



Université Lille 1
Sciences et Technologies
Ecole Doctorale **SMRE**

THÈSE

pour obtenir le titre de
Docteur de l'Université Lille 1

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

présentée et soutenue publiquement par :
Aude SIVERY

Dynamique du stress en cellules vivantes

soutenue publiquement le 18 juillet 2014 devant le jury composé de :

Valérie LALLEMAND-MEZGER	Directeur de recherche - Université Paris Diderot	Rapporteur
Marie ERARD	Maître de conférence - Université Paris Sud	Rapporteur
Jean-Marie AUBRY	Professeur - Ecole Nationale Supérieure de Chimie de Lille	Examinateur
Georges WLODARCZAK	Professeur - Université Lille 1	Examinateur
Stéphane GUYOT	Maître de conférence - AgroSup Dijon	Examinateur
Emmanuel COURTADE	Maître de conférence - Université Lille 1	Directeur de Thèse

Thèse préparée, au sein du Laboratoire de Physique des Lasers, Atomes et Molécules
(UMR 8523), Université Lille 1 - Sciences et Technologies,
sous la direction d'Emmanuel Courtade.

Numéro d'Ordre : 41464

Année 2014

Résumé

La cellule lutte à chaque instant contre les perturbations afin de maintenir l'équilibre de son milieu intérieur, et permettre sa survie. L'apparition d'espèces oxydantes ou l'augmentation de la température sont autant de perturbations auxquelles une cellule doit faire face. Mon travail de thèse s'est articulé autour de la dynamique temporelle des stress oxydant et thermique en cellules vivantes.

L'originalité de l'équipe dans laquelle j'ai effectué ma thèse est de proposer une alternative aux photothérapies dynamiques en produisant directement, sans photosensibilisant, de l'oxygène singulet considéré comme l'agent cytotoxique principal dans la réponse au stress oxydant. Cette façon de produire directement l'oxygène singulet permet non seulement d'adresser plus directement des questions de dosimétrie qui sont importantes en thérapie mais aussi d'identifier les macromolécules impliquées dans le stress oxydant. Dans une première partie je présenterai des études de cinétique photochimique qui ont permis de déterminer dans différents solvants et en cellule, le taux de production et la réactivité de l'oxygène singulet avec un partenaire spécifique.

Dans une seconde partie, je présenterai mes travaux sur la dynamique temporelle de réponse au stress thermique en cellules vivantes. Le développement d'un modèle mathématique minimal de titration du stress thermique couplé à des expériences associant un facteur de transcription clef dans la régulation du stress, nous ont permis de mettre en évidence les contributions des principales réactions impliquées dans le mécanisme de réponse cellulaire au stress thermique.

Mots clefs : oxygène singulet, lasers, microscopie optique de cellules vivantes, microscopie de fluorescence, thermométrie optique, stress oxydant, mort cellulaire, photophysique, photochimie, photobiologie, cinétique chimique, interface physique-biologie, réponse au stress thermique, modélisation mathématique.

Abstract

The cell fight everytime against disturbances to maintain the balance of its internal environment and ensure its survival. The appearance of oxidative species or increasing the temperature are all major perturbations which the cell has to face. My thesis is structured around the temporal dynamics of oxidative and thermal stress in living cells.

The originality of the team where I did my thesis, is to propose an alternative way to phototherapy dynamic in producing directly, without a photosensitizer, singlet oxygen which is considered as the main cytotoxic agent in the oxidative stress response. This way of producing directly singlet oxygen allows to address dosimetry issues that are important in therapy but also, to identify the macromolecules involved in oxidative stress more directly. In the first part, I will present photochemical kinetics studies that have enable to determine in different solvents and in cells, the production rate and the reactivity of singlet oxygen with a specific partner.

In the second part, I will present my work on the temporal dynamics of heat stress response in living cells. The development of a minimal mathematical model of titration of thermal stress coupled with experiments involving a key transcription factor in the regulation of stress, allowed us to identify the main reactions involved in the mechanism of cell response to heat shock.

Key words : singlet oxygen, lasers, optical microscopy of living cells, fluorescence microscopy, optical thermometry, oxidative stress, cell death, photophysics, photochemistry, photobiology, chemical kinetics, physics-biology interface, heat shock response, mathematical modeling.

La fixité du milieu intérieur suppose une perfection de l'organisme de telle sorte que les variations externes sont à chaque instant compensées et équilibrées. Ainsi, loin d'être indifférent au monde extérieur, l'animal supérieur est au contraire dans une constante et savante relation avec lui de telle manière que son équilibre résulte d'une compensation continue et subtile, établie par la plus sensible des balances.

Claude Bernard

Remerciements

Ce travail de thèse a été pour moi une expérience extrêmement enrichissante et épanouissante tant d'un point de vue intellectuel qu'humain. Cette période a été le fruit de nombreuses rencontres qui ont coloré l'histoire et le cheminement de ce projet.

Ce travail a été réalisé au sein du laboratoire PhLAM de l'Université de Lille 1, je tiens donc à remercier son directeur Georges Wlodarczak pour la confiance et le soutien apportés à notre équipe de recherche.

Je remercie les membres du jury qui ont accepté d'évaluer mon travail. Je remercie Valérie Lallemand Mezger et Marie Erard d'avoir accepté d'être rapporteur de cette thèse, ainsi que Jean-Marie Aubry et Stéphane Guyot d'avoir été examinateurs de cette thèse.

Je tiens à adresser mes remerciements à l'équipe qui m'a encadrée pendant mon parcours de thèse. J'ai bénéficié de l'encadrement de plusieurs personnes travaillant sur des disciplines différentes. Mes remerciements vont donc à Emmanuel Courtade, Quentin Thommen, François Anquez, Ikram El Yazidi Belkoura.

Je tiens à remercier mon directeur de thèse Emmanuel Courtade d'avoir accepté d'encadrer cette thèse. Son expérience et sa patience ont permis l'avancée de ce projet de recherche. L'espace de liberté qu'il m'a laissé dans la gestion de mon travail ainsi que la confiance qu'il a su m'accorder ont été précieuses pour moi. Les nombreuses discussions que nous avons pu avoir ont permis l'émergence d'idées nouvelles, l'ouverture vers de nouvelles collaborations et l'enrichissement de cette thèse.

Quentin, qui au départ d'une discussion s'est retrouvé embarqué malgré lui au coeur des projets de recherche de l'équipe, a été un véritable soutien tout au long de cette thèse. L'expérience qu'il a pu m'apporter sur de nombreux aspects de mon travail a été très enrichissante pour moi. Les heures passées à chercher des granules sur un écran d'ordinateur resteront parmi les bons moments de cette thèse.

Je remercie François Anquez, que j'ai succédé en thèse, et que j'ai eu la joie (;-)) de retrouver dans l'équipe lors de ma dernière année de thèse. Par sa rigueur, François a su me pousser dans mes retranchements et a su m'apporter toute son expertise et sa passion.

Je remercie Ikram pour m'avoir apporté son expertise en biologie expérimentale et avoir été disponible pour répondre aux questionnements parfois farfelus que notre équipe de physicien pouvaient parfois se poser.

Je tiens également à remercier Stéphane Randoux et Pierre Suret, les opticiens non linéaires incohérents de l'équipe ;-), pour leur présence et leur soutien. Ils ont su m'apporter leurs compétences et leur passion. Leur humour et leur bonne humeur ont rendu cette thèse agréable.

Adam Stankiewicz, un biologiste sûrement un peu fou pour être venu rejoindre notre équipe de physiciens lors de ma deuxième de thèse, a été d'un grand soutien et a su m'apporter son expertise et ses idées sur des questionnements biologiques.

Je tiens également à remercier les personnes avec qui nous avons réalisé des collaborations enrichissantes et fructueuses. Je remercie Jean-Marie Aubry et Christel Pierlot pour l'étude de l'oxygène singulet en solvants. Bien plus qu'une aide technique, ils ont su m'apporter des idées nouvelles et nous avons pu échanger nos points de vue. Je remercie également Rabah Boukherroub et Alexandre barras pour l'expertise qu'ils ont apportée dans la formulation des nanocapsules lipidiques. Les nombreux échanges que nous avons pu avoir avec Alexandre ont été extrêmement importants et enrichissants pour moi. Je remercie Valérie Lallemand-Mezger pour nous avoir reçu à Paris et accepté de partager nos compétences et idées. Enfin, je remercie l'équipe de Claire Vourc'h et Catherine Souchier pour la transfection des cellules HEK.

Ce travail n'aurait pu être réalisé sans toutes les personnes qui ont apporté leur soutien technique. Merci à l'atelier d'électronique, Hervé, Jean, Michel, Christian et Thierry pour leur dépannage (toujours dans l'urgence...) et leur efficacité. Merci à l'atelier de mécanique de l'UFR de physique, Laurent, Jean-luc et Daniel pour avoir découpé et redécoupé des pièces pour qu'elle puisse enfin

rentrer dans nos dispositifs expérimentaux ! Merci à l'équipe technique du CERLA, Thierry et Marc pour leur bonne humeur et leur sympathie. Merci à Laurent Hay pour la patience et l'aide apportée sur l'interfaçage des instruments.

Merci également à tous ceux qui ont pris part à l'installation du nouveau labo de culture cellulaire, Thierry pour le démontage de la serre, Jean-Luc, pour votre efficacité et surtout votre bonne humeur.

Puis, il y a tous ceux qui ont partagé le labo ou le bureau pour un temps plus ou moins long. Merci à Nico, qui a usé de patience pour mes débuts en programmation. Merci à Paul et Adriana d'avoir apporté un peu de gaiété à mes débuts de thèse. Merci aux doctorants et post-doctorants qui ont fait des séjours parfois éclairs dans le bureau, mais qui ont su apporter leur personnalité et faire partager leur culture. Merci à Pierre, qui a rejoint notre bureau en cours de thèse, et qui a su apporter sa bonne humeur. Merci également à Arslan qui a rejoint notre équipe et qui je l'espère me succédera dans l'équipe.

Ce projet a pu aboutir grâce à toutes les personnes qui m'ont soutenu, même inconsciemment. Merci à mes amies Stéphanie, Sarah, Julie et Claire, toujours présentes, d'avoir été un bol d'air pour moi lors de nos soirées entre filles ! Merci à mon ami d'enfance Eglantine d'avoir été présente. Merci à Anaïs pour son éternel sourire et sa présence à mes côtés. Merci aussi à mes voisins (et oui, ça existe des voisins sympas !), Ludivine, Christophe, Judith, Louis-Pierre, Hélène, Cindy, Antoine, Antoine (n°2) et Auriane pour toutes ces soirées à vos côtés qui m'ont permis de faire le vide. Merci également à mes compagnons de galère rencontrés lors de la préparation de l'agrégation, Mohammed, Arthur, Benoît, Virginie, Ange et Marion.

Et puis, il y a ma famille, qui a toujours eu beaucoup de mal à comprendre ce que je faisais et qui, malgré tout, a toujours été présente. Je tiens à remercier mes parents pour leur amour et leur soutien tout au long de mon parcours (qui a commencé en maternel...). Mes frères, Jean-baptiste, Marc et Thibaut qui m'ont soutenu et qui chacun à leur manière ont permis de rendre mon projet de thèse réalisable.

Et enfin il y a toi, Sébastien qui a accepté ce projet de thèse et qui m'a toujours apporté ton soutien même dans les moments difficiles. Tu as toujours été présent et tu as su me rassurer lors des moments de doute. Grâce à toi, j'ai pu acquérir un peu plus de cette confiance en moi qui me fait souvent défaut. Alors, merci pour ton amour et ton soutien indéfectible.

Ethan et Maxence, peut être tomberez-vous un jour sur ce manuscrit et vous serez intrigué parce que le nom de maman est en première page, alors votre curiosité vous poussera peut-être jusqu'à cette page (au delà je n'y crois pas trop...quoique, il y a de jolies images...). Ethan, maman a démarré ce projet alors que tu avais à peine 2 mois, cela n'a pas été facile pour maman de te laisser si petit chez la nounou, mais tes sourires lorsque je rentrais le soir compensaient ces moments d'absence. Maxence, tu n'étais pas encore né et maman entamait sa 2^{me} année de thèse, cela a été un super challenge mais ton grand frère et ton papa ont assuré ! Sachez tous les deux que ce projet a demandé un investissement important à votre maman mais qu'il a été passionnant. Sachez que je vous aime et que je serai toujours là pour vous (même si vous aussi vous vous lancez dans le pari un peu fou de faire une thèse...).

Table des matières

Introduction	8
I Introduction générale	13
1 Homéostasie cellulaire et protéostasie	15
1.1 Définitions	15
1.1.1 Homéostasie cellulaire	15
1.1.2 Protéostasie	15
1.2 Réseau de la protéostasie	16
2 Rôle central pour le facteur de transcription <i>HSF1</i> dans les mécanismes de réponse au stress	19
2.1 Définition et fonctions des facteurs de transcription	19
2.2 Le facteur de transcription <i>HSF1</i>	20
2.2.1 Structure et fonctions	20
2.2.2 Modifications post-traductionnelles d' <i>HSF1</i>	22
2.3 <i>HSF1</i> impliqué dans la réponse aux stress thermique et oxydant	23
2.3.1 <i>HSF1</i> dans la réponse au stress oxydant	23
2.3.2 <i>HSF1</i> senseur du stress via des changements de son état redox	24
II Etude de la production et de la réactivité de 1O_2 créé par excitation optique directe à 1270 nm	27
3 L'oxygène singulet : espèce cytotoxique au coeur de photothérapie	29
3.1 Introduction	29
3.2 La thérapie photodynamique	29
3.2.1 Introduction	29
3.2.2 Mécanismes de production d'ERO par PDT	30
3.2.3 Dosimétrie de la PDT : quantité d'oxygène singulet produite	31
3.2.4 Localisation du photo-agent	31
3.3 Schéma alternatif à la PDT	32
3.3.1 Contexte	32
3.3.2 Mort cellulaire induite par irradiation laser à 1270 nm	33
3.3.3 Motivations	34
3.4 Axes et objectifs de mon travail de thèse	36
4 Etude du taux de production et de la réactivité de 1O_2 en solvants organiques	37
4.1 Contexte	37
4.2 Modélisation des mécanismes réactionnels	38

4.2.1	Système d'équations	38
4.2.2	Solution analytique pour la vitesse de disparition du piège	38
4.2.3	Simulation numérique	39
4.3	Résultats expérimentaux en solvants organiques	41
4.3.1	Dispositif expérimental	41
4.3.2	Résultats expérimentaux	41
4.3.3	Vérification des résultats obtenus avec un autre piège : le rubrène	45
4.3.4	Expériences complémentaires	45
4.4	Discussion et conclusions	48
5	Etude du taux de production et de la réactivité de 1O_2 dans l'eau	51
5.1	Position du problème en milieu aqueux	51
5.1.1	État de l'art des données dans D_2O et H_2O	51
5.1.2	Sondes de l'oxygène singulet en milieu aqueux	52
5.1.3	Utilisation du DPIBF piégé en nanocapsules lipidiques (LNCs) et du rubrène-2,3,8,9-tetracarboxylate de potassium (RTC)	53
5.2	DPIBF encapsulé en LNCs dans D_2O	53
5.2.1	Présentation des LNCs	53
5.2.2	Théorie	53
5.2.3	Taux de production de 1O_2 et réactivité avec DPIBF dans les dispersions de LNCs dans D_2O	56
5.2.4	Influence de la fraction volumique en LNCs sur le taux de production de 1O_2 et réactivité avec le DPIBF	58
5.3	Étude dans D_2O et H_2O pur avec le composé hydrosoluble RTC	59
5.3.1	Méthode	59
5.3.2	Résultats dans D_2O	59
5.3.3	Effets du chauffage laser	60
5.3.4	Spectre d'absorption de l'oxygène pour la transition $^3O_2[{}^3\Sigma_g^-] \longrightarrow ^1O_2[{}^1\Delta_g]$	61
5.3.5	Étude dans H_2O	61
5.4	Comparaison des résultats obtenus avec le DPIBF encapsulé dans les LNCs et le RTC	63
5.5	Discussion et Conclusions	64
	Vérification de la loi d'Einstein en solution	65
5.6	Introduction à la loi d'Einstein	65
5.7	Discussion sur les résultats	65
5.8	Conclusion	67
6	Etude de la réactivité de 1O_2 en cellules	69
6.1	Contexte et Méthodes	69
6.1.1	Introduction	69
6.1.2	Dispositif expérimental	69
6.1.3	Incorporation du DPIBF en cellule	70
6.1.4	Quantification de la concentration en DPIBF intracellulaire	71
6.2	Résultats expérimentaux	73
6.2.1	Irradiation des cellules à 1270 nm	73
6.2.2	Analyse des résultats	74
6.3	Discussion et conclusions	75
6.4	Perspectives	76

III	Dynamique temporelle du stress thermique en cellules vivantes	77
7	Introduction au stress thermique	79
7.1	Historique	79
7.2	Introduction au stress thermique	80
7.3	Les chaperons moléculaires	81
7.3.1	Les protéines de stress thermique	81
7.3.2	Réseau des chaperons moléculaires	82
7.4	Le contrôle qualité des protéines : Réparation ou dégradation ?	83
7.5	Mécanismes de réponse au stress thermique	85
7.5.1	Modèle d'un <i>ARN</i> senseur thermique	85
7.5.2	Réponse intrinsèque	85
7.5.3	Contrôle neuronal	86
7.5.4	Déplacement des chaperons	87
7.6	Granules de stress nucléaires en cellules humaines	87
7.6.1	Composition et fonction	87
7.6.2	Cibles chromosomiques	88
7.6.3	Dynamique temporelle et spatiale	89
7.6.4	Structure d' <i>HSF1</i> dans les granules et relation avec la transcription des gènes <i>hsps</i>	89
7.7	Questions ouvertes dans la réponse au stress thermique	90
7.7.1	Rôle des structures de stress nucléaires	90
7.7.2	Rôle des transcrits des séquences satellite III	91
7.7.3	Présence d' <i>HSF2</i> dans les corps de stress nucléaire	91
7.8	Le laser pour sonder les mécanismes cinétiques biologiques moléculaires	92
7.8.1	Ordres de grandeur	92
7.8.2	Corrélation de la dose thermique à la réponse au stress thermique	92
7.8.3	Cinétique du stress thermique et réponse au stress thermique	94
7.8.4	Induction d'un stress thermique par laser	95
7.9	Axes et objectifs de mon travail de thèse	96
8	Modélisation de la réponse au stress thermique	97
8.1	Modèle mathématique de titration de la réponse au stress thermique	97
8.1.1	Intérêt de modéliser et de simplifier le réseau de régulation du stress thermique	97
8.1.2	Modèles de titration actuels	98
8.1.3	Conclusions	101
8.2	Modèle mathématique minimal de titration	102
8.2.1	Introduction et description d'un modèle mathématique minimal	102
8.2.2	Intégration de la viabilité cellulaire au modèle	103
8.2.3	Résultats numériques	104
8.2.4	Évolution temporelle des espèces réactionnelles	106
8.2.5	Conclusions du modèle de titration minimal	107
8.2.6	Prédictions du modèle minimal sur la thermotolérance	110
8.3	Discussion et conclusions	111
9	Induction d'un stress thermique par laser	115
9.1	Dispositif expérimental pour l'induction d'un stress thermique par laser	115
9.1.1	Introduction	115
9.1.2	Description du dispositif expérimental	116
9.1.3	Premières observations en absence de stress	117
9.2	Détermination de l'élévation de température	117
9.2.1	Méthode	117

9.2.2	Réalisation pratique	120
9.2.3	Peut-on s'affranchir du stress oxydant ?	123
9.3	Résultats expérimentaux	123
9.3.1	Les granules de stress nucléaires révèlent l'activation de la réponse au stress thermique	123
9.3.2	Confirmation de l'élévation de température induite par laser sur les cinétiques des granules de stress nucléaires	124
9.3.3	Effet de la cinétique de montée en température sur la cinétique des granules de stress nucléaires	125
9.3.4	Observations expérimentales d'un effet lié à l'oxygène sur les granules de stress nucléaires	128
9.3.5	Conclusions	131
9.3.6	Discussion	131
9.4	Hétérogénéité dans la réponse au stress	133
9.4.1	Réponse localisée de réponse au stress : possible rôle des communications cellulaires	133
9.4.2	Effets du cycle cellulaire et du métabolisme	134
9.5	Perspectives : Vers un couplage modélisation/expériences	135
9.5.1	Effet de la cinétique de montée en température	135
9.5.2	Stress thermiques courts ($\sim min$)	136
9.5.3	Discussion et conclusions	137
Conclusions		140
Annexes		146
A Expériences complémentaires pour l'étude de l'oxygène singulet en milieu aqueux		147
A.1	Élévation de température induite par le laser infrarouge dans D_2O et H_2O	147
A.1.1	Mesure de l'élévation de température	147
A.1.2	Influence de l'élévation de température sur la concentration en oxygène dissous et sur le temps de vie de 1O_2	147
A.2	Evolution du coefficient d'absorption linéaire α dans D_2O en fonction de la longueur d'onde	148
A.3	Expériences complémentaires	149
A.3.1	Saturation des solutions de RTC en O_2 ou N_2	149
A.3.2	Influence des produits d'oxydation sur la cinétique de disparition du RTC	149
B Dispersions de nanocapsules lipidiques en milieu aqueux		151
B.1	Détail de l'analyse cinétique du modèle à deux pseudophases dans les dispersions de LNCS en milieu aqueux	151
B.2	Formulation des nanocapsules lipidiques	152
B.2.1	Réactifs et solvants utilisés	152
B.2.2	Préparation des LNCs chargées en DPIBF	153
B.2.3	Détermination de la concentration en DPIBF dans les LNCs	153
B.3	Expériences complémentaires	153
B.3.1	Formation de deux produits d'oxydation durant l'irradiation à 1270 nm	153
B.3.2	Analyse des fuites de DPIBF et des produits d'oxydation formés	153
B.3.3	Effet de l'irradiation à 1270 nm sur la stabilité des LNCs	154
B.4	Effet de solvant sur la vitesse de dégradation du DPIBF dans les dispersions de LNCs en milieu aqueux	154

C	Protocole de culture cellulaire	157
C.1	Lignée cellulaire HEK transfectées <i>HSF1</i> – <i>eGFP</i>	157
C.1.1	Plasmide et transfection cellulaire	157
C.1.2	Culture cellulaire	157
C.2	Lignée cellulaire MCF-7	158
D	Étude de la réactivité de 1O_2 en cellules vivantes	159
D.1	Protocole de détermination de la concentration intracellulaire en DPIBF	159
D.1.1	Préparation des solutions de DPIBF	159
D.1.2	Incubation du DPIBF en cellules vivantes	159
D.1.3	Extraction du DPIBF incubé en cellules	159
D.2	Courbe de calibration de fluorescence du DPIBF dans l'éthanol	160
D.3	Détermination de la concentration intracellulaire en DPIBF	160
E	Modélisation du stress thermique	163
E.1	Modèle mathématique de titration actuel du stress thermique	163
E.1.1	Systèmes d'équations différentielles ordinaires	163
E.1.2	Jeu de paramètres obtenus	163
E.2	Modèle mathématique minimal de titration du stress thermique	163
F	Détermination expérimentale de l'élévation de température induite par laser	169
F.1	Formulation des solutions de rhodamine B et 110	169
F.1.1	Préparation des solutions mères dans l'éthanol	169
F.1.2	Préparation des solutions finales dans l'eau à 1 % d'éthanol	169
F.2	Stockage des solutions de rhodamine	170
G	Programme de détection et de suivi des granules de stress nucléaires	171
G.1	Développement d'un programme de détection et de suivi des granules	171
G.2	Illustration sur un exemple	171
H	Diffraction de la lumière, limite de résolution et profondeur de champ	173
H.1	Introduction au concept de diffraction des ondes lumineuses	173
H.2	Formation de l'image par une lentille	173
H.2.1	Optique géométrique	173
H.2.2	Optique ondulatoire	173
H.2.3	Limite de résolution transversale du microscope optique	174
H.2.4	Ouverture numérique	175
H.2.5	Notion de profondeur de champ	175
H.3	Focalisation d'un faisceau laser gaussien à travers une lentille	175
	Bibliographie	179

Introduction

J'ai effectué ma thèse au sein du laboratoire de Physique des Lasers Atomes et Molécules (PhLAM) de l'Université de Lille 1 - Sciences et technologies qui regroupe des chercheurs travaillant autour des interactions lumière matière. Le laboratoire regroupe ainsi des équipes travaillant dans des domaines variés, tels que la spectroscopie, les atomes froids, la photonique et la dynamique non linéaire.

L'équipe "Dynamique non linéaire des systèmes optiques et biologiques" dans laquelle j'ai effectué ma thèse, a été fondée récemment au laboratoire PhLAM avec comme intérêt l'étude biophysique du vivant. Notre activité, qui a démarré en 2006, repose sur la dynamique du stress (oxydant et thermique) en cellule vivante. Ce projet vise à mieux comprendre les mécanismes cinétiques et fonctionnels mis en jeu lors de l'induction d'un stress à l'échelle cellulaire.

Notre équipe regroupe des compétences aux interfaces entre physique et biologie qui s'articulent dans une approche intégrative autour de la modélisation (pour la compréhension des réseaux de régulation), de l'optique (pour l'imagerie du vivant et sonder les interactions lumière/matière) et de la chimie. La richesse des projets de l'équipe vient de la complémentarité de ces approches. Ainsi, les méthodes utilisées à des échelles de temps et d'espace différentes permettent une vision d'ensemble des mécanismes réactionnels de la réponse au stress cellulaire.

La cellule est un milieu vivant qui doit veiller en permanence à maintenir une stabilité relative des différentes composantes de son milieu interne et ce, malgré les changements constants de l'environnement externe : c'est ce qu'on appelle l'homéostasie. Lorsque la cellule est soumise à un stress alors l'homéostasie de la cellule est perturbée. La cellule va mettre en oeuvre un ensemble de mécanismes réactionnels lui permettant de rétablir cet équilibre. Les stress auxquels une cellule peut être soumise peuvent être de nature très variés : exposition à des métaux lourds, création d'espèces oxydantes, élévation de la température ...

Ces stress vont perturber l'homéostasie cellulaire et peuvent donc, si la cellule n'est pas capable d'y faire face, être néfastes. Ces stress peuvent donc être mis à profit dans le but de détruire une cellule indésirable, notamment les cellules cancéreuses. Dans le traitement du cancer, la chirurgie, la chimiothérapie et les rayons ionisants sont les méthodes les plus utilisées, la PhotoThérapie Dynamique (PDT) fait son apparition en France dans les années 1990 pour le traitement de carcinomes basocellulaires ¹ ou de la DMLA ².

Dans la PDT, la combinaison d'un agent photo-sensibilisant et de la lumière conduit à la destruction du tissu indésirable. L'activation du photo-agent par la lumière va conduire à la formation d'espèces oxydantes qui vont créer dans la cellule un stress oxydant pouvant conduire, s'il n'est pas régulé par la cellule, à la mort cellulaire. En PDT, parmi les espèces réactives formées, l'oxygène singulet ³ est considéré comme l'espèce cytotoxique principale impliquée dans les mécanismes de stress oxydant.

L'équipe a proposé un schéma alternatif possible à la PDT, reposant sur une excitation laser directe à 1270 nm de l'oxygène singulet sans utiliser d'agent photo-sensibilisant. La production d'oxygène singulet à 1270 nm a permis d'obtenir la mort de cellules cancéreuses. Ce schéma alternatif a l'avantage, contrairement à la PDT, d'être un système "pur" de création d'oxygène singulet ce qui permet potentiellement de (i) simplifier la quantification d'oxygène singulet produite, qui est nécessaire pour une dosimétrie prédictive en thérapie et (ii) comprendre les mécanismes de mort cellulaire induite par la création d'oxygène singulet.

La première partie de mon travail de thèse s'est portée sur le stress oxydant, et plus particulièrement l'étude du taux de production et la réactivité de l'oxygène singulet créé à 1270 nm. Avant

¹Le carcinome basocellulaire est le cancer de la peau le plus fréquent. Survenant généralement après 60 ans, il est favorisé par des expositions solaires répétées.

²La Dégénérescence Maculaire Liée à l'Age (DMLA) est une maladie qui provoque une déformation du champ visuel.

³L'oxygène singulet est le premier état électronique excité, singulet de spin, du dioxygène

d'aborder le système complexe que représente la cellule, je me suis intéressée aux solvants. Dans un premier temps, mon étude s'est tournée vers les solvants organiques, là où les pièges chimiques spécifiques de l'oxygène singulet sont nombreux et bien étudiés. Des expériences de photochimie sur les cinétiques de réactivité de l'oxygène singulet ont permis d'obtenir des taux de production et de réactivité de l'oxygène singulet dans ces solvants.

L'eau est un élément majoritaire dans la composition des cellules, en effet, les cellules sont composées à 80 % en volume d'eau. L'étude de l'oxygène singulet en milieux aqueux est donc une étape importante avant l'étude en milieux biologiques. Nous avons utilisé des nanocapsules lipidiques afin de pouvoir solubiliser un piège chimique de l'oxygène singulet hydrophobe.

L'étude en milieux hétérogènes, représentés par les dispersions de nanocapsules lipidiques dans l'eau, a permis le développement d'un modèle cinétique à deux pseudophases permettant d'évaluer l'effet de la complexité de l'environnement sur la production et la réactivité de l'oxygène singulet. Ce modèle cinétique en milieu hétérogène représente un premier pas vers l'étude du système complexe que représente la cellule.

Enfin, des études préliminaires en cellules vivantes, ont été menées afin d'évaluer la réactivité de l'oxygène singulet en milieu biologique et d'apporter des réponses quant à la réactivité intracellulaire de celui-ci.

Une seconde partie de mon travail de thèse s'est portée sur le stress thermique, et plus particulièrement sur l'étude de sa dynamique temporelle en cellules vivantes.

Chaque protéine possède une action biologique spécifique. Pour fonctionner, celle-ci doit posséder une conformation adéquate. Ainsi, des modifications de conformation des protéines non contrôlées par la cellule, peuvent être néfastes. Des dysfonctionnements dans les mécanismes de réparation des protéines dénaturées ou mal conformées peuvent conduire à l'accumulation d'agrégats de protéines. Ces phénomènes, qui augmentent avec l'âge, sont à l'origine de maladies neurodégénératives, telles que la maladie d'Alzheimer ou de Parkinson.

Le stress thermique induit la formation et l'accumulation de protéines dénaturées dans la cellule. De nombreuses espèces impliquées dans la réponse au stress thermique ainsi que certains mécanismes réactionnels de régulation ont été découverts. Ainsi le facteur de transcription, HSF1 est fortement impliqué dans ce réseau de régulation. Également, les protéines chaperons, chargées notamment de garantir la conformation optimale des protéines et de réparer les protéines dénaturées, sont fortement impliquées dans ce réseau de régulation. Cependant, la hiérarchisation des mécanismes réactionnels ainsi que les partenaires clés de la réponse au stress thermique sont mal décrits à l'heure actuelle. De plus, bien que très détaillés, de nombreux modèles mathématiques du stress thermique ne sont pas capables de reproduire les données expérimentales de la littérature.

Dans un premier temps, j'ai développé un modèle mathématique minimal de titration des protéines chaperons qui vise à identifier les mécanismes de régulation essentiels afin de (i) décrire les expériences et (ii) être prédictif. Non seulement, ce modèle décrit les observations expérimentales, mais il met également en lumière les partenaires clés de la réponse au stress thermique, identifie des régimes de température distincts et révèle un équilibre de réparation/dégradation des protéines dénaturées comme mécanisme clé du réseau de régulation du stress thermique.

Dans un second temps, j'ai développé un dispositif expérimental d'induction d'un stress thermique par laser sur une population de cellules, génétiquement modifiées pour exprimer une protéine *HSF1* fluorescente. L'élévation de température est ainsi finement contrôlée et peut être modulée temporellement. Le stress thermique induit le recrutement des protéines *HSF1* fluorescentes, vers des cibles de l'ADN spécifiques, où elles forment des granules de stress nucléaires. Des expériences de vidéo-microscopie en fluorescence permettent alors de suivre la dynamique temporelle de ces structures lors de l'induction d'un stress thermique par laser.

L'intérêt de modéliser les mécanismes réactionnels d'un réseau de régulation est de prédire un comportement cellulaire. La perspective de mon projet de thèse sur le stress thermique était donc

de coupler approche expérimentale et modélisation. C'est pourquoi, dans une étude préliminaire, j'ai testé les prédictions du modèle de titration minimal pour des conditions de stress thermique particulières.

Première partie

Introduction générale

Chapitre 1

Homéostasie cellulaire et protéostasie

1.1 Définitions

1.1.1 Homéostasie cellulaire

Le phénomène d'homéostasie fut observé et décrit en 1878 par le médecin et physiologiste français, Claude Bernard 'La fixité du milieu intérieur est la condition d'une vie libre et indépendante'. C'est en 1939 que le terme fut créé par l'américain Walter Bradford Cannon, selon qui 'L'homéostasie est l'équilibre dynamique qui nous maintient en vie'. L'homéostasie se définit comme la capacité de l'organisme de maintenir un état de stabilité relative des différentes composantes de son milieu interne et ce, malgré les changements constants de l'environnement externe. L'homéostasie est en réalité un état d'équilibre dynamique dans lequel les conditions du milieu interne peuvent varier. Ces variations ne doivent cependant pas dépasser certaines limites au-delà desquelles la survie des cellules est menacée. L'homéostasie est maintenue quand les besoins cellulaires sont satisfaits. L'environnement interne de la cellule est le siège de changements continuels qui vont provoquer des déséquilibres interne que la cellule se doit de compenser. Quand la cellule assure la satisfaction de ces besoins physiologiques alors la cellule maintient cet état d'équilibre dynamique appelé homéostasie.

Lorsque la cellule est soumise à un stress alors l'homéostasie de la cellule est perturbée. La cellule va alors mettre en oeuvre un ensemble de mécanismes réactionnels pour lui permettre de rétablir cet équilibre et ainsi de permettre sa survie. En présence d'un stress, la cellule va avoir deux possibilités qui dépendent majoritairement de la durée, de l'intensité du stress ainsi que de la nature du stress, pour activer une réponse au stress afin de permettre la survie de la cellule ou activer une voie de signalisation de mort. Si l'intensité du stress ne dépasse pas un certain niveau, alors la cellule peut le supporter et elle va mettre en oeuvre une réponse protectrice face à ce stress pour assurer la survie des cellules. A l'inverse, si la cellule ne peut activer ou maintenir une réponse face au stress alors des cascades de signalisation de stress qui peuvent conduire aux voies de mort cellulaires sont mises en place [1]. Le mécanisme par lequel une cellule meurt qui peut être apoptotique, nécrotique, pyroptose, ou autophagique dépend de la capacité de la cellule de faire face aux conditions auxquelles elle est exposée.

