épaisseur e de milieu.

D.1 Equation de propagation d'un milieu d'indice quadratique

Soit un milieu transparent dont l'indice de réfraction est défini par l'équation parabolique :

$$n(r) = n_0 \times \left(1 + \frac{r^2}{2.h^2}\right) \quad (\text{D.1})$$

où n est l'indice de réfraction, r la distance par rapport à l'axe (Oz) et h une longueur caractéristique.

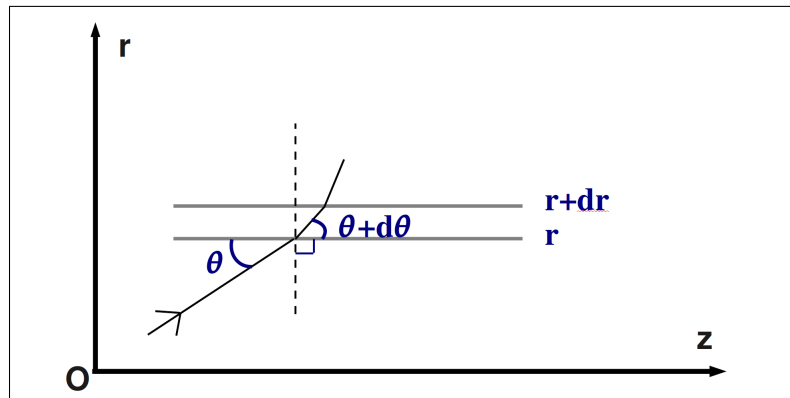


FIG. D.1 – Représentation schématique de la réfraction par un milieu d'indice parabolique.

Considérons la situation de la figure D.1 : un rayon est, au point de coordonnées $(r; z)$, incliné d'un angle θ par rapport à l'axe Oz . Ce rayon est réfracté par le dioptre constitué par l'interface entre les milieux d'indice $n(r)$ et $n(r + dr)$.

La loi de Snell-Descartes s'écrit :

$$\begin{aligned} n(r).cos(\theta) &= n(r + dr).cos(\theta + d\theta) \\ &\approx \left(n(r) + \frac{\partial n}{\partial r}.dr\right) \times (cos(\theta) - sin(\theta).d\theta) \end{aligned}$$

En développant l'expression et en éliminant les termes du second ordre, il vient :

$$\frac{1}{n(r)} \cdot \frac{dn}{dr} = tan(\theta) \cdot \frac{d\theta}{dr}$$

En remarquant que $\tan(\theta) = \frac{dr}{dz}$ et que $\theta \approx \frac{dr}{dz}$, on trouve :

$$\frac{d^2r}{dz^2} = \frac{1}{n(r)} \cdot \frac{\partial n}{\partial r}$$

On a d'autre part, d'après l'équation D.1 :

$$\begin{aligned} \frac{1}{n(r)} \cdot \frac{\partial n}{\partial r} &= \frac{n(r)}{n_0} \cdot \frac{r}{h^2} \\ &\approx \frac{r}{h^2} \end{aligned}$$

Ainsi on peut écrire l'équation de propagation en milieu quadratique :

$$\frac{d^2r}{dz^2} = \frac{r}{h^2} \quad (\text{D.2})$$

D.2 Solution de l'équation quadratique

La solution générale de l'équation s'écrit :

$$\begin{aligned} r(z) &= A \cdot \exp\left(\frac{z}{h}\right) + B \cdot \exp\left(-\frac{z}{h}\right) \\ \theta(z) &\approx \frac{dr}{dz} = \frac{A}{h} \cdot \exp\left(\frac{z}{h}\right) - \frac{B}{h} \cdot \exp\left(-\frac{z}{h}\right) \end{aligned}$$

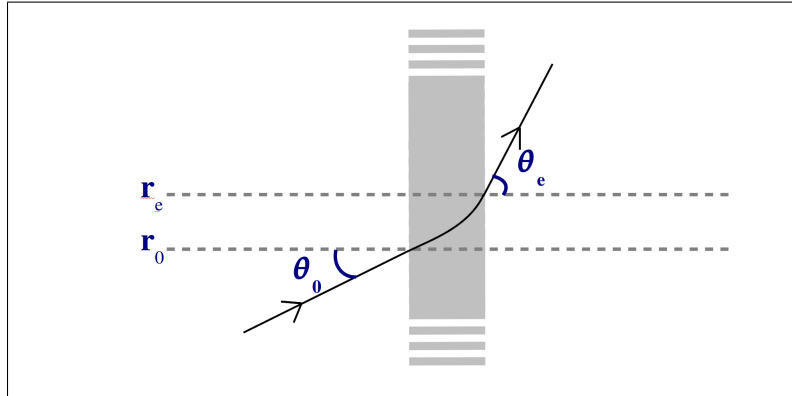


FIG. D.2 – Représentation schématique d'un rayon traversant un milieu d'indice parabolique.

Ainsi, comme l'illustre la figure D.2, si un rayon formant un angle $\theta = \theta_0$ est, en $z = 0$ et $r = r_0$, incident au milieu dont l'indice est défini par la relation D.1, il ressort, après avoir traversé une longueur e de milieu, en $r = r_e$ et avec un angle $\theta = \theta_e$ tels que :

$$r_e = r(e) = r_0 \times ch\left(\frac{e}{h}\right) + h \cdot \theta_0 \times sh\left(\frac{e}{h}\right) \quad (\text{D.3})$$

$$\theta_e = \frac{r_0}{h} \times sh\left(\frac{e}{h}\right) + \theta_0 \times ch\left(\frac{e}{h}\right) \quad (\text{D.4})$$

où $ch(x)$ et $sh(x)$ sont les fonctions cosinus et sinus hyperboliques respectivement.

D.3 Matrice ABCD et distance focale équivalentes

Les équations D.3 et D.4 se résument de manière matricielle par :

$$\begin{pmatrix} r_e \\ \theta_e \end{pmatrix} = \begin{pmatrix} ch\left(\frac{e}{h}\right) & h \times sh\left(\frac{e}{h}\right) \\ \frac{1}{h} \times sh\left(\frac{e}{h}\right) & ch\left(\frac{e}{h}\right) \end{pmatrix} \cdot \begin{pmatrix} r_0 \\ \theta_0 \end{pmatrix} \quad (\text{D.5})$$

Nous avons donc obtenu la matrice de transfert (ou ABCD) d'une épaisseur e de milieu d'indice parabolique. Le terme M_{12} (en bas à droite d'une telle matrice) représente l'opposé de la vergence du système [201], c'est à dire :

$$M_{12} = -V' = -\frac{1}{f'}$$

où V' est la vergence et f' est la distance focale image du système.

On a donc finalement la distance focale image équivalente d'une épaisseur e de milieu dont l'indice est défini par la relation D.1 :

$$f' = -\frac{1}{h} \times sh\left(\frac{e}{h}\right) \quad (\text{D.6})$$

Annexe E

Matériel supplémentaire : vidéos

Cette annexe précise les conditions expérimentales correspondant aux vidéos présentées sur le CD-ROM associé au manuscrit.