1.1.2 Protéostasie

L'homéostasie des protéines également appelée protéostasie est le processus qui régule les protéines à l'intérieur de la cellule pour maintenir la santé du protéome ¹ et de l'organisme lui-même. Ainsi, ce processus est au centre du développement cellulaire, il permet également de lutter contre les dommages liés au vieillissement cellulaire et protège les cellules des maladies [2–4]. La protéostasie exerce un contrôle de la concentration, de la structure, des interactions et de la localisation des

¹Protéome : ensemble des protéines exprimées dans une cellule, une partie d'une cellule (membranes, organites) ou un groupe de cellules (organes, organismes, groupe d'organismes) dans des conditions données et à un moment donné.

protéines de la cellule qui implique souvent des changements au niveau transcriptionnel et traductionnel [5]. La fonctionnalité du protéome est essentielle à tous les processus cellulaires et centrale pour la santé de l'organisme et la durée de vie.

Le stress et les mutations qui affectent la formation et la stabilité des protéines perturbent la protéostasie. Au cours du temps et durant le vieillissement, les dommages protéiques s'accumulent, ces événements contribuent à l'effondrement de la protéostasie qui sont également observés dans les pathologies de conformation protéique telles que les maladies neurodégénératives, le cancer, et les maladies métaboliques [4]. Différents stress environnementaux (le stress thermique, les métaux lourds, les espèces réactives de l'oxygène (ERO) ...), les physiopathologies (la fièvre, l'inflammation, les infections bactériennes ...), les pathologies de conformation protéique ainsi que la croissance et le développement (le cycle cellulaire, les facteurs de croissance, la différenciation ...) peuvent induire un déséquilibre de la protéostasie (voir figure 1.1) [4].

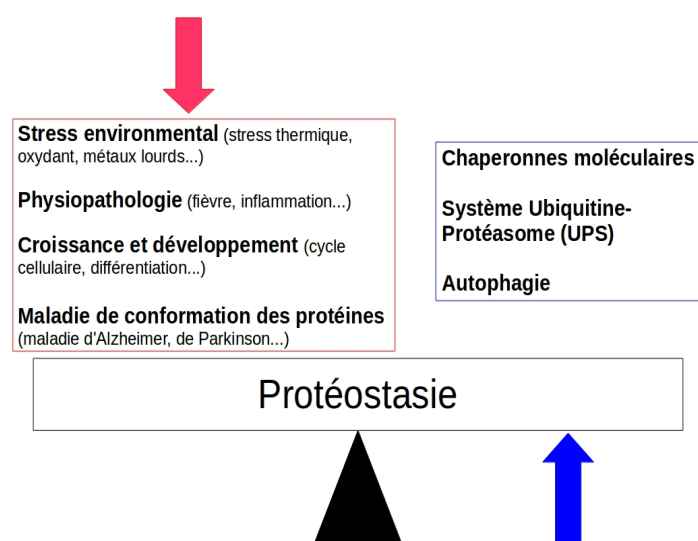


FIG. 1.1: La protéostasie. Différents stress environnementaux ou physiologiques induisent un déséquilibre de l'homéostasie des protéines : (i) les stress environnementaux tels que le stress thermique, le stress oxydant, les métaux lourds, (ii) les physiopathologies tels que la fièvre, l'inflammation, les infections bactériennes, (iii) les pathologies de conformation protéique tels que la maladie d'Alzheimer, la maladie de Parkinson et (iv) la croissance et le développement tels que le cycle cellulaire, la différenciation. Le réseau de la protéostasie incluant les chaperons moléculaires, le système ubiquitine-protéasome (Ubiquitin Proteasome System, UPS) et les mécanismes d'autophagie, va permettre de rétablir la protéostasie et de réparer ou dégrader les protéines dénaturées.

1.2 Réseau de la protéostasie

La stabilité de chaque protéine du protéome de chaque cellule et tissu est réalisée grâce à des interactions avec les composés du réseau de la protéostasie (proteostasis network (PN) en anglais). Le réseau de la protéostasie est un réseau dynamique qui contrôle l'état fonctionnel de chaque protéine. Ce réseau répond à un déséquilibre de protéines endommagées ou mal formées à l'intérieur de chaque compartiment cellulaire [4]. Ainsi, le réseau de la protéostasie gouverne et contrôle le chemin de vie d'une protéine de sa naissance à sa mort.

La protéostasie n'implique pas une seule voie ou un unique mécanisme mais est maintenue grâce à un réseau fortement interconnecté comprenant de nombreuses voies qui contrôlent : la synthèse, la formation, le trafic, l'agrégation, la désagrégation et la dégradation des protéines. Ce réseau

comprend les chaperons moléculaires ² qui influencent la formation, la conformation et la stabilité des protéines, le système ubiquitine-protéasome (Ubiquitin Proteasome System, UPS) et les activités d'autophagie pour nettoyer les dommages protéiques [4]. Ainsi, le réseau de la protéostasie permet de rétablir le déséquilibre de la protéostasie causé par des stress environnementaux et physiologiques (voir figure 1.1).

Parmi les senseurs clés du stress cellulaire on distingue la réponse au stress thermique (HSR, Heat Shock Response) et la réponse aux protéines dépliées (UPR, Unfolded Protein Response) qui orchestrent ensemble la santé du protéome [2, 6]. La réponse au stress thermique, en régulant l'expression des chaperons moléculaires et d'autres composés du réseau de la protéostasie, rétablit la stabilité du protéome et rééquilibre la balance de la protéostasie afin de restaurer la cellule et de prévenir les dommages protéiques [2, 6, 7]. L'UPR quant à lui est un mécanisme de réponse face à l'accumulation de protéines mal formées dans le réticulum endoplasmique (RE) qui engendre l'augmentation d'expression des protéines chaperons et stimule les voies de dégradation des protéines associées au RE [8].

²Protéines chaperons : protéine dont la fonction est d'assister d'autres protéines dans leur maturation en leur assurant un repliement tridimensionnel adéquat. Les chaperons assistent également les protéines dans leur stabilité, aident à leur réparation en cas de dommages réversibles et les amènent à la dégradation en cas de dommages importants.

Chapitre 2

Rôle central pour le facteur de transcription *HSF1* dans les mécanismes de réponse au stress

Une cellule peut être exposée à des stress de nature très différente : stress oxydant, métaux lourds, stress chimique, thermique... En fonction du stress rencontré, la cellule va mettre en place différents mécanismes réactionnels afin de faire face à celui-ci.

Parmi les mécanismes de réponse au stress, on peut distinguer la réponse au stress thermique, l'UPR mais également la réponse aux dommages à l'ADN et la réponse au stress oxydant [1]. Face à un stimulus externe, la cellule met en oeuvre un mécanisme de réponse adapté. Cependant, ces voies de réponse ne sont pas totalement dissociées les unes des autres. Ainsi, des couplages existent entre le stress oxydant et d'autres voies de réponse au stress. Par exemple, le stress oxydant peut induire l'expression de certaines protéines de stress inductibles, notamment *HSP27* [9–11]. Or, les protéines de stress thermique sont connues pour protéger les cellules de stress divers : thermique, métaux lourds, monoxyde d'azote et d'autres oxydants [12]. De plus, l'activation de l'UPR stimule la régulation positive de gènes antioxydants [13]. De même, des perturbations dans l'équilibre rédox de la cellule sensibilisent la cellule aux effets néfastes d'un stress du RE [14]. On comprend alors la complexité et la diversité des différents mécanismes de réponse au stress ainsi que leurs étroites interconnexions.

Le facteur de transcription *HSF1* a un rôle central dans l'activation de la réponse face à différents types de stress. Ainsi, les stress engendrant la formation de protéines dénaturées, induisent l'activation d'*HSF1* qui va alors promouvoir la transcription des gènes de stress thermique, augmentant ainsi le niveau des protéines de stress thermique *HSPs* dans la cellule [15]. Les stress thermique et oxydant ont la propriété d'activer *HSF1* et d'induire son activité transcriptionnelle, induisant ainsi la production des gènes de stress thermique (*hsps*) [12].

2.1 Définition et fonctions des facteurs de transcription

En Biologie moléculaire un facteur de transcription est une protéine qui se lie à des séquences spécifiques de l'ADN, contrôlant ainsi le taux de transcription de l'information génétique codée par l'ADN en ARN. Les facteurs de transcription, seul ou en complexe avec d'autres protéines, activent ainsi ou répriment le recrutement de l'ARN polymérase¹ vers des gènes spécifiques. Une des spécificité commune des facteurs de transcription est la présence d'un ou plusieurs domaine de liaison à l'ADN (DBD), qui s'attachent à des séquences spécifiques de l'ADN adjacentes des gènes qu'ils régulent.

Les facteurs de transcription sont impliqués dans des fonctions diverses telles que le développement (exemple de la famille des facteurs de transcription *Hox*), le contrôle du cycle cellulaire

¹L'ARN polymérase est une enzyme qui permet la transcription de l'information génétique de l'ADN en ARN.

(exemple de l'oncogène *Myc*) et la pathogénèse (exemple des effecteurs *TAL*). Certains facteurs de transcription peuvent être activés en réponse à des signaux intercellulaires (exemple du récepteur à oestrogène) ou en réponse à l'environnement (exemple de la famille *HSF*).

2.2 Le facteur de transcription *HSF1*

2.2.1 Structure et fonctions

A cause de son rôle central dans la réponse au stress thermique et de la conservation de sa fonction au cours de l'évolution *HSF1* est de loin le mieux caractérisé de tous les membres de la famille des *HSF* (aujourd'hui, quatre membres de la famille *HSF* ont été découverts chez les mammifères voir détail au Chap. 7).

HSF1 est exprimé de manière constitutive dans la plupart des tissus et des types cellulaires et est régulé principalement par des modifications post-traductionnelles [16]. En absence de stress, la liaison à l'ADN et la capacité de *trans*-activation² d'*HSF1* sont soumises à une régulation négative, et la majorité des molécules d'*HSF1* sont présentes sous forme de monomères distribués de manière uniforme dans le noyau et le cytoplasme. Dans des conditions de stress engendrant la formation de protéines dénaturées, *HSF1* est convertie de manière rapide en une forme active pour la transcription. Plusieurs étapes sont nécessaires : formation des trimères d'*HSF1* (ce qui va permettre par la suite la liaison d'*HSF1* à l'ADN), accumulation d'*HSF1* vers le noyau et modifications post-traductionnelles (sumoylation³, acétylation, phosphorylation) [17].

La première étape dans l'activation d'*HSF1* nécessite la conversion de la forme monomérique d'*HSF1* vers la forme active trimérique. En cas de stress cellulaire, la distribution cellulaire d'*HSF1* est elle aussi affectée. Dans des conditions normales la distribution d'*HSF1* est majoritairement nucléaire mais *HSF1* peut également circuler entre le cytoplasme et le noyau [18, 19]. En condition de stress thermique, l'export d'*HSF1* vers le cytoplasme est inhibé et on observe une relocalisation d'*HSF1* vers le noyau [19]. Chez l'homme, on observe également des structures nucléaires particulières appelées nuclear Stress Bodies (nSBs) dont la fonction est inconnue à l'heure actuelle [20]. Il n'est pas encore clair si les modifications post-traductionnelles sont nécessaires ou jusqu'à quel point elles le sont pour l'activation d'*HSF1*. Lorsque le stress est arrêté ou après un stress prolongé l'activité transcriptionnelle d'*HSF1* est atténuée et *HSF1* retourne à son état inerte monomérique.

La figure 2.1 présente le détail de la structure du facteur de transcription *HSF1* chez l'homme d'après [5]. Nous allons détailler brièvement la structure des principaux domaines d'*HSF1*.

Domaine de liaison à l'ADN

La région la plus conservée entre les membres de la famille des *HSF* est la région N-terminal du domaine de liaison à l'ADN (DBD pour DNA Binding Domain) voir Figure 2.1 (a), c'est aussi cette région pour laquelle le plus de données structurales sont disponibles. Ce domaine se compose d'un motif hélice-tour-hélice mais contrairement à beaucoup d'autres facteurs de transcription, ce motif d'*HSF1* ne fait pas de contact direct avec l'ADN [21] mais stabilise la forme trimérique d'*HSF1* lié à l'ADN par des interactions protéine-protéine [22]. La forme trimérique d'*HSF1* possède une affinité pour les sites *HSE* bien supérieure à la forme monomérique [23]. *HSF1* se fixe préférentiellement sur des sites *HSE* contenant au moins trois motifs *nGAAn* répétés (Fig. 2.1 (a)) [24,25]. De plus, de nombreux promoteurs des gènes cibles d'*HSF1* possèdent des motifs *nGAAn* répétés étendus ou plus d'un *HSE* ce qui permet la liaison simultanée et coopérative de plusieurs trimères d'*HSF1* [23,24].

² *Trans*-activation : Capacité de promouvoir l'expression d'un gène ou d'un ensemble de gènes.

³ Sumoylation : liaison enzymatique et covalente des protéines *SUMO* avec les résidus lysine des protéines cibles.

⁴ Une séquence heptad répétée est un motif structural qui se compose d'un motif répétitif de sept acides aminés.

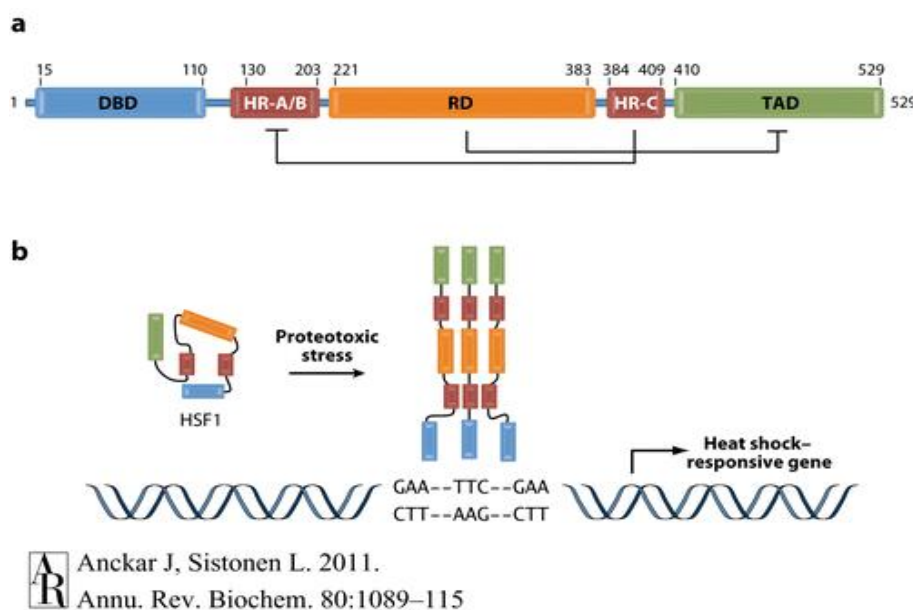


FIG. 2.1: Structure du facteur de transcription *HSF1* chez l'homme d'après [5]. (a) Le domaine DBD (pour DNA Binding Domain) inclue le domaine N-terminal comportant ~ 100 acides aminés ainsi que la région la plus conservée entre les membres de la famille des *HSF*. La liaison d'*HSF1* avec l'ADN nécessite une étape de trimérisation qui est régulée par la séquence heptad répétée (HR)-A/B/C⁴. La trimérisation d'*HSF1* se fait par la formation d'une structure en super hélice triple brins générée par interactions intermoléculaires entre les domaines HR-A/B et HR-C. La capacité de *trans*-activation d'*HSF1* vient du domaine C-terminal (TAD) trans-activable, qui est régulé de manière négative par le domaine (RD) situé au milieu d'*HSF1*. (b) *HSF1* peut être activée par une multitude de stress engendrant des dommages protéiques. Sous activation *HSF1* se trimérise via les domaines HR-A/B, s'accumule dans le noyau, subit des modifications post-traductionnelles et se lie aux *HSE* qui comprennent des répétitions inversées du pentamère *nGAAn* au niveau des promoteurs des gènes *hsps* et des autres gènes cibles.

Domaine d'oligomérisation

La trimérisation d'*HSF1* est régulée par un domaine d'oligomérisation qui se situe à proximité du DBD (voir Figure 2.1 (a)). Ce domaine est riche en contenu α -hélicoïdal et se divise en deux sous domaines chacun contenant une hélice amphiphile avec les motifs HR-A et HR-B ou HR-A/B [26,27]. Dans la forme trimérique d'*HSF1*, la région HR-A/B forme une structure très allongée dans laquelle des contacts intermoléculaires hydrophobes entre les régions HR-A/B engendrent la formation d'une configuration étonnante en super hélice triple brins [27]. La trimérisation spontanée d'*HSF1* est évitée grâce au domaine hydrophobe HR-C situé entre le domaine de régulation (RD) et de *trans*-activation (TADs). Il semblerait que ce domaine se replie et interagisse avec le domaine HR-A/B pour maintenir *HSF1* dans sa forme inactive [28]. Le passage de la forme monomérique inactive à trimérique active et capable de se lier à l'ADN nécessite donc le passage d'une super hélice à interactions intramoléculaires à une super hélice à interactions intermoléculaires [16].

Domaine de *trans*-activation

Le domaine C-terminal d'*HSF1* facilite l'activité transcriptionnelle des gènes cibles et régule le niveau d'activation d'*HSF1* (Figure 2.1 (a)). La structure de cette région est peu connue et apparaît majoritairement dépliée, le repliement peut être observé en une structure plus compacte, partiellement structurée en présence d'un pH acide ou de détergents cationiques [29]. La région C-terminal contient 150 acides aminés et est constituée de deux domaines TADs, TAD1 and TAD2 [30]. TAD1 se situe entre les acides aminés 401 et 420 et est riche en acides aminés hydrophobes. En

comparaison, les limites de TAD2 sont moins bien définies. TAD2 se situe entre les acides aminés 431 et 529 et contient des résidus acides et hydrophobes. Dans des essais de transcriptions *in vitro*, TAD1 and TAD2 sont capables de stimuler les activités transcriptionnelles d'initiation et d'élongation mais ces capacités sont contrôlées par des modules différents à l'intérieur de ces TADs.

Domaine de régulation

En absence de stress le domaine TAD d'*HSF1* est restreint par le domaine de régulation (RD) situé entre les régions HR-A/B et HR-C (Figure 2.1 (a)) [31]. Le domaine RD exerce un contrôle négatif sur les domaines TAD et prévient l'activation d'*HSF1* en absence de dommages protéiques [30,31]. Le domaine de régulation d'*HSF1* possède la propriété intrinsèque d'être sensible au stress thermique [30]. Le domaine RD d'*HSF1* est la cible de nombreuses modifications post-traductionnelles : phosphorylation, sumoylation et acétylation. La régulation négative d'*HSF1* peut donc être modulée par les modifications post-traductionnelles du RD.

2.2.2 Modifications post-traductionnelles d'*HSF1*

Une fois *HSF1* convertit de sa forme monomère vers sa forme trimère, celui-ci demeure inactif vis-à-vis de l'induction de transcription des gènes *hsps*. D'autres mécanismes sont donc nécessaires pour activer la transcription des gènes cibles d'*HSF1*. Ainsi les modifications post-traductionnelles de phosphorylation, sumoylation et acétylation du trimère d'*HSF1* vont permettre de réguler l'activité transcriptionnelle d'*HSF1*.

Phosphorylation

L'obtention de l'activité transcriptionnelle du trimère d'*HSF1* se fait en même temps que l'hyperphosphorylation ⁵ des résidus sérine (S) qui se trouve principalement sur le domaine de régulation (RD) [32]. L'analyse menée par l'équipe de Guettouche *et al.* sur plus de 90 % de la séquence des acides aminés d'*HSF1* a montré la phosphorylation d'au moins 12 résidus de sérine et aucune détection de phosphorylation des résidus thréonine ou tyrosine [33]. Alors que des mutations sur la plupart des sérines ne semblent pas affecter l'activation de *trans*-activation d'*HSF1* [33], à contrario, la réponse au stress thermique est affectée si des mutations touchent les sérines S326 et S230 [34,35]. Étonnamment certaines phosphorylations semblent réprimer l'activité transcriptionnelle d'*HSF1* [5]. Il semblerait que la phosphorylation des sérines S303 et S307 soit sensible au stress, empêchant ainsi l'activation d'*Hsf1* en absence de stress [32,36]. La déphosphorylation de ces deux sérines va permettre, en situation de stress, l'activité transcriptionnelle d'*HSF1*.

Sumoylation

L'effet inhibiteur engendré par la phosphorylation d'*HSF1* a été révélé lorsqu'on a découvert que la phosphorylation de la sérine S303 était le signal de départ pour la sumoylation (fixation d'une protéine SUMO ⁶) d'*HSF1* sur K298 [38,39]. Dans *HSF1*, les motifs adjacents de sumoylation et de phosphorylation forment un motif étendu suggérant une étape de phosphorylation pré-requise à l'étape de sumoylation. Ces motifs appelés PDSM (pour Phosphorylation-Dependent Sumoylation Motif) ont été découverts initialement sur *HSF1* et ont depuis été décrits sur d'autres facteurs de transcription [39,40]. La sumoylation subséquente à la phosphorylation d'*HSF1*, réprime l'activité transcriptionnelle d'*HSF1* [39]. La phosphorylation-sumoylation d'*HSF1* sur les PDSM sert de mécanisme principal par lequel le domaine de régulation (RD) freine l'activité transcriptionnelle d'*HSF1* [30]. Cette hypothèse est soutenue par le fait que la répression de sumoylation d'*HSF1* est

⁵L'hyperphosphorylation correspond à l'état totalement phosphorylé d'une molécule. Celui-ci apparaît lorsque tous les sites potentiels de phosphorylation de la molécule sont occupés.

⁶SUMO : petites protéines ressemblant de part leur structure, mais pas dans leur fonction, aux ubiquitines, se fixent transitoirement de manière covalente aux lysines (K) de nombreuses protéines cellulaires [37].

observée en cas de stress thermique et que celle-ci se fait progressivement avec la sévérité du stress thermique. Pour les cellules exposées à des stress modérés la sumoylation d'*HSF1* est maintenue et est détectable après un stress prolongé. Par contre, sur les cellules exposées à des stress plus sévères, la sumoylation est transitoire [39]. Ceci suggère que la persistance de sumoylation d'*HSF1* est sensible au stress et restreint l'activité d'*HSF1* en cas de stress modéré. Cependant des questions restent en suspens notamment : Quel mécanisme permet la sumoylation d'*HSF1* conduisant ainsi à sa répression ? Les mécanismes de répression par sumoylation sont complexes, ils sont spécifiques à un substrat donné et peuvent faire intervenir des contrôle de stabilité du substrat, de séquestration, de changement de conformation ou des recrutements de corepresseurs de transcription [37]. En cas de stress thermique, le niveau d'*HSF1* reste constant [39] et se retrouve transitoirement co-localisé avec les protéines SUMO dans les nSBs, mais le recrutement *HSF1* vers ces structures ne nécessite pas la sumoylation préalable d'*HSF1* [38]. Bien que les protéines SUMO répriment clairement l'activité d'*HSF1* dans les analyses du gène rapporteur et sur les promoteurs des gènes *hsp*s endogènes [39], les gènes cibles d'*HSF1* affectés par la sumoylation doivent encore être étudiés.

Acétylation

Une des modifications post-traductionnelles subies par *HSF1* concerne l'induction d'une acétylation en cas de stress [41]. En cas de stress thermique, le niveau d'*HSF1* acétylé augmente graduellement et apparaît décalé dans le temps par rapport à la phosphorylation d'*HSF1*, suggérant un rôle pour l'acétylation d'*HSF1* dans la phase d'atténuation de l'activité d'*HSF1*. L'acétylation d'*HSF1* est réduite en présence de la sirtuine 1⁷ (*SIRT1*). Il a été observé que la durée d'interaction entre *HSF1* et l'ADN pouvait être augmentée ou diminuée par la présence de composés chimiques activant ou inhibant l'activité de *SIRT1* respectivement, ce qui suggère que la désacétylation d'*HSF1* par *SIRT1* peut maintenir *HSF1* dans un état compétent pour sa fixation à l'ADN [41]. Au contraire de la phosphorylation d'*HSF1* qui se fait majoritairement au niveau du domaine de régulation (RD), l'acétylation d'*HSF1* se fait sur des lysines localisées sur des régions impliquées dans les propriétés fondamentales pour l'activité d'*HSF1* tels que les sites de reconnaissance de l'ADN, les régions d'oligomérisation et de localisation subcellulaire [41]. L'acétylation des cibles K208 et K224 pourrait contribuer à l'exportation d'*HSF1* en dehors du noyau [19]. Les lysines K116 et K118 sont localisées dans la région flexible connectant le DBD au HR-A/B *HSF1* et des mutations de cette région affecte la formation des trimères d'*HSF1* [42]. L'atténuation la réponse au stress thermique via l'acétylation d'*HSF1* pourrait donc résulter de plusieurs mécanismes différents.

2.3 *HSF1* impliqué dans la réponse aux stress thermique et oxydant

Bien que l'activation d'*HSP* soit un procédé central conservé en biologie, les mécanismes précis de senseur de stress et de signalisation permettant l'activation d'*HSF1*, ainsi que les mécanismes par lesquels des stress distincts activent *HSF1* sont mal connus. Aujourd'hui une nouvelle figure émerge et révèle l'étroite interconnexion entre mécanismes de réponse au stress thermique et stress oxydant.

2.3.1 *HSF1* dans la réponse au stress oxydant

L'exposition des cellules NIH-3T3 à un stress oxydant (H_2O_2 et ménadione) conduit à l'activation d'*HSF* [43] (un unique membre de la famille *HSF* était connu à ce stade). Cependant l'activation d'*HSF* par le stress oxydant n'induit pas, contrairement au stress thermique, d'accumulation de

⁷Sirtuine : classe d'enzymes ayant une activité déacétylase sur les histones, leur conférant une fonction régulatrice de l'expression des gènes. Elles se retrouvent aussi bien chez les organismes eucaryotes que procaryotes. Leur nom provient de Silent mating type Information Regulation two, un gène retrouvé chez les levures. Chez l'homme, il en existe 7 formes différentes, nommées de *SIRT1* à *SIRT7*.

l'*ARNm* d'*HSP70* ou des protéines de stress thermique. Ainsi, l'activation d'*HSF* induite par stress oxydant n'induit pas la transcription des gènes de stress thermique, indiquant que cette activation pourrait avoir une fonction différente de l'activation d'*HSF* induite par traitement thermique [43].

Cependant, des études ont permis de révéler l'induction de certaines protéines de stress inducibles, notamment *HSP27* en condition de stress oxydant [9–11]. De plus, en cellules d'origine lymphoïde les ERO sont capables d'induire l'accumulation d'*HSP70* et durant la recouvrance à l'hypoxie, l'accumulation d'*HSP70* est aussi observée (voir références dans [43]). Les résultats observés en cellules lymphoïdes pourraient indiquer des mécanismes spécifiques à chaque tissu. Quand les cellules NIH-3T3 sont soumises à une hypoxie puis en recouvrance, *HSP70* semble effectivement s'accumuler indiquant l'existence d'un mécanisme différent impliqué dans l'hypoxie comparé à l'application d'un stress oxydant externe [43].

Il est possible par ailleurs que le stress oxydant induise la trimérisation d'*HSF* mais pas la phosphorylation subséquente qui est nécessaire à l'activation transcriptionnelle d'*HSF* (voir détail des modifications post-traductionnelles d'*HSP1* dans 2.2.2). *HSP* est également impliqué dans la transcription de gènes différents des gènes de stress thermique, habituellement transcrits après exposition aux ERO ou au stress thermique. Ainsi différents types de stress pourraient activer la fixation d'*HSP* à l'ADN, mais le niveau de phosphorylation pourrait déterminer les gènes qui seront effectivement transcrits et si *HSP* jouera le rôle de régulateur positif ou négatif dans l'expression des gènes [43].

Le prétraitement au peroxyde d'hydrogène sensibilise fortement les cellules de manière spécifique au traitement thermique et induit la perte du potentiel membranaire mitochondrial [44]. L'exposition à H_2O_2 bloque l'induction d'*HSP40/HSP70* de la réponse au stress thermique (HSR, pour Heat Shock Response) et la réparation des protéines endommagées. Ainsi, l'inhibition du HSR et des activités de réparation sont cruciales pour l'augmentation de sensibilité cellulaire face au traitement thermique médiée par H_2O_2 [44]. Ces mécanismes de réponse au stress non contrôlés pourraient augmenter le taux de mortalité cellulaire. Ainsi, le stress oxydant est un facteur crucial qui affecte la tolérance au stress thermique [44]. L'effet biologique induit par H_2O_2 provient donc majoritairement de l'inhibition du HSR médiée par *HSP1*, et un lien étroit entre la réparation des protéines endommagées et la protection contre la perte de potentiel membranaire mitochondrial a été mis en évidence [44]. En conclusion, le stress oxydant inhibe le HSR et la réparation des protéines endommagées et diminue ainsi leur fonction protectrice contre le stress thermique.

De nombreuses études font le lien entre le stress oxydant et thermique et suggèrent une augmentation synergique de mort cellulaire induite par les deux stress, ainsi l'augmentation de production des ERO pour les cellules stressées thermiquement a été mis en évidence (voir références dans [44]). Cependant, aucune augmentation dans la production d'ERO n'est détectée dans les cellules T98G (human malignant glioma) après traitement thermique [44]. Or *HSP70* et d'autres chaperons induites par le stress thermique sont capables de réduire le stress oxydant [45], et il est donc possible que la corruption du HSR puisse augmenter la production d'ERO et contribuer à l'augmentation de mort cellulaire spécialement quand les cellules sont exposées à des stress oxydants persistants

2.3.2 *HSP1* senseur du stress via des changements de son état rédox

L'étude menée par S-G Ahn et D. J. Thiele [46] révèle *in vitro* et *in vivo* qu'*HSP1* est capable de sentir directement à la fois la chaleur et le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) pour s'assembler en un homotrimère d'une manière réversible et que ce mécanisme est régulé par l'état rédox d'*HSP1*. L'activation rédox de l'homotrimérisation d'*HSP1* *in vitro* va de pair avec les changements de l'état rédox induit par le stress *in vivo*. Ainsi, les deux résidus cystéines C35 et C105 (les résidus cystéines sont responsables de l'état rédox de la cellule) localisés à l'intérieur ou proche du DBD d'*HSP1* sont nécessaires pour la formation de ponts disulfures en réponse au stress [46]. Cette formation de pont disulfures fait partie intégrale du mécanisme d'activation intrinsèque d'*HSP1* en condition

de stress. Ceci entraîne la formation d'homotrimères d'*HSF1*, la liaison à l'ADN, l'accumulation nucléaire, l'activation des gènes cibles et la protection de l'apoptose induit par le stress.

Ces observations permettent d'établir un lien commun permettant de comprendre les mécanismes par lesquels des stress de nature différente permettent d'activer la fonction d'*HSF1* et la production subséquente des *HSPs*. La maintenance de la structure trimérique d'*HSF1* est régulée de manière rédox *in vitro*, et à la fois les stress thermique et oxydant (H_2O_2) induisent des changements concomitants dans l'état rédox d'*HSF1 in vivo* [46]. La régulation rédox de la trimérisation d'*HSF1* et son accumulation nucléaire sont des étapes précoces étroitement liées dans l'activation d'*HSF1*.

HSF1 est connu pour être lié aux *HSPs* et d'autres protéines de stress thermique avant et après activation, or ces interactions pourraient permettre de fixer les niveaux d'activation d'*HSF1* en réponse à des conditions pouvant générer des changements de l'état rédox cellulaire qui nécessitent des réponses dans la régulation transcriptionnelle. Des niveaux de protection contre le stress oxydant ainsi que des concentrations en composés réducteurs (tel que le glutathion) dans différents types cellulaires, tissus ou organismes pourraient expliquer les différents seuils de température observés pour l'activation d'*HSF1* [46].

Les stress oxydant et thermique ont été au coeur de mon travail de thèse. Je décomposerai donc mon manuscrit en deux parties : la première s'intéressera à l'oxygène singulet, espèce réactive de l'oxygène impliquée dans le stress oxydant (Partie II), et la seconde à l'étude de la dynamique temporelle du stress thermique en cellules vivantes (Partie III).

Deuxième partie

Etude de la production et de la réactivité de 1O_2 créé par excitation optique directe à 1270 *nm*

Chapitre 3

L'oxygène singulet : espèce cytotoxique au coeur de photothérapie

3.1 Introduction

La survie cellulaire nécessite des concentrations adéquates en oxygène moléculaire et en anti-oxydants. Les espèces réactives de l'oxygène (ou ERO) sont une des menaces les plus importantes et omniprésentes rencontrées par les cellules. Parmi ces ERO, on distingue l'anion superoxyde, le peroxyde d'hydrogène, l'oxygène singulet, le radical hydroxyle, le radical peroxyde [47]. Dans des conditions normales, un équilibre entre espèces pro-oxydantes et des mécanismes de défense anti-oxydants est observé. Le stress oxydant se produit quand il y a une perturbation de cet équilibre pro-oxydant/antioxydant et cela a été corrélé à de nombreux procédés biologiques et pathologiques [47]. La plupart des lésions oxydantes sont maîtrisées par les mécanismes naturels de défenses cellulaires, si la perturbation de l'équilibre perdure alors celle-ci peut engendrer la mort cellulaire par apoptose ou nécrose [47–51].

3.2 La thérapie photodynamique

3.2.1 Introduction

La thérapie photodynamique (PDT) est un traitement des maladies malignes cliniquement utilisée depuis le début des années 1990 [52]. Dans cette thérapie, l'utilisation d'un photoagent (molécule photosensible) combinée à la lumière conduisent à la création d'ERO toxiques pour la cellule. Une part des effets de la PDT est due à la création d'oxygène singulet qui est le premier état excité de l'oxygène moléculaire [53].

A l'heure actuelle, la PDT consiste à administrer localement ou par injection un agent non toxique, nommé Photo-Sensibilisant (PS) ou photo-agent à un patient présentant des lésions qui peuvent être cancéreuses ou non. Après un temps d'incubation, la lésion à traiter est illuminée, souvent par de la lumière rouge (620- 700 nm). Le photo-agent est alors excité et va en présence de dioxygène produire des ERO qui vont elles-même pouvoir induire la mort des cellules et tissus [52,54]. *In vivo*, la PDT induit la mort des cellules tumorales par trois effets différents. Tout d'abord, la PDT peut induire la mort des lésions cancéreuses par nécrose et apoptose *in vitro* mais aussi *in vivo* [54]. Ensuite, une vasoconstriction peut être obtenue avec la PDT entraînant une réduction de l'apport en oxygène et nutriment. Ainsi, ces effets vasculaires ont été associés à des retards de croissance de la tumeur [55]. Enfin, une réponse immunitaire peut être induite par PDT entraînant la destruction de la tumeur par les leucocytes ou macrophages [56].

Les ERO étant des composés très réactifs, leur temps de vie est très court en présence de substrat biologiques ($\leq \mu s$). Par conséquent, leur distance de diffusion est très limitée en milieu biologique [52].

Ainsi, les effets cytotoxiques de la PDT sont induits à proximité du lieu d'absorption de la lumière par le PS.

3.2.2 Mécanismes de production d'ERO par PDT

L'exposition du photo-agent à la lumière va conduire à la formation d'ERO par deux mécanismes distincts et simultanés [53]. Le photo-agent dans son état fondamental S_0 est excité dans un état singulet S_1 qui est instable. Par conversion interne (IC, pour Internal Conversion) et croisement inter-systèmes (ISC, pour Inter System Crossing), l'état S_1 est converti en état triplet T_1 qui est métastable. Dans un premier mécanisme, dit de type I, l'état T_1 peut réagir avec des cibles biologiques, conduire à la production d'ERO et ainsi induire un stress oxydant. C'est le "quenching chimique" : l'état T_1 transfère son énergie au milieu biologique par réaction chimique. Dans un second mécanisme, dit de type II, un transfert d'énergie par collision se fait entre l'état T_1 du photo-agent et une molécule de dioxygène dans son état fondamental. L'oxygène moléculaire passe alors de son état fondamental triplet (3O_2) à son premier état électronique excité, l'oxygène singulet (1O_2). On parle alors de "quenching" physique car l'énergie est transférée par collision (voir figure 3.1).

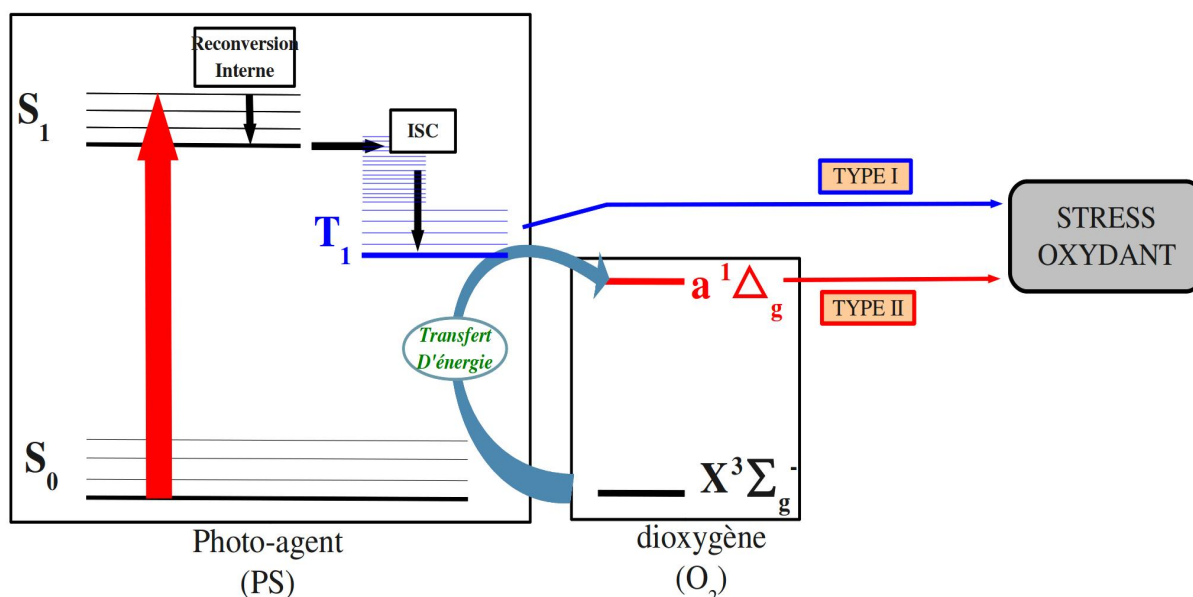


FIG. 3.1: Schéma des deux mécanismes (type I et II) conduisant à la production d'ERO en PDT. En bleu, mécanisme de type I dans lequel le PS excité réagit avec un substrat biologique et conduit par cascade de réactions chimiques à la formation d'ERO et à l'induction d'un stress oxydant. En rouge, mécanisme de type II dans lequel l'état excité du PS transfère son énergie à l'oxygène dans son état fondamental et conduit ainsi à la production d'oxygène singulet.

Dans le mécanisme de type I, une série de réactions en chaîne peut conduire à la formation de produits peroxydés [57,58]. On peut ainsi citer par exemple la peroxydation des lipides. L'accumulation d'hydroperoxydes formés par ces réactions en chaîne, peut entraîner une nouvelle cascade de réactions conduisant à l'augmentation des dommages [57]. Dans le mécanisme de type II, c'est l'oxygène singulet lui-même qui peut réagir avec une molécule du cytoplasme, ou un phospholipide par exemple et conduire à la formation d'hydroperoxydes [57].

Les deux mécanismes, type I et II donnent lieu à une réponse cellulaire. La part des voies I et II dans l'induction d'un stress oxydant par PDT dépend de trois facteurs :

- la nature du photo-agent [59]
- la quantité d'oxygène singulet présente dans l'environnement proche du PS excité [52]

- l'environnement dans lequel est localisé le PS (donc le compartiment cellulaire de localisation du PS) [59]

Les cinétiques des réactions chimiques engendrées par l'excitation du PS, vont jouer un rôle dans la part de chacun des deux mécanismes induisant le stress oxydant et la mort cellulaire [57].

3.2.3 Dosimétrie de la PDT : quantité d'oxygène singulet produite

L'oxygène singulet est considéré par de nombreux auteurs, comme l'agent cytotoxique principal en PDT. Pour une application clinique, une dosimétrie prédictive et précise est nécessaire. La dose est ainsi définie comme la concentration cumulée d'oxygène singulet produite lors du traitement [60–62]. Cependant, il apparaît difficile de connaître précisément la concentration cumulée d' 1O_2 pendant le traitement car le système PS- 1O_2 singulet est complexe.

Ainsi, de nombreuses interactions entre le PS (état fondamental et état excité), l'oxygène (état fondamental et état excité), le solvant, d'éventuels substrats biologiques peuvent fortement complexifier le schéma réactionnel présenté à la figure 3.1 [63]. *In vitro*, même lorsque la concentration en oxygène dissous varie peu, le photoblanchiment du PS conduit à des diminutions importantes de sa concentration qui ne peuvent être négligées sur la durée de traitement [64,65]. Dans de telles conditions, la quantité d'oxygène singulet produite n'est pas proportionnelle à l'intensité d'irradiation et il est alors complexe de définir des doses létales pour la thérapie. De plus, *in vitro* et *in vivo*, la production d'oxygène singulet conduit à diminuer la concentration en oxygène moléculaire dissous dans la cellule ce qui complexifie encore le système que constitue la PDT. La production d' 1O_2 par PDT dépend de la nature du PS et du type cellulaire. Enfin, le PS n'étant pas distribué de manière homogène dans les tissus et sa concentration intracellulaire est une donnée délicate à obtenir.

Deux méthodes principales ont été proposées pour la dosimétrie de l'oxygène singulet en PDT. La première méthode permet, par le suivi de la fluorescence naturelle du PS au cours du traitement, le suivi de sa concentration [62]. Et, dans le cas où la concentration en oxygène dissous intracellulaire varie peu, la concentration instantanée en oxygène singulet est liée aux variations de concentration du PS et la dose ne dépend que de la concentration en PS [62]. La seconde méthode est basée sur la détermination directe de la concentration en oxygène singulet par mesure de la phosphorescence de cet état. Cette méthode requiert un dispositif de comptage de photons, car l'émission d'un photon de l'état excité singulet vers l'état fondamental est un processus très peu probable. L'intérêt de cette approche est l'accès à deux informations importantes : la quantité d'oxygène singulet produite et la réactivité de celui-ci par mesure de son temps de vie.

Ces deux méthodes donnent de bonnes corrélations entre la dose (définie par la concentration cumulée d'oxygène singulet produit) et la mort cellulaire *in vitro* et *in vivo* pour les photo-agents étudiés [60–62]. Des variations de plus d'un ordre de grandeur ont toutefois été observées concernant la dose minimum [62].

3.2.4 Localisation du photo-agent

Un autre point important est la localisation in homogène du photo-agent à l'intérieur de la cellule. En effet, selon la nature du PS, celui-ci peut se localiser dans différents compartiments cellulaires tels que la mitochondrie, l'appareil de Golgi, le noyau ou la membrane plasmique [66] et de plus cette localisation peut changer pendant et après l'incubation du photoagent. Or, au vue du faible temps de vie des ERO produites par PDT, les dommages vont être causés dans la zone de localisation du PS. Ainsi, cette localisation intracellulaire du photo-agent influence fortement le type de dommages cellulaires (dommages à l'ADN, peroxydation des lipides de la membrane plasmique...) et les mécanismes de réponse cellulaire.

3.3 Schéma alternatif à la PDT

L'oxygène singulet ($^1O_2[{}^1\Delta_g]$) est l'état excité le plus bas du dioxygène moléculaire (O_2). 1O_2 est un intermédiaire clé dans de nombreux domaines tels que la chimie ou la biologie [67]. En biochimie, il est impliqué dans la photosynthèse des plantes [68]. Il a été fortement étudié pour son rôle central dans de nombreux mécanismes de photo-oxydation chimiques et biologiques [52,67,69]. En phase liquide l'oxygène singulet est produit de manière efficace via l'activation d'un PS par excitation optique dans le visible. Une fois excité le PS transfère son énergie au dioxygène moléculaire créant ainsi différents états excités de l'oxygène et en particulier l'oxygène singulet.

3.3.1 Contexte

Théorie : l'oxygène singulet en phase gaz

Pour la molécule isolée, la transition optique du dioxygène est fortement interdite par les règles de transition électrique dipolaire [59,70]. En effet la transition ${}^3O_2[{}^3\Sigma_g^-] \longrightarrow {}^1O_2[{}^1\Delta_g]$ à 1270 nm est interdite de spin, de symétrie et de parité. En pratique cette transition est donc très peu efficace. Cependant l'environnement dans lequel se trouve l'oxygène singulet va influencer fortement sur cette probabilité de transition [59,71,72]. Les collisions avec les molécules de solvant vont permettre d'augmenter l'efficacité de production de 1O_2 [59,71,73,74]. Ainsi en solvants, la probabilité de transition ${}^1O_2[{}^1\Delta_g] \longrightarrow {}^3O_2[{}^3\Sigma_g^-]$ augmente de 3 ordres de grandeur [71] comparé à la phase gaz.

En solvants organiques

L'excitation optique directe à 1270 nm à température et pression atmosphérique cause l'oxydation des solutions de 1,3-diphénylisobenzofuran (DPIBF) et tétracène dans les solvants organiques [75–77]. Le DPIBF et le tétracène sont des pièges chimiques, très réactifs et spécifiques vis-à-vis de l'oxygène singulet. Ce mécanisme de photo-oxydation est dû à la réaction de l'oxygène singulet produit via la transition ${}^3O_2[{}^3\Sigma_g^-] \longrightarrow {}^1O_2[{}^1\Delta_g]$ à 1270 nm avec le piège chimique (DPIBF ou tétracène).

En milieu micellaire

La production d'oxygène singulet à 1270 nm provoque la photo-oxydation du DPIBF en milieu micellaire [75,77]. Le DPIBF étant hydrophobe, un agent surfactant ionique, le SDS (sodium dodécyl sulfate), est utilisé pour solubiliser celui-ci dans l'eau. Le SDS va alors former des micelles à l'intérieur desquelles le DPIBF va être piégé. Ces études ont montré que l'oxygène singulet créé à 1270 nm en milieu micellaire, conduisait à la dégradation du DPIBF par photo-oxydation avec l'oxygène singulet. Les micelles, de par leur ressemblance structurale à la bicouche lipidique de la membrane plasmique, sont intéressantes car elles représentent un premier pas pour l'étude de l'oxygène singulet en milieu biologique.

Création de 1O_2 par excitation optique directe en cellules

Partant du constat qu'il était possible en milieu dense (solvants organiques et milieu micellaire) de créer l'oxygène singulet à 1270 nm, et que cet oxygène singulet en PDT est un agent cytotoxique engendrant la mort cellulaire, notre équipe a cherché à produire en excitation optique directe à 1270 nm de l'oxygène singulet en cellules vivantes afin d'induire la mort cellulaire (voir figure 3.2). Notre équipe, et plus précisément François Anquez a montré au cours de son travail de thèse que l'irradiation à 1270 nm *in vitro* en cellules vivantes créait de l'oxygène singulet et que ce stress oxydant engendrait la mort cellulaire. Nous allons présenter ici succinctement les principaux résultats de ce travail original.

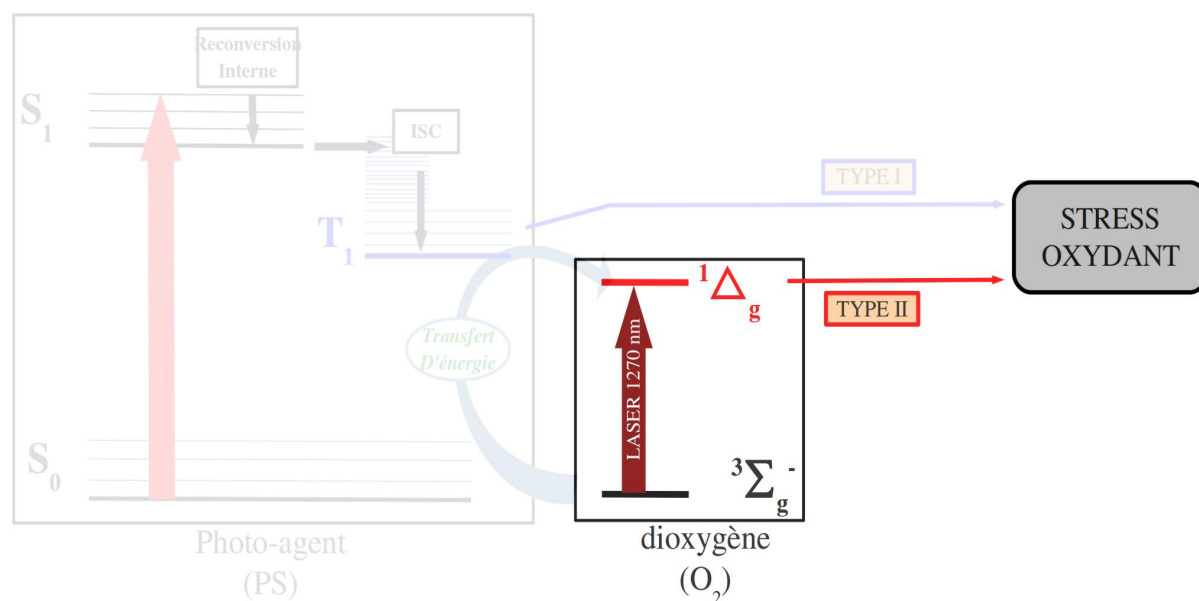


FIG. 3.2: Schéma de principe de l'excitation directe de l'oxygène singulet à 1270 nm pour obtenir un effet analogue à celui de la PDT.

3.3.2 Mort cellulaire induite par irradiation laser à 1270 nm

Afin de répondre à la question est-il possible d'induire de la mort cellulaire par irradiation laser à 1270 nm de l'oxygène moléculaire, l'équipe a développé sa propre source laser accordable centrée autour de 1270 nm, afin de sonder la transition $^3O_2 \rightarrow ^1O_2$. Un laser Raman à fibre accordable autour de 1270 nm a ainsi été développé (plage d'accordabilité comprise entre 1250 et 1290 nm) permettant de délivrer des puissances de l'ordre d'une centaine de mW au niveau du plan des cellules [78].

Résultats expérimentaux

Des cellules de cancer du sein MCF7 ont été irradiées à 1270 nm. Comme le montrent les images des figures 3.3 (a) et (b), l'effet de l'irradiation à 1270 nm sur les cellules est indéniable. La mort des cellules est observée sur un rayon de $\sim 200 \mu m$ autour du centre du faisceau laser 30 h post irradiation, alors que les cellules non irradiées survivent et continuent à se diviser. Lorsque la longueur d'onde d'irradiation est de 1247 nm, il n'y a pas d'effet observé sur les cellules irradiées (voir Fig. 3.3 (c) et (d)).

Spectre d'action de l'irradiation laser autour de 1270 nm

La figure 3.4 (a) présente la dépendance en longueur d'onde de la fraction de cellules mortes dans une zone de rayon $r \approx 200 \mu m$ autour du centre du faisceau laser. On observe une forte dépendance de la mort cellulaire avec la longueur d'onde d'irradiation (voir Fig 3.4) (a). Le maximum ($1270 \pm 2 nm$) et la largeur du spectre ($\sim 15 nm$) coïncident avec les caractéristiques spectrales de l'émission de l'oxygène singulet associée à la transition $^1O_2 \rightarrow ^3O_2$ dans l'eau ainsi que dans un milieu vivant *in vitro* et *in vivo* [60, 61].

J'ai mesuré le spectre d'absorption de l'oxygène moléculaire vers le premier état électronique excité $^3O_2 \rightarrow ^1O_2$ en solvant organique et dans l'eau deutérée grâce à la méthode qui sera décrite dans le chapitre 4. 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 $^3O_2 \rightarrow ^1O_2$. Par ailleurs, l'équipe a évalué l'effet d'une saturation de l'incubateur en oxygène. La cinétique de mort cellulaire est fortement augmentée pour une atmosphère saturée en oxygène comparée à une

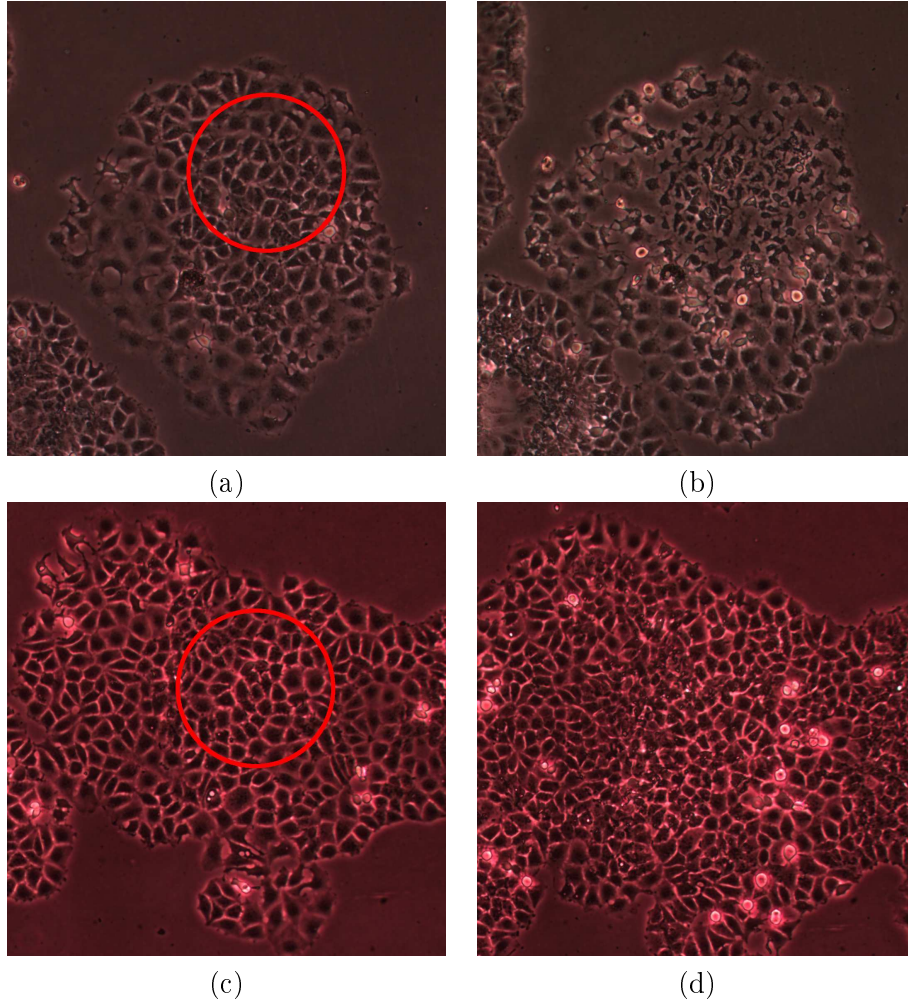


FIG. 3.3: Cellules MCF-7 observées au microscope à contraste de phase ($4\times$) et irradiées pendant 3 h à une puissance d'environ $P_0 \approx 110 \pm 10 \text{ mW}$ (soit une intensité maximale de $I_{max} \approx 108 \text{ W.cm}^{-2}$ au centre du faisceau laser), le cercle rouge sur les figure (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.

atmosphère normale. En effet, le temps nécessaire pour atteindre 100 % de mort cellulaire sur une zone centrée autour du spot laser est plus faible en condition d'hypéroxye (voir détails dans [79]).

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

3.3.3 Motivations

Le schéma alternatif de production d'oxygène singulet, sans PS, a l'avantage d'être un système "pur" de création d'oxygène singulet. Pour la compréhension des mécanismes réactionnels engendrant la mort cellulaire ainsi que pour une dosimétrie prédictive en application clinique, ce schéma est intéressant.

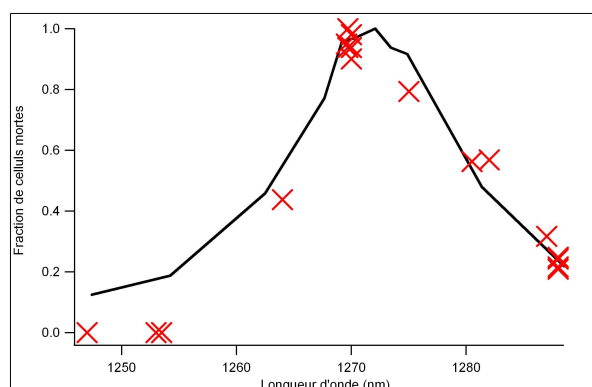


FIG. 3.4: En rouge la fraction de cellules mortes dans une zone $r \approx 200 \mu\text{m}$ autour du centre du faisceau laser pour une irradiation de $3h$ à $I_{\text{moy}} \approx 25 \text{ W.cm}^{-2}$, en noir le spectre d'absorption normalisé au maximum correspondant à la transition $^3\text{O}_2 \rightarrow ^1\text{O}_2$ du dioxygène dissous dans l'éthanol. Ce dernier spectre a été obtenu à l'aide de la méthode décrite au chapitre 4.

D'un point de vue fondamental : Compréhension des mécanismes

La figure 3.1 présente le mécanisme de production de l'oxygène singulet en photothérapie dynamique avec l'utilisation d'un PS. Cette voie de création d'oxygène singulet bien que très efficace en application clinique rend la compréhension des mécanismes engendrant la mort des cellules cancéreuses complexe. En effet c'est le photoagent qui par transfert d'énergie avec le dioxygène moléculaire conduit à la formation de l'oxygène singulet. Plusieurs molécules et réactions entrent en jeu dans ce mécanisme, soulevant de nombreuses questions. Quelle est la part réelle de transfert d'énergie du photoagent vers l'oxygène singulet ? Existe-t-il des interactions entre le photoagent dans l'état fondamental et l'oxygène singulet créé ? Quelles sont les espèces réactives de l'oxygène créées ? Le photoagent lui-même n'induit-il pas un stress voir une mort cellulaire ? Est-ce l'oxygène singulet qui engendre directement la mort cellulaire ou alors induit-il une cascade de réactions impliquant d'autres ERO qui elles-même vont induire la mort cellulaire ?

Dans ce contexte la production d' $^1\text{O}_2$ à 1270 nm apparaît donc comme une méthode de choix pour la production d'oxygène singulet en système biologique. Ce système "pur" de création d'oxygène singulet s'affranchit de la présence du photoagent et des éventuels interactions de celui-ci avec l'oxygène singulet créé.

Obtention de données quantitatives pour la dosimétrie

En PDT, le photoagent se localise vers des zones spécifiques de la cellule : membrane, mitochondrie... En excitation optique directe, la création d'oxygène singulet n'est, à priori, pas localisée. De plus, en excitation à 1270 nm , l'absence de photoagent simplifie fortement les mécanismes réactionnels, c'est l'absorption des photons à 1270 nm qui excite la molécule de dioxygène dans son état fondamental. Si la section efficace d'absorption à 1270 nm du dioxygène moléculaire en cellules est connue, on peut calculer une concentration d'oxygène singulet produite.

Pour une application clinique, la connaissance du taux de production d'oxygène singulet est une donnée importante pour la dosimétrie et ainsi adapter la puissance du laser ainsi que la durée d'irradiation de la zone à traiter.

Pour une photothérapie moins invasive

En PDT, certains PS peuvent présenter des effets secondaires post-traitement. En effet, l'évacuation du PS peut être lente ce qui peut conduire à une sensibilisation du patient à la lumière solaire jusqu'à plusieurs semaines après l'injection du PS. Le coût de l'administration du PS limite également le développement de cette thérapie.

Le schéma alternatif de production de 1O_2 à 1270 nm pourrait potentiellement s'intégrer dans une nouvelle approche thérapeutique de traitement du cancer, tout en s'affranchissant des effets secondaires du PS observés en PDT traditionnelle.

3.4 Axes et objectifs de mon travail de thèse

Cette nouvelle voie de création d'oxygène singulet ouvre de nombreuses perspectives tant d'un point de vue fondamental (compréhension des mécanismes du stress oxydant), que pour l'obtention de données quantitatives (dosimétrie de l'oxygène singulet).

La question de dosimétrie est une question essentielle pour une application clinique. Comme nous l'avons détaillé un peu plus en amont, si on veut quantifier une concentration d'oxygène singulet créé en irradiation laser à 1270 nm, il est nécessaire de connaître la section efficace d'absorption du dioxygène moléculaire (σ_{1270}) pour la transition $^3O_2 \longrightarrow ^1O_2$ en système biologique. La cellule étant composée à 70 % d'eau en masse, la connaissance de σ_{1270} en milieu aqueux est nécessaire pour définir la concentration cumulée en oxygène singulet induite par excitation optique directe.

De plus, les mécanismes réactionnels engendrant la mort cellulaire par création de 1O_2 ne sont pas bien connus à l'heure actuelle. Ainsi, est-ce l'oxygène singulet lui-même ou la cascade des mécanismes réactionnels qu'il engendre qui conduisent aux voies de signalisation de mort cellulaire ? De même, l'étude de la réactivité de l'oxygène singulet vis-à-vis de cibles biologiques privilégiées (ADN, membrane plasmique...) est intéressante pour comprendre le réseau de régulation du stress oxydant.

Apporter des données quantitatives sur le taux de production de 1O_2 et sur sa réactivité en milieu biologique

Mon travail de thèse avait pour premier objectif d'apporter des données quantitatives sur le taux de production et la réactivité de 1O_2 en cellules. Cependant, la cellule étant un milieu complexe, obtenir ces données en solvants est une première étape vers l'étude en système biologique. Afin de valider la méthode de détection et l'analyse cinétique, je me suis tout d'abord intéressée à l'étude de 1O_2 en solvants organiques là où les sondes de 1O_2 sont solubles et où les réactivités sont connues. La cellule étant majoritairement composée d'eau, l'obtention du taux de production de 1O_2 dans l'eau était donc un premier pas important. Des nanocapsules lipidiques permettant de solubiliser un piège chimique insoluble en milieu aqueux associées à un modèle cinétique à deux pseudophases ont été utilisées. Cette approche en milieu hétérogène représente une étape préliminaire à l'étude en milieu hétérogène que représente une cellule. Dans une dernière partie, je me suis intéressée, de manière préliminaire, à la réactivité de 1O_2 en cellule.

Chapitre 4

Etude du taux de production et de la réactivité de 1O_2 en solvants organiques

Nous avons vu au chapitre précédent que notre équipe a prouvé que l'excitation optique directe à 1270 nm du dioxygène moléculaire en cellules vivantes crée de l'oxygène moléculaire et que celui-ci engendrait (directement ou indirectement) la mort cellulaire. Cependant des données quantitatives quant au taux de production d'oxygène singulet en cellules étaient manquantes.

Mon travail de thèse avait donc pour objectif d'apporter des éléments de réponse sur ce point. Avant de s'intéresser aux systèmes biologiques complexes que représente la cellule, obtenir des données quantitatives en solvants est une première étape importante. Un dispositif expérimental couplé à une analyse cinétique originale des mécanismes réactionnels permettant de déterminer de manière **simultanée** la section efficace d'absorption du dioxygène à 1270 nm, ainsi que la réactivité de 1O_2 avec un piège chimique a été développé.

Je me suis tout d'abord intéressée aux solvants organiques, là où la majorité des sondes de 1O_2 sont solubles et leurs réactivités connues. Cette première étape en solvants organiques est une étape nécessaire pour la validation de la méthode de détection et de l'analyse cinétique.

Cette étude a donné lieu à une collaboration avec l'équipe de Jean-Marie Aubry et Christel Pierlot du laboratoire de Chimie Moléculaire et Formulation de l'Université de Lille 1.

4.1 Contexte

Des études en solvants organiques menées par Krasnovsky et al. [75–77] ont montré que la création d'oxygène singulet via la transition $^3O_2[^3\Sigma_g^-] \longrightarrow ^1O_2[^1\Delta_g]$ à 1270 nm crée l'oxydation des solutions de DPIBF, tétracène et anthracène. Ces études ont permis d'obtenir des taux de production d'oxygène singulet. Cependant, l'obtention de ce taux de production de 1O_2 , nécessite la connaissance de la réactivité de 1O_2 avec le piège chimique utilisé. La valeur de la constante de réaction entre le piège et 1O_2 étant soit déterminée par mesure de phosphorescence de 1O_2 ou en faisant varier la concentration en piège [77].

Dans les système hétérogènes représentés par les dispersions de micelles dans l'eau, les valeurs de constante de réaction entre le piège et 1O_2 ne sont pas connues. L'influence de la viscosité sur la constante de réaction entre 1O_2 et le piège est modélisé par un modèle de collision complexe [75, 77]. Ainsi, la valeur de la section efficace d'absorption du dioxygène à 1270 nm obtenue dans [77] est totalement liée à la valeur postulée pour la constante de réaction entre le piège et 1O_2 . Or, une augmentation de la section efficace d'absorption du dioxygène à 1270 nm est observée en systèmes micellaires [77]. Soulevant ainsi des questions quant à la validité du modèle théorique d'évolution de la constante de réaction entre le piège et 1O_2 avec la viscosité des solutions.

Dans ce contexte, nous avons établi un dispositif expérimental couplé à une analyse cinétique originale des mécanismes réactionnels permettant de déterminer de manière **simultanée** la section

efficace d'absorption du dioxygène à 1270 nm, ainsi que la constante de vitesse de réaction de 1O_2 avec le piège utilisé.

4.2 Modélisation des mécanismes réactionnels

4.2.1 Système d'équations

L'excitation optique à 1270 nm en solvants organiques du dioxygène moléculaire crée de l'oxygène singulet. Krasnovsky et al. [75–77] ont montré que l'irradiation laser à 1270 nm du dioxygène dissous en solvants organiques crée la photo-oxydation des pièges DPIBF et tétracène selon le schéma réactionnel suivant :



L'oxygène singulet est produit via l'excitation optique directe (i.e. sans PS) à 1270 nm (Eq. 4.1). k_d est la constante de vitesse de pseudo-premier ordre de désexcitation de l'oxygène singulet par les molécules de solvant, telle que : $k_d = 1/\tau_\Delta$ avec τ_Δ le temps de vie de 1O_2 en absence de piège. T représente le piège DPIBF ou tétracène et k_r est la constante de vitesse de réaction de 1O_2 avec T conduisant à la formation du produit oxydé. k_q est la constante de vitesse de désexcitation de 1O_2 avec T par “quenching” physique.

Dans notre étude, nous avons utilisé deux pièges différents en solvants organiques : le DPIBF et le rubrène connu pour leurs spécificités et fortes réactivités vis-à-vis de 1O_2 [75–77, 80]. Ces pièges sont très réactifs vis-à-vis de 1O_2 et de ce fait la constante bimoléculaire de réaction entre T et 1O_2 est proche de la limite de diffusion [67]. Le “quenching” physique est négligeable en comparaison du “quenching” chimique, i.e. $k_q \ll k_r$. En conclusion, les équations différentielles relatives à l'évolution de chacune des 2 espèces peuvent s'écrire de la manière suivante :

$$\frac{d[^1O_2]}{dt} = \Gamma - k_d[^1O_2] - (k_r + k_q)[^1O_2][T] \quad (4.5)$$

$$\frac{d[T]}{dt} = -k_r[^1O_2][T] \quad (4.6)$$

où $\Gamma = \sigma_{1270}I[O_2]$ est le taux de production de l'oxygène singulet ($mol.L^{-1}.s^{-1}$). Ce taux de production dépend du flux de photons à 1270 nm I ($s^{-1}cm^{-2}$), de la concentration en dioxygène $[O_2]$ ($mol.L^{-1}$) et de la section efficace d'absorption à 1270 nm (σ_{1270}) (cm^2).

4.2.2 Solution analytique pour la vitesse de disparition du piège

Approximation de l'état quasi-stationnaire

L'évolution des concentrations des deux espèces se fait à deux échelles de temps bien distinctes. On peut calculer une valeur minimum pour l'échelle de temps de variation de 1O_2 telle que : $\tau_{O_2} = (k_d + k_r[T]_0)^{-1}$. Pour le DPIBF, une valeur maximum pour l'échelle de temps d'évolution du piège avec le temps peut être calculée quand $[^1O_2]$ est maximum : $\tau_T = (k_r[^1O_2]_\infty)^{-1}$ où $[^1O_2]_\infty = \Gamma/k_d$.

Pour une concentration initiale en piège de l'ordre de $[T]_0 \sim 10^{-4} \text{ mol.L}^{-1}$, en utilisant les valeurs de k_r et k_d dans l'acétone [81] et une valeur de $\sigma_{1270} \sim 10^{-23} \text{ cm}^2$ [75–77] : $\tau_{O_2} \sim 10^{-5} \text{ s} \ll \tau_T \sim 10^4 \text{ s}$. Il est donc clair que l'approximation de l'état quasi-stationnaire peut être appliquée à 1O_2 et les équations 4.5 et 4.6 peuvent être simplifiées de la manière suivante :

$$[^1O_2] = \frac{\Gamma}{k_d + k_r[T]} \quad (4.7)$$

$$\frac{d[T]}{dt} = -\frac{\Gamma}{1 + \beta[T]} \quad (4.8)$$

ou $\beta = k_d/k_r$ est appelé indice de réactivité [82, 83]. β représente la concentration en piège pour laquelle le “quenching” de 1O_2 par les molécules de solvant (k_d) est égal à la décroissance du piège par réactivité avec 1O_2 ($k_r[T]$).