Chaque vidéo correspond à une expérience de vidéo-microscopie dans laquelle les images sont prises par intervalles de temps de 10 min. Les vidéos sont encodées à une vitesse de 10 images par seconde. La durée totale de chaque expériences est de $\sim 33 h$.

E.1 Expériences d'irradiation

1270_3h_37.avi

Cellules MCF-7 observées au microscope $4\times$ à contraste de phase irradiées à $1270 nm$ pendant $3 h$ à une puissance d'environ $P_0 \approx 110 \pm 10 mW$, le cercle noir représente le diamètre FWHM ($300 \mu m$) du faisceau laser pendant la durée de l'irradiation. Dans ces expériences, l'incubateur est maintenu à $37^\circ C$ pendant l'irradiation et la température maximale atteinte est donc de $\sim 43^\circ C$.

On observe 100% de cellules mortes dans une zone de rayon $r \approx 200 \mu m$ autour du faisceau laser $\sim 30 h$ après l'irradiation..

1247_3h_37.avi

Cellules MCF-7 observées au microscope $4\times$ à contraste de phase irradiées à $1247 nm$ pendant $3 h$ à une puissance d'environ $P_0 \approx 110 \pm 10 mW$, le cercle noir représente le diamètre FWHM ($300 \mu m$) du faisceau laser pendant la durée de l'irradiation. Dans ces expériences, l'incubateur est maintenu à $37^\circ C$ pendant l'irradiation et la température maximale atteinte est donc de $\sim 43^\circ C$.

On observe pas de mort cellulaire.

1270_1h_19.avi

Cellules MCF-7 observées au microscope $4\times$ à contraste de phase irradiées à $1270 nm$ pendant $1 h$ à une puissance d'environ $P_0 \approx 500 \pm 10 mW$, le cercle noir représente le diamètre FWHM ($300 \mu m$) du faisceau laser pendant la durée de l'irradiation. Dans ces expériences, l'incubateur est maintenu à $\sim 20^\circ C$ pendant l'irradiation et la température maximale atteinte est donc de $\sim 49^\circ C$.

On observe 100% de cellules mortes dans une zone de rayon $r \approx 350 \mu m$ autour du faisceau laser $\sim 30 h$ après l'irradiation.

1247_1h_19.avi

Cellules MCF-7 observées au microscope $4\times$ à contraste de phase irradiées à $1247 nm$ pendant $1 h$ à une puissance d'environ $P_0 \approx 500 \pm 10 mW$, le cercle noir représente le diamètre FWHM ($300 \mu m$) du faisceau laser pendant la durée de l'irradiation. Dans ces expériences, l'incubateur est maintenu à $\sim 20^\circ C$ pendant l'irradiation et la température maximale atteinte est donc de $\sim 49^\circ C$.

On observe pas de mort cellulaire.

E.2 Stress hyperthermique

43deg_3h.avi

Cellules MCF-7 observées au microscope 4× à contraste de phase exposées à un stress hyperthermique de 3 *h* à 43 °C. La température est indiquée en bas à droite de l'écran.

On observe pas d'effet significatif.

48deg_1h.avi

Cellules MCF-7 observées au microscope 4× à contraste de phase exposées à un stress hyperthermique de 1 *h* à 48 °C. La température est indiquée en bas à droite de l'écran.

On observe des changements morphologiques réversibles, mais seulement ~ 5% de mort cellulaire ~ 48 *h* après le stress hyperthermique.

49deg_1h.avi

Cellules MCF-7 observées au microscope 4× à contraste de phase exposées à un stress hyperthermique de 1 *h* à 49 °C. La température est indiquée en bas à droite de l'écran.

On observe des changements morphologiques suivit de ~ 100% de mort cellulaire ~ 48 *h* après le stress hyperthermique.

Bibliographie

Bibliographie

- [1] B. Alberts, A. Johnson, J. Lewis, M. Raff, K. Roberts, and P. Walter. *Molecular Biology of the Cell, fifth edition*. Garland Science, 2008.
- [2] Dennis E.J.G.J. Dolmans, Dai Fukumura, and Rakesh K. Jain. Photodynamic therapy for cancer. *Nature Reviews*, 3 :380–387, 2003.
- [3] Dietmar Kültz. Evolution of the cellular stress proteome : from monophyletic origin to ubiquitous function. *The journal of Experimental Biology*, 206 :3119–3124, 2003.
- [4] Dietmar Kültz. Molecular and evolutionary basis of the cellular stress response. *Annual Review of Physiology*, 67 :225–257, 2005.
- [5] J.F. Ward. The complexity of dna damage : Relevance to biological consequences. *International Journal of Radiation Biology*, 66 :427–432, 1994.
- [6] Earl R. Stadtman. Metal ion-catalyzed oxidation of proteins : Biochemical mechanism and biological consequences. *Free Radical Biology and Medicine*, 9 :315–325, 1990.
- [7] Allen P Minton. Implications of macromolecular crowding for protein assembly. *Current Opinion in Structural Biology*, 10 :34–39, 2000.
- [8] Christoph Richter. Biophysical consequences of lipid peroxidation in membranes. *Chemistry and Physics of Lipids*, 44 :175–189, 1987.
- [9] L.H. Hartwell and T.A. Weinert. Check points : controls that ensure the order of cell cycle events. *Science*, 246 :629–634, 1989.
- [10] Y. Shiloh. Atm and related protein kinases : safeguarding genome integrity. *Nature Reviews Cancer*, 3 :155–168, 2003.
- [11] W. Dai, X. Huang, and Q. Ruan. Polo-like kinases in cell cycle checkpoint control. *Frontiers in Bioscience*, 8 :1128–1133, 2003.
- [12] Antonio Jacinto, Alfonso Martinez-Arias, and Paul Martin. Mechanisms of epithelial fusion and repair. *Nature Cell Biology*, 3 :E117–E123, 2001.
- [13] Mary Muers. Genome stability : Pathways to integrity. *Nature*, 10 :592–593, 2009.
- [14] A. Tissières, H.K. Mitchell, and U.M. Tracy. Protein synthesis in salivary glands of *Drosophila melanogaster* : relation to chromosome puffs. *Journal of Molecular Biology*, 84 :389–398, 1974.
- [15] I. Shamovsky and E. Nudler. New insights into the mechanism of heat shock response activation. *Cellular and Molecular Life Science*, 65 :855–861, 2008.
- [16] R.I. Morimoto. Regulation of the heat shock transcriptional response : cross talk between a family of heat shock factors, molecular chaperones, and negative regulators. *Genes and Development*, 12 :3788–3796, 1998.
- [17] R.J. Ellis and F.U. Hart. Principles of protein folding in the cellular environment. *Current Opinion in Structural Biology*, 9 :102–110, 1999.
- [18] M.J. Gething and J. Sambrook. Protein folding in the cell. *Nature*, 355 :33–45, 1992.
- [19] S.Y. Fuchs, V.A. Fried, and Z. Ronai. Stress activated kinases regulate protein stability. *Oncogene*, 17 :1483–1490, 1998.