Analyse cinétique de la vitesse de disparition du piège

L'équation 4.8 montre deux régimes bien distincts. Au début de l'expérience, quand la concentration en piège est maximum, si $[T] \gg \beta$ alors $-d[T]/dt \approx \Gamma$. La vitesse de disparition du piège est constante et est uniquement limitée par la production d'oxygène singulet. En fin d'expérience la concentration en piège tend vers zéro alors $[T] \ll \beta$, la vitesse de disparition du piège s'écrit alors : $-d[T]/dt \approx \Gamma[T]/\beta$. En fin de réaction $-d[T]/dt$ varie de manière linéaire avec la concentration en piège. Connaissant la valeur de β , la valeur de Γ est alors déterminée. Le tracé de la vitesse de disparition du piège en fonction de la concentration en piège, nous permet donc uniquement dans le cas où l'inégalité $[T] \gg \beta$ est vérifiée, d'avoir accès de manière **simultanée** au taux de production d'oxygène singulet (donc à la valeur de la section efficace d'absorption à 1270 nm, σ_{1270}) ainsi qu'à l'indice de réactivité β .

En pratique, pour les solvants organiques étudiés : acétone, acétone d_6 et toluène, démarrant d'une concentration initiale de $\sim 120 \mu\text{M}$, la relation $[T_0] \gg \beta$ est vérifiée (valeur théorique des β dans les différents solvants dans [81]), l'analyse cinétique via la vitesse de disparition du piège est exploitable et nous donne donc accès à Γ et β .

Pour l'éthanol, la valeur théorique pour β est comprise entre 65 et 200 μM [81]. L'analyse de l'équation 4.8 ne donne plus accès qu'à un seul régime cinétique où la vitesse de disparition du piège est linéaire avec la concentration en piège. Dans ce régime, la pente de la courbe est égale au ratio de Γ/β , et donc on ne peut plus, en théorie, obtenir la valeur de chaque paramètre indépendamment. Pour l'éthanol, bien que la relation $[T_0] \gg \beta$ ne soit pas vérifiée, les valeurs de Γ et β ont pu être obtenue via le tracé de $-d[T]/dt$. La modélisation du système d'équations différentielles va nous permettre de vérifier les résultats obtenus.

4.2.3 Simulation numérique

Méthode

Comme nous l'avons vu précédemment, le cas idéal où $[T_0] \gg \beta$ n'est pas vérifié dans tous les solvants et de ce fait pour l'éthanol notamment notre analyse cinétique de la vitesse de disparition du piège en fonction de $[T]$ devient difficilement exploitable. Nous avons alors décidé de modéliser le système d'équations différentielles afin de vérifier les données obtenues pour Γ et β via le tracé de $-d[T]/dt = f([T])$ dans (i) les solvants organiques où la relation $[T_0] \gg \beta$ est vérifiée et (ii) dans l'éthanol où la confiance dans l'exploitation de $-d[T]/dt = f([T])$ est moins bonne. Un meilleur ajustement sur les données expérimentales par la méthode des moindres carrés est effectué afin d'obtenir les valeurs de Γ et β en intégrant le système d'équations différentielles relatives à l'oxygène singulet 4.5 et au piège 4.6.

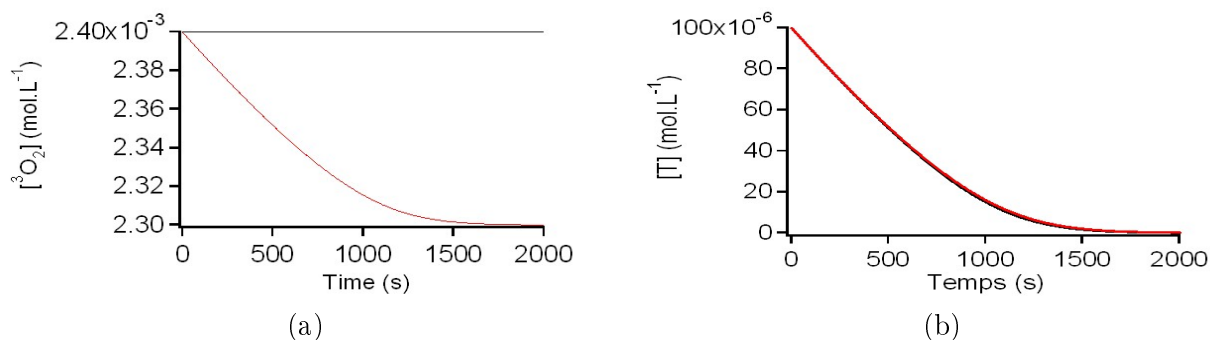


FIG. 4.1: Modélisation de l'influence de la consommation en oxygène dissous sur la cinétique de réaction entre DPIBF et 1O_2 dans l'acétone $[T_0] \sim 120 \mu M$. (a) représente l'évolution de la concentration en oxygène dissous et (b) l'évolution de la concentration en DPIBF en fonction du temps pour une irradiation des solutions à $P \sim 1.1 W$. Les courbes noire et rouge présentent le cas où la consommation en oxygène dissous serait constante ou diminue respectivement.

Influence de la consommation en oxygène dissous

La modélisation du système d'équations nous permet également de voir l'influence de la consommation en oxygène dissous au cours de l'irradiation de la solution. Nous avons donc introduit dans le système d'équations une troisième espèce : l'oxygène moléculaire dissous via l'équation différentielle 4.9.

$$\frac{d[{}^3O_2]}{dt} = -\sigma I[{}^3O_2] + k_d[{}^1O_2] \quad (4.9)$$

Cette fois $\Gamma = \sigma I[{}^3O_2]$ n'est plus une constante, mais varie avec la concentration en oxygène dissous. Le paramètre Γ a été modifié dans les équations relatives à l'oxygène singulet et au piège (Eqs. 4.5 et 4.6) afin de prendre en compte l'évolution de la concentration en oxygène dissous dans le temps. Afin d'évaluer la consommation en oxygène dissous sur la cinétique de réaction, nous avons modélisé deux cas limites : le cas où la concentration en oxygène dissous serait constante (cas idéal où chaque molécule d'oxygène consommée est remplacée instantanément par une molécule d'oxygène dissous) et le cas où chaque molécule d'oxygène consommée n'est pas remplacée et donc où la concentration en oxygène dissous ne fait que diminuer. Les résultats obtenus sur ces 2 cas limites sont présentés dans le cas de l'acétone Fig. 4.1.

Le cas où la quantité d'oxygène dissous n'est pas renouvelée fait chuter la concentration en 3O_2 dissous de $2.4 \times 10^{-3} mol.L^{-1}$ à $2.3 \times 10^{-3} mol.L^{-1}$, soit une variation relative de 4.2 % dans le cas de l'acétone (pour le toluène et l'éthanol on obtient une variation relative de 5.6 % et 4.8 % respectivement). La cinétique de disparition du piège montre peu de différences entre les deux cas limites. L'analyse des données obtenues sur Γ et β , par le tracé de $-d[T]/dt = f([T])$, nous donne un écart de moins de 1 % et 7 % sur les deux valeurs respectivement. Au regard des incertitudes obtenues sur les valeurs moyennes de Γ et β (voir 4.1), cette consommation en oxygène peut être négligée. De plus, le cas limite où l'oxygène dissous ne ferait que disparaître et ne serait pas renouvelé semble peu réaliste. En effet, la cuve étant au contact de l'air ambiant (non bouchée), une partie des molécules d'oxygène consommées doit être remplacées par échange avec les molécules d'oxygène présentes sous forme gazeuse. En conclusion, l'éventuelle consommation d'oxygène dissous au cours de l'irradiation a peu d'effet sur la cinétique de disparition du piège et sera négligée dans notre étude.

Nous allons présenter ici les résultats que nous avons obtenu sur le taux de production et la réactivité de 1O_2 en solvants organiques. Afin de valider l'analyse cinétique et la méthode de détection de 1O_2 en solvants, je me suis intéressée dans un premier temps aux solvants organiques, là où la grande majorité des pièges chimiques de 1O_2 sont solubles et leurs réactivités connues.

4.3 Résultats expérimentaux en solvants organiques

4.3.1 Dispositif expérimental

Nous avons mis au point un montage expérimental permettant simultanément l'irradiation des solutions de DPIBF ainsi que la mesure de l'absorbance de ces solutions en fonction du temps. La Fig. 4.2 est un schéma du dispositif expérimental.

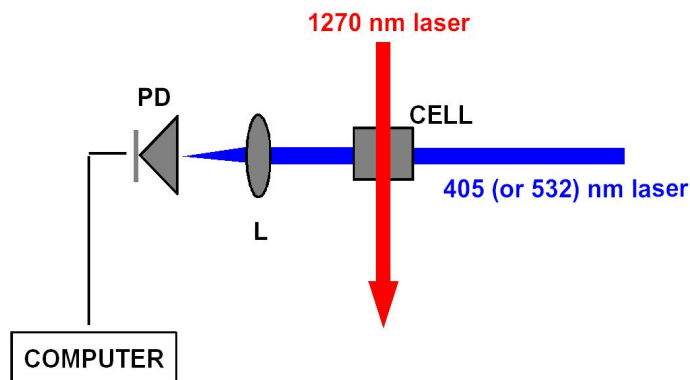


FIG. 4.2: Schéma du montage expérimental pour l'irradiation des solutions de DPIBF à 1270 nm et la mesure des variations de concentration de DPIBF. La concentration en piège est mesurée par absorbance du laser à 405 nm focalisé sur une photodiode (PD) par la lentille (L). Les lasers à 1270 nm et 405 nm se croisent au centre d'une cuvette en quartz contenant les solutions de DPIBF saturées en air. Le laser à 405 nm peut être remplacé par un laser à 532 nm dans le cas de la mesure d'absorbance d'un autre piège de 1O_2 , le rubrène.

Le laser à 1270 nm induit la formation de l'oxygène singulet par excitation optique directe, celui-ci traverse la cuve de quartz contenant la solution de DPIBF (diamètre du laser ~ 3 mm et puissance maximale $\sim 1,4$ W). Le DPIBF présente un maximum d'absorption à 410 nm (Fig. 4.3 (b)). Le laser à 405 nm est élargi (par un système à deux lentilles) à ~ 8 mm afin de couvrir de manière homogène la largeur de la cuve, puis est focalisé sur la photodiode par une lentille. Celui-ci va donc nous permettre, via la mesure d'absorbance, de déterminer la concentration du DPIBF dans la solution durant toute la durée de l'irradiation ($\epsilon_{405, DPIBF} = 2.27 \times 10^4 M^{-1}.s^{-1}$). La puissance du laser à 405 nm est diminuée à l'aide de densité optique pour éviter le photo-blanchiment des solutions de DPIBF ($P_{405nm} \sim 3 \mu W$). Pour la même raison le laser n'est ouvert que pendant 1 s et coupé 30 s à l'aide d'un obturateur mécanique. Nous avons vérifié que dans ces conditions, le DPIBF n'est pas dégradé en absence d'irradiation à 1270 nm. L'absorbance maximale étant limitée par le seuil de détection de la photodiode, dans ces conditions expérimentales $A_{max} \sim 2.8$ soit une concentration maximale en DPIBF mesurée à $\sim 120 \mu M$. Nous avons vérifié la linéarité de la photodiode pour des absorbances comprises entre 0 et 2.8.

4.3.2 Résultats expérimentaux

Valeurs de σ_{1270} et β

Nous avons irradié à 1270 nm des solutions de DPIBF dans 4 solvants organiques : acétone, acétone d_6 , toluène et éthanol et suivi les variations d'absorbance du DPIBF au cours de l'irradiation via le montage expérimental présenté un peu plus en amont. La figure 4.4 représente les courbes expérimentales obtenues pour des solutions de DPIBF dans deux solvants organiques : acétone et acétone d_6 avec $[T_0] \sim 80 \mu M$ à une puissance laser IR de l'ordre de 1.1 W. Les valeurs trouvées pour β normalisées à la concentration initiale en DPIBF dans les 2 solvants sont aussi représentées.

L'équation 4.8 peut être réarrangée suivant l'expression suivante :

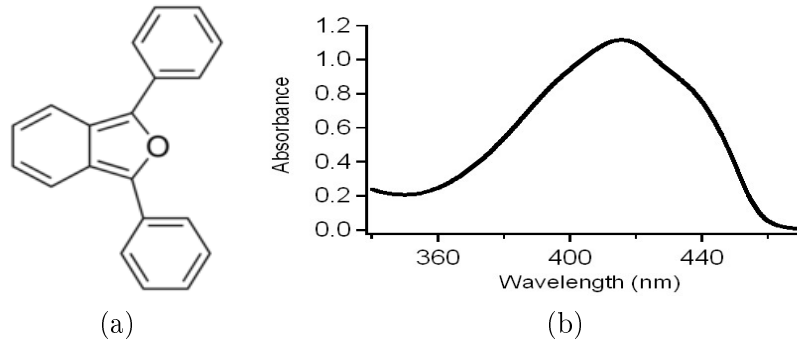


FIG. 4.3: Molécule de DPIBF (a) et spectre d'absorbance (b) d'une solution de DPIBF dans l'acétone avec $[T_0] \sim 50 \mu M$ mesuré au spectrophotomètre.

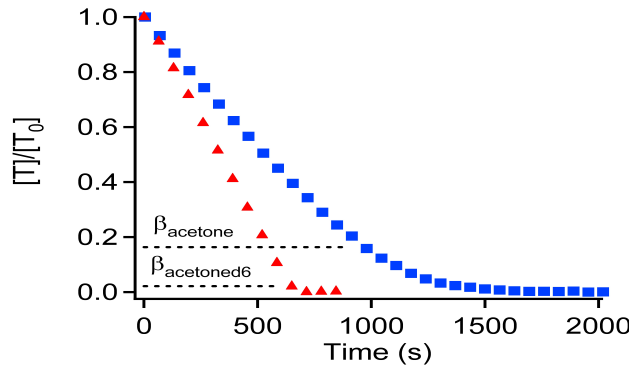


FIG. 4.4: Évolution expérimentale de la concentration en DPIBF en fonction du temps dans deux solvants organiques saturés à l'air : acétone (carrés bleus) et acétone d_6 (triangles rouges) quand les solutions sont irradiées par le laser IR à 1270 nm ($P \sim 1.1 \text{ W} \pm 1\%$). Les valeurs expérimentales déterminées pour β sont représentées et normalisées à la concentration initiale en DPIBF ($[T]_0 \sim 80 \mu \text{mol.L}^{-1}$).

$$-\frac{d[T]}{dt} = \frac{a}{1 + b[T]^{-1}} \quad (4.10)$$

où $a = \Gamma$ et $b = \beta$. Les données expérimentales vont alors être ajustées avec a and b comme paramètres libres. Nous allons détailler ici les résultats obtenus dans l'acétone et l'acétone d_6 . La figure 4.5 représente l'évolution de $-d[T]/dt = f([T])$ dans ces 2 solvants.

Le flux de photon à 1270 nm dans notre expérience est donné par la relation 4.11 :

$$I = \frac{P_0 L}{h\nu V_{sol}} \times \left(\frac{1 - e^{-\alpha L}}{\alpha L} \right) \times K_{quartz} \quad (4.11)$$

en $\text{photon.cm}^{-2}.\text{s}^{-1}$, où $P_0 = 1.1 \text{ W}$ est la puissance laser et $L = 1 \text{ cm}$ est la longueur de la cuve, $h\nu$ est l'énergie des photons à 1270 nm , $V_{sol} = 1.4 \text{ ml}$ est le volume de la solution dans la cuve et α est le coefficient d'absorption linéaire du solvant, du à l'absorption inactive du solvant qui est $\sim 0.04 \text{ cm}^{-1}$ dans l'acétone et K_{quartz} (~ 0.94) est l'absorption du laser par la 1ère face de la cuve en quartz. Utilisant la valeur de $[O_2] = 2.4 \times 10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$ [84] on obtient alors dans l'acétone : $\sigma_{1270} = 11.8 \times 10^{-24} \text{ cm}^2 \pm 3\%$ and $\beta = 1.80 \times 10^{-5} \text{ mol.L}^{-1} \pm 4\%$. Dans l'acétone d_6 $\Gamma = 1.38 \times 10^{-7} \text{ mol.L}^{-1}.\text{s}^{-1} \pm 3\%$, les mêmes paramètres sont utilisés pour l'analyse, on trouve alors $\sigma_{1270} = 12.4 \times 10^{-24} \text{ cm}^2 \pm 4\%$ et $\beta = 1.78 \times 10^{-6} \text{ mol.L}^{-1} \pm 21\%$. Les valeurs de la section efficace d'absorption de l'oxygène à 1270 nm dans l'acétone et l'acétone d_6 sont en très bon accord.

Les valeurs moyennes de σ_{1270} et β mesurées à partir de cinq expériences différentes dans chaque solvant sont reportées dans la table 4.1. Pour chaque expérience, les valeurs de σ_{1270} et β sont

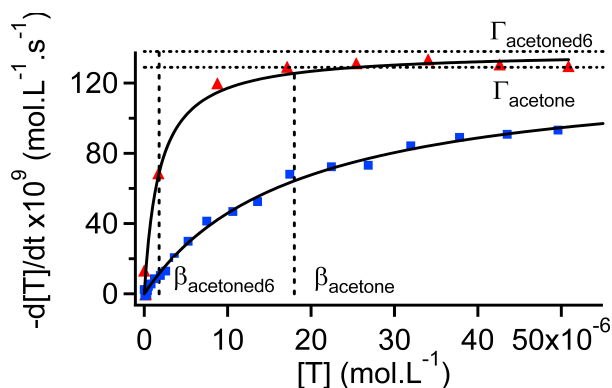


FIG. 4.5: Vitesse de disparition du DPIBF dans l'acétone (carrés bleus) et l'acétone d_6 (triangles rouges). La puissance du laser à 1270 nm est $1.1 \text{ W} \pm 1\%$. Avec a et b en paramètres libres, on peut déterminer à partir d'un ajustement des données (trait plein noir) d'après l'équation 4.8 : $\Gamma = 1.29 \times 10^{-7} \text{ mol.L}^{-1}.\text{s}^{-1} \pm 2\%$ et $\beta = 1.80 \times 10^{-5} \text{ mol.L}^{-1} \pm 4\%$ dans l'acétone $\Gamma = 1.38 \times 10^{-7} \text{ mol.L}^{-1}.\text{s}^{-1} \pm 3\%$ et $\beta = 1.78 \times 10^{-6} \text{ mol.L}^{-1} \pm 21\%$ dans l'acétone d_6 , où les incertitudes sont évaluées d'après les coefficients de corrélation. Les lignes en pointillés horizontales et verticales représentent les valeurs expérimentales déterminées pour Γ et β respectivement, dans l'acétone protonée et deutérée.

obtenues en évaluant les paramètres a et b de l'équation 5.12. Pour comparaison, les valeurs de la littérature de σ_{1270} sont aussi reportées. Les valeurs minimum et maximum pour β et k_r dans chaque solvant sont aussi reportées de F. Wilkinson *et al.* [81].

Dans l'éthanol, comme nous l'avons évoqué un peu plus en amont, la confiance dans le tracé de la vitesse de disparition du piège en fonction de la concentration en piège est moins bonne puisque la relation $[T_0] \gg \beta$ n'est pas vérifiée. La modélisation du système d'équations différentielles montre des résultats sur ces deux paramètres en très bon accord avec les valeurs de a et b déterminé par le tracé de $-d[T]/dt = f([T])$. De même dans les autres solvants organiques acétone, acétone d_6 et toluène, la modélisation du système d'équations différentielles a permis de confirmer les résultats obtenus par le tracé de $-d[T]/dt = f([T])$.

Spectre d'absorption de l'oxygène pour la transition $^3O_2[{}^3\Sigma_g^-] \longrightarrow {}^1O_2[{}^1\Delta_g]$

Différentes études ont cherché à évaluer le déplacement en longueur d'onde du maximum d'absorption de l'oxygène moléculaire pour la transition $^3O_2[{}^3\Sigma_g^-] \longrightarrow {}^1O_2[{}^1\Delta_g]$ en fonction du solvant. Comparé à la phase gaz, le maximum d'absorption pour cette transition est décalé vers le rouge [93]. Ce décalage en longueur d'onde augmente avec l'indice de réfraction du solvant, donc avec la polarisabilité des molécules de solvant [72]. On observe ainsi dans [94] un déplacement en longueur d'onde de 6 nm pour la longueur d'onde d'émission de la transition ${}^1O_2[{}^1\Delta_g] \longrightarrow {}^3O_2[{}^3\Sigma_g^-]$ entre l'acétone ($\lambda_{em} = 1273 \text{ nm}$, $n = 1.3560$) et l'anisole ($\lambda_{em} = 1279 \text{ nm}$, $n = 1.518$). Ce déplacement en longueur d'onde dépend également des interactions électroniques entre les molécules de solvant et l'oxygène moléculaire. Un effet sur la forme de la bande pour l'absorption ou l'émission a également été observé dans certains solvants [95,96].

Afin de déterminer la position du maximum d'absorption ainsi que la largeur de la transition $^3O_2[{}^3\Sigma_g^-] \longrightarrow {}^1O_2[{}^1\Delta_g]$ à 1270 nm, nous avons évalué la section efficace d'absorption dans deux solvants organiques : acétone et éthanol pour des longueurs d'onde allant de 1247 à 1288 nm. La figure 4.6 présente les résultats obtenus dans ces 2 solvants.

Nous avons mesuré un maximum d'absorption autour de $(1273 \pm 1) \text{ nm}$ dans l'acétone et l'éthanol, ce qui est en très bon accord avec [75,94]. La largeur à mi-hauteur est de l'ordre de $20 \pm 2 \text{ nm}$ pour les deux solvants, ce qui est comparable aux valeurs précédemment reportées par Losev *et al.* [90].

solvents	τ_{Δ} (μs)	$[^3O_2]$ ($10^{-3} mol.L^{-1}$)	$\alpha_{solvent}$ (cm^{-1})	β ($10^{-5} mol.L^{-1}$)	k_r ($10^8 L.mol^{-1}.s^{-1}$)	σ_{1270} ($10^{-24} cm^2$)
acétone	47.5 [59]	2.4 [84]	0.04	$1.8 \pm 10\%^a$ 5 – 9.4 [81]	11.7 ^a 4.1 – 17 [81]	$11.5 \pm 3\%^a$ $8.0 \pm 10\%$ [85] $6.9 \pm 30\%$ [75] $6.6 \pm 10\%$ [77] $8.8 \pm 15\%$ [86]
acétone d ₆	$690 \pm 3\%$ [87] 992 [59] $410 \pm 5\%$ [88]	2.4	0.04	$0.2 \pm 14\%^a$	7.9 ^a 5.0 ^a 13.3 ^a	$12.6 \pm 3\%^a$
toluène	$27.8 \pm 10\%$ [89]	1.8 [84]	0.04	$4.2 \pm 7\%^a$ 4 – 12 [81]	8.6 ^a 4.3 – 8.9 [81]	$34.8 \pm 4\%^a$ 44.4 [90] $15.5 \pm 30\%$ [75]
éthanol	13.9 [91]	2.1 [84]	0.34	$9.1 \pm 13\%^a$ 6.5 – 20 [81]	7.9 ^a 4.3 – 13 [81] 11 [77] 14 [86]	$17.7 \pm 7\%^a$ $12.6 \pm 10\%$ [85] $9.2 \pm 30\%$ [75] $9.9 \pm 10\%$ [77] $8.4 \pm 15\%$ [86]

TAB. 4.1: σ_{1270}^a et β^a sont déterminés expérimentalement dans différents solvants en évaluant les paramètres a et b de l'équation 5.12 comme décrit dans la partie 4.3 en utilisant le DPIBF. Les incertitudes sur σ_{1270}^a et β^a sont les déviations standard obtenus sur cinq expériences. Le coefficient d'absorption linéaire α , mesuré expérimentalement, est reporté ainsi que les valeurs des concentrations en oxygène dissous reportées dans la littérature. Les valeurs des τ_{Δ} prennent en compte le pourcentage d'eau [92] contenu dans les solvants considérés en utilisant les valeurs de la littérature du τ_{Δ} dans le solvant pur. Pour l'acétone d₆, considérant la pureté du solvant (99.9%) et au vu de l'écart entre les valeurs tabulées pour le temps de vie de l'oxygène singulet, aucune correction n'a été faite sur ce temps de vie. k_r^a est calculé en utilisant les valeurs estimées pour τ_{Δ} . La concentration initiale en DPIBF est $[T]_0 \approx 100 \mu mol.L^{-1}$ et la puissance du laser à 1270 nm est égale à 1.1 W dans toutes les expériences. Les valeurs minimum et maximum de β et k_r sont reportées de [81].

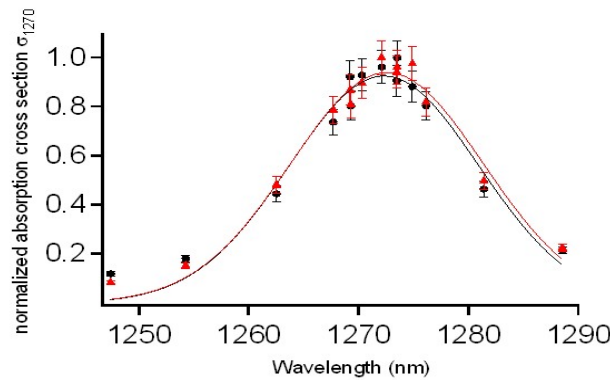


FIG. 4.6: Spectre d'absorption de l'oxygène moléculaire pour la transition $^3O_2[{}^3\Sigma_g^-] \rightarrow {}^1O_2[{}^1\Delta_g]$ dans l'acétone (triangles rouges) et l'éthanol (cercles noirs). Les lignes pleines permettent d'évaluer la forme de la bande d'absorption de la transition.

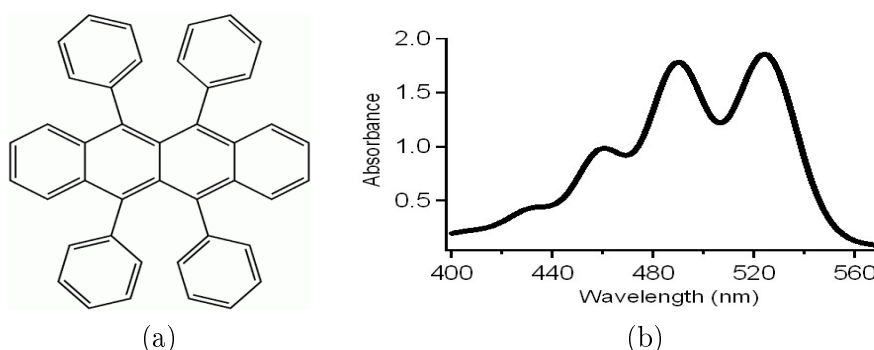


FIG. 4.7: Molécule de rubrène (a) et spectre d'absorbance (b) du rubrène dans l'acétone d_6 avec $[T_0] \sim 120 \mu M$ mesuré au spectrophotomètre.

La position du maximum d'absorption pour la transition $^3O_2[{}^3\Sigma_g^-] \longrightarrow {}^1O_2[{}^1\Delta_g]$ est identique dans le cas des deux solvants étudiés. Si on compare les indices de réfraction pour l'acétone et l'éthanol de 1.3560 et 1.3594 respectivement, ceux-ci sont très proches. Nos résultats révèlent que pour les deux solvants étudiés il n'y a pas d'effet sur la position du maximum d'absorption, ce qui semble donc en bon accord avec l'étude [94] qui montre que la position du maximum d'absorption est sensiblement identique pour des solvants d'indice de réfraction similaire.

4.3.3 Vérification des résultats obtenus avec un autre piège : le rubrène

Pour confirmer la valeur de σ_{1270} trouvé avec le DPIBF, les mêmes expériences cinétiques sont réalisées dans l'acétone d_6 avec un autre piège chimique : le rubrène. Le rubrène présente un maximum d'absorption autour de 540 nm , comme le montre la figure 4.7. Afin de mesurer les variations d'absorbance de ce piège, nous avons remplacé le laser à 405 nm par un laser à 532 nm ($\epsilon_{532\text{Rubrene}} = 9.5 \times 10^3 \text{ M}^{-1}.\text{cm}^{-1}$).

Nous avons vérifié, comme dans le cas du DPIBF que dans nos conditions expérimentales de mesure d'absorbance (nombre de points de mesure et intensité du laser à 532 nm), le rubrène n'est pas dégradé en absence d'irradiation à 1270 nm . Pour une puissance laser de 1.1 W et une concentration initiale en piège de l'ordre de $[T]_0 \approx 100 \mu\text{mol}.\text{L}^{-1}$, les valeurs expérimentales trouvées pour Γ et β sont de $1.43 \times 10^{-7} \text{ mol}.\text{L}^{-1}.\text{s}^{-1} \pm 3\%$ et $2.74 \times 10^{-5} \text{ mol}.\text{L}^{-1} \pm 8\%$. A partir de l'Eq. 4.11, la valeur de $\sigma_{1270} = 11.7 \times 10^{-24} \text{ cm}^2 \pm 4\%$ est déterminée, celle-ci est en très bon accord avec la valeur moyenne trouvée avec le DPIBF. De même, la valeur trouvée pour β est en très bon accord avec la valeur donnée dans [81].

4.3.4 Expériences complémentaires

Effet de chauffage laser

Mesure de l'élévation de température

Une partie de l'énergie lumineuse est absorbée par le solvant et va être responsable d'un échauffement du liquide. Dans les solvants organiques acétone, acétone d_6 , et toluène $\alpha \sim 0,04$ ce qui entraîne que seul 2 % de l'énergie lumineuse est absorbée et en moyenne nous avons relevé des élévations de température faible de 2°C à puissance laser maximale. Dans l'éthanol $\alpha \sim 0,34$, 15 % de l'énergie lumineuse est absorbée, l'échauffement au sein du liquide est plus important et nous avons relevé des élévations de température de $\sim 10^\circ\text{C}$. Nous avons voulu vérifier quel pouvait être l'effet de cette élévation de température sur le taux de production de 1O_2 et sur sa réactivité avec le DPIBF.

Effet de cette augmentation de température sur la production d' 1O_2 et sa réactivité

Nous avons alors irradié des solutions de DPIBF dans l'acétone à différentes puissance laser allant de 200 *mW* à 1.1 *W*. La figure 4.8 présente la valeur de Γ obtenue pour chacune de ces expériences :

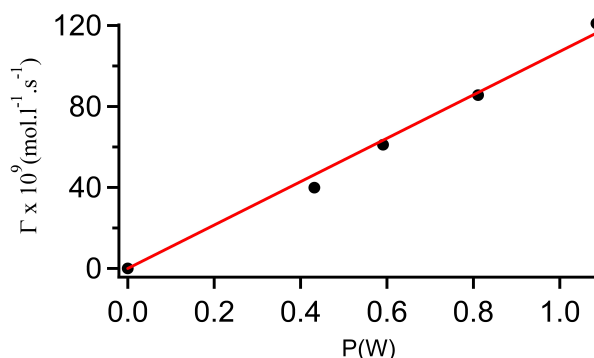


FIG. 4.8: Taux de production d'oxygène singulet dans l'acétone en fonction de la puissance laser à 1270 *nm*. Les données expérimentales sont en noirs. Par ajustement linéaire (trait plein rouge), on évalue $\sigma_{1270} = 10.6 \times 10^{-24} \text{ cm}^2 \pm 3\%$ à partir de l'équation 4.11. La valeur obtenue pour σ_{1270} est en bon accord avec la valeur obtenue avec le DPIBF (voir section 4.3.2).

La pente de cette courbe nous donne accès à σ_{1270} . La valeur de σ_{1270} obtenue : $10.6 \times 10^{-24} \text{ cm}^2 \pm 3\%$ est en très bon accord avec la valeur moyenne obtenue dans la table 4.1. En conclusion, l'élévation de température ne semble pas avoir d'effet sur le taux de production d'oxygène singulet. Pour les autres solvants organiques, les mêmes observations ont été faites, et la valeur de σ_{1270} obtenue par le tracé de $\Gamma = f(P)$ est en très bon accord avec la valeur moyenne du σ_{1270} calculée dans chaque solvant.

De même, pour chaque solvant, le tracé de $\beta = f(P)$ n'a pas montré d'évolution significative pour β avec la température. Aux puissances maximales utilisées et donc aux élévations de température maximales (2°C pour l'acétone, l'acétone *d*₆ et le toluène et 10°C dans l'éthanol), il ne semble pas y avoir d'effet net sur β . P. R. Ogilby et son équipe [67] ont évalué l'évolution du temps de vie pour différents solvants avec la température. Pour des gammes de température allant de 20 à 30°C le temps de vie change très peu : dans le toluène et le méthanol, la variation relative sur le temps de vie est de 13 % et 6 % respectivement, sur une élévation de température de 60°C. Dans l'acétone [87], le temps de vie change de moins de 1% sur 40°C. Dans les solvants organiques étudiés, le temps de vie étant sensiblement constant et β n'ayant pas montré d'évolution significative avec la température, ceci implique que la valeur de k_r semble être constant sur la plage de température étudiée.

Dans l'étude menée par [95], C. A. Long et D. R. Kearns se sont intéressés à l'évolution du temps de vie de l'oxygène singulet ainsi qu'à la constante de réactivité de DPIBF et ¹O₂ en fonction de la température dans *CHCl*₃. La variation relative sur la valeur de k_r est de 6 % sur 10°C. Une hypothèse sur l'évolution de k_r avec la température via la dépendance de la viscosité avec la température est émise [95]. Dans les trois solvants : acétone, acétone *d*₆ et toluène, l'élévation de température est faible et nous n'avons pas observé d'effet sur k_r avec la température. Dans l'éthanol, là où l'élévation de température est plus importante, nous n'avons pas observé d'effet net sur l'évolution de k_r avec la température. Une diminution de 16 % sur la viscosité est observée entre 20 et 40°C dans l'éthanol [97]. Si la dépendance de k_r avec la température est liée à un changement de viscosité du solvant avec la température, alors une augmentation de k_r de l'ordre de $\sim 16\%$ est attendue. Cependant, compte tenu de l'incertitude sur la valeur moyenne obtenue sur β dans l'éthanol (13 %) qui est de l'ordre de grandeur de l'effet attendu sur k_r avec la température, notre montage expérimental ne nous permet pas sur 10°C d'observer cet effet. En conclusion, dans les solvants acétone, acétone *d*₆ et toluène, l'élévation de température étant faible, nous n'avons pas observé de variation de k_r , ce qui semble cohérent avec ce qui a été observé dans *CHCl*₃ [95]. Dans l'éthanol, nos incertitudes de mesure étant

probablement du même ordre de grandeur que d'une éventuelle variation de k_r avec la température, nous ne pouvons pas conclure sur celle-ci. Éventuellement, nous pourrions augmenter la température de l'éthanol grâce à l'agitateur magnétique chauffant sur lequel la cuve repose. Ainsi, atteindre des élévations de température de quelques dizaines de degrés nous permettrait *a priori* d'observer ce phénomène.

Influence des produits d'oxydation

Dans les expériences menées par Krasnovsky et son équipe [75–77], seule une faible variation d'absorbance est analysée ($\Delta A \sim 0.05$) et donc une faible fraction de DPIBF est oxydé. Ici, $120 \mu M$ de DPIBF est oxydé et donc la concentration en produit oxydé formé est importante. L'effet d'accumulation de produits oxydés doit donc être évaluée sur la cinétique de dégradation du piège. Deux expériences ont été réalisées.

Dans la première expérience, après avoir réalisé la dégradation complète du DPIBF, on dissout dans la solution contenant les produits oxydés à nouveau $120 \mu M$ de DPIBF et cette solution est de nouveau irradiée à même puissance laser. Nous avons observé exactement la même cinétique de disparition du DPIBF pour les 2 expériences. Dans la deuxième expérience, nous avons réalisé des solutions de DPIBF à différentes concentration de $\sim 10 \mu M$ à $\sim 100 \mu M$. Toutes les solutions ont été irradiées à $1270 nm$ avec la même puissance laser. Pour de faibles variations d'absorbance ($\Delta A \sim 0.1$) la dégradation du piège est linéaire avec le temps (voir analyse détaillée dans [75, 76]. Les pentes pour de faibles variations d'absorbance sont reportées sur la cinétique de disparition du piège à $\sim 100 \mu M$ (Fig. 4.9) et coïncident parfaitement avec la cinétique de dégradation totale du piège.

Ces deux expériences montrent clairement que l'accumulation des produits d'oxydation n'a pas d'influence sur la valeur de la section efficace d'absorption de l'oxygène à $1270 nm$ ni sur la valeur de β dans les solvants organiques étudiés.

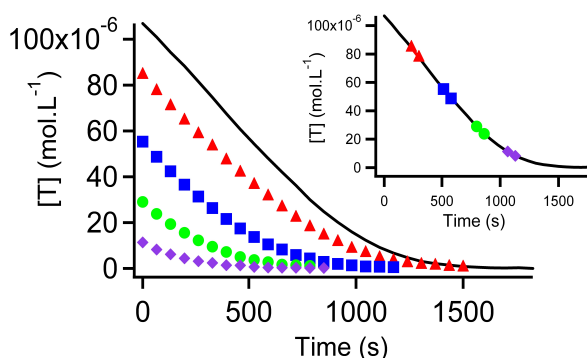


FIG. 4.9: Effet des produits de dégradation sur la cinétique de disparition du piège. Cinq concentrations différentes en DPIBF de 100 à $10 \mu\text{mol.L}^{-1}$ dans l'acétone sont irradiées à $1270 nm$. Pour de faible variation de concentration ($\Delta[T] \sim 10\%$), la dégradation du DPIBF est linéaire avec le temps. Les pentes correspondant à de faibles variations sur la concentration en DPIBF ($80 \mu\text{mol.L}^{-1}$ triangles rouges, $50 \mu\text{mol.L}^{-1}$ carrés bleus, $30 \mu\text{mol.L}^{-1}$ cercles verts et $10 \mu\text{mol.L}^{-1}$ losanges violets) sont reportés dans l'insert de la figure et se superposent parfaitement à la cinétique de dégradation complète du piège (trait plein noir) où $[T_0] \sim 100 \mu\text{mol.L}^{-1}$.

Effet de saturation en O_2 ou N_2

Pour évaluer l'effet de concentration en gaz dissous sur la cinétique de dégradation du DPIBF (comme dans les études [85, 98]) nous avons réalisé des expériences de saturation en diazote et dioxygène dissous 4.10. La solution de DPIBF dans l'acétone est saturée en oxygène en bullant pendant $20 min$ à l'aide d'un capillaire très fin. Nous trouvons une valeur de Γ 4.94 plus grande que

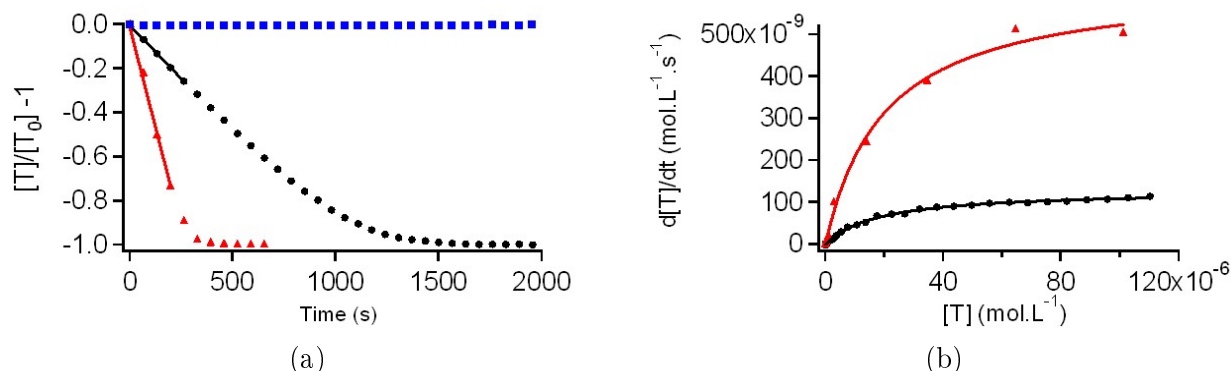


FIG. 4.10: Effet de saturation en O_2 et N_2 sur la cinétique de dégradation du DPIBF. (a) Évolution de la concentration en piège en fonction du temps pour les expériences où la cuve est saturée à l'air (ronds noirs), en O_2 (triangles rouges) ou en N_2 (carré bleu). (b) Evolution de la vitesse de disparition du piège pour les expériences de saturation à l'air (ronds noirs), en O_2 (triangles rouges) ou en N_2 (carré bleu).

pour la solution saturée à l'air ($\Gamma = 6.28 \times 10^{-7} \text{ mol.L}^{-1}.\text{s}^{-1}$ pour la solution saturée en oxygène comparé à 1.27×10^{-7} pour l'autre). Γ est donc proportionnel à la concentration en oxygène dissous et le taux de production d' 1O_2 peut être augmenté d'un facteur ~ 5 en saturant la solution en 3O_2 . Pour les solutions où la concentration en oxygène est nulle (obtenue en bullant en N_2 ultra-pur pendant 1 h) aucune dégradation du piège n'a été observée pour une irradiation d'1 h à 1270 nm.

4.4 Discussion et conclusions

En conclusion, nous avons construit un montage expérimental qui permet une mesure en temps réel de la concentration en piège $[T]$ sous excitation directe à 1270 nm de 3O_2 . Nous avons détaillé une expression analytique pour la cinétique de disparition du piège, $-d[T]/dt$ en fonction de la concentration en piège durant de telles expériences. A partir de cette expression, il est possible de déterminer de manière simultanée β , et le taux de production d'oxygène singulet Γ pour des systèmes piège-solvant où l'inégalité $[T_0] \gg \beta$ est vérifiée. Le fait que le taux de production d'oxygène singulet puisse être déterminé sans nécessité de connaître β , peut être intéressant dans les expériences où ce paramètre est inconnu ou estimé de manière indirecte.

Notre approche permet de déterminer σ_{1270} et β en une seule expérience, *i. e.* sans nécessité de connaître la constante de vitesse de réaction au préalable. En solvants organiques, la comparaison des sections efficaces d'absorption pour la transition $O_2[^3\Sigma_g^-] \rightarrow O_2[^1\Delta_g]$ de l'oxygène moléculaire à 1270 nm déterminées avec deux pièges différents nous donnent des valeurs de σ_{1270} en très bon accord. Dans l'éthanol et le toluène, les valeurs expérimentales déterminées pour β sont en bon accord avec les données de la littérature (voir table 4.1). Dans l'acétone, la valeur de β déterminée dans ce travail n'est pas dans la gamme des valeurs tabulées dans [81]. Ceci peut s'expliquer par la faible valeur de τ_Δ utilisée pour calculer β dans ces papiers. Dans tous les solvants organiques testés, la valeur calculée pour k_r est dans la gamme des valeurs reportées dans [81]. Ces résultats ont fait l'objet d'un article récemment publié dans la revue Chem. Phys. Lett. [99].

A notre connaissance, les estimations pour σ_{1270} en solvants ont seulement été rapporté par Krasnovsky *et al.* [75–77, 86]. Les valeurs reportées dans l'acétone dans [77, 85, 86] s'étalent entre $6,6 \times 10^{-24}$ to $8,8 \times 10^{-24} \text{ cm}^2$. Notre estimation, voir Fig. 4.5, est 1.2 à 1.6 fois plus grande. Dans l'éthanol, σ_{1270} est $17,7 \times 10^{-24} \text{ cm}^2$ comparé aux valeurs publiées entre $8,4 \times 10^{-24}$ et $12,6 \times 10^{-24} \text{ cm}^2$ [77, 85, 86]. Nos valeurs estimées de σ_{1270} dans l'acétone et l'éthanol, sont plus grandes que celles reportées par Krasnovsky *et al.*, mais relativement nos données sont comparables : le ratio des σ_{1270} dans l'éthanol et l'acétone est approximativement 1.5 (excepté pour l'étude [86]).

Mentionnons également que utilisant la même analyse que dans [76], *i. e.* calculant la valeur de la section efficace d'absorption à 1270 nm en postulant les valeurs de la littérature pour β , nous avons également trouvé des valeurs plus élevées dans l'acétone et l'éthanol en partant de concentrations de DPIBF différentes ($[T]_0 \approx 100 \mu\text{mol.L}^{-1}$; $50 \mu\text{mol.L}^{-1}$) et utilisant des puissances laser à 1270 nm différentes (1.2 W ; 300 mW ; 100 mW). En conclusion, cette différence ne vient donc pas d'un artefact expérimental ni de notre méthode d'analyse cinétique (Eq. 4.8). Nous n'avons pas trouvé d'explications à cette différence. Cependant, la valeur déterminée pour σ_{1270} dans le toluène est proche de la valeur extrapolée par Losev *et al.* [90] d'expériences à haute pression en phase gazeuse. Dans [76], les auteurs ont mentionné une valeur deux fois plus faible que les valeurs extrapolées à partir de ces expériences.

Dans un article plus récent ([86]), une nouvelle méthode est utilisée pour mesurer la section efficace d'absorption de l'oxygène à 1270 nm dans les solvants organiques et l'eau. σ_{1270} est obtenu par comparaison du taux de photooxygénation obtenu sous excitation direct de l'oxygène moléculaire par des diodes laser IR et sous excitation indirect par réactions photosensibilisées avec des porphyrines. Cependant, des concentrations identiques de DPIBF sont nécessaires pour assurer l'acuité de cette nouvelle technique et une bonne connaissance du rendement quantique de création d'oxygène singulet par le photoagent est aussi nécessaire. Les valeurs relatives des sections efficaces des différents solvants s'écartent significativement des résultats obtenus dans les études précédentes [75, 77, 85]. Ainsi, des questions restent ouvertes sur la validité de la méthode appliquée dans [86]. Une discussion détaillée sur ce point sera développée à la fin du prochain chapitre.

Chapitre 5

Etude du taux de production et de la réactivité de 1O_2 dans l'eau

En solvants organiques, nous avons développé une analyse cinétique nouvelle des mécanismes réactionnels permettant d'obtenir des données quantitatives sur le taux de production et la réactivité de 1O_2 avec le DPIBF.

Avant de s'intéresser au milieu complexe que représente la cellule, notre étude s'est portée vers les milieux aqueux. En effet, les cellules étant composées à 80 % en volume d'eau, l'obtention de données quantitatives en milieu aqueux est un premier pas vers l'étude de la production et de la réactivité de 1O_2 dans les systèmes biologiques. Pour cette étude, deux études complémentaires ont été menées. Dans un premier temps, nous avons choisi d'utiliser des nanocapsules lipidiques dispersées dans D_2O afin de piéger le DPIBF. Dans ce milieu hétérogène, un modèle cinétique à deux pseudophases a été développé afin d'étudier la cinétique de réaction entre 1O_2 et le DPIBF. Dans un second temps, un piège chimique hydrosoluble spécifique du DPIBF a été étudié afin de confirmer les résultats obtenus sur les dispersions de nanocapsules lipidiques.

Cette étude en milieu hétérogène a donné lieu à une collaboration avec l'équipe de Rabah Boukherroub et Alexandre Barras de l'équipe Nanobiointerfaces de l'Institut de Recherche Interdisciplinaire de Villeneuve d'Ascq (IRI).

Nous présenterons à la suite de ce chapitre, l'ensemble des résultats obtenus en solvants organiques et en milieu aqueux afin de vérifier la relation d'Einstein en solution.

5.1 Position du problème en milieu aqueux

5.1.1 État de l'art des données dans D_2O et H_2O

Peu d'études menées dans D_2O ou H_2O ont été réalisées et de ce fait, il y a peu de données sur σ_{1270} dans ces deux solvants. Une étude menée dans D_2O donne une section efficace théorique de $9.17 \times 10^{-24} \text{ cm}^2$ [90].

Dans H_2O , au vue de la non solubilité des sondes usuelles en solvant aqueux l'équipe de Krasnovsky *et al.* [77] a utilisé un agent surfactant ionique le dodécyl sulfate de sodium (*SDS*) afin de solubiliser le DPIBF dans l'eau. Cette molécule, de formule brute $CH_3(CH_2)_{11}OSO_3Na$, est composée d'une chaîne de 12 atomes de carbone au bout de laquelle est attachée un groupement sulfate. La chaîne carbonée est hydrophobe (non miscible à l'eau) et le groupement sulfate est hydrophile (miscible à l'eau). Dans l'eau, la forme stable de ces molécules est une pseudophase appelée micelle. Une fois dans l'eau, les molécules de *SDS* vont s'arranger afin d'orienter leurs parties hydrophiles vers l'extérieur et leurs parties hydrophobes à l'intérieur afin de former des structures de quelque nanomètre de diamètre. Le DPIBF étant fortement hydrophobe va, a priori, se retrouver piégé dans ces micelles.

La membrane de la cellule biologique est composée de phospholipides [52]. Ce sont aussi des

molécules amphiphiles (molécule qui possède à la fois un groupement hydrophile et un groupement hydrophobe) dont la tête hydrophile est composée d'un groupement phosphate. Les phospholipides ont aussi la propriété de s'assembler en micelles en présence d'eau [100]. Mais la membrane plasmique est structurée sous forme de bicouche lipidique [100]. L'analogie n'est pas complète, mais la solution de DPIBF dissout à l'aide de *SDS*, apparaît être un bon modèle de départ pour étudier la réactivité de l'oxygène singulet dans le milieu complexe que représente la cellule. Dans cette analogie, le DPIBF serait une cible privilégiée de l'oxygène singulet et le *SDS* jouerait le rôle de la membrane plasmique.

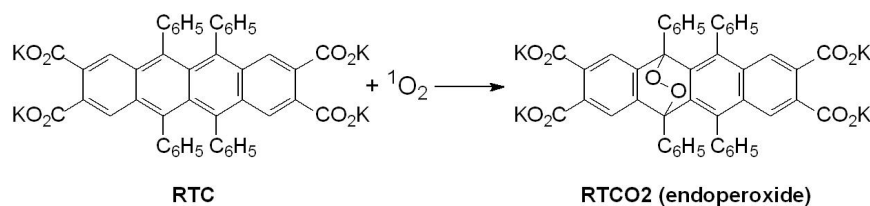
Dans l'étude [77], les solutions de DPIBF dans un mélange eau-*SDS* sont utilisées afin de déterminer la valeur de la section efficace d'absorption de l'oxygène à 1270 nm dans l'eau pure. Le DPIBF est solubilisé dans l'acétone à forte concentration, puis des solutions de DPIBF à 1% d'acétone dans un mélange eau-*SDS* sont réalisées. Différentes concentrations de *SDS* sont utilisées afin d'extrapoler la valeur du taux de production d'oxygène singulet à fraction volumique de micelles nulle. Dans H_2O , la valeur de σ_{1270} $7.2 \times 10^{-24} \text{ cm}^2$ est déterminée. Cependant, dans cette étude des questions sur la valeur de σ_{1270} se posent. En effet, la valeur de k_r pour ces mélanges eau-*SDS* n'est pas mesurée, mais calculée à l'aide d'un modèle de collision complexe [101] reliant la viscosité macroscopique des solutions à k_r . Or, pour de faibles variations d'absorbance, la valeur de σ_{1270} est obtenue en postulant une valeur pour k_r (voir [76]). La valeur de σ_{1270} obtenue est donc complètement liée à la valeur postulée pour k_r .

5.1.2 Sondes de l'oxygène singulet en milieu aqueux

La recherche de sonde de l'oxygène singulet utilisable en milieu aqueux est un enjeu majeur pour l'étude de l'oxygène singulet en milieu biologique. En solvants organiques des données quantitatives sur la production d'oxygène singulet ainsi que la connaissance de la réactivité de 1O_2 vis-à-vis d'un piège spécifique peuvent donc être obtenues grâce à des pièges spécifiques et très réactifs. Ces pièges tels que DPIBF, tétracène, anthracène ou rubrène comportent des cycles aromatiques et sont insolubles en milieu aqueux. En milieu aqueux des sondes spécifiques de l'oxygène singulet hydrosolubles doivent donc être utilisées.

De nombreuses équipes se sont attachées à synthétiser des sondes de l'oxygène singulet solubles en milieu aqueux. Un piège chimique idéal en milieu aqueux doit posséder de nombreuses propriétés : être soluble dans l'eau, être très réactif et être spécifique à l'oxygène singulet, c'est-à-dire ne pas réagir avec les autres espèces de l'oxygène, tel que l'oxygène dans son état fondamental 3O_2 ou d'autres ERO (anion superoxyde, peroxyde d'hydrogène...). Ainsi des dérivés hydrosolubles du DPIBF connus pour leur spécificité et leur forte réactivité vis-à-vis de l'oxygène singulet ont été synthétisés [102]. La valeur de la constante de réactivité entre le dérivé hydrosoluble (noté p-4 dans cette étude) est de $5.5 \times 10^8 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$, soit presque deux fois moins réactif que le DPIBF en milieu organique.

L'équipe de J.M. Aubry s'est également intéressée à la synthèse de sondes hydrosolubles de l'oxygène singulet. Différents pièges ont été synthétisés et caractérisés, tels que le *bis*-9,10-anthracène-(4-triméthylphenylammonium) dichloride (BPAA) [103] qui donne un endoperoxyde en unique produit d'oxydation avec une constante de réactivité globale $k_r + k_q = 2.0 \times 10^7 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ soit bien moins réactif que le DPIBF. Le 1,3-Cyclohexadiène-1,4-Diethanoate de sodium (CHDDE) réagit quant à lui uniquement par quenching chimique avec un $k_r = (2.6 \times 10^7 \pm 0.3) \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ [104] mais est environ 35 fois moins réactif que le DPIBF. Le rubrène-2,3,8,9-tetracarboxylate de potassium (RTC) dérivé hydrosoluble du rubrène 5.1 a également été élaboré au sein du laboratoire de J.M. Aubry [105] et sa cinétique de réaction avec l'oxygène singulet étudiée [106]. Dans l'article de [104] une valeur de $k_r = 1.5 \times 10^8 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ a été calculée dans D_2O . Malgré une constante de réactivité 6 fois plus faible que celle du DPIBF en solvants organiques, le RTC est très soluble dans l'eau et forme un produit d'oxydation stable et incolore (RO_2) par réaction avec l'oxygène singulet [106].

FIG. 5.1: Réaction entre ${}^1\text{O}_2$ et le RTC.

5.1.3 Utilisation du DPIBF piégé en nanocapsules lipidiques (LNCs) et du rubrène-2,3,8,9-tetracarboxylate de potassium (RTC)

Afin de caractériser la production et la réactivité de l'oxygène singulet en milieu aqueux, nous avons choisi d'utiliser des nanocapsules lipidiques permettant d'encapsuler le DPIBF et de solubiliser celui-ci dans l'eau. Afin de vérifier les résultats obtenus, un piège hydrosoluble le RTC a été utilisé.

Dans un premier temps, nous nous intéresserons à l'étude menée avec les dispersions de nanocapsules lipidiques en milieu aqueux. Dans ce milieu hétérogène, nous détaillerons les différents mécanismes réactionnels. Nous expliciterons l'analyse cinétique que nous avons développée afin d'obtenir le taux de production et la réactivité de ${}^1\text{O}_2$ avec le DPIBF dans ce milieu complexe. Ces deux paramètres sont révélateurs de la complexité du milieu et nous verrons que l'extrapolation à fraction volumique de nanocapsules lipidiques nulle, va nous permettre d'obtenir σ_{1270} et β en milieu aqueux pur. Dans un second temps l'étude réalisée avec le RTC sera détaillée et nous verrons que les résultats obtenus sur les valeurs de σ_{1270} et β confirment les données obtenues avec les nanocapsules lipidiques.

5.2 DPIBF encapsulé en LNCs dans D_2O

5.2.1 Présentation des LNCs

Afin de caractériser l'oxygène singulet en milieu aqueux, des structures de type micelles ou microémulsions peuvent être utilisées pour solubiliser une molécule hydrophobe réactive de ${}^1\text{O}_2$. Les nanocapsules lipidiques (LNCs) sont des nanocargos hydrosolubles ayant un grand intérêt pour la délivrance de drogues et apparaissent être des structures utiles pour la solubilisation de composés hydrophobes. Par exemple, l'encapsulation de la quercétine dans ces LNCs peut augmenter sa solubilité apparente d'un facteur 100 [107]. De même, l'incorporation d'hypéricine en LNCs (Hy) prévient l'agrégation de celle-ci en phase aqueuse, augmente sa solubilité apparente et permet d'augmenter le taux de production d'oxygène singulet en comparaison avec l'Hy libre [108]. Les LNCs se composent d'un cœur huileux de triglycérides entouré par une couche mixte de lécithines et d'un surfactant hydrophile, qui expose des chaînes de polyéthylène glycol (PEG) de taille moyenne contenant une moyenne de 15 unités d'éthylène glycol (voir Fig. 5.2). Ici, le piège hydrophobe DPIBF est encapsulé dans les LNCs pour étudier sa cinétique de réaction avec le DPIBF dans les dispersions de nanocapsules lipidiques en D_2O et d'extrapoler le taux de production d' ${}^1\text{O}_2$ en D_2O pur.

Le protocole de synthèse des nanocapsules lipidiques est détaillé en annexe B.2. Les LNCs sont formulées à une taille nominale de 25 nm dans D_2O en utilisant une méthode d'inversion de phase d'un système huile/eau, comme décrit par Heurtault [109]. Le rendement d'encapsulation du DPIBF est supérieur à 97 %, ce qui implique que la majeure partie du DPIBF est contenue à l'intérieur des nanocapsules.

5.2.2 Théorie

Le schéma réactionnel décrit en solutions homogènes (voir 4.2.1) est insuffisant pour décrire la cinétique de production de réaction de ${}^1\text{O}_2$ en milieux microhétérogènes. Le taux de production de ${}^1\text{O}_2$ et sa réactivité sont affectés par la présence de compartiments hydrophile et hydrophobe. De

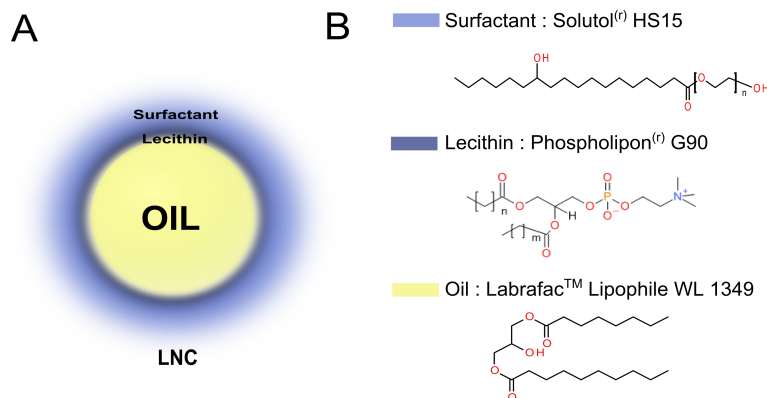
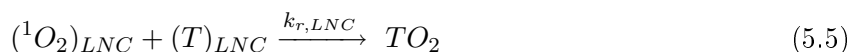


FIG. 5.2: Schéma des nanocapsules lipidiques. Les LNCs (~ 25 nm) sont formés d'un coeur de triglycérides entouré d'une couche mixte de lécithines et d'un surfactant hydrophile (~ 3 nm), qui expose une chaîne de PEG de taille moyenne contenant une moyenne de 15 unités d'éthyléneglycol.

plus, la distribution à l'équilibre de 1O_2 entre les phases aqueuse et organique doit être prise en compte. Un modèle cinétique pour la désactivation de 1O_2 en milieux micellaires a été développé pour la première fois par Rodgers *et al.* [110,111]. Peu de temps après, un modèle à deux pseudophases a été appliqué aux analyses cinétiques de 1O_2 en microémulsions [112,113] et Martinez *et al.* ont montré que ce modèle était capable de décrire avec une bonne précision les constantes de désactivation radiative et non radiative pour différents types de micelles et de microémulsions [92].

Le modèle à deux pseudophases appliqué aux dispersions de nanocapsules lipidiques en D_2O prend en compte le fait que (i) la section efficace d'absorption de 3O_2 (σ_{1270}) pour la transition $^3O_2[{}^3\Sigma_g^-] \longrightarrow {}^1O_2[{}^1\Delta_g]$ à 1270 nm est différente dans les phases LNC et D_2O , (ii) la constante de désactivation de 1O_2 , k_d , est différente dans les phases LNC et D_2O et (iii) les constantes de réaction pour l'entrée ou la sortie de 1O_2 de la phase LNC sont aussi différentes. Un schéma cinétique proche de celui proposé Rodgers *et al.* [110, 111] est représenté dans la Fig. 5.3.

Le jeu d'équations réactionnelles pour les dispersions de LNCs dans D_2O est donné par les Eqs. 5.1 à 5.6 :



où, $(^3O_2)_x$ est l'oxygène moléculaire et $(^1O_2)_x$ l'oxygène singulet. σ_x est la section efficace d'absorption de 3O_2 pour la transition $^3O_2[^3\Sigma_g^-] \longrightarrow ^1O_2[^1\Delta_g]$ à 1270 nm. $k_{d,x}$ est la constante de désactivation de 1O_2 par le solvant. Ainsi, $k_{d,x} = 1/\tau_{\Delta,x}$ où $\tau_{\Delta,x}$ est le temps de vie de l'oxygène singulet en absence de piège. x représente la phase *LNC* ou *D₂O*. k_{in} et k_{out} sont les constantes de réaction pour le transfert de 1O_2 d'une pseudophase à l'autre. $k_{q,LNC}$ est la constante de quenching

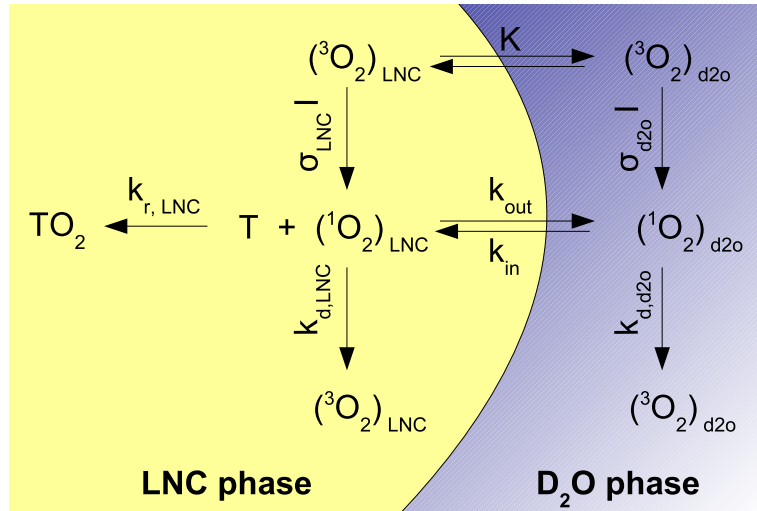


FIG. 5.3: Schéma cinétique du modèle à deux pseudophases pour la production de 1O_2 production et sa désactivation dans les dispersions de LNCs. $(^3O_2)_x$ and $(^1O_2)_x$ sont l'oxygène moléculaire et l'oxygène singulet, respectivement. σ_x est la section efficace d'absorption de 3O_2 pour la transition $^3O_2[{}^3\Sigma_g^-] \rightarrow ^1O_2[{}^1\Delta_g]$ à 1270 nm et I est le flux de photons à 1270 nm . $k_{d,x}$ est la constante de désactivation de 1O_2 par le solvant. x représente la phase *LNC* ou *D₂O*. k_{in} et k_{out} sont les constantes de réaction pour le transfert de 1O_2 d'une pseudophase à l'autre. $k_{r,LNC}$ est la constante de quenching chimique de 1O_2 par T . T est le DPIBF et TO_2 est le produit d'oxydation primaire formé par réaction entre 1O_2 et le DPIBF. K est la constante d'équilibre montrant la solubilité relative de 3O_2 entre les deux pseudophases.

chimique par T dans la phase *LNC*. T est le DPIBF et TO_2 le produit d'oxydation primaire formé par réaction entre 1O_2 et le DPIBF.

L'oxygène singulet est activé à 1270 nm à l'intérieur et à l'extérieur des LNCs. Une fois formé dans les LNCs, $(^1O_2)_{LNC}$ peut être désactivé par les molécules de solvant ($k_{d,LNC}$), réagir avec le DPIBF ($k_{r,LNC}$) ou diffuser en dehors des nanocapsules (k_{out}). Dans la phase *D₂O*, $(^1O_2)_{D2O}$ peut être désactivé par les molécules de solvant ($k_{d,D2O}$) ou retourner dans les LNCs (k_{in}). Les expressions sont fortement simplifiées si on fait l'hypothèse qu'un équilibre très rapide est établi pour 1O_2 entre les deux phases en comparaison avec les procédés de désactivation, i.e. $k_{in}, k_{out} \gg k_{d,LNC}, k_{d,D2O}, k_{r,LNC}[T]_{LNC}$. Cette hypothèse est tenue en milieu micellaire où les constantes de réaction pour l'entrée et la sortie des agrégats micellaires ont été reportées supérieures à 10^7 s^{-1} [114] comparé à $k_d \sim 2.9 \times 10^5\text{ s}^{-1}$ dans H_2O [81]. Pour les dispersions de LNCs, si on considère un coefficient de diffusion (D) pour 3O_2 de $1.41 \times 10^{-5}\text{ cm}^2\text{ s}^{-1}$ [115] et le temps de vie de l'oxygène singulet dans D_2O [87] ($\tau_{\Delta,D2O} = 68\text{ }\mu\text{s}$), la distance traversée par 1O_2 (L) sur une période (t) de deux fois son temps de vie est $\sim 1069\text{ nm}$ (root mean square radial displacement : $L = \sqrt{6Dt}$) [67,116]. Ainsi, la distance de diffusion de 1O_2 est bien plus grande que le diamètre moyen des LNCs ($\sim 25\text{ nm}$) et que la distance moyenne entre LNCs (~ 60 à 290 nm pour les fractions volumiques de LNCs étudiées). Ainsi, un équilibre est établie pour 1O_2 entre les deux pseudophases et la constante d'équilibre K_{eq} est donnée par l' Eq. 5.7

$$K_{eq} = k_{in}/k_{out} = [^1O_2]_{LNC}/[^1O_2]_{D2O} \quad (5.7)$$

où, $[^1O_2]_{LNC}$ est $[^1O_2]_{D2O}$ sont les concentrations de 1O_2 dans les phases *LNC* et *D₂O*, respectivement.

Le schéma cinétique décrit dans la Fig. 5.3 a été résolu par Lee and Rodgers [110]. Ici, une approche similaire est réalisée avec un substrat (T) inclus dans le modèle comme dans [113].

Les systèmes microhétérogènes comme les microémulsions peuvent être considérées comme un mélange homogène caractérisé par des constantes de réaction apparentes [113]. Dans les dispersions

de LNCs, le taux de réaction de 1O_2 peut ainsi être exprimé avec des constantes de réaction apparentes Γ_{app} , $k_{d,app}$ et $k_{r,app}$ correspondant respectivement au taux de production de 1O_2 , la constante de désactivation de l'oxygène singulet par le solvant et la constante de quenching chimique par T . On peut montrer que σ_{app} (le détail de l'analyse cinétique est présenté en annexe B.1), la section efficace d'absorption apparente de 3O_2 pour la transition $^3O_2[{}^3\Sigma_g^-] \rightarrow ^1O_2[{}^1\Delta_g]$ à 1270 nm peut être exprimée comme suit :

$$\sigma_{app} = \frac{\Gamma_{app}}{I[{}^3O_2]_{D_2O}} = [f_{LNC}(K\sigma_{LNC} - \sigma_{D_2O}) + \sigma_{D_2O}] \quad (5.8)$$

L'indice de réactivité $\beta_{app} = k_{d,app}/k_{r,app}$, qui représente la concentration en piège pour laquelle le quenching de 1O_2 par les molécules de solvant ($k_{d,app}$) est égal à la désactivation par le quenching total par le substrat T ($k_{r,app}[T]$), est donné par :

$$\beta_{app} = \frac{1}{Kk_{r,LNC}}[f_{LNC}(Kk_{d,LNC} - k_{d,D_2O}) + k_{d,D_2O}] \quad (5.9)$$

Ainsi, σ_{app} et β_{app} sont des fonctions linéaires de f_{LNC} .