- [20] D. Kanduc, A. Mittelman, R. Serpico, E. Sinigaglia, A. A. Sinha, C. Natale, R. Santacroce, M. G. Di Corcia, A. Lucchese, L. Dini, P. Pani, S. Santacroce, S. Simone, R. Bucci, and E. Farber. Cell death : Apoptosis versus necrosis (review). *International journal of Oncology*, 21 :165–170, 2002.
- [21] R. Virchow. Cellular pathology as based upon physiological and pathological histology, ed 2. Translated from german by B. Chance, 1859 *Reproduced in 1971 by Dover Publications, New York*, 1858.
- [22] G. Majno and I. Joris. Apoptosis, oncosis and necrosis : *An Overview of Cell Death*. *American Journal of Pathology*, 146 :3–15, 1995.
- [23] J. F. R. Kerr, A. H. Wyllie, and A. R. Currie. Apoptosis : A basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *British Journal of Cancer*, 26 :239–257, 1972.
- [24] G. Kroemer, W. S. El-Deiry, P. Golstein, M. E. Peter, D. Vaux, P. Vandenabeele, B. Zhivotovsky, M. V. Blagosklonny, W. Malorni, R. A. Knight, M. Piacentini and S. Nagata, and G. Melino. Classification of cell death : recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death. *Cell Death and Differentiation*, 12 :1463–1467, 2005.
- [25] F. Van Herreweghe, N. Festjens, W. Declercq, and P. Vandenabeele. Tumor necrosis factor-mediated cell death : to break or to burst, that’s the question. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 67 :1567–1579, 2010.
- [26] X. Wang, S. W. Ryter, C. Dai, ZL. Tang, S. C. Watkins, XM. Yin, R. Song, and A. M. K. Choi. Necrotic Cell Death in Response to Oxidant Stress Involves the Activation of the Apoptogenic Caspase-8/Bid Pathway. *The journal of Biological Chemistry*, 278 :29184–29191, 2003.
- [27] M. D. Jacobson, M. Weil, and M. C. Raff. Programmed cell death in animal development. *Cell*, 88 :347–354, 1997.
- [28] I. Herr and KM. Debatin. Cellular stress response and apoptosis in cancer therapy. *Blood*, 98 :2603–2614, 2001.
- [29] S. Takamaya, JC Reed, and S. Homma. Heat-shock proteins as regulators of apoptosis. *Oncogene*, 22 :9041–9047, 2003.
- [30] R. L. Bar-Or, R. Maya, L. A. Segel, U. Alon, A. J. Levine, and M. Oren. Generation of oscillations by the p53-Mdm2 feedback loop : A theoretical and experimental study. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 97 :11250–11255, 2000.
- [31] G. Lahav, N. Rosenfeld, A. Sigal, N. Geva-Zatorsky, A. J. Levine, M. B. Elowitz, and U. Alon. Dynamic of the p53-mdm2 feedback loop in individual cells. *Nature Genetics*, 36 :147–150, 2004.
- [32] A. Ciliberto, B. Novak, and J. J. Tyson. Steady States and Oscillations in the p53/Mdm2 Network. *Cell Cycle*, 4 :488–493, 2005.
- [33] Samuel Bottani and Basile Grammaticos. Analysis of a minimal model for p53 oscillations. *Journal of Theoretical Biology*, 249 :235–245, 2007.
- [34] S. Elmore. Apoptosis : a review of programmed cell-death. *Toxicologic Pathology*, 35 :495–516, 2007.
- [35] N. L. Oleinick, R. L. Morris, and I. Belichenko. the role of apoptosis in response to photodynamic therapy : what, where, why, and how. *Photochemical and Photobiological Sciences*, 1 :1–21, 2002.
- [36] J. C. Reed. Mechanisms of apoptosis. *American Journal of Pathology*, 157 :1415–1430, 2000.
- [37] Noboru Mizushima, Akitsugu Yamamoto, Makoto Matsui, Tamotsu Yoshimori, and Yoshinori Ohsumi. In vivo analysis of autophagy in response to nutrient starvation using transgenic mice expressing a fluorescent autophagosome marker. *Molecular Biology of Cell*, 15 :1101–1111, 2004.

- [38] Shigeomi Shimizu, Toku Kanaseki, Noboru Mizushima, Takeshi Mizuta, Satoko Arakawa-Kobayashi, Craig B. Thompson, and Yoshihide Tsujimoto. Role of bcl-2 family proteins in a non-apoptotic programmed cell death dependent on autophagy genes. *Nature Cell Biology*, 6 :1221–1228, 2004.
- [39] M. Gardès-Albert, Dominique Bonnefort-rousselot, Zohreh Abedinzadeh, and Daniel Jore. Espèces réactives de l’oxygène : comment l’oxygène peut-il devenir toxique ? *L’Actualité chimique*, 11 :91–96, 2003.
- [40] Jacques Delattre, Jean-Louis Beaudeau, and Dominique Bonnefont-Rousselot. *Radicaux libres et stress oxydant*. éditions TEC et DOC / Editions Medicales internationales, 2005.
- [41] Daniel L. Gilbert and Carol A. Colton. *Reactive Oxygen Species in Biological Systems : An Interdisciplinary Approach*. Kluwer Academic / Plenum publishers, 1999.
- [42] Alain Favier. Le stress oxydant : Intérêt conceptuel et expérimental dans la compréhension des mécanismes des maladies et potentiel thérapeutique. *L’Actualité Chimique*, 11 :108–115, 2003.
- [43] Klaus Apel and Heribert Hirt. REACTIVE OXYGEN SPECIES : Metabolisme, Oxidative Stress, and Signal Transduction. *Annual Review of Plant Biology*, 55 :373–399, 2004.
- [44] Jean Cadet, Thierry Delatour, Thierry Douki, Didier Gasparutto, Jean-Pierre Pouget, Jean-Luc Ravanat, and Sylvie Sauvaigo. Hydroxyl radicals and DNA base damage. *Mutation Research*, 424 :9–21, 1999.
- [45] Danxia Liu, Jing Wen, Jing Liu, and Liping Li. The roles of free radicals in amyotrophic lateral sclerosis : reactive oxygen species and elevated oxidation of protein, DNA, and membrane phospholipids. *The FASEB Journal*, 13 :2318–2328, 1999.
- [46] C. L. Limoli, E. Giedzinski, R. Rola, S. Otsuka, T. D. Palmer, and J. R. Fike. Radiation Response of Neural Precursor Cells : Linking Cellular Sensitivity to Cell Cycle Checkpoints, Apoptosis and Oxidative Stress. *Radiation Research*, 161 :17–27, 2004.
- [47] P. A. Riley. Free radicals in biology : Oxidative stress and the effects of ionizing radiation. *International Journal of Radiation Biology*, 65 :27–33, 1994.
- [48] T. J. Dougherty, C. J. Gomer, B. W. Henderson, G. Jori, D. Kessel, M. Koberlik, J. Moan, and Q. Peng. Photodynamic therapy. *Journal of the National Cancer Institute*, 90 :889–905, 1998.
- [49] Joseph P; Martin and Naomi Logsdon. The role of oxygen radicals in dye-mediated photodynamic effects in *Escherichia coli B*. *The journal of Biological Chemistry*, 262 :7213–7219, 1987.
- [50] Joseph L. Roti Roti. Cellular responses to hyperthermia (40–46°C) : Cell killing and molecular events. *International Journal of Hyperthermia*, 24 :3–15, 2008.
- [51] James R. Lepock. How do cells respond to their thermal environment ? *International Journal of Hyperthermia*, 8 :681–687, 2005.
- [52] G.J. Stege, L. Li, H. H. Kampinga, A. W. Konings, and G. C. Li. Importance of the ATP binding domain and nucleolar localization domain of HSP72 in the protection of nuclear proteins against heat-induced aggregation. *Experimental Cell research*, 21 :279–284, 1994.
- [53] H. H. Kampinga, J. F. Brunsting, G. J. Stege, A. W. Konings, and J. Landry. Cells overexpressing Hsp27 show accelerated recovery from heat-induced nuclear protein aggregation. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 204 :1170–1177, 1994.
- [54] James R. Lepock. Cellular effects of hyperthermia : relevance to the minimum dose for thermal damage. *International Journal of Hyperthermia*, 19 :252–256, 2003.
- [55] R. L. Warters, L. M. Brizgys, and J. Axtell-Bartlett. DNA damage production in CHO cells at elevated temperatures. *Journal of Cell Physiology*, 123 :481–486, 1985.