Dans une solution contenant un piège de 1O_2 sous irradiation à 1270 nm, le taux de production de 1O_2 $\Gamma_{app} = \sigma_{app}I[{}^3O_2]_{D_2O}$ ($mol.L^{-1}.s^{-1}$) dépend du flux de photons à 1270 nm, I ($s^{-1}cm^{-2}$), de la concentration en oxygène moléculaire, $[{}^3O_2]_{D_2O}$ ($mol.L^{-1}$), et de la section efficace d'absorption à 1270 nm, σ_{app} (cm^2). Comme détaillé en amont, l'équilibre sur l' 3O_2 entre les deux pseudophases est très rapide en comparaison avec la désactivation de 1O_2 . Ainsi, la concentration en oxygène moléculaire dans les LNCs peut être considérée comme constante, et Γ_{app} ne dépend que de la puissance laser à 1270 nm.

L'évolution des deux espèces se fait à deux échelles de temps bien distinctes, et l'approximation de l'état quasi-stationnaire peut être appliquée à l' 1O_2 conduisant à l'Eq. 5.10 et à l'Eq. 5.11 pour la vitesse de disparition du piège.

$$[{}^1O_2] = \frac{\Gamma_{app}}{k_{d,app} + k_{r,app}[T]} \quad (5.10)$$

$$\frac{d[T]}{dt} = -\frac{\Gamma_{app}}{1 + \beta_{app}[T]^{-1}} \quad (5.11)$$

5.2.3 Taux de production de 1O_2 et réactivité avec DPIBF dans les dispersions de LNCs dans D_2O

La fraction volumique de LNCs (f_{LNC}) dispersés dans D_2O est comprise entre 0.17 % et 3.8 % pour (i) déterminer σ_{app} et β_{app} dans les dispersions de LNCs dans D_2O et (ii) extrapoler σ_{1270} dans D_2O pur.

Le DPIBF est encapsulé dans les LNCs à $\sim 100 \mu M$ est irradié avec le laser Raman à fibre [78] à 1270 nm à la puissance de $\sim 1 W$. L'absorption à 1270 nm dans D_2O induit une augmentation de température. Dans ce solvant, le temps de vie de l'oxygène singulet et la concentration en oxygène moléculaire diminue avec la température [117, 118]. A une puissance laser typique de 1 W, une augmentation de température de $\sim 6^\circ C$ a été mesurée conduisant à $\tau_{\Delta,D_2O} = 66 \mu s$ et $[{}^3O_2]_{D_2O} = 2.46 \times 10^{-4} mol.L^{-1}$. Fig. 5.4 (a) montre la diminution de la concentration en DPIBF pour $[T_0] = 124 \mu mol.L^{-1}$ en D_2O pour $f_{LNC} = 0.0017$ sous irradiation à 1270 nm pour $\sim 1.1 W$.

La modélisation des équations différentielles ordinaires pour l'oxygène singulet et le piège est développée pour confirmer la validité de notre expression analytique du taux de disparition du piège (Eq. 4.8) et des valeurs obtenues pour Γ_{app} et β_{app} . La méthode des moindres carrés est appliquée à l'évolution de la concentration en piège dans le temps (t) : $[T] = f(t)$ (voir Fig. 5.4 (a)), et d'après le

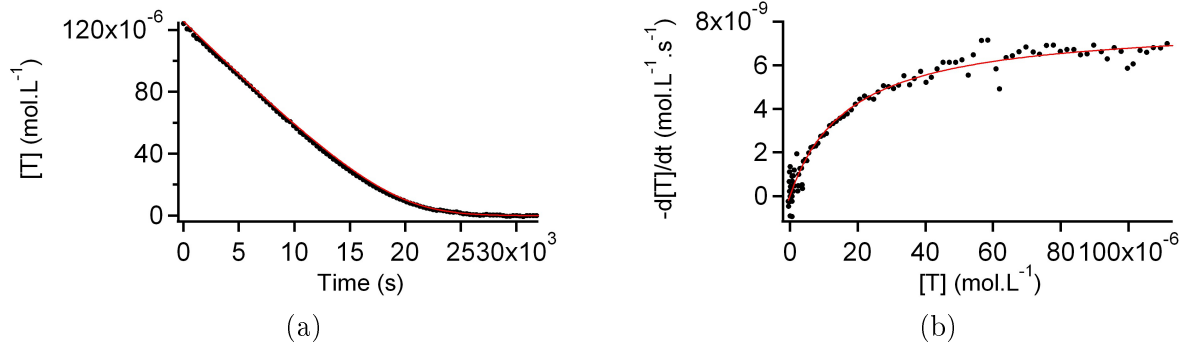


FIG. 5.4: (a) Évolution expérimentale du DPIBF encapsulé dans les dispersions de LNCs dans D_2O pour $[T_0] = 124 \mu\text{mol.L}^{-1}$ et $f_{LNC} = 0.0017$ sous irradiation laser à 1270 nm à une puissance de $1.1W$ (points). Modélisation du jeu d'équations réactionnelles est réalisé et à partir du meilleur ajustement (trait plein) des données expérimentales, les valeurs de $\Gamma_{app} = 7.95 \times 10^{-9} \text{mol.L}^{-1}.\text{s}^{-1}$ et $\beta_{app} = 17.3 \times 10^{-6} \text{mol.L}^{-1}$ sont obtenus. (b) Taux de disparition du DPIBF pour $f_{LNC} = 0.0017$ dans D_2O en fonction de $[T]$ (points). Le meilleur ajustement des données expérimentales est réalisé (trait plein) à partir de l'Eq. 5.12, les paramètres $a = 7.98 \times 10^{-9} \text{mol.L}^{-1}.\text{s}^{-1} \pm 3\%$ et $b = 17.5 \times 10^{-6} \text{mol.L}^{-1} \pm 9\%$ sont obtenus.

meilleur ajustement sur les résultats expérimentaux, les valeurs de $\Gamma_{app} = 7.95 \times 10^{-9} \text{mol.L}^{-1}.\text{s}^{-1}$ et $\beta_{app} = 17.3 \times 10^{-6} \text{mol.L}^{-1}$ sont obtenues. Le taux de disparition du piège en fonction de $[T]$ pour la même expérience est représenté dans la Fig. 5.4 (b). Un meilleur ajustement sur les données est obtenu en utilisant l'expression suivante :

$$-\frac{d[T]}{dt} = \frac{a}{1 + b[T]^{-1}} \quad (5.12)$$

où, $a = \Gamma_{app}$ et $b = \beta_{app}$.

Le taux de production de l'oxygène singulet Γ_{app} et l'indice de réactivité β_{app} sont déterminés d'après les paramètres a et b , respectivement. Les valeurs de $a = 7.98 \times 10^{-9} \text{mol.L}^{-1}.\text{s}^{-1} \pm 3\%$ et $b = 17.5 \times 10^{-6} \text{mol.L}^{-1} \pm 9\%$ sont obtenus. Ainsi, les valeurs obtenues pour Γ_{app} et β_{app} avec les deux méthodes sont en très bon accord, confirmant la validité de l'analyse du taux de disparition du piège (Eq. 4.8).

Grâce à l'Eq. 4.11 et compte tenu de la valeur du coefficient d'absorption linéaire (α) dans les dispersions de LNCs dans D_2O de $\sim 0,17 \text{ cm}^{-1}$ (α est identique dans D_2O pur et dans les dispersions de LNCs pour les fractions volumiques de LNCs étudiées) pour une valeur de $\Gamma_{app} = 7.98 \times 10^{-9} \text{mol.L}^{-1}.\text{s}^{-1}$, une valeur de $\sigma_{app} = 8.2 \times 10^{-24} \text{cm}^2 \pm 4\%$ est obtenue pour $f_{LNC} = 0.0017$.

Les dispersions de LNCs en D_2O ont été analysés par mesures HPLC avant et après 1 h et 2 h d'irradiation à 1270 nm . Deux produits d'oxydation formés par réaction entre 1O_2 et DPIBF sont identifiés (voir Annexe B.3.1). La fuite du DPIBF en dehors des capsules durant l'irradiation est constante et faible ($\sim 10\%$) (voir Annexe B.3.2). Ainsi, la réaction entre 1O_2 et le DPIBF doit se faire principalement dans les LNCs où à l'interface entre les phases LNCs et D_2O . Pour analyser l'effet de solvants sur la réactivité de 1O_2 envers le DPIBF dans les dispersions de LNC, des expériences à la même fraction volumique de LNCs de 0.0017 ont été réalisées dans D_2O et H_2O . Le taux de disparition de DPIBF est fortement augmenté dans D_2O comparé à H_2O , reflétant les temps de vie relatifs de l'oxygène singulet dans ces deux solvants (voir Annexe B.4). Ainsi, l'oxygène singulet est produit à l'intérieur et à l'extérieur des LNCs, mais la réaction entre 1O_2 et DPIBF doit se faire à l'intérieur des LNCs ou à l'interface entre les phases LNCs et D_2O . Le schéma cinétique décrit dans la section 5.2.2 est donc en accord avec ces observations expérimentales.

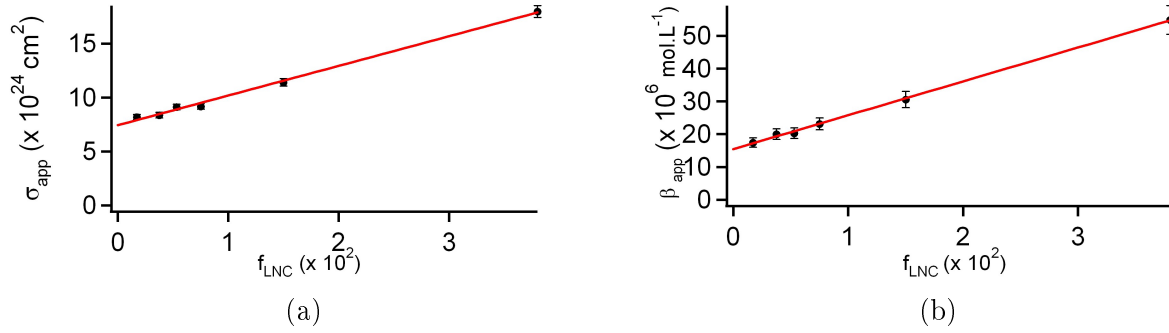


FIG. 5.5: Évolution de σ_{app} (a) et β_{app} (b) en fonction de la fraction volumique de LNCs dispersées dans D_2O pour $0.17 < f_{LNC} < 3.8\%$. Les pentes des courbes sont égales à $275 \times 10^{-24} \text{ cm}^2 \pm 3\%$ et $1034 \times 10^{-6} \text{ mol.L}^{-1} \pm 2\%$ pour $\sigma_{app} = f(f_{LNC})$ et $\beta_{app} = f(f_{LNC})$ respectivement. σ_{1270} peut alors être extrapolée en D_2O pur. La valeur de $\sigma_{D_2O} = 7.4 \times 10^{-24} \text{ cm}^2 \pm 2\%$ est obtenue. Pour $f_{LNC} = 0$ $\beta_{app} = 15.5 \times 10^{-6} \text{ mol.L}^{-1} \pm 2\%$ est déterminé.

5.2.4 Influence de la fraction volumique en LNCs sur le taux de production de 1O_2 et réactivité avec le DPIBF

Pour évaluer la complexité de l'environnement sur la production de 1O_2 et sur sa réactivité avec le DPIBF, j'ai fait varier la proportion de LNCs dans D_2O . La fraction volumique de LNCs est comprise entre 0.17 % et 3.8 %. La Fig. 5.5 montre l'évolution de σ_{app} (a) et β_{app} (b) avec la fraction volumique de LNCs. σ_{app} et β_{app} varient linéairement avec la fraction volumique de LNCs pour f_{LNC} jusqu'à 3.8 %.

Des expériences d'irradiation en LNCs à blanc ont également été réalisées pour évaluer l'effet de l'irradiation à 1270 nm sur la stabilité des LNCs. A la fois les mesures d'absorbance et de DLS ont montré que les LNCs n'étaient pas endommagées sous irradiation laser à 1270 nm pour $0.17\% < f_{LNCs} < 3.8\%$ (voir Annexe B.3.3).

L'augmentation du taux de production de 1O_2 avec f_{LNC} peut s'expliquer par une plus forte probabilité de transition et une plus forte solubilité de l'oxygène moléculaire dans la phase LNCs comparé à la phase D_2O . En effet, le coeur des LNCs est composé de triglycérides et la solubilité de l'oxygène est augmentée d'un facteur ~ 4 entre l'eau et l'huile d'olive [119]. L'indice de réactivité β_{app} augmente également linéairement avec f_{LNC} , correspondant à une diminution du temps de vie apparent de 1O_2 $\tau_{\Delta,app}$ et une diminution de la constante de quenching chimique entre 1O_2 et le DPIBF, $k_{r,app}$. En environnement complexe, le quenching de l'oxygène singulet avec les molécules environnantes est supposé augmenter, résultant en un temps de vie plus faible pour l'oxygène singulet. Par exemple τ_{Δ} diminue lorsque la concentration en SDS augmente en D_2O [92]. Finalement la réactivité entre le DPIBF et l'oxygène singulet pourrait diminuer dû à une augmentation de la viscosité des solutions comme proposé dans [77].

A partir de l'expression proposée dans la partie 5.2.2 pour le comportement de σ_{app} avec f_{LNC} , les valeurs de σ_{D_2O} et σ_{LNC} peuvent être extrapolées à $f_{LNC} = 0$ et $f_{LNC} = 1$, respectivement. La pente de la courbe $\sigma_{app} = f(f_{LNC})$ est égale à $275 \times 10^{-24} \text{ cm}^2 \pm 3\%$ correspondant à $K\sigma_{LNC} - \sigma_{D_2O}$. Avec une valeur de $K \approx 4$ [119] et $\sigma_{D_2O} = 7.4 \times 10^{-24} \text{ cm}^2 \pm 2\%$, une valeur de $\sigma_{LNC} = 71 \times 10^{-24} \text{ cm}^2 \pm 3\%$ est obtenue. A travers l'évolution de β_{app} avec f_{LNC} , les valeurs de $k_{r,LNC}$ et $k_{d,LNC}$ peuvent être déterminées. Une valeur de $\beta_{app} = 15.5 \times 10^{-6} \text{ mol.L}^{-1} \pm 2\%$ est déterminée à $f_{LNC} = 0$. Ainsi, considérant $k_{d,D_2O} = 1.5 \times 10^4 \text{ s}^{-1} \pm 4\%$ [87], une valeur de $k_{r,LNC} = 2.44 \times 10^8 \text{ mol.L}^{-1} \cdot \text{s}^{-1} \pm 6\%$ est obtenue. A partir de la pente de la courbe de $1034 \times 10^{-6} \text{ mol.L}^{-1} \pm 2\%$, une valeur de $k_{d,LNC} = 2.56 \times 10^5 \text{ s}^{-1} \pm 8\%$ est obtenue. A travers l'augmentation de β_{app} avec f_{LNC} , la diminution de $\tau_{\Delta,app}$ avec f_{LNC} est révélée (voir Fig. 5.6). En effet, $\tau_{\Delta,app}$ peut être exprimé de la manière suivante :

$$\tau_{\Delta,app} = \frac{1}{\beta_{app}k_{r,app}} = \frac{1}{\beta_{app}} \frac{Kf_{LNC} + (1 - f_{LNC})}{Kk_{r,LNC}} \quad (5.13)$$

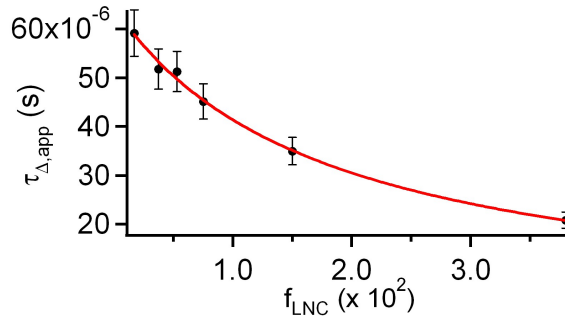


FIG. 5.6: Temps de vie apparent de 1O_2 en fonction de f_{LNC} dans les dispersions de LNCs dans D_2O (points noirs (Eq. 5.13) et ligne rouge pleine (Eq. B.8 présentée en annexe)). $\tau_{\Delta,app}$ décroît de $66 \mu s$ en D_2O pur, à $21 \mu s$ dans les dispersions LNCs dans D_2O à $f_{LNC} = 0.038$ dû à l'augmentation de la complexité de l'environnement.

Nous avons réalisé une irradiation à 1270 nm dans le Labrafac pur, le triglycérider constituant le coeur des LNCs. A partir du taux de disparition du DPIBF, une valeur de $\sigma_{labrafac} \sim 68 \times 10^{-24} \text{ cm}^2$ a été déterminée et est en très bon accord avec σ_{LNC} . Une valeur de $\beta_{labrafac} \sim 250 \times 10^{-6} \text{ mol.L}^{-1}$ a également été estimée, qui est quatre fois plus faible que β_{LNC} indiquant que la désactivation de 1O_2 dans les LNCs se fait à la fois dans le coeur huileux, mais également dans la couche mixte lécithines et du surfactant hydrophile.

5.3 Étude dans D_2O et H_2O pur avec le composé hydrosoluble RTC

La valeur de σ_{D_2O} peut être extrapolée pour des concentrations de LNCs tendant vers zéro (voir Fig. 5.5 (a)). Afin de confirmer la valeur extrapolée de $\sigma_{D_2O} = 7.4 \times 10^{-24} \text{ cm}^2 \pm 2\%$, nous avons choisi d'utiliser le piège chimique hydrosoluble RTC.

5.3.1 Méthode

La concentration en O_2 dissous est environ ~ 10 fois plus faible dans D_2O et H_2O qu'en solvants organiques. Nous avons donc saturé les solutions de RTC en oxygène en bullant à l'intérieur des solutions à l'aide d'une pipette pasteur avant irradiation. Pendant toute la durée de l'expérience, le bullage en oxygène était maintenu au dessus du liquide afin de ne pas gêner la mesure d'absorbance.

Le RTC présente un maximum d'absorption à 540 nm (voir Fig. 5.7). Pour monitorer les variations d'absorbance du piège, le laser à 532 nm est utilisé ($\epsilon_{RTC,532nm} = 7.42 \times 10^3 \text{ M}^{-1}.\text{cm}^{-1}$).

5.3.2 Résultats dans D_2O

Des solutions de RTC autour de $100 \mu\text{mol.L}^{-1}$ sont irradiées à 1270 nm ($\sim 1W$). Si la valeur de $\beta = 1.01 \times 10^{-4} \text{ mol.L}^{-1}$ [87,104] est postulée, la valeur moyenne de $\sigma = 6.8 \times 10^{-24} \text{ cm}^2 \pm 16\%$ est obtenue, où l'incertitude est la déviation standard sur dix expériences. Les valeurs obtenues avec le RTC et avec le DPIBF encapsulé en LNCs sont en très bon accord. De plus, ces valeurs sont en bon accord avec [90]. On peut également remarquer que, si β est laissé libre dans le meilleur ajustement des données de la courbe $[T] = f(t)$, les valeurs de $\sigma_{D_2O} = 7.6 \times 10^{-24} \text{ cm}^2 \pm 51\%$ et $\beta_{D_2O} = 9.5 \times 10^{-5} \text{ mol.L}^{-1} \pm 49\%$ sont obtenues. Les incertitudes montrent clairement que σ_{D_2O}

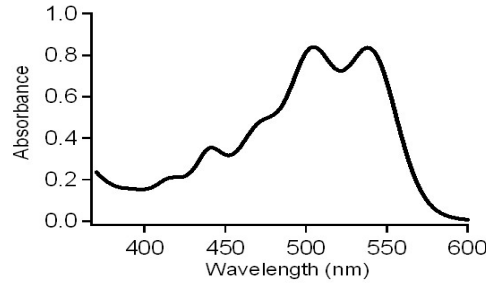


FIG. 5.7: Spectre d'absorbance du RTC dans D₂O à $\sim 110 \mu M$ mesuré au spectrophotomètre.

et β_{D_2O} ne peuvent être obtenus indépendamment dans le cas du RTC où $[T_0] \sim \beta$. Cependant, la valeur moyenne de β est en excellent accord avec [106].

Pour tester l'influence de la concentration en oxygène dissous sur la production de 1O_2 , nous avons également réalisé des expériences avec des solutions de RTC saturées en air et en azote (comme dans les expériences [85, 98, 99]). Pour la solution saturée en azote, nous n'avons pas observé de dégradation du RTC pour une irradiation d'1 h à 1270 nm à une puissance laser de $\sim 1 W$. Le taux de production de 1O_2 est multiplié par un facteur ~ 5 pour la solution saturée en oxygène comparée à la solution saturée en oxygène (voir annexe A.3.1). De plus, nous avons vérifié que les produits d'oxydation n'affectaient pas la cinétique de disparition du RTC (voir annexe A.3.2).

5.3.3 Effets du chauffage laser

Pour évaluer l'impact de l'élévation de température sur la cinétique de disparition du RTC, les solutions de RTC saturées en oxygène dans D_2O ont été irradiées à des puissances laser comprises entre 300 et 1200 mW.

Pour l'analyse, une valeur de $k_r = 1.5 \times 10^8 \text{ mol}^{-1} \cdot \text{L} \cdot \text{s}^{-1}$ [104] est postulée et le temps de vie de 1O_2 est calculé de manière à prendre en compte l'élévation de température due au laser IR (voir annexe A.1.1 pour la mesure de l'élévation de température dans la cuve et annexe A.1.2 pour l'évolution du temps de vie de 1O_2 avec la température). La concentration en oxygène dissout quant à elle diminue fortement avec la température (voir annexe A.1.2). Cette diminution sur la concentration en oxygène dissout n'est donc pas négligeable et sera pris en compte dans l'analyse des résultats expérimentaux. Après meilleur ajustement des données des courbes $[T] = f(t)$, la valeur de Γ est obtenu pour chaque puissance laser. La figure 5.8, représente l'évolution du taux de production de 1O_2 en fonction de la puissance du laser à 1270 nm.

D'après la pente de la courbe, la valeur de $\sigma_{D_2O} = 7.2 \times 10^{-24} \text{ cm}^2 \pm 3\%$ est obtenue, ce qui est en bon accord avec la valeur moyenne de σ_{D_2O} obtenue ci-dessus 5.3.2. Ainsi, le chauffage des solutions de RTC dans D_2O ne semblent pas affecter le taux de production de 1O_2 . De plus, σ_{D_2O} est en très bon accord avec la valeur extrapolée à fraction volumique de LNCs nulle.

Concernant β , nous n'avons pas observé aux élévations de température maximales d'effet significatif sur une éventuelle évolution de β avec la température quand celui-ci est laissé libre dans l'équation 5.12. Si on considère l'évolution de la viscosité dans D_2O avec la température, une diminution de 22 % est observée entre 20 and 30°C [67]. Si la dépendance de k_r avec la température est reliée à un changement de viscosité du solvant avec la température [95] alors une augmentation de $\sim 20\%$ est attendue pour k_r entre les puissances faibles et fortes d'irradiation laser à 1270 nm. Ici, les incertitudes de mesure sur β ($\sim 50\%$) sont telles qu'elles ne nous permettent pas de conclure sur une quelconque évolution de β (donc de k_r si on considère $\tau_\Delta \sim cst$) avec la température.

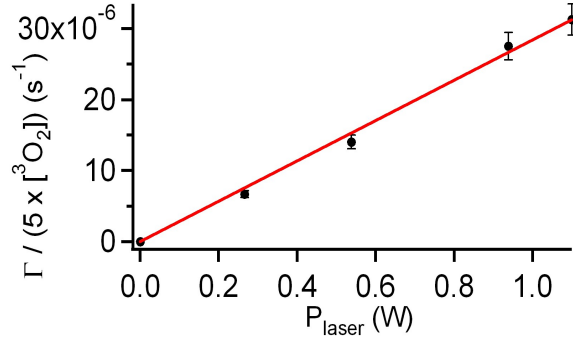


FIG. 5.8: Taux de production d'oxygène singulet dans D_2O en fonction de la puissance laser IR. Les solutions de RTC saturées en oxygène dans D_2O sont irradiées à 1270 nm à différentes puissances laser comprises entre 300 et 1200 mW . Les données expérimentales sont en noir. Après meilleur ajustement linéaire (trait plein rouge), la pente de la courbe $(2.84 \times 10^{-5} \pm 5.63 \times 10^{-7})\text{s}^{-1}$ est obtenue, ce qui permet de déterminer $\sigma_{D_2O} = 7.2 \times 10^{-24}\text{ cm}^2 \pm 3\%$.

5.3.4 Spectre d'absorption de l'oxygène pour la transition $^3O_2[^3\Sigma_g^-] \rightarrow ^1O_2[^1\Delta_g]$

Afin d'évaluer un éventuel déplacement du maximum d'absorption pour la transition $^3O_2[^3\Sigma_g^-] \rightarrow ^1O_2[^1\Delta_g]$ de l'oxygène moléculaire. Nous avons irradié des solutions de RTC dans D_2O pour des longueurs d'onde comprises entre 1247 et 1288 nm à puissance laser IR identique $P \sim 1.1\text{ W}$ et des concentrations en RTC identiques $[T_0] \sim 100\text{ }\mu\text{M}$. Sur cette plage de longueur d'onde, l'absorption change et le coefficient linéaire d'absorption α augmente de 50% (voir annexe A.2). De ce fait, 6% d'intensité lumineuse supplémentaire est absorbé à 1288 nm comparé à 1247 nm . Cette variation sur l'intensité absorbée sera prise en compte dans l'analyse des résultats pour le spectre d'absorption de la transition $^3O_2[^3\Sigma_g^-] \rightarrow ^1O_2[^1\Delta_g]$ de l'oxygène moléculaire dans D_2O .

La figure 5.9 présente les sections efficaces d'absorption de l'oxygène moléculaire pour la transition $^3O_2[^3\Sigma_g^-] \rightarrow ^1O_2[^1\Delta_g]$ dans D_2O obtenues pour des longueurs d'onde de 1247 à 1288 nm . Les sections efficaces d'absorption de l'oxygène moléculaire pour la transition $^3O_2[^3\Sigma_g^-] \rightarrow ^1O_2[^1\Delta_g]$ sont calculées pour de faibles variations d'absorbance des solutions de RTC dans D_2O (voir le détail de l'analyse cinétique pour $\Delta A \sim 0.05$ dans [77]) postulant $\beta = 1.5 \times 10^8\text{ M}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$ [104].

Le maximum d'absorption est mesuré à $(1273 \pm 1)\text{ nm}$. La largeur à mi-hauteur est de $\sim 18\text{ nm} \pm 2\text{ nm}$. Si l'on compare le spectre d'absorption de l'oxygène moléculaire obtenu dans les deux solvants organiques (acétone et éthanol) avec celui obtenu dans les cas de D_2O , la position des maximums ainsi que la largeur à mi-hauteur sont sensiblement identiques. L'indice de réfraction dans D_2O est de 1.3284 , donc un peu faible que celui de l'acétone et éthanol. Dans [94], le décalage en longueur d'onde observé entre l'acétone d_6 et l'éthanol deutéré (possédant un indice de réfraction de 1.329 donc proche de l'indice de réfraction de (D_2O)) est de seulement 1 nm . Compte-tenu de l'incertitude de 1 nm sur la position du maximum d'absorption, il est impossible d'observer un tel effet. Nos résultats donnant une position du maximum d'absorption pour la transition $^3O_2[^3\Sigma_g^-] \rightarrow ^1O_2[^1\Delta_g]$ de l'oxygène moléculaire sensiblement identique dans l'acétone, l'éthanol et D_2O semblent donc en accord avec ce qui été attendu [94].

5.3.5 Étude dans H_2O

Limite de la méthode : Pourquoi le cas de l'eau est-il problématique ?

Le cas de H_2O est probablement le plus intéressant du fait de l'implication de 1O_2 dans des procédés d'oxydation en milieux biologiques [120,121].

Cependant, comparé à D_2O le temps de vie dans H_2O est environ 20 fois plus faible [67], ce qui implique un indice de réactivité β 20 fois plus grand. De plus l'eau absorbe fortement l'intensité

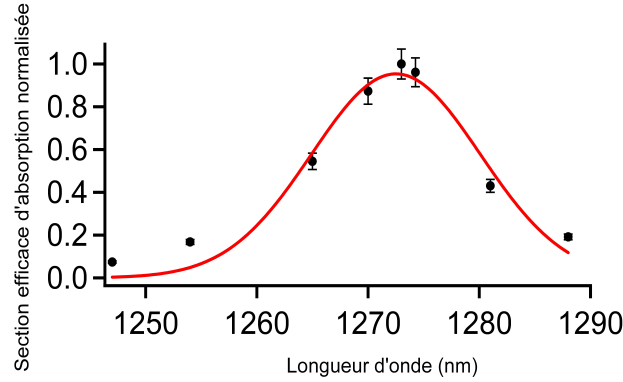


FIG. 5.9: Spectre d'absorption de l'oxygène moléculaire pour la transition $^3O_2[^3\Sigma_g^-] \rightarrow ^1O_2[^1\Delta_g]$ dans D_2O .

lumineuse à 1270 nm ($\alpha \sim 1,09\text{ cm}^{-1}$) : l'eau absorbe 40% de l'énergie lumineuse sur 1 cm traversé, ce qui induit une forte élévation de température dans le solvant. Ainsi, 40 % de l'énergie lumineuse est dissipée dans le solvant sous forme de chaleur et ne contribue pas directement à la production d'oxygène singulet. Le temps de vie faible va avoir pour effet une diminution de probabilité de réactivité entre le RTC et 1O_2 . La combinaison de ces effets va avoir pour impact une augmentation importante sur la durée de dégradation complète des solutions de RTC pour H_2O comparé à D_2O . En effet, la figure 5.10 représente les simulations numériques pour l'irradiation à 1270 nm de deux solutions de RTC à $120\text{ }\mu\text{M}$ dans D_2O et H_2O à même puissance laser.

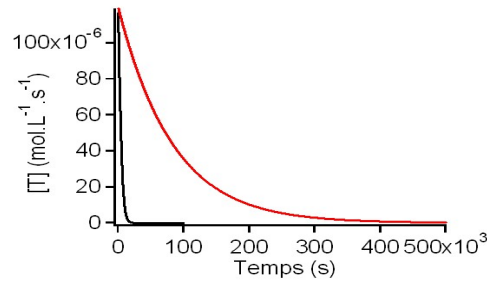


FIG. 5.10: Simulation numérique de l'irradiation à 1270 nm de deux solutions de RTC à $120\text{ }\mu\text{M}$ dans D_2O (courbe noire) et H_2O (courbe rouge) à $P \sim 1.1\text{ W}$.

Alors qu'il faut environ $\sim 8h$ pour obtenir la dégradation totale de la solution de RTC dans D_2O , le temps d'expérience dans H_2O passe à ~ 6 jours.

En pratique dans H_2O , nous nous sommes limités à de faibles variations d'absorbance et nous avons postulé une valeur pour β afin de quantifier le taux de production d'oxygène singulet. Nous avons suivi le même protocole expérimental que celui suivi pour l'étude dans D_2O . Les solutions de RTC sont saturées en 3O_2 1 h en faisant buller de l'oxygène dans la solution avant irradiation. Pendant toute la durée d'irradiation, le bullage est maintenu constant au dessus du liquide pour ne pas gêner la mesure d'absorbance.

Obtention de σ_{H_2O}

Nous avons mené des expériences dans H_2O avec le RTC, ce qui a permis d'obtenir une valeur moyenne pour σ_{H_2O} de $7.6 \times 10^{-24}\text{ cm}^2 \pm 4\%$, où les incertitudes sont la déviation standard sur trois expériences. Cette valeur est donc en bon accord avec la valeur extrapolée de $7.2 \times 10^{-24}\text{ cm}^2$ déterminée par Krasnovsky *et al.* lorsque la concentration en SDS tend vers zéro [77]. Les valeurs déterminées pour σ_{1270} dans D_2O et H_2O sont identiques.

Effet du chauffage laser

Dans l'eau, comme nous l'avons mentionné, l'absorption d'intensité lumineuse est forte à 1270 nm. C'est dans ce solvant que nous avons relevé les plus fortes élévations de température, soit 20°C à $P \sim 1.2 \text{ W}$ (voir annexe A.1.1). L'effet de cette augmentation de température n'influe pas sur le temps de vie de l'oxygène singulet puisque celui-ci varie très peu sur plusieurs dizaines de degrés : variation relative de 8 % sur 45°C [67] (voir annexe A.1.2).

Compte-tenu de la valeur de $\beta = 1.5 \times 10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$ [106], même si la cinétique de dégradation complète du RTC dans H_2O était obtenue il serait impossible d'avoir accès aux valeurs de Γ et β de manière simultanée. En effet, la condition $[T_0] \gg \beta$ n'est pas du tout vérifiée puisqu'ici $\beta \gg [T_0]$. En conséquence l'analyse de $-d[T]/dt = f([T])$ ne serait pas exploitable. Il est donc impossible dans le cas d' H_2O d'étudier les effets de chauffage laser sur la production d'oxygène singulet et sur sa réactivité avec le RTC.

D'autres sondes hydrosolubles, plus réactives vis-à-vis de l'oxygène singulet pourraient être utilisées dans ce même montage expérimental et apporter des éléments de réponse quant à l'effet de température sur la production d'oxygène singulet et à la réactivité de cette sonde vis-à-vis de 1O_2 dans l'eau protonée et deutérée.

5.4 Comparaison des résultats obtenus avec le DPIBF encapsulé dans les LNCs et le RTC

La valeur de σ_{D_2O} peut être extrapolée à f_{LNC} égale à zéro (voir Fig. 5.5) et comparée à la valeur obtenue avec le RTC. La table 5.1 résume les données obtenues sur σ et β avec le DPIBF encapsulé en LNCs et avec le RTC dans H_2O et D_2O .

solvants	H_2O	D_2O
$\sigma_{1270} (10^{-24} \text{ cm}^2)$	$7.6 \pm 4\% \text{ }^b$	$7.4 \pm 2\% \text{ }^a$
		$7.6 \pm 51\% \text{ }^b$
		$7.2 \pm 3\% \text{ }^c$
	7.0 [77]	9.2 [90]
$\sigma_{LNC} (10^{-24} \text{ cm}^2)$		$71 \pm 3\% \text{ }^a$
$k_{r,LNC} (10^8 \text{ mol.L}^{-1} \cdot \text{s}^{-1})$		$2.44 \pm 6\% \text{ }^a$
$k_{d,LNC} (10^5 \text{ s}^{-1})$		$2.56 \pm 8\% \text{ }^a$
$\beta_{RTC} (10^{-5} \text{ mol.L}^{-1})$		$9.5 \pm 49\% \text{ }^b$
		9 [106]

TAB. 5.1: Résumé des valeurs obtenues pour σ_{1270} dans H_2O , D_2O et en LNCs. Les constantes de réaction de 1O_2 pour le quenching chimique par le DPIBF ($k_{r,LNC}$) et le quenching par les molécules de solvant ($k_{d,LNC}$) dans les LNCs ainsi que l'indice de réactivité β_{RTC} en D_2O sont reportés. Les valeurs obtenues pour les dispersions de DPIBF encapsulé en LNCs en D_2O (a), les solutions de RTC (b) et en faisant varier la puissance laser à 1270 nm dans les solutions de RTC dans D_2O (c). Les valeurs publiées sont reportées de [77,90,106].