- [56] J. B. Jorritsma and A. W. Koning. The occurrence of DNA strand breaks after hyperthermic treatments of mammalian cells with and without radiation. *Radiation Research*, 98 :198–208, 1940.
- [57] P.L. Olive. Detection of DNA damage in individual cells by analysis of histone H2AX phosphorylation. *Methods in Cell Biology*, 75 :355–373, 2004.
- [58] Robert J. Palzer and Charles Heidelberger. Studies on the quantitative biology of hyperthermic killing of hela cells. *Cancer Research*, 33 :415–421, 1973.
- [59] E. W. Gerner, R. Boone, W. G. Connor, J. A. Hicks, and M. L. M. Boone. A transient thermotolerant survival response produced by single thermal doses in hela cells. *Cancer Research*, 36 :1035–1040, 1976.
- [60] O.S. Nielsen, K.J. Henle, and J. Overgaard. Arrhenius analysis of survival curves from thermotolerant and step-down heated L1A2 cells in vitro. *Radiation Research*, 91(3) :468–482, 1982.
- [61] José J. Cotto, Susan G. Fox, and Richard I. Morimoto. HSF1 granules : a novel stress-induced compartment of human cells. *Journal of Cell Science*, 110 :2925–2934, 1997.
- [62] Caroline Jolly, Yves Usson, and Richard i. Morimoto. Rapid and reversible relocalization of heat shock factor 1 within seconds to nuclear granules. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 96 :6769–6774, 1999.
- [63] P. Wusta, B. Hildebrandtb, G. Sreenivasaa, B. Rauc, J. Gellermann, H. Riessb, R. Felix, and P. M. Schlag. Hyperthermia in combined treatment of cancer. *The LANCET Oncology*, 8 :487–497, 2002.
- [64] Stephen A. Sapareto and William C. Dewey. Thermal dose determination in cancer therapy. *International Journal of Radiation Oncology*, 6 :787–800, 1984.
- [65] Thomas J. Vogl, Katrin Eichler, Stefan Zangos, and Martin G. Mack. Interstitial laser therapy of liver tumors. *Medical Laser Application*, 20 :115–118, 2005.
- [66] Christopher s. Foote. Mechanisms of photosensitized oxidations. *Science*, 162 :963–970, 1968.
- [67] C. A. Robertson, D. Hawkins Evans, and H. Abrahamse. Photodynamic therapy (PDT) : A short review on cellular mechanisms and cancer research applications for PDT. *Journal of Photochemistry and Photobiology B : Biology*, 96 :1–8, 2009.
- [68] M. Korbelik and G. Krosl. Cellular levels of photosensitisers in tumours : the role of proximity to the blood supply. *British journal of Cancer*, 70 :604–610, 1994.
- [69] H. Messmann, P. Mlkvy, G. Buonaccorsi, C. L. Davies, A. J. MacRobert, and S. G. Bown. Enhancement of photodynamic therapy with 5-aminolaevulinic acid-induced porphyrin photosensibilisation in normal rat colon by threshold and light fractionation studies. *British journal of Cancer*, 72 :589–594, 1995.
- [70] Willem M. Star, Hans P. A. Marijnissen, Anneke E. van den Berg-Blok, Jeanne A. C. Versteeg, Klaas A. P. Franken, and Huibert S. Reinhold. Destruction of rat mammary tumor and normal tissue microcirculation by hematoporphyrin derivative photoradiation observed *in vivo* in sandwich observation chamber. *Cancer Research*, 46 :513–517, 1986.
- [71] J. Y. Matroule, C. Volanti, and J. Piette. Nf- κ b in photodynamic therapy : Discrepancies of a master regulator. *Photochemistry and Photobiology*, 82 :1241–1246, 2006.
- [72] S. O. Gollnick, L. Vaughna, and B. W. Henderson. Generation of effective antitumor vaccines using photodynamic therapy. *Cancer Research*, 62 :1604–1608, 2002.
- [73] M. D. C. Pazos and H. B. Nader. Effect of photodynamic therapy on the extracellular matrix and associated compnents. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 40 :1025–1035, 2007.