Les valeurs de σ_{1270} déterminées via le DPIBF encapsulé en LNCs extrapolé à f_{LNC} nulle, et avec le RTC dans D_2O sont identiques. Les valeurs de σ_{D_2O} et σ_{H_2O} sont également identiques.

5.5 Discussion et Conclusions

Dans les systèmes microhétérogènes formés par les dispersions de LNCs dans D_2O , l'écriture des mécanismes réactionnels relatifs à chaque phase nous a permis de déterminer l'expression analytique pour l'évolution de σ_{app} et β_{app} avec la fraction volumique de LNCs. La complexité de l'environnement sur le taux de production de 1O_2 et de sa réactivité avec le DPIBF est étudiée en faisant varier la fraction volumique de LNCs. σ_{app} et β_{app} varient de manière linéaire avec la fraction volumique de LNCs pour $f_{LNC} < 3.8\%$.

Nous avons développé un modèle cinétique à deux pseudophases, capable de décrire qualitativement et quantitativement l'évolution de σ_{app} et β_{app} avec la fraction volumique de LNCs. L'extrapolation de σ_{app} à fraction volumique de LNCs nulle nous a permis de déterminer la valeur de σ_{D_2O} , valeur qui est en bon accord avec la valeur attendue [90]. Le spectre d'absorption de l'oxygène moléculaire pour la transition $^3O_2[^3\Sigma_g^-] \rightarrow ^1O_2[^1\Delta_g]$ à 1270 nm a ainsi pu être mesuré dans D_2O . La position du maximum d'absorption ainsi que la largeur de la bande sont approximativement similaires aux données obtenues dans l'acétone et l'éthanol.

Le piège chimique hydrosoluble RTC est utilisé pour sa grande spécificité et réactivité envers 1O_2 [104, 106]. Dans H_2O et D_2O , σ_{1270} a été mesuré et est en bon accord avec les valeurs publiées [77, 90]. Malheureusement, la réactivité du RTC est trop faible pour permettre la détermination simultanée de σ_{1270} et β . La valeur de σ_{D_2O} extrapolée à fraction volumique de LNCs nulle est en très bon accord avec la valeur obtenue avec le RTC. Les valeurs déterminées pour σ_{1270} dans D_2O et H_2O sont identiques. Ces résultats ont fait l'objet d'un article récemment publié dans la revue J. Phys. Chem. C. [122].

Cette nouvelle méthode d'analyse fournit un outil simple et fiable pour l'étude de l'oxygène singulet en photochimie ou photo-physique. Par exemple, celle-ci pourrait être utilisée pour caractériser des sondes fluorescentes de l'oxygène singulet ou combiner avec la détection de la phosphorescence de l'oxygène singulet résolue en temps qui peut être délicate à interpréter [123].

L'oxygène singulet est une espèce réactive de l'oxygène (ERO) et peut oxyder différents types de molécules biologiques, telles que les protéines, l'ADN ou les lipides [124]. Par exemple, en PDT, 1O_2 est considéré comme l'espèce cytotoxique principale capable d'induire la mort cellulaire [52, 69, 79]. Dans ce contexte, cette étude pourrait être intéressante en cellules vivantes dans le but d'estimer la production d'oxygène singulet pour la dosimétrie et sa réactivité avec des cibles biologiques. De plus, les dispersions de LNCs en D_2O représentent un milieu hétérogène qui peuvent mimer la bicouche lipidique de la membrane plasmique. Le modèle à deux pseudophases pourrait ainsi être une première étape permettant de comprendre la dynamique de l'oxygène singulet en milieu biologique.

Discussion : loi d'Einstein en solution

5.6 Introduction à la loi d'Einstein

Conformément à la loi d'Einstein, le coefficient d'absorption molaire d'une molécule est proportionnel à la constante de désexcitation radiative k_{rad} de cette molécule correspondant à la même transition électronique [125]. Soit dans le cas de l'oxygène : $\epsilon_{1270} \sim k_{rad}/n^2$ avec n l'indice de réfraction du solvant. La section efficace d'absorption étant liée au coefficient d'absorption molaire *via* la relation : $\sigma_{1270} = (2300 \times \epsilon)/N_{av}$ avec N_{av} , le nombre d'Avogadro [76]. Il est donc intéressant dans les solvants étudiés de comparer σ_{1270} au ratio k_{rad}/n^2 . Dans le tableau 5.2, nous avons reporté pour différents solvants les valeurs obtenues sur σ_{1270} normalisées à la valeur de σ_{1270} dans l'acétone, ainsi que les valeurs de k_{rad}/n^2 également normalisées à la valeur dans l'acétone d'après [74].

solvant	k_{rad}/n^2 [74]	σ_{1270}^a	σ_{1270} [85]	σ_{1270} [75]	σ_{1270} [77]	σ_{1270} [86]
acétone	1	1	1	1	1	1
éthanol	1.010	1.539	1.575	1.333	1.500	0.955
toluène	2.187	3.026		2.246		
D ₂ O	0.391	0.643	2.571*	0.767		
H ₂ O	0.401	0.643			1.064	0.523**

TAB. 5.2: Tableau comparant les valeurs de la section efficace d'absorption de l'oxygène pour la transition $^3O_2[^3\Sigma_g^-] \rightarrow ^1O_2[^1\Delta_g]$ à 1270 nm. On a reporté, les valeurs obtenues dans notre étude en solvants organiques et dans l'eau (a), et les études de Krasnovsky *et al.* [75, 77, 85, 86] dans les solvants organiques étudiés. Pour les études en milieu aqueux, les valeurs de σ_{1270} dans H₂O sont reportées pour une concentration en SDS tendant vers zéro [77]. * La solution contient 0.2 % d'emulgator cremafore 6E pour la solubilisation du DPIBF [85]. ** La solution contient 2 M de SDS pour la solubilisation du DPIBF et 1-5 % d'acétone [86]. Les valeurs sont normalisées à la valeur de la section efficace d'absorption dans l'acétone. Les valeurs du ratio k_{rad}/n^2 sont reportées d'après [74] et sont aussi normalisées à la valeur obtenue dans l'acétone.

5.7 Discussion sur les résultats

Nous observons une tendance identique entre nos valeurs et celle des études [75, 77, 85] entre l'acétone et l'éthanol. Avec une valeur de σ_{1270} plus importante dans le cas de l'éthanol que l'acétone. On retrouve dans le cas des études [77, 85] une section efficace dans l'éthanol d'environ 1,5 fois plus grande que celle déterminée dans le cas de l'acétone. Pour le toluène, la valeur de [75] semble en très bon accord avec la valeur du ratio k_{rad}/n^2 . La section efficace déterminée dans notre étude pour le toluène est sensiblement supérieure.

Dans le cas de l'eau et D₂O, il est possible de comparer les valeurs obtenues d'après les études [75, 77] où la fraction micellaire de SDS est prise en compte pour extrapoler la valeur de la section efficace en solvant pur. On observe dans le cas de D₂O [75], une valeur relative pour σ_{D_2O} en bon accord avec celle que nous avons déterminée. L'accord relatif est nettement moins bon pour l'étude dans l'eau [77], malgré une valeur absolue pour σ_{H_2O} en très bon accord avec notre étude (voir

Tableau 5.1). Dans la dernière étude menée par Krasnovsky *et al.*, les valeurs de σ_{1270} semblent être en bon accord avec la constante de désexcitation radiative k_{rad} de l'oxygène, dans le cas de l'éthanol mais également dans le cas des dispersions de *SDS* dans l'eau.

On observe dans le cas des solvants organiques ne contenant pas de groupement hydroxyle (CCl_4 , C_6H_6 , C_6H_6 , acétone), un bon accord entre le coefficient d'absorption molaire de l'oxygène et la constante de désexcitation radiative k_{rad} de l'oxygène [75, 77, 85]. Un bon accord est également trouvé entre σ_{1270} et k_{rad}/n^2 pour le toluène dans l'étude de [75]. Dans notre étude, le toluène semble montrer une section efficace supérieure au ratio k_{rad}/n^2 (~ 1.4).

Dans le cas des solvants contenant des groupements *OH* (ou *OD*), les études menées par Krasnovsky *et al.* (exceptée [86]), montre que σ_{1270} est supérieure à la constante de désexcitation radiative de l'oxygène [75, 77, 85]. Dans notre étude également, nous observons dans le cas de l'éthanol, H_2O et D_2O , une valeur de σ_{1270} environ 1,5 à 1,6 fois supérieure à k_{rad}/n^2 .

Dans l'éthanol, H_2O et D_2O , là où les valeurs de σ_{1270} sont supérieures aux valeurs de k_{rad}/n^2 , on observe une absorbance du solvant importante à 1270 nm, qui est due aux modes vibrationnels des groupements *OH* (*OD*). En accord avec le mécanisme proposé par A. Singh *et al.* [126], il a été proposé qu'un transfert d'énergie des molécules de solvant excitées (*via* les modes vibrationnels des groupements *OH* ou *OD*) à l'oxygène, pourrait augmenter la probabilité de transition $^3O_2[{}^3\Sigma_g^-] \rightarrow ^1O_2[{}^1\Delta_g]$. Cependant, les données expérimentales obtenues dans [75] semblent contredire cette hypothèse. En effet, les valeurs de σ_{1270} ne sont pas corrélées à l'absorption du solvant à 1270 nm. De plus, le spectre d'absorption de l'oxygène pour la transition $^3O_2[{}^3\Sigma_g^-] \rightarrow ^1O_2[{}^1\Delta_g]$ montre que la dégradation du DPIBF n'est pas observée sous irradiation à 1200-1220 nm, dans la région des bandes d'absorption des groupements hydroxyles. En conclusion, l'étude menée par Krasnovsky *et al.* [75] n'a pas révélée l'implication des modes vibrationnels des molécules de solvant dans la dégradation du DPIBF dans les solvants contenant des groupements *OH* (*OD*).

De plus, nos résultats semblent également contredire l'hypothèse proposée par Singh *et al.*. En effet, on observe une absorption du solvant à 1270 nm plus importante dans le cas de H_2O ($\alpha \sim 1,09 \text{ cm}^{-1}$) que dans l'éthanol ($\alpha \sim 0,34 \text{ cm}^{-1}$) or, la section efficace d'absorption à 1270 nm est plus importante dans l'éthanol. De manière encore plus probante, dans D_2O et H_2O l'absorption du solvant à 1270 nm est significativement différente (0,17 et 1,09 cm^{-1} dans D_2O et H_2O , respectivement) et pourtant σ_{1270} est identique.

Ainsi, nos résultats et les résultats de [75] révèlent qu'un mécanisme de transfert d'énergie des molécules de solvant excitées à l'oxygène n'est pas impliqué dans l'augmentation de probabilité de transition $^3O_2[{}^3\Sigma_g^-] \rightarrow ^1O_2[{}^1\Delta_g]$. Les raisons permettant d'expliquer l'augmentation de probabilité de transition dans les solvants contenant des groupements hydroxyles comparé à la phase gaz ne sont pas encore comprises à l'heure actuelle.

De manière intrigante, la dernière étude réalisée par Krasnovsky *et al.* [86], révèlent des valeurs de σ_{1270} approximativement identiques au ratio k_{rad}/n^2 dans CCl_4 et l'acétone, mais également dans le cas de l'éthanol et des dispersions de *SDS* dans l'eau. Ces données suggèrent qu'un seul et même mécanisme serait donc responsable de la dépendance du solvant avec k_{rad} et σ_{1270} . Une des hypothèses démontrée de manière théorique par Minaev [127, 128], est qu'en complexe collisionnel avec les molécules de solvant, un couplage spin-orbite entre les transitions $b[{}^1\Sigma_g^+] \leftarrow a[{}^1\Delta_g]$ et $a[{}^1\Delta_g] \leftarrow X[{}^3\Sigma_g^-]$ permettrait d'augmenter la probabilité de transition de $a[{}^1\Delta_g] \leftarrow X[{}^3\Sigma_g^-]$ comparée à la phase gaz. Cette idée a ensuite été appuyée par différentes études expérimentales [59, 74, 128].

En conclusion, nos résultats expérimentaux obtenus dans l'éthanol, H_2O et D_2O concernant l'augmentation de σ_{1270} par rapport au ratio k_{rad}/n^2 sont en accord avec les études menées par Krasnovsky *et al.* [75, 77, 85] hormis l'étude [86]. Dans les études [75, 77, 85], l'oxygène moléculaire est excité par excitation optique directe à 1270 nm et une approche cinétique similaire à notre

approche est réalisée. Dans l'étude [86] une toute autre approche est réalisée. C'est la comparaison entre le taux de dégradation de DPIBF obtenu par excitation optique direct et par photosensibilisation par des porphyrines qui permet l'obtention de σ_{1270} . Cette étude révèle dans l'acétone, l'éthanol et H_2O des résultats significativement différents concernant le comportement de σ_{1270} avec k_{rad}/n^2 en comparaison des études précédentes [75, 77, 85]. Aujourd'hui, les explications permettant d'expliquer les divergences observées entre d'une part nos résultats et les résultats des études menées par Krasnovsky *et al.* [75, 77, 85] et d'autre part l'étude de 2012 [86] ne sont pas clairement établies. On peut toutefois noter que dans [86], des quantités exactement identiques en DPIBF dans les deux expériences sont nécessaires et primordiales pour la validité de l'analyse cinétique. De même, la connaissance du taux de photooxydation du DPIBF induite par photoagent et du rendement quantique de production d'oxygène singulet induite par le photosensibilisant sont nécessaires. De plus, cette étude révèle une analyse cinétique satisfaisante si les valeurs des constantes de vitesse de réaction entre le DPIBF et l'oxygène singulet (k_r) dans l'éthanol et les dispersions de *SDS* dans l'eau sont assumées égales à $1.4 \times 10^9 M^{-1}.s^{-1}$ et $2.8 - 2.9 \times 10^9 M^{-1}.s^{-1}$ respectivement. Or ces valeurs sont quelque peu supérieures aux valeurs précédemment proposées [77].

Comme nous l'avons évoqué dans la partie d'introduction sur le stress oxydant, les mécanismes de création d'oxygène singulet par photoagent sont plus complexes que pour la création en excitation optique directe. L'analyse cinétique de l'étude [86] se place ainsi dans le cas idéal où le photoagent transfère intégralement son énergie à l'oxygène moléculaire pour conduire à la création d'oxygène singulet. Or, il est nécessaire dans ce système complexe (plusieurs molécules et réactions entrent en jeu) d'évaluer notamment la part des interactions possibles entre le photoagent dans l'état fondamental et l'oxygène singulet. Pour l'étude dans les dispersions de *SDS* dans l'eau, la localisation préférentielle du photoagent, à priori au niveau des chaînes carbonées du *SDS*, induit une production de 1O_2 elle aussi localisée, la section efficace d'absorption alors obtenue ne peut alors refléter sa valeur dans l'eau pure. Il est nécessaire dans ce cas de prendre en compte la fraction volumique de *SDS* comme proposée dans [75, 77]. Notre étude en LNCs, révèle ainsi l'influence de la complexité de l'environnement (par l'intermédiaire de la fraction volumique des LNCs) sur la section efficace d'absorption apparente obtenue. L'approche en excitation optique directe présente l'avantage d'être un système 'pur' de création de 1O_2 et permet de s'affranchir des mécanismes complexes engendrés par la présence du photoagent.

5.8 Conclusion

En conclusion, la dernière étude menée par Krasnovsky *et al.* [86] présente une nouvelle méthode de détermination de la section efficace d'absorption de l'oxygène moléculaire pour la transition $^3O_2[{}^3\Sigma_g^-] \rightarrow ^1O_2[{}^1\Delta_g]$ mais des questions restent ouvertes sur les résultats obtenus et la continuité vis-à-vis des travaux précédents pour l'étude dans l'éthanol et H_2O [75, 77, 85]. Des divergences notables sur les valeurs absolues de σ_{1270} mais également sur la relation entre σ_{1270} et k_{rad}/n^2 nécessiteront des expériences complémentaires pour comprendre ces différences.

Aujourd'hui, des questions intéressantes restent ouvertes sur la validité de loi d'Einstein en solution. Une étude expérimentale plus approfondie permettrait par exemple de vérifier des hypothèses de couplage spin-orbite entre les transitions $b[{}^1\Sigma_g^+] \leftarrow a[{}^1\Delta_g]$ et $a[{}^1\Delta_g] \leftarrow X[{}^3\Sigma_g^-]$ [127, 128].

Chapitre 6

Etude de la réactivité de 1O_2 en cellules

L'étude réalisée en solvants organiques a permis de déterminer simultanément et indépendamment la section efficace d'absorption de l'oxygène moléculaire pour la transition $^3O_2[{}^3\Sigma_g^-] \longrightarrow ^1O_2[{}^1\Delta_g]$ à 1270 nm ainsi que la réactivité de 1O_2 avec un piège spécifique.

En milieu aqueux, nous avons déterminé la valeur de σ_{1270} , ce qui représente une première étape à l'étude de 1O_2 en cellules puisque les cellules sont composées à 80 % en volume d'eau. En milieux hétérogènes, nous avons développé un modèle cinétique à deux pseudophases permettant de relier l'évolution de σ_{1270} et β à la complexité de l'environnement. La cellule représente un milieu complexe, composée de différents organites (noyau, mitochondries...) entourés par le cytoplasme. Ainsi, le développement d'un modèle cinétique en milieux hétérogènes constitue une première étape vers l'étude cinétique de 1O_2 en environnement cellulaire. L'étude en solvants nous a permis de valider la méthode de détection et l'analyse cinétique.

La dernière étape de notre projet est l'étude de 1O_2 en cellule. Un montage expérimental de microscopie de fluorescence a été développé afin de permettre l'irradiation à 1270 nm de cellules vivantes ayant incorporées le DPIBF. Ce montage couplé à la vidéo-microscopie va nous permettre de détecter le signal de fluorescence du DPIBF et sa cinétique de réaction avec 1O_2 à l'intérieur des cellules.

6.1 Contexte et Méthodes

6.1.1 Introduction

Le DPIBF est intéressant au vue de sa grande réactivité avec 1O_2 . De plus, la molécule de DPIBF possède un spectre de fluorescence : il est possible d'exciter le DPIBF à une longueur d'onde spécifique et de détecter son signal de fluorescence [129]. Pour des expériences de microscopie en cellules vivantes, nous allons pouvoir détecter le signal de fluorescence du DPIBF à l'intérieur d'une cellule.

Dans un premier temps, nous détaillerons l'expérience d'irradiation laser à 1270 nm des cellules ayant incorporées le DPIBF que nous avons conçue. Ce montage expérimental, va nous permettre de détecter le signal de fluorescence du DPIBF et ainsi de pouvoir suivre la cinétique de disparition de fluorescence du DPIBF *in vivo* comme nous avons pu suivre la cinétique de disparition d'absorbance du DPIBF *in vitro*. Les résultats de l'irradiation laser à 1270 nm sur la fluorescence du DPIBF intracellulaire seront présentés et les résultats obtenus sur la réactivité de 1O_2 avec le DPIBF seront détaillés.

6.1.2 Dispositif expérimental

Le DPIBF est une molécule fluorescente. Celui-ci peut être excité à la longueur d'onde de 410 nm. Le signal de fluorescence du DPIBF excité possède deux maximums centrés à 455 et 477 nm [129].

Afin d'induire un stress oxydant par laser, le laser Raman à fibre accordable autour de 1270 nm est injecté dans le microscope à l'aide d'une lentille (L_1) de focale $f_1 = 200$ mm. Un miroir dichroïque (D_{vis-IR})¹ placé à 45° permet de réfléchir le faisceau laser IR et son injection au travers d'un objectif de grandissement 40 X (voir Fig. 6.1). La distance L_1 /objectif est ajustée de manière à collimater au mieux le faisceau laser derrière l'objectif. La largeur à mi-hauteur du faisceau laser derrière l'objectif 40 X est de ~ 34 μ m. Le miroir dichroïque permet de transmettre la lumière visible pour réaliser une image en transmission des cellules projetée dans le plan de la caméra à l'aide d'une lentille de fin de tube (L_t) de focale $f_t = 200$ mm.

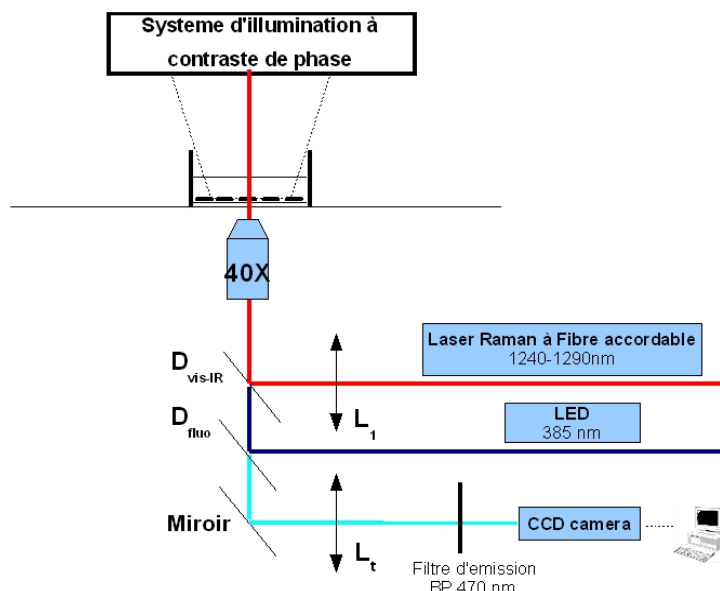


FIG. 6.1: Montage expérimental pour l'irradiation laser à 1270 nm des cellules ayant incorporé le DPIBF et la détection du signal de fluorescence du DPIBF.

Dans notre dispositif expérimental, une LED² émettant à 385 nm est utilisée pour l'excitation du DPIBF. Le faisceau lumineux provenant de la LED est réfléchi à l'aide d'un miroir dichroïque (D_{fluo}) placé à 45°, et passe au travers de l'objectif 40 X pour venir exciter le DPIBF. Un filtre (BP_{470nm}) placée devant la caméra permet de collecter de manière sélective l'émission de fluorescence du DPIBF.

6.1.3 Incorporation du DPIBF en cellule

Nous avons choisi les cellules MCF7 qui sont des cellules de cancer du sein pour rester dans la continuité du travail de l'équipe sur l'irradiation à 1270 nm de ces cellules.

Nous avons vu précédemment que l'analyse cinétique permettant l'obtention simultanée de σ et β nécessitait d'être dans les conditions $[T_0] \gg \beta$. Il était donc nécessaire de maximiser la concentration en DPIBF incorporée par les cellules.

Dans un premier temps, nous avons incubé les cellules avec des dispersions de DPIBF en LNCs. La figure 6.2 présente les images de fluorescence des cellules MCF7 ayant incorporé des dispersions de DPIBF en LNCs à ~ 100 μ mol.L⁻¹ dans D_2O ($f_{LNC} = 0.075$) pendant 2 h. On peut observer une accumulation du DPIBF dans le cytoplasme avec une accumulation péri-nucléaire. Le DPIBF est exclu du noyau. On observe également quelques vésicules très fluorescentes, visibles également

¹Miroir dichroïque : Composant optique permettant la séparation de deux ondes lumineuses de deux longueurs d'onde différentes. L'une est transmise et l'autre est réfléchie.

²LED pour light emitting diode

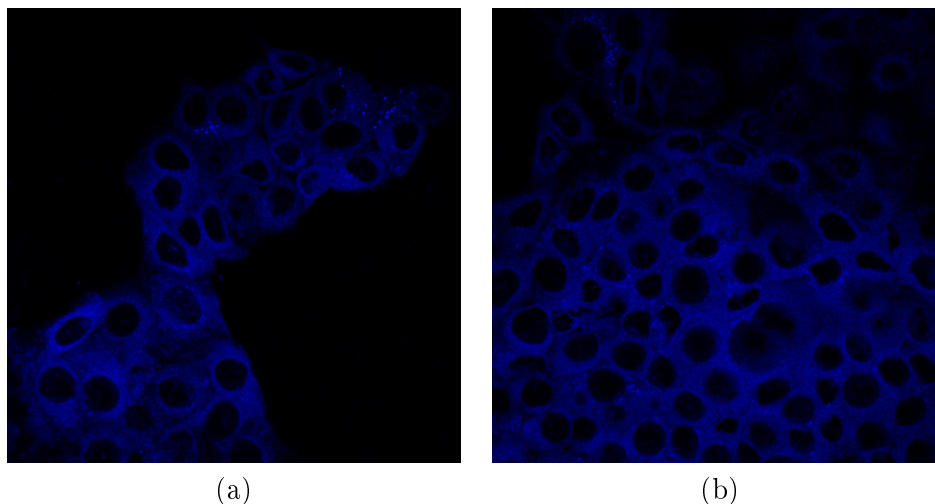


FIG. 6.2: Images de fluorescence par microscopie confocale des cellules MCF7 avec un objectif 40 X à immersion. Les cellules ont été exposées à des dispersions de DPIBF en LNCs à des concentrations de $\sim 100 \mu\text{mol.L}^{-1}$ ((a) et (b)) dans D_2O pendant 2 h ($f_{LNC} = 0.075$).

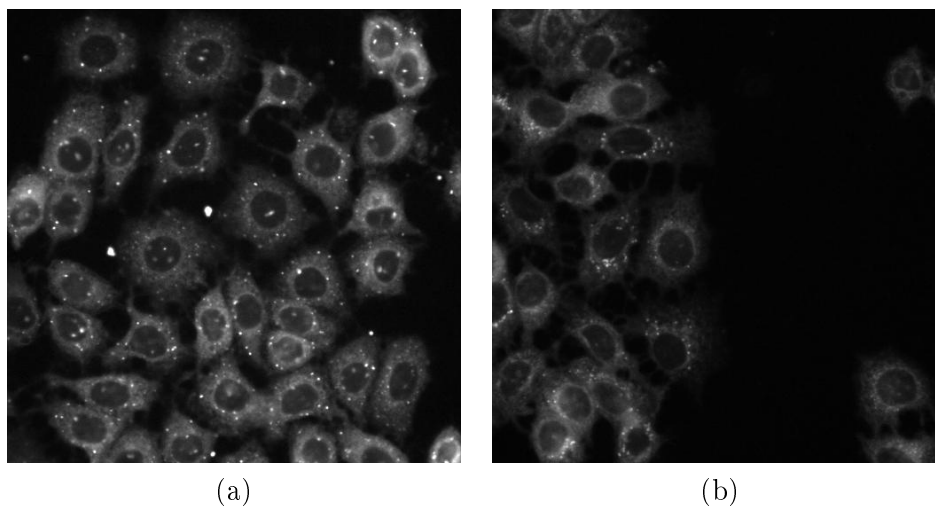


FIG. 6.3: Images de fluorescence des cellules MCF7 ayant incorporées le DPIBF. Les cellules ont été exposées à des solutions de DPIBF dans le milieu de culture complet (à 1% de DMSO) à des concentrations de 500 (a), et 50 (b) $\mu\text{mol.L}^{-1}$ pendant une durée d'1 h .

en microscopie de transmission qui indique une accumulation du DPIBF dans des vésicules cytoplasmiques. Cependant, nous avons observé rapidement que la concentration incorporée en cellules était plus importante lorsque le DPIBF était incubé de manière libre. C'est pour cette raison que nous avons incubé le DPIBF libre dans du milieu de culture complet (à 1 % de DMSO).

6.1.4 Quantification de la concentration en DPIBF intracellulaire

Premières observations : Dispersion de l'intensité de fluorescence du DPIBF entre cellules et à l'intérieur d'une cellule

Les images de fluorescence des cellules ayant incorporées le DPIBF, montre une hétérogénéité dans l'incorporation du DPIBF d'une cellule à l'autre (cf Fig. 6.3), pour une concentration de DPIBF donnée.

L'histogramme présenté dans la figure 6.4 permet de rendre compte de cette hétérogénéité. On observe une dispersion d'intensité de fluorescence du DPIBF intercellulaire d'un peu plus de $\pm 20\%$.

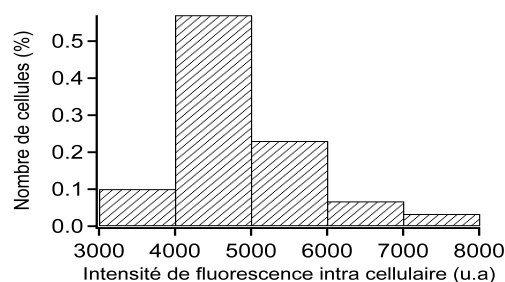


FIG. 6.4: Dispersion de l'intensité de fluorescence intracellulaire pour des cellules MCF7 ayant été exposées à une concentration en DPIBF de $50 \mu\text{mol.L}^{-1}$ pendant 1 h.

Nous avons observé à l'intérieur des cellules des disparités dans la localisation du DPIBF. On peut ainsi observer (Fig. 6.3), une localisation préférentielle du DPIBF dans le cytoplasme et une absence totale de celui-ci à l'intérieur du noyau. Le DPIBF semble également présenter une accumulation péri-nucléaire. On peut observer des structures très brillantes, visibles également en microscopie en transmission. Le DPIBF semble ainsi s'accumuler dans des vésicules cytoplasmiques. Ainsi, la dispersion d'intensité de fluorescence intracellulaire est de $\sim \pm 18\%$.

Au delà d'une concentration d'incubation de $50 \mu\text{mol.L}^{-1}$, le signal de fluorescence du DPIBF ne semble pas augmenter, ce qui indique une saturation de son incorporation au niveau des cellules. Nous avons ainsi déterminé pour un nombre de cellules donné, la concentration d'incubation minimale pour atteindre la saturation intracellulaire en DPIBF. Les cellules MCF7 seront incubées à cette concentration dans les expériences d'irradiation.

Quantifier la concentration en DPIBF et la corréler à l'intensité de fluorescence du DPIBF en cellules

Pour être quantitatif, il est nécessaire, comme dans les expériences de photochimie *in vitro*, de connaître la concentration en DPIBF incorporée en cellules vivantes. Ceci a nécessité la mise au point d'un protocole spécifique. Le protocole que nous avons mis au point pour déterminer la concentration de DPIBF incorporée en cellules vivantes est détaillé en annexe D.1. Celui-ci est basé sur le protocole de Weishaupt *et al.* [130]. La concentration intracellulaire en DPIBF est déterminée avec une incertitude de $\sim \pm 30 \%$.

Nous avons dans un premier temps vérifié la relation de linéarité entre la fluorescence du DPIBF incorporé en cellules et la concentration intracellulaire en DPIBF. Cette mesure est primordiale dans le but d'être quantitatif et d'être capable de relier le signal de fluorescence du DPIBF en cellules avec une concentration intracellulaire. Pour ce faire, des boîtes de culture contenant les cellules MCF7 adhérentes sont exposées à des solutions de DPIBF dans le milieu de culture à des concentrations différentes (entre 5 et $0.05 \mu\text{mol.L}^{-1}$). Le signal de fluorescence des cellules ayant incorporé le DPIBF est mesuré et la concentration en DPIBF incorporée est déterminée. On trace alors le signal de fluorescence des cellules ayant incorporé le DPIBF en fonction de la concentration intracellulaire en DPIBF. Les résultats sont présentés dans la figure 6.5. On observe une relation linéaire entre le signal de fluorescence cellulaire et la concentration intracellulaire en DPIBF. Cette courbe va nous permettre de corréler le signal de fluorescence cellulaire à une concentration intracellulaire en DPIBF.

Conclusion sur la détermination de la concentration intracellulaire en DPIBF

Notre protocole permet de déterminer la concentration intracellulaire moyenne d'une population cellulaire ($\sim 10^6$ cellules). Il ne permet pas de rendre compte de l'hétérogénéité intercellulaire dans l'incorporation du DPIBF ni de la localisation préférentielle du DPIBF dans certains compartiments cellulaires. De même, les différences de volume (qui apparaissent au cours du cycle cellulaire) entre

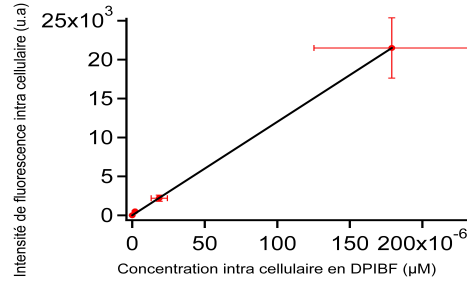


FIG. 6.5: Intensité de fluorescence des cellules ayant incorporées le DPIBF en fonction de la concentration intracellulaire en DPIBF.

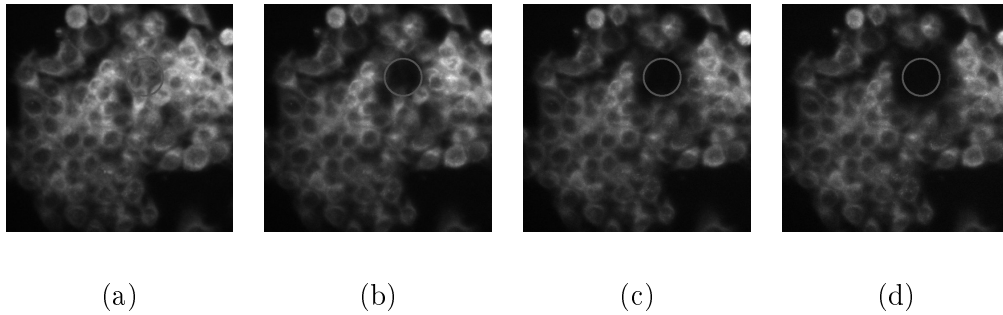


FIG. 6.6: Images obtenues en vidéo-microscopie lors de l'irradiation des cellules MCF7 à 1270 nm à une puissance laser de $P \sim 100\text{ mW} \pm 5\%$. Images à $t = 0$ (a), $t = 58\text{ s}$ (b), $t = 120\text{ s}$ (c) et $t = 184\text{ s}$ (d) d'irradiation laser. Le cercle gris correspond à la largeur à mi-hauteur du faisceau laser (FWHM $\sim 34\text{ }\mu\text{m}$).

cellules ne sont pas pris en compte puisque le volume des cellules MCF7 est supposé constant et égal à 2.4 pL [131]. A l'heure actuelle, notre protocole nous permet de déterminer une concentration intracellulaire moyenne en DPIBF avec une incertitude de $\pm 30\%$.