- [74] A. A. Krasnovsky Jr. Primary mechanisms of photoactivation of molecular oxygen. history of development and the modern status of research. *Biochemistry (Moscow)*, 72 :1065–1080, 2007.
- [75] Alexander Greer. Christopher Foote’s discovery of the role of singlet oxygen [$^1O_2(^1\Delta_g)$] in Photosensitized Reactions. *Accounts of Chemical Research*, 39 :797–804, 2006.
- [76] R. M. Tyrrell. The molecular and cellular pathology of solar ultraviolet radiation. *Molecular aspects of medicine*, 15 :1–77, 1994.
- [77] A. A. Krasnovsky. The primary processes of photo-synthesis in plants. *Annual Review of Plant Physiology*, 11 :363–410, 1960.
- [78] Albert W. Girotti. Photosensitized oxidation of membrane lipids : reaction pathways, cytotoxic effects, and cytoprotective mechanisms. *Journal of Photochemistry and Photobiology B*, 63, 2001.
- [79] F. Petrat, S. Pindiur, M. Kirsch, and H. de Groot. NAD(P)H, a primary Target of 1O_2 in Mitochondria of Intact Cells. *The Journal of Biological Chemistry*, 278 :3298–3307, 2003.
- [80] R. D. Almeida, B. J. Manadas, A. P. Carvalho, and C. B. Duarte. Intracellular signaling mechanisms in photodynamic therapy. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1704 :59–86, 2004.
- [81] C. Schweitzer and Reinhard Schmidt. Physical mechanisms of generation and deactivation of singlet oxygen. *Chemical Reviews*, 103 :1685–1757, 2003.
- [82] Mark Niedre, Michael S. Patterson, and Brian C. Wilson. Direct Near infrared Luminescence Detection of Singlet Oxygen Generated by Photodynamic Therapy in Cells *In Vitro* and Tissues *In Vivo*. *Photochemistry and Photobiology*, 75 :382 – 391, 2002.
- [83] Mark J. Niedre, Andrea J. Secord, Michael S. Patterson, and Brian C. Wilson. *In Vitro* tests of the validity of singlet oxygen luminescence measurements as a dose metric in photodynamic therapy. *Cancer Research*, 63 :7986–7994, 2003.
- [84] MJ Niedre, CS Yu, MS Patterson, and BC Wilson. Singlet oxygen luminescence as an *in vivo* photodynamic therapy dose metric : validation in normal skin mouse with topical aminolevulinic acid. *British Journal of Cancer*, 92 :298–304, 2005.
- [85] M. T. Jarvi, M. J. Niedre, M. S. Patterson, and B. C. Wilson. Singlet Oxygen Luminescence Dosimetry (SOLD) for Photodynamic Therapy : Current Status, Challenges and Future Prospects. *Photochemistry and Photobiology*, 82 :1198–1210, 2006.
- [86] Jonathan s. Dysart, Gurmit Singh, and Michael S. Patterson. Calculation of Singlet Oxygen Dose from Photosensitizer Fluorescence and Photobleaching During mTHPC Photodynamic Therapy of MLL Cells. *Photochemistry and Photobiology*, 81 :196 – 205, 2005.
- [87] J. Baier, T. Fuß, C. Pöllmann, C. Wiesmann, K. Pindl, R. Engl, D. Baumer, M. Maier, M. Landhaler, and W. Bäuml. Theoretical and experimental analysis of the luminescence signal of singlet oxygen for different photosensitizers. *Journal of Photochemistry and Photobiology B*, 87 :163–173, 2007.
- [88] Irene Georgakoudi and Thomas H. Foster. Singlet Oxygen Versus Non-singlet Oxygen-Mediated Mechanisms of Sensitizer Photobleaching and Their Effects on Photodynamic Dosimetry. *Photochemistry and Photobiology*, 67 :612 – 625, 1998.
- [89] I. Georgakoudi, M. G. Nichols, and T. H. Foster. The mechanism of photofrin® photobleaching and its consequences for photodynamic dosimetry. *Photochemistry and Photobiology*, 65 :135–144, 1997.
- [90] C. Foote. Definition of type I and type II photosensitized oxidation. *Photochemistry and Photobiology*, 54 :659, 1991.
- [91] Reinhard Schmidt. Photosensitized generation of singlet oxygen. *Photochemistry and Photobiology*, 82 :1161–1177, 2006.

- [92] P.R. Ogilby. Singlet oxygen : there is indeed something new under the sun. *Chemical Society Reviews*, 39(8) :3181–3209, 2010.
- [93] J. W. Snyder, E. Skovsen, J. D. C. Lambert, L. Poulsen, and P. R. Ogilby. Optical detection of singlet oxygen from single cells. *Physical Chemistry Chemical Physics*, 8 :4280–4293, 2006.
- [94] M. K. Kuimova, G. Yahiolglu, and P. R. Ogilby. Singlet oxygen in a cell : Spatially dependent lifetimes and quenching rate constants. *Journal of the American Chemical Society*, 131 :332–340, 2009.
- [95] M. K. Kuimova, S. W. Botchway, A. W. Parker, M. Balaz, H. A. Collins, H. L. Collins, K. Suhling, and P. R. Ogilby. Imaging intracellular viscosity of a single cell during photoinduced cell death. *Nature Chemistry*, 1 :69–73, 2009.
- [96] Catherine Gapper and Liam Dolan. Control of plant development by reactive oxygen species. *Plant Physiology*, 141 :341–345, 2006.
- [97] A. J. Harvey, K. L. Kind, and J. G. Thompson. Redox regulation of early embryo development. *Reproduction*, 132 :479–486, 2002.
- [98] David R. Kearns. Physical and chemical properties of singlet molecular oxygen. *Chemical Reviews*, 71 :395–427, 1971.
- [99] Paul H. Kupenie. The spectrum of molecular oxygen. *The journal of Physical and Chemical references data*, 1 :423–534, 1972.
- [100] Charles Long and David R. Kearns. Selection rules for the intermolecular enhancement of spin forbidden transitions in molecular oxygen. *The Journal of Chemical Physics*, 59 :5729–5736, 1973.
- [101] M. Hild and R. Schmidt. The Mechanism of the Collision-Induced Enhancement of the $a^1\Delta_g \rightarrow X^3\Sigma_g^-$ and $b^1\Sigma_g^+ \rightarrow a^1\Delta_g$ Radiative Transitions of O₂. *Journal of Physical Chemistry A*, 103(31) :6091–6096, 1999.
- [102] Peter R. Ogilby. Solvent effects on the radiative transitions of singlet oxygen. *Accounts of Chemical Research*, 32 :512–519, 1999.
- [103] A.A. Krasnovsky Jr. and R.V. Ambartzumian. Tetracene oxygenation caused by infrared excitation of molecular oxygen in air-saturated solutions : the photoreaction action spectrum and spectroscopic parameters of the $^1\Delta_g \leftarrow ^3\Sigma_g^-$ transition in oxygen molecules. *Chemical Physics Letters*, 400 :531–535, 2004.
- [104] Robert W. Redmond and Janet N. Gamlin. A compilation of singlet oxygen yields from biologically relevant molecules. *Photochemistry and Photobiology*, 1999 :391–475, 1999.
- [105] A. A. Krasnovsky Jr. Luminescence and photochemical studies of singlet oxygen photonics. *Journal of Photochemistry and Photobiology A*, 196 :210–218, 2008.
- [106] C. Flors, M.J. Fryer, J. Waring, B. Reeder, U. Bechtold, P.M. Mullineaux, S. Nonell, M.T. Wilson, and N.R. Baker. Imaging the production of singlet oxygen in vivo using a new fluorescent sensor, Singlet Oxygen Sensor Green (R). *Journal of experimental botany*, 57(8) :1725, 2006.
- [107] X. Ragàs, A. Jiménez-Banzo, D. Sánchez-García, X. Batllori, and S. Nonell. Singlet oxygen photosensitisation by the fluorescent probe Singlet Oxygen Sensor Green®. *Chemical Communications*, 2009(20) :2920–2922, 2009.
- [108] A.A. Krasnovsky Jr., N.N. Drozdova, A.V. Ivanov, and R.V. Ambartzumian. Activation of molecular oxygen by infrared laser radiation in pigment-free aerobic systems. *Biochemistry (Moscow)*, 68 :1178–1182, 2003.
- [109] A. A. Krasnovsky Jr., Ya. V. Roumbal, and A. A. Strizhakov. Rates of 1O_2 ($^1\Delta_g$) production upon direct excitation of molecular oxygen by 1270 nm laser radiation in air-saturated alcohols and micellar aqueous dispersions. *Chemical Physics Letters*, 458 :195–199, 2008.

- [110] David R. Lide, editor. *CRC Handbook of Chemistry and Physics, 89th Edition*. CRC Press/Taylor and Francis, Boca Raton, FL, 2009.
- [111] YE. Lee Koo, Y. Cao, R. Kopelman, S.M. Koo, M. Brasuel, and M.A. Philbert. Real-time measurements of dissolved oxygen inside live cells by organically modified silicate fluorescent nanosensors. *Analytical Chemistry*, 76 :2498–2505, 2004.
- [112] S. D. Zakharov and A. V. Ivanov. Light-oxygen effect in cells and its potential applications in tumour therapy (review). *Quantum Electronic*, 29 :1031–1053, 1999.
- [113] A. V. Ivanov, S. D. Zkharov, and A. A. Mashalov. The light oxygen effect as the analogue of photodynamic effect and its possibility in tumour therapy. *Proceedings of SPIE*, 5973 :U1–U13, 2005.
- [114] A. S. Yusupov, S. E. Goncharov, I. D. Zalevski, V. M. Paramonov, and A. S. Kurkov. Raman fiber laser for the drug-free photodynamic therapy. *Laser Physics*, 20 :357–359, 2010.
- [115] HD. Soule, J. Vazquez, A. Long, S. Albert, and M. Brennan. A human cell line from a pleural effusion derived from a breast carcinoma. *Journal of the National Cancer Institute*, 51 :1409 – 1416, 1973.
- [116] M. Lacroix and G. Leclercq. Relevance of breast cancer cell lines as models for breast tumours : an update. *Breast Cancer Research and Treatment*, 83 :249 – 289, 2004.
- [117] C.D Helgason and C. L. Miller, editors. *Basic Cell Culture Protocols*, volume 290 of *Method in molecular biology*. humana press, 2004.
- [118] Peter Atkins and Julio de Paula, editors. *Atkins' Physical Chemistry, 8th Edition*. Oxford University Press, 2006.
- [119] Zhongkui Li., Liqun Xia, Leo M. Lee, Alexander Khaletskiy, Jianyi Wang, Jeffrey Y. C. Wong, and Jian-Jian Li. Effector Genes Altered in MCF-7 human Breast Cancer Cells after Exposure to Fractionned Ionizing Radiation. *Radiation Research*, 155 :543 – 553, 2001.
- [120] Anthony E. Siegman. *Lasers*. University Science Books, 1986.
- [121] D. J. Taatjes, B. E. Sobel, and R. C. Budd. Morphological and cytochemical determination of celle death by apoptosis. *Histochemistry and Cell Biology*, 129 :33–43, 2008.
- [122] M. Haseyama and Y. Sasamura. Effective apoptotic cell extraction from video microscopy images. *IEEE International Conference on Acoustics, Speech, and Signal Processing*, 2 :ii/461–ii/464, 2005.
- [123] Hugo O. Jauregui, Nancy T. Hayner, James L. Driscoll, Rhonda Williams-Holland, Milton H. Lipsky, and Pierre M. Galletti. Trypan blue dye uptake and lactate dehydrogenase in adult rat hepatocytes-freshly isolated cells, cell suspensions, and primary monolayer cultures. *In vitro*, 17 :1100–1110, 1981.
- [124] PC Reeves-Hall and JR Taylor. Wavelength tunable CW Raman fibre ring laser operating at 1486-1551 nm. *Electronics Letters*, 37(8) :491–492, 2001.
- [125] MD Mermelstein, C. Headley, JC Bouteiller, P. Steinvurzel, C. Horn, K. Feder, and BJ Eggleton. Configurable three-wavelength Raman fiber laser for Raman amplification and dynamic gain flattening. *IEEE Photonics Technology Letters*, 13(12) :1286–1288, 2001.
- [126] BA Cumberland, SV Popov, JR Taylor, OI Medvedkov, SA Vasiliev, and EM Dianov. 2.1 μm continuous-wave Raman laser in GeO_2 fiber. *Optics Letters*, 32(13) :1848–1850, 2007.
- [127] S. Randoux, G. Beck, F. Anquez, G. Mélin, L. Bigot, M. Douay, and P. Suret. Grating-Free and Bragg-Grating-Based Raman Lasers Made With Highly Nonlinear Photonic Crystal Fibers. *Journal of Lightwave Technology*, 27(11) :1580–1589, 2009.
- [128] F. anquez, P. suret, A. Sivery, E. Courtade, and S. Randoux. A high-power tunable Raman fiber ring laser for the investigation of singlet oxygen production from direct laser excitation around 1270 nm. *acceptée dans Optics Express*, 2010.

- [129] G. Agrawal. *Nonlinear fiber optics*. Springer, 2000.
- [130] K.O. Hill and G. Meltz. Fiber Bragg grating technology fundamentals and overview. *Journal of Lightwave Technology*, 15(8) :1263–1276, 1997.
- [131] E. Bélanger, M. Bernier, D. Faucher, D. Côté, and R. Vallée. High-power and widely tunable all-fiber Raman laser. *Journal of Lightwave Technology*, 26 :1696–1701, 2008.
- [132] S.A. Babin, D.V. Churkin, S.I. Kablukov, M.A. Rybakov, and A.A. Vlasov. All-fiber widely tunable Raman fiber laser with controlled output spectrum. *Optics Express*, 15(13) :8438–8443, 2007.
- [133] G. Qin, M. Liao, T. Suzuki, A. Mori, and Y. Ohishi. Widely tunable ring-cavity tellurite fiber Raman laser. *Optics letters*, 33(17) :2014–2016, 2008.
- [134] F. Hetch, O. Pironneau, A. Le Hyaric, and K. Ohtsua. Freefem++ manual. Laboratoire Jacques Louis Lions, Paris, <http://www.freefem.org/ff++/>, 2010.
- [135] J.G. Bayly, V.B. Kharta, and W.H. Stevens. The absorption spectra of liquid phase H_2O , HDO and D_2O from $0.7 \mu m$ to $10 \mu m$. *Infrared Physics*, 3 :211–223, 1963.
- [136] Susanne Ebert, Kort Travis, Bryan Lincoln, and Jochen Gluck. Fluorescence ratio thermometry in a microfluidic dual-beam laser trap. *Optics Express*, 15 :15493 – 15499, 2007.
- [137] Erwin J. G. Peterman, Frederick Gittes, and Christoph F. Schmidt. Laser-induced heating in optical traps. *Biophysical Journal*, 84 :1308 – 1316, 2003.
- [138] J. P. Holman. *Heat Transfert*. Eight SI - metric edition, 2001.
- [139] Pierre-Yves Lagrée. Transfert thermique et massiques dans les fluides. <http://www.lmm.jussieu.fr/~lagree/COURS/ENSTA/coursENSTA.html>, 2009.
- [140] Bernard Eyglunet. *Manuel de thermique théorie et pratique 2ème édition*. HERMES, 1997.
- [141] J. Sakakibara and R. J. Adrian. Whole field measurement of temperature in water using two-color laser induced fluorescence. *Experiments in Fluids*, 26 :7–15, 1999.
- [142] J. W. Lichtman and JA Conchello. Fluorescence microscopy. *Nature Methods*, 2 :910–919, 2005.
- [143] M. Born and E. Wolf. *Principles of Optiques 7th (expanded) edition*. Cambridge University Press, 2003.
- [144] W. S. Rasband. Imagej. <http://rsb.info.nih.gov/ij/>, National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA, 2009.
- [145] A. Singh, G.W. Korrol, and S.A. Antonsen. Possible formation of singlet oxygen from vibrationally excited water. *Journal of Photochemistry*, 25 :99–104, 1984.
- [146] O.S. Finikova, A.Y. Lebedev, A. Aprelev, T. Troxler, F. Gao, C. Garnacho, S. Muro, R.M. Hochstrasser, and S.A. Vinogradov. Oxygen microscopy by two-photon-excited phosphorescence. *ChemPhysChem*, 9 :1673–1679, 2008.
- [147] L.A. Greene and A.S. Tischler. Establishment of a noradrenergic clonal line of rat adrenal pheochromocytoma cells which respond to nerve growth factor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 73(7) :2424, 1976.
- [148] A. Ashkin, JM Dziedzic, JE Bjorkholm, and S. Chu. Observation of a single-beam gradient force optical trap for dielectric particles. *Optics Letters*, 11 :288–290, 1986.
- [149] S.K. Mohanty, M. Sharma, and P.K. Gupta. Generation of ROS in cells on exposure to CW and pulsed near-infrared laser tweezers. *Photochemical & Photobiological Sciences*, 5(1) :134–139, 2006.
- [150] M.P. Landry, P.M. McCall, Z. Qi, and Y.R. Chemla. Characterization of Photoactivated Singlet Oxygen Damage in Single-Molecule Optical Trap Experiments. *Biophysical journal*, 97(8) :2128–2136, 2009.