6.2 Résultats expérimentaux

6.2.1 Irradiation des cellules à 1270 nm

Après incubation du DPIBF pendant 1 h , le milieu d'incubation est éliminé et 2 ml de PBS sont ajoutés pour l'irradiation ³.

La puissance laser derrière l'objectif $40\times$ dans nos conditions expérimentales est de $100\text{ mW} \pm 5\%$. Les cellules sont irradiées pendant environ 100 s , temps nécessaire pour observer la disparition totale du DPIBF intracellulaire. Le signal d'excitation de la LED (temps d'exposition et nombre de points) est ajusté pour éviter au maximum la dégradation du DPIBF par l'excitation de la LED.

La figure 6.6, montre les images obtenues en vidéo-microscopie lors de l'irradiation des cellules MCF7 à 1270 nm . On observe à l'endroit où est centré le spot laser, une disparition rapide du signal de fluorescence du DPIBF. On observe que seules les 5 à 6 cellules centrées sur le spot laser sont touchées par l'irradiation (voir Fig. 6.6) et voit leur signal de fluorescence du DPIBF disparaître au cours de l'irradiation. Les cellules MCF7 ayant un diamètre moyen d'environ $10\text{ }\mu\text{m}$, la zone d'effet ($\sim 50\text{ }\mu\text{m}$) est un peu plus large que la largeur à mi-hauteur du faisceau laser (FWHM $\sim 34\text{ }\mu\text{m}$).

La cinétique de disparition du signal de fluorescence est corrélée à l'intensité d'irradiation à 1270 nm , i.e. la fluorescence de la cellule centrale décroît de manière plus rapide que celle de la cellule voisine (cf Fig. 6.6). Pour l'analyse, nous étudierons le signal de fluorescence de la cellule centrée sur

³Le PBS est utilisé pour l'irradiation des cellules et permet un meilleur rapport signal sur bruit qu'avec le milieu de culture

le spot laser. Sur les bords, le signal de fluorescence du DPIBF n'est pas modifié par l'irradiation à 1270 nm : on observe une légère diminution de l'intensité de fluorescence en bordure de champ causée par l'excitation de la LED.

Afin d'obtenir des données quantitatives sur le taux de production d' 1O_2 en cellules et de sa réactivité avec le DPIBF, nous avons analysé le signal de fluorescence cellulaire du DPIBF et son évolution dans le temps. Pour ce faire, on définit l'intensité de fluorescence du DPIBF (I_{fluo}), telle que :

$$I_{fluo} = \frac{I_{cellule,centre} - I_{fond}}{I_{cellule,bord} - I_{fond}} \quad (6.1)$$

avec, $I_{cellule,centre}$ et $I_{cellule,bord}$, l'intensité moyenne de fluorescence d'une cellule centrée sur le spot laser et d'une cellule en dehors du spot laser. I_{fond} est l'intensité de fluorescence du fond (en dehors des cellules). Le ratio des intensités de fluorescence d'une cellule centrée sur le post laser et d'une cellule en dehors du spot laser, permet de corriger la dégradation du DPIBF causée par photo-blanchiment de la LED.

Connaissant la relation entre le signal de fluorescence du DPIBF et la concentration intracellulaire en DPIBF, on peut alors tracer la courbe expérimentale de dégradation du DPIBF intracellulaire en fonction du temps d'irradiation à 1270 nm. Nous avons également réalisé dans les mêmes conditions expérimentales une irradiation à 1250 nm pour s'éloigner du maximum de la transition $^3O_2[^3\Sigma_g^-] \rightarrow ^1O_2[^1\Delta_g]$ (voir le spectre d'absorption de l'oxygène dans D_2O dans la section 5.3.4). Les résultats des irradiations à 1250 et 1270 nm sont présentés dans la courbe 6.7.

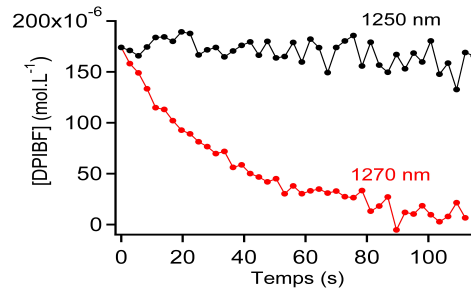


FIG. 6.7: Concentration intracellulaire en DPIBF lors d'une irradiation laser à 1270 nm (courbe rouge) et 1250 nm (courbe noire), pour une puissance laser $P = 100 \text{ mW} \pm 5\%$.

On observe à 1270 nm, une dégradation très rapide du DPIBF en $\sim 100 \text{ s}$. A 1250 nm, la concentration en DPIBF chute très légèrement, ceci s'explique par une section efficace d'absorption de l'oxygène moléculaire pour la transition $^3O_2[^3\Sigma_g^-] \rightarrow ^1O_2[^1\Delta_g]$ non nulle à 1250 nm ($\sigma_{1250} \sim 8,5\% \times \sigma_{1270}$).

6.2.2 Analyse des résultats

La concentration intracellulaire en DPIBF incorporé en cellule est, comme le montre la figure 6.5, de l'ordre de $200 \mu\text{mol.L}^{-1}$. Si on considère la valeur de la constante de réaction entre le DPIBF et 1O_2 , k_r identique à sa valeur en solvants organiques et dans l'eau, soit $9 \times 10^8 \text{ L.mol}^{-1}.\text{s}^{-1}$ et un temps de vie pour 1O_2 en cellules de compris entre 0.4 et $3.2 \mu\text{s}$ [132], alors on trouve une valeur théorique de β en cellule comprise entre 0.3 et $3 \times 10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$. Pour être dans les conditions $[T_0] \gg \beta$, permettant l'obtention de σ et β , il faudrait que la concentration intracellulaire en DPIBF soit supérieur à $10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$. Or la concentration incorporée en DPIBF est environ 10 fois plus faible.

Ce qui implique qu'en cellules, notre analyse cinétique ne nous permet pas l'obtention de σ et β au vue de la concentration incorporée en DPIBF. La cellule étant composée à 80% en volume d'eau,

nous avons choisi de postuler la section efficace d'absorption en cellule $\sigma_{cellule}$ égale à la section efficace d'absorption en milieu aqueux, telle que $\sigma_{cellule} = 7.4 \times 10^{-24} \text{ cm}^2$. En cellules, le taux de production de 1O_2 est défini par l'Eq. 6.2, tel que :

$$\Gamma_{cellule} = \sigma_{cellule} \frac{I}{h\nu} [^3O_2]_{cellule} \quad (6.2)$$

où, I est l'intensité lumineuse ($W.cm^2$) à 1270 nm , $[^3O_2]_{cellule}$ la concentration en dioxygène dissout à l'intérieur des cellules ($mol.L^{-1}$). 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 1270 nm .

En cellules, Lee Koo *et al.* [133] ont mesuré la concentration en dioxygène dissous dans les macrophages à 7.8 ppm , soit $[^3O_2]_{cellule} \sim 2.4 \times 10^{-4} \text{ mol.L}^{-1}$, une valeur identique à la concentration en oxygène dissous dans l'eau. Ce qui conforte l'observation de Finikova *et al.* d'une concentration en dioxygène dissous sensiblement identique à l'intérieur des cellules qu'en milieux aqueux [134].

Considérant la puissance laser d'irradiation $P \sim 100 \text{ mW}$ et la largeur à mi-hauteur du faisceau laser à 1270 nm de $\sim 34 \text{ }\mu\text{m}$ (rayon de ceinture $w_0 \sim 28.8 \text{ }\mu\text{m}$), l'intensité maximale au centre du faisceau laser est de $I_{max} \approx 7680 \text{ W.cm}^{-2}$. Pour la cellule centrée sur le spot laser, le taux de production d'oxygène singulet $\Gamma_{cellule}$ vaut $\sim 8,7 \times 10^{-5} \text{ mol.L}^{-1}$.

Postulant la valeur de $\Gamma_{cellule}$, la valeur obtenue pour β est de $2.8 \times 10^{-3} \text{ mol.L}^{-1} \pm 30\%$ où l'incertitude de mesure est la déviation standard obtenue sur six expériences. Si on postule $k_r = 9 \times 10^8 \text{ L.mol}^{-1}.s^{-1}$, alors la valeur calculée pour $\tau_{\Delta,cellule}$ est de $\sim 0.4 \text{ }\mu\text{s}$, ce qui est en accord avec la valeur basse du temps de vie de l'oxygène singulet en cellule [132].

6.3 Discussion et conclusions

Le temps de vie de 1O_2 en cellules a été mesuré par différentes équipes et est compris entre 0.4 et $3.2 \text{ }\mu\text{s}$ [132]. Ces temps de vie ont été mesurés avec des photo-agents différents. Or, les photo-agents se localisent de manière préférentielle dans certains compartiments cellulaires en fonction de leur spécificité. Or, comme nous l'avons observé avec les expériences de LNCs, le temps de vie de 1O_2 reflète la complexité de l'environnement. Ainsi, il n'est pas étonnant que le temps de vie mesuré pour 1O_2 dépende du photo-agent utilisé. La création de 1O_2 par excitation optique directe permet de s'affranchir de cette production localisée de 1O_2 par PS. Cependant, dans notre cas, c'est le DPIBF qui se localise préférentiellement dans certains compartiments cellulaires. En conclusion si le temps de vie (ou la réactivité via la mesure de β) de 1O_2 pouvait être obtenu en cellules, il ne pourrait être déterminé qu'aux endroits de localisation du DPIBF.

A l'heure actuelle, la résolution optique obtenue dans nos conditions expérimentales avec l'objectif $40 \times$ est de l'ordre de la longueur d'onde d'émission du DPIBF, soit $\sim 0.5 \text{ }\mu\text{m}$ (voir annexe H). A titre de comparaison les cellules MCF7 ont un diamètre d'environ $10 \text{ }\mu\text{m}$. Les compartiments cellulaires étant de complexité différente, on peut s'attendre à observer des cinétiques de disparition du DPIBF différentes à l'intérieur d'une cellule. De même, du fait de l'accumulation préférentielle du DPIBF dans certains compartiments cellulaires, il est possible que des cinétiques de disparition différentes soient observées dans ces compartiments. Cependant, le niveau du rapport signal sur bruit (ou SNR, pour signal to noise ratio) ne nous permet pas de distinguer des cinétiques de dégradation à l'échelle d'un compartiment cellulaire.

La concentration intracellulaire en DPIBF est déterminée à $\sim \pm 30 \%$. Le protocole de détermination de la concentration intracellulaire en DPIBF fait intervenir de nombreuses étapes (centrifugation, extraction, comptage des cellules, mesure de fluorescence...), l'incertitude de mesure est augmentée à chacune des étapes. Afin de diminuer l'incertitude sur la mesure de concentration, il est nécessaire de déterminer un protocole comportant un nombre d'étapes plus faibles. Il serait également intéressant dans notre étude d'être capable de quantifier dans chaque compartiment cellulaire, la concentration en DPIBF.

6.4 Perspectives

Vers l'étude de l'interaction entre 1O_2 et un partenaire biologique...

Cette étude en microscopie de fluorescence peut être exportée à l'étude de la dynamique d'interaction entre 1O_2 et une cible biologique privilégiée. Ainsi, l'anti-oxydant NAD(P)H ⁴ apparaît comme un bon candidat pour l'étude de la réaction de 1O_2 créée en cellule. Son implication dans les mécanismes anti-oxydant dans les mitochondries a été mis en évidence [58]. De plus, NAD(P)H possède un signal de fluorescence naturel ($\lambda_{exc} \sim 340 \text{ nm}$ et $\lambda_{em} \sim 460 \text{ nm}$) permettant sa visualisation par microscopie de fluorescence.

Augmenter la résolution transversale du microscope

L'utilisation d'un objectif à immersion permettrait d'augmenter la résolution transversale du microscope et d'augmenter le SNR par collection d'un plus grand nombre de photons (voir annexe H). Ainsi, à l'intérieur d'une cellule unique, la cinétique de dégradation du signal de fluorescence du DPIBF devrait nous permettre d'étudier la réactivité de 1O_2 avec le DPIBF et ainsi de sonder la complexité de l'environnement.

Focaliser le laser à l'échelle d'une cellule unique

En focalisant le laser à l'échelle de la cellule unique, des questions sur le rôle des communications intercellulaires, notamment l'importance des effets bystander peuvent être adressées.

Focaliser le laser à l'échelle d'un organe

Dans nos conditions expérimentales, la largeur à mi-hauteur du faisceau laser à 1270 nm est de $\sim 34 \mu\text{m}$. Au cours d'une irradiation, les 3 à 4 cellules centrées sur le spot laser sont ainsi touchées par l'irradiation. En ôtant la lentille L_1 du dispositif expérimental, le laser peut être focalisé derrière l'objectif 40 X au niveau du plan des cellules. La largeur à mi-hauteur théorique du faisceau laser serait alors de l'ordre de $\sim 3 \mu\text{m}$ (voir annexe H.3). La production de 1O_2 pourrait alors être localisée dans le noyau, les mitochondries, le cytoplasme... On pourrait alors distinguer des cinétiques de réaction entre 1O_2 et le DPIBF dans chaque compartiment.

Remplacer l'eau protonée du milieu cellulaire par de l'eau deutérée

Au vue de la concentration intracellulaire en DPIBF, seule la réactivité de 1O_2 avec le DPIBF a pu être déterminée en cellules. Une manière de diminuer la valeur de β est d'échanger l'eau intracellulaire par de l'eau deutérée [67]. Considérant le temps de vie de 1O_2 dans D_2O de $68 \mu\text{s}$ [67], la valeur théorique de β est de $\sim 16.10^{-6} \text{ mol.L}^{-1}$. Dans le cas d'une cellule incubée en D_2O , on devrait donc pouvoir déterminer simultanément σ_{1270} et β . La perspective de cette étude et donc d'incuber les cellules en D_2O afin de déterminer ces deux paramètres en cellules.

En conclusion, notre étude a permis d'étudier la dynamique d'interaction entre 1O_2 et un piège chimique spécifique en solvant et à l'échelle de la cellule. La perspective essentielle du projet est maintenant de sonder la dynamique d'interaction entre 1O_2 et une cible biologique d'intérêt dans différents compartiments cellulaires. Dans cette optique, le modèle cinétique à deux pseudophases devrait permettre de sonder des réactivités dépendantes du compartiment cellulaire. A terme, une perspective intéressante serait d'avoir une compréhension fine de la dynamique spatio-temporelle de 1O_2 en cellules vivantes.

⁴NAD(P)H est une molécule réductrice qui participe au métabolisme cellulaire. Le NAD(P)H est la principale source d'électrons utilisés dans les réactions biosynthétiques de la cellule. Il est également impliqué dans les mécanismes de protection contre le stress oxydant.

Troisième partie

Dynamique temporelle du stress thermique en cellules vivantes

Chapitre 7

Introduction au stress thermique

7.1 Historique

En 1962, un généticien italien Ferruccio Ritossa fit une découverte par inadvertance qui sera le point de départ de l'intérêt de la recherche sur le stress thermique lorsqu'il nota une "bouffée" sur les chromosomes polytènes ¹ des glandes salivaires de larves de *Drosophila melanogaster* exposées accidentellement à des hautes températures [135,136]. A cette époque, ce comportement était connu pour être lié à l'activation de gène et cette activation était détectée après seulement quelques minutes de stress thermique. Quelques années plus tard grâce au marquage radioactif des ARNm et des protéines plusieurs laboratoires ont établi une corrélation entre l'apparition de ces "bouffées" et la production de protéines de stress thermique (*HSPs*) qui ont un rôle de protéines chaperons [137]. Le stress thermique induit une augmentation de production d'*HSP* mais également une diminution importante des protéines exprimées de manière constitutive dans la cellule [138–140]. En conclusion la maintenance de l'homéostasie protéique requiert à la fois l'augmentation de la concentration en protéines chaperons mais également une réduction de la concentration totale des protéines cellulaires. Après la découverte en 1978 par Schlesinger que des protéines similaires aux *HSPs* étaient synthétisées dans des cultures de cellule aviaires [141], des réponses comparables ont été reportées dans tous les organismes étudiés.

La réponse au stress thermique est un mécanisme hautement conservé dans tous les organismes depuis les levures jusqu'à l'homme et est induite par diverses attaques protéotoxiques tel que la chaleur, le stress oxydant, les métaux lourds, les toxines et les infections bactériennes [12]. Cette conservation dans différents organismes eucaryotes suggère que la réponse au stress thermique est essentielle pour la survie de l'organisme dans des conditions de stress environnemental. La réponse au stress thermique est régulée à l'échelle transcriptionnelle par des séquences cis ² appelées heat shock elements (*HSE*) qui sont présentes en de nombreuses copies en amont des gènes *hsp* [142].

La première preuve d'un régulateur transcriptionnel spécifique, le facteur de transcription Heat-Shock Factor (*HSF*) qui peut se lier aux *HSE* et induire l'expression des gènes *hsp*, a été obtenu grâce à des études d'interactions ADN-protéines sur des noyaux isolés de cellules de *D. melanogaster* [143,144]. Contrairement à l'existence d'un seul facteur de transcription chez les invertébrés, de nombreux *HSF* sont exprimés chez les plantes et les vertébrés [16,145,146]. La famille des *HSF* chez les mammifères se compose de quatre membres : *HSF1*, *HSF2*, *HSF3* et *HSF4*. Chacun de ces *HSF* possède des fonctions uniques et d'autres qui se recouvrent (voir Fig. 7.1 d'après [6]), des niveaux d'expression qui diffèrent suivant le type de tissu considéré, possèdent de multiples modifications post-traductionnelles (PTMs) et possèdent des partenaires d'interactions différents

¹Chromosome polytène : Chromosome qui subit de nombreuses réplifications de l'ADN sans aucune division cellulaire et produit de nombreux brins de chromatides soeurs qui restent liées entre elles, par exemple dans les glandes salivaires des larves de *D. melanogaster*.

²Séquence cis : région de l'ADN (ou de l'ARN) qui régule l'expression d'un gène localisé sur cette même molécule d'ADN (souvent un chromosome).

[17,145,147]. Les recouvrements de fonctions des *HSFs* et les modifications post-traductionnelles facilitent la régulation fine dans l'expression des gènes régulés par *HSF*. Au delà des gènes *hsp*, de nombreux autres gènes ont été identifiés comme cible des *HSF*, ce qui implique que ces facteurs de transcription ne sont pas uniquement impliqués dans la réponse au stress thermique [6]. Ainsi les fonctions connues des *HSF* recouvrent la réponse au stress thermique, le développement, le métabolisme, la durée de vie et les pathologies, intégrant ainsi deux chemins qui étaient jusqu'alors divisés entre la réponse au stress d'un côté et la physiologie normale de l'autre.

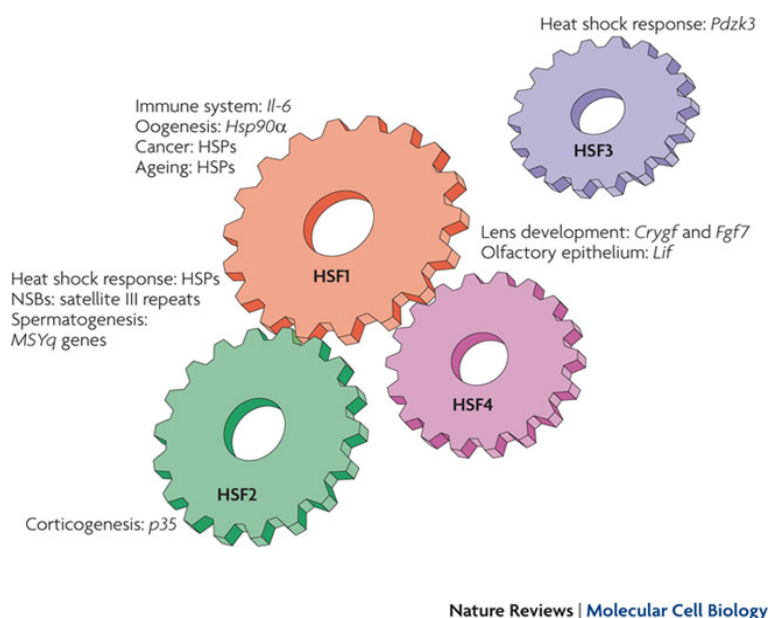


FIG. 7.1: La machinerie *HSF* chez les mammifères d'après [6]. Une vue d'ensemble des facteurs de transcription (*HSF*) chez les mammifères et leurs fonctions biologiques. Les *HSFs* contribuent à de multiples fonctions physiologiques normales et des pathologies par régulation direct de leurs gènes cibles. Les gènes cibles des *HSFs* ayant été identifiés *in vivo* sont détaillés. *HSF1* a été le premier à être reconnu dans son implication dans la réponse au stress thermique mais de récentes études ont montré la formation de complexe entre *HSF1* et *HSF2* permettant ainsi de réguler l'expression des *HSPs* induite par *HSF1* [148,149]. *HSF1* est aussi un régulateur dans la réponse immunitaire et du cancer. Des fonctions régulatrices dans de nombreux mécanismes de développement ont été attribuées à *HSF1* et *HSF2*, tels que l'oogenèse, la spermatogenèse la corticogenèse. *HSF4* est impliqué dans le développement de différents organes sensoriels en coopération avec *HSF1*, mais n'est pas impliqué dans la réponse au stress thermique. *HSF3* est le plus récent des *HSF* identifié chez les mammifères, il participe à la réponse au stress thermique en se liant à *Pdsk3* [147]. A l'heure actuelle, *HSF3* n'est connu pour interagir avec les autres *HSFs* et est donc placé séparément des autres.

7.2 Introduction au stress thermique

Un type de cellule donné possède une température de croissance optimale, c'est-à-dire une température pour laquelle la croissance et la prolifération cellulaire (division des cellules) est idéale. En culture cellulaire, la température optimale de croissance des cellules dépend fortement de la température du corps de l'hôte dont elle dérive et légèrement des variations anatomiques de température (la température de la peau peut être plus faible que celle des reins). Par exemple pour les cellules humaines ou de mammifère, cette température est de 37°C alors qu'elle est 27°C, 38.5°C ou entre 15-26°C pour les cellules d'insectes, les cellules aviaires ou les cellules d'animaux à sang froid respectivement. La réponse au stress thermique a été décrite à l'origine comme la réponse biochimique des cellules à une élévation de température moyenne (c'est-à-dire 3 à 5°C au dessus de la

température de croissance optimale) [137]. Dans la réponse au stress thermique, une augmentation de la concentration en protéines mal repliées ou dénaturées est observée [15], ces protéines possèdent alors une conformation ne leur permettant plus d'assurer leurs fonctions principales. Pour maintenir les fonctions vitales de la cellule ces protéines anormales doivent donc être éliminées ou réparées afin de permettre à la cellule de rétablir son homéostasie protéique et de permettre sa survie. Des protéines appelées chaperons ont pour rôle de maintenir cet état d'équilibre dynamique à l'intérieur de la cellule. Au cours du stress thermique, des protéines de stress thermique *HSPs* (pour Heat Shock Proteins) sont exprimées et vont chaperonner des protéines dénaturées afin de redonner à ces protéines une conformation normale et fonctionnelle [150,151]. Si l'intensité et la durée du stress ne dépasse pas un certain niveau, alors les protéines mal repliées sont réparées et le niveau des protéines dénaturées baissent dans la cellule au profit des protéines de conformation normale. La cellule rétablit ainsi la protéostasie. En réalité le mécanisme de réponse au stress thermique est bien plus complexe et fait intervenir un réseau de mécanismes moléculaires et de nombreux partenaires réactionnels que nous allons détailler ici.

7.3 Les chaperons moléculaires

7.3.1 Les protéines de stress thermique

La terminologie des chaperons moléculaires vient des protéines de stress thermique : les *HSPs* (pour heat shock proteins). Les *HSPs* sont des protéines hautement conservées, omniprésentes et abondantes dans presque tous les compartiments cellulaires. Elles sont divisées en différentes familles relativement à leur poids moléculaire (i.e. *HSP100*, *HSP90*, *HSP70*, *HSP60*, *HSP40*, et les petites *HSPs*) [152]. Ces protéines jouent un rôle critique pour assurer l'homéostasie des protéines. Dans les cellules de mammifères, de nombreuses *HSPs* fonctionnent comme des chaperons. Celles-ci sont essentielles à la formation correcte des protéines [153–155], à l'assemblage et au désassemblage des complexes [8], à la translocation intracellulaires des protéines vers des organites cibles, elles permettent également d'inhiber l'agrégation incorrecte des protéines qui pourrait se produire en cas de fort encombrement ou par dénaturation thermique [156,157], de dégrader ou réparer [158,159] les protéines mal repliées et d'activer le système immunologique en réponse à la présence de protéines virales [160,161].

Les *HSPs* sont exprimées dans des conditions de croissance normale et peuvent être induites par des molécules biologiquement actives telles que l'hémine [162] et les prostaglandines [163] alors que d'autres sont exprimées dans des conditions de stress [150,164]. Alors que l'exposition prolongée à un stress important peut être nocive et engendrer la mort des cellules et des tissus, l'induction de la synthèse des *HSPs* peut engendrer de l'adaptation au stress et une cytoprotection contre les dommages moléculaires induits par le stress [165]. Ainsi, l'exposition préalable des cellules à une température élevée a un effet protecteur lorsque ces cellules sont ensuite exposées à un stress prolongé habituellement létal [165]. Les *HSPs* ont pour fonction principale lors d'un stress, de maintenir les protéines mal repliées et de leur redonner leur conformation originale, fonctionnant ainsi comme des pièges cinétiques pour éviter la formation d'agrégats [150,151].

L'une des famille les plus étudiées des *HSPs* est la famille *HSP 70 kDa* (*HSP70*), dont la structure a été hautement conservée au cours de l'évolution de la bactérie à l'homme, suggérant un rôle important dans la survie des organismes [150,164]. La famille des *HSP70* chez les eucaryotes code pour des protéines spécifiques à un compartiment cellulaire, incluant *HSC70* exprimée de manière constitutive, *HSP70* et *HSP72* inductibles, *grp78/BiP* régulé par le glucose et *P75* mitochondrial sont localisées dans le cytosol, le noyau, le lumen et la mitochondrie où elles maintiennent les protéines dans un état replié intermédiaire compétent pour la translocation à travers les membranes et reforment ultérieurement les protéines dans leur état original [166,167]. Les protéines *HSP70* protègent la cellules de différents stress tels que le stress thermique létal, l'anoxie, les métaux lourds, l'arsénite et l'éthanol [12,165]. Un rôle cytoprotecteur pour *HSP70* a également été

reporté dans de nombreuses maladies chez l'homme telles que l'ischémie, les dégâts de la reperfusion, la fièvre et l'inflammation, les désordres métaboliques, les traumatismes cellulaires et tissulaires, le vieillissement, les infections et le cancer [12,150]. De plus, les membres de la famille des *HSP70* semblent jouer un rôle direct dans l'autorégulation de la réponse au stress thermique.

Il est maintenant établi que les *HSPs* sont utilisées par la cellule dans les processus de réparation subséquents à différents types de lésions, afin de prévenir les dommages résultant de l'accumulation et de l'agrégation de protéines dénaturées [12,150].

7.3.2 Réseau des chaperons moléculaires

Une caractéristique générale des chaperons et des co-chaperons régulateurs est leur capacité à supprimer les protéines mal repliées et l'agrégation des polypeptides non formés, et de maintenir les espèces dénaturées dans des états intermédiaires qui seront par la suite reconformés dans l'état natif (voir figure 7.2 extraite de [2]). L'activité de maintenance est une propriété commune à beaucoup de chaperons telles qu'*HSP104*, *HSP90*, *HSP70*, les petites *HSPs* (*sHSP* pour small *HSPs*), les immunophilines/cyclophilines (*FKBP52* and *Cyp40*), *p23* (steroid aporeceptor complex protein), et *Hip* (une protéine d'interaction d'*HSP70* et *HSP90*) [2]. La maintenance des états intermédiaires est une activité partagée par les chaperons, alors que la formation vers l'état natif est fortement régulée par *HSP70* et l'hydrolyse de l'ATP [2]. La machinerie *HSP60/CCT/Clp/HSP104* a également un rôle central dans la formation et l'agrégation [2]. Les co-chaperons vont présenter une grande spécificité d'interactions avec les chaperons et les protéines cibles, à l'inverse des chaperons qui possèdent une faible sélectivité pour leur substrat [2]. Ainsi, l'assemblage de ces complexes chaperons/co-chaperons contenant des substrats spécifiques, est un motif structural commun dans la transduction du signal pour assurer que les protéines dont l'activité doit être précisément régulée soient dans un état conformationnel prêt à être déclenché.

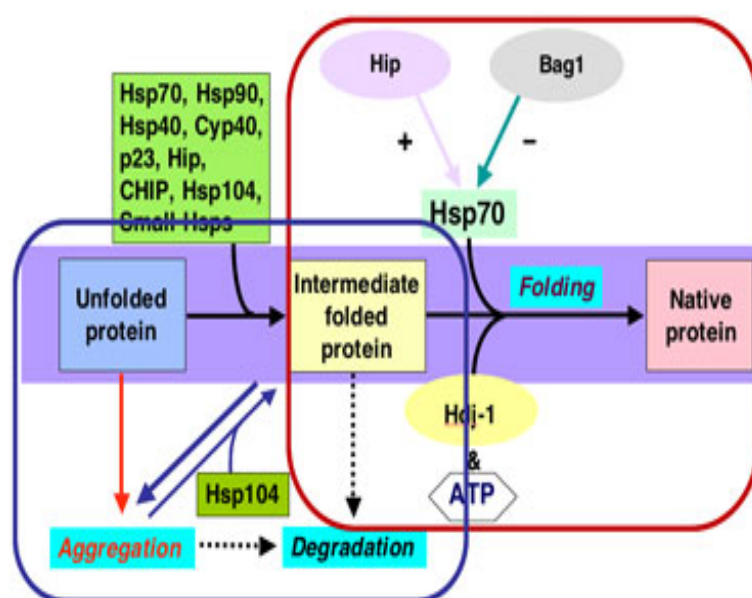


FIG. 7.2: Le réseau des chaperons et la régulation de la conformation des protéines d'après [2]. La protéine non formée transite de la forme intermédiaire vers la forme native assistée par les chaperons moléculaires. L'activité de maintenance des chaperons est représentée par la formation d'un intermédiaire transitoire stable qui continue vers la forme native sous interaction avec un ensemble de chaperons ATP dépendante tel qu'*HSP70* (avec l'ATP et les co-chaperons *Bag1*, *Hip* et *Hdj1*). Les protéines non formées et les états intermédiaires peuvent former des agrégats qui peuvent être sauvés par la classe des *HSP104*. Les états intermédiaires peuvent également former des agrégats, être dégradés ou reformés vers l'état natif grâce à des chaperons moléculaires.

7.4 Le contrôle qualité des protéines : Réparation ou dégradation ?

L'association des chaperons avec des co-chaperons différentes module la voie de signalisation des protéines cibles. Ainsi, l'association d'*HSP70* avec les co-chaperons *Hip* et *Hop* conduit la protéine cible au repliement adéquat alors que l'association avec les co-chaperons *Bag₁* et *CHIP*³ conduit à la dégradation de la protéine cible vers la protéasome [168] (voir figure 7.3).

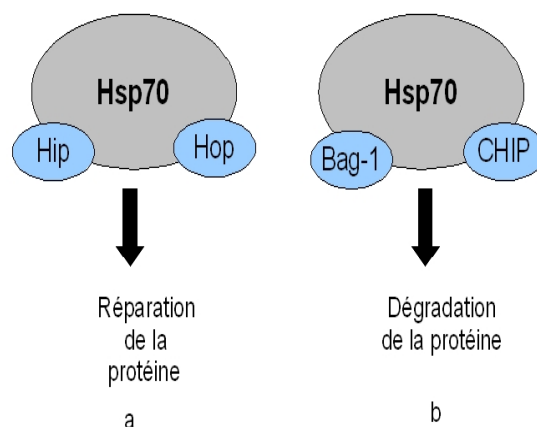


FIG. 7.3: Repliement adéquat ou dégradation de la protéine cible. (a) Le complexe formé par l'association d'*HSP70* avec les co-chaperons *Hip* et *Hop* conduit au repliement adéquat de la protéine cible. *Hip* promeut la liaison au substrat alors que *Hop* promeut le recrutement de la machinerie de repliement des *HSP90* [168]. (b) L'association de *Bag-1* et *CHIP* avec *HSP70* conduit la protéine cible à la dégradation. *Bag-1* est en compétition avec *Hip* pour la liaison au domaine *ATPase* et favorise le recrutement du protéasome, alors que *CHIP* est en compétition avec *Hop* et dirige l'ubiquitination de la protéine chaperonnée [168].

La voie ubiquitine-protéasome (UPP, Ubiquitin Proteasome Pathway) joue un rôle dans la dégradation sélective des protéines endommagées ou anormales, alors que les chaperons moléculaires tels que les Hsps sont impliquées dans le repliement adéquat des protéines dénaturées [168,169]. Cependant, ces mécanismes de réparation et de dégradation sont inter-connectés et les chaperons moléculaires en association avec leurs co-chaperons peuvent également conduire à la voie de dégradation des protéines chaperonnées si les dégâts sont trop importants. Une interaction coordonnée entre l'UPP et les chaperons doit exister afin d'assurer le contrôle qualité des protéines [168,169].

Ainsi, l'UPP et les chaperons reconnaissent les protéines de structure anormale et ces deux systèmes sont en compétition pour leurs substrats [169]. Le système de contrôle qualité des protéines possède un mécanisme de triage [169]. Le premier niveau de tri doit être l'identification des protéines endommagées qui requièrent une réparation ou une dégradation. Un second niveau de décision doit être fait : La protéine est-elle réparable ? En principe, les chaperons devraient avoir l'opportunité première de se fixer aux protéines endommagées. Les protéines endommagées au-delà d'une réparation possible doivent alors être dégradées par l'UPP [169].

La possibilité pour l'UPP et les chaperons d'interagir avec leurs substrats permet à ses deux mécanismes de réparation ou dégradation d'opérer en parallèle ou en compétition. Le sort de la protéine endommagée dépend probablement de la cinétique d'interaction entre la protéine endommagée et les chaperons moléculaires ou les chaperons de l'UPP [169]. Si la protéine endommagée est efficacement réparée, elle est éliminée du système de triage. Si au contraire, elle n'est pas réparée par les chaperons, alors le co-chaperon *CHIP* amorce l'ubiquitination de la protéine cible. Le substrat

³*CHIP* : pour C-terminus of *HSP70/HSC70* interacting protein, est une ligase ubiquitine qui lorsqu'elle interagit avec *HSP70/HSC70* capture de manière efficace les protéines mal repliées et les ubiquitinent assurant ainsi la dégradation