- [151] R.W. Redmond and I.E. Kochevar. Spatially resolved cellular responses to singlet oxygen. *Photochemistry and photobiology*, 82(5) :1178–1186, 2006.
- [152] F. Wilkinson, W.P. Helman, and A.B. Ross. Rate constants for the decay and reactions of the lowest electronically excited singlet state of molecular oxygen in solution. An expanded and revised compilation. *Journal of Physical and Chemical Reference Data*, 24(2) :663–1022, 1995.
- [153] T.J. Dougherty, C.J. Gomer, and K.R. Weishaupt. Energetics and efficiency of photoinactivation of murine tumor cells containing hematoporphyrin. *Cancer Research*, 36(7 Part 1) :2330, 1976.
- [154] S. Coutier, S. Mitra, L.N. Bezdetnaya, R.M. Parache, I. Georgakoudi, T.H. Foster, and F. Guillemin. Effects of Fluence Rate on Cell Survival and Photobleaching in Meta-Tetra-(hydroxyphenyl) chlorin-photosensitized Colo 26 Multicell Tumor Spheroids. *Photochemistry and Photobiology*, 73(3) :297–303, 2001.
- [155] CF Cesarone, C. Bolognesi, and L. Santi. Improved microfluorometric DNA determination in biological material using 33258 Hoechst. *Analytical Biochemistry*, 100(1) :188–197, 1979.
- [156] B. Alberts, A. Johnson, J. Lewis, M. Raff, K. Roberts, and P. Walter. *Molecular biology of the cell. 2002 - 4th Ed.* Garland Science, Taylor and Francis Group, 2002.
- [157] G. Koopman, CP Reutelingsperger, GA Kuijten, RM Keehnen, ST Pals, and MH Van Oers. Annexin V for flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on B cells undergoing apoptosis. *Blood*, 84(5) :1415, 1994.
- [158] I. Vermes, C. Haanen, H. Steffens-Nakken, and C. Reutelingsperger. A novel assay for apoptosis flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on early apoptotic cells using fluorescein labelled annexin V. *Journal of immunological methods*, 184(1) :39–51, 1995.
- [159] M. van Engeland, L.J.W. Nieland, F.C.S. Ramaekers, B. Schutte, and C.P.M. Reutelingsperger. Annexin V-affinity assay : a review on an apoptosis detection system based on phosphatidylserine exposure. *Cytometry Part A*, 31(1) :1–9, 1998.
- [160] O. Honda, M. Kuroda, I. Joja, J. Asaumi, Y. Takeda, S. Akaki, I. Togami, S. Kanazawa, S. Kawasaki, and Y. Hiraki. Assessment of secondary necrosis of Jurkat cells using a new microscopic system and double staining method with annexin V and propidium iodide. *International journal of oncology*, 16(2) :283, 2000.
- [161] H. Lecoœur, M.C. Prévost, and M.L. Gougeon. Oncosis is associated with exposure of phosphatidylserine residues on the outside layer of the plasma membrane : a reconsideration of the specificity of the annexin V/propidium iodide assay. *Cytometry Part A*, 44(1) :65–72, 2001.
- [162] M. Vitale, L. Zamai, G. Mazzotti, A. Cataldi, and E. Falcieri. Differential kinetics of propidium iodide uptake in apoptotic and necrotic thymocytes. *Histochemistry and Cell Biology*, 100(3) :223–229, 1993.
- [163] J. Yamamoto, S. Yamamoto, T. Hirano, S. Li, M. Koide, E. Kohno, M. Okada, C. Inenaga, T. Tokuyama, N. Yokota, Susummu Teragkwa, and Horoki Namba. Monitoring of singlet oxygen is useful for predicting the photodynamic effects in the treatment for experimental glioma. *Clinical Cancer Research*, 12(23) :7132, 2006.
- [164] C. Blanc, Q.L. Deveraux, S. Krajewski, R.U. Janicke, A.G. Porter, J.C. Reed, R. Jaggi, and A. Marti. Caspase-3 is essential for procaspase-9 processing and cisplatin-induced apoptosis of MCF-7 breast cancer cells. *Cancer research*, 60(16) :4386, 2000.
- [165] R.U. Jänicke, M.L. Sprengart, M.R. Wati, and A.G. Porter. Caspase-3 is required for DNA fragmentation and morphological changes associated with apoptosis. *Journal of Biological Chemistry*, 273(16) :9357, 1998.
- [166] MAJ Gorman et al. New trends in photobiology : : Current perspectives of singlet oxygen detection in biological environments. *Journal of Photochemistry and Photobiology B : Biology*, 14(3) :159–176, 1992.

- [167] C.N. Banwell and E.M. McCash. *Fundamentals of molecular spectroscopy 4^e ed.* McGraw-Hill London, 1994.
- [168] RS Mulliken. Interpretation of the atmospheric oxygen bands ; electronic levels of the oxygen molecule. *Nature*, 122(3075) :505, 1928.
- [169] B.F. Minaev. Intensities of spin-forbidden transitions in molecular oxygen and selective heavy-atom effects. *International Journal of Quantum Chemistry*, 17(2) :367–374, 1980.
- [170] L.K. Andersen and P.R. Ogilby. Absorption spectrum of singlet oxygen in D₂O : Enabling the test of a model for the effect of solvent on oxygen’s radiative transitions. *J. Phys. Chem. A*, 106(46) :11064–11069, 2002.
- [171] D. Weldon and P.R. Ogilby. Time-resolved absorption spectrum of singlet oxygen in solution. *J. Am. Chem. Soc.*, 120(49) :12978–12979, 1998.
- [172] SH Lin, J. Lewis, and TA Moore. Application of the collision-complex model to the photo-physical processes of singlet oxygen in liquids. *Journal of Photochemistry and Photobiology A : Chemistry*, 56(1) :25–34, 1991.
- [173] T.D. Poulsen, P.R. Ogilby, and K.V. Mikkelsen. Solvent Effects on the $O_2(a^1\Delta_g)$ - $O_2(X^3\Sigma_g^-)$ Radiative Transition : Comments Regarding Charge-Transfer Interactions. *J. Phys. Chem. A*, 102(48) :9829–9832, 1998.
- [174] T. Foster. Excitation transfer. *Ann. Phys.(Leipzig)*, 2 :12–19, 1948.
- [175] E.A. Jares-Erijman and T.M. Jovin. FRET imaging. *Nature Biotechnology*, 21(11) :1387–1395, 2003.
- [176] R. Schmidt. Comparative analysis of the collisional deactivation of $O_2(^1\Delta_g)$, $O_2(^1\Sigma_g^+)$, $SO(^1\Sigma^+)$, $SeO(^1\Sigma^+)$ and $NF(^1\Sigma^+)$ by small polyatomic molecules. *Journal of Photochemistry and Photobiology A : Chemistry*, 80(1-3) :1–5, 1994.
- [177] CS Foote and EL Clennan. *Properties and reactions of singlet dioxygen.* Active oxygen in chemistry - Blackie Academic and Professional, 1995.
- [178] B.R. Andersen, T.F. Lint, and A.M. Brendzel. Chemically shifted singlet oxygen spectrum. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects*, 542(3) :527–536, 1978.
- [179] J. Cadet, J.L. Ravanat, G.R. Martinez, M.H.G. Medeiros, and P.D. Mascio. Singlet oxygen oxidation of isolated and cellular DNA : Product formation and mechanistic insights. *Photochemistry and Photobiology*, 82(5) :1219–1225, 2006.
- [180] E. Skovsen, J.W. Snyder, J.D.C. Lambert, and P.R. Ogilby. Lifetime and diffusion of singlet oxygen in a cell. *J. Phys. Chem. B*, 109(18) :8570–8573, 2005.
- [181] F. Ritossa. A new puffing pattern induced by temperature shock and DNP in *Drosophila*. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 18(12) :571–573, 1962.
- [182] J. Baier, M. Maier, R. Engl, M. Landthaler, and W. Bäumlner. Time-resolved investigations of singlet oxygen luminescence in water, in phosphatidylcholine, and in aqueous suspensions of phosphatidylcholine or HT29 cells. *J. Phys. Chem. B*, 109(7) :3041–3046, 2005.
- [183] IBC Matheson and J. Lee. Reaction of chemical acceptors with singlet oxygen produced by direct laser excitation. *Chemical Physics Letters*, 7(4) :475–476, 1970.
- [184] J. Moan, Q. Peng, JF Evensen, K. Berg, A. Western, and C. Rimington. Photosensitizing efficiencies, tumor-and cellular uptake of different photosensitizing drugs relevant for photodynamic therapy of cancer. *Photochemistry and Photobiology*, 46(5) :713–721, 1987.
- [185] K.R. Weishaupt, C.J. Gomer, and T.J. Dougherty. Identification of singlet oxygen as the cytotoxic agent in photo-inactivation of a murine tumor. *Cancer research*, 36(7 Part 1) :2326, 1976.
- [186] L. Ma, J. Moan, and K. Berg. Evaluation of a new photosensitizer, meso-tetra-hydroxyphenyl-chlorin, for use in photodynamic therapy : a comparison of its photobiological properties with those of two other photosensitizers. *International Journal of Cancer*, 57(6) :883–888, 1994.

- [187] A. A. Krasnovsky Jr., N. N. Drozdova, Ya. V. Roumbal, A. V. Ivanov, and R. V. Ambartzumian. Biophotonics of molecular oxygen : activation efficiencies upon direct and photosensitized excitation. *Chinese Optics Letters*, 3 :S1–S4, 2005.
- [188] A. A. Krasnovsky Jr., Ya. V. Roumbal, A. V. Ivanov, and R. V. Ambartzumian. Solvent dependance of the steady-state rate of 1O_2 generation upon excitation of dissolved oxygen by cw 1267 nm laser radiation in air-saturated solutions : Estimates of the absorbance and molar absorption coefficients of oxygen at the excitation wavelength. *Chemical Physics Letters*, 430 :260–264, 2006.
- [189] S. Jockusch, N. J. Turro, E. K. Thompson, M. Gouterman, J. B. Callis, and G. E. Khalil. Singlet molecular oxygen by direct excitation. *Photochemical and Photobiological Sciences*, 7 :235–239, 2008.
- [190] L Skuja and B. Güttler. Detection of Interstitial Molecules in SiO_2 Glass by Direct Photoexcitation of the Infrared Luminescence of Singlet O_2 . *Physical Review Letters*, 77 :2093–2096, 1996.
- [191] Joseph W. Goodman. *Introduction à l'optique de Fourier et à l'holographie*. MASSON ET Cie, EDITEURS, 1972.
- [192] L. Tao and C. Nicholson. The three-dimensionnal point spread functions of a microscope objective in image and object space. *Journal of Microscopy*, 178 :267–271, 1995.
- [193] W.S. Chan, J.F. Marshall, R. Svensen, J. Bedwell, and I.R. Hart. Effect of sulfonation on the cell and tissue distribution of the photosensitizer aluminum phthalocyanine. *Cancer research*, 50(15) :4533, 1990.
- [194] P.C. Lee and M.A.J. Rodgers. Singlet molecular oxygen in micellar systems. 1. Distribution equilibriums between hydrophobic and hydrophilic compartments. *The Journal of Physical Chemistry*, 87(24) :4894–4898, 1983.
- [195] AP Losev, IN Nichiporovich, IM Byteva, NN Drozdov, and IF Jghgami. The perturbing effect of solvents on the luminescence rate constant of singlet molecular oxygen. *Chemical Physics Letters*, 181(1) :45–50, 1991.
- [196] C.J. Gomer, S.W. Ryter, A. Ferrario, N. Rucker, S. Wong, and A.M.R. Fisher. Photodynamic therapy-mediated oxidative stress can induce expression of heat shock proteins. *Cancer Research*, 56(10) :2355, 1996.
- [197] J. Dahle, S. Bagdonas, O. Kaalhus, G. Olsen, H.B. Steen, and J. Moan. The bystander effect in photodynamic inactivation of cells. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects*, 1475(3) :273–280, 2000.
- [198] J. Dahle, S.O. Mikalsen, E. Rivedal, and H.B. Steen. Gap Junctional Intercellular Communication is not a Major Mediator in the Bystander Effect in Photodynamic Treatment of MDCKII Cells. *Radiation Research*, 154(3), 2000.
- [199] J.L. Lions and R. Dautray. *Analyse mathématique et calcul numérique pour les sciences et les techniques*. Masson, 1988.
- [200] P. Laurent-Gengoux and D. Verwaerde. Analyse des équations aux dérivées partielles. Ecoles Centrale Paris - <http://perso.ecp.fr/~laurent/Modelf/>, 2006.
- [201] J.P. Pérez. *Optique, fondements et applications*. Dunod (Paris), 2004.
- [202] Bo Zhang, Josiane Zeburia, and Jean-Christophe Olivo-Marin. Gaussian approxiamtions of fluorescence microscope point spread function models. *Applied Optics*, 46 :1819–1829, 2007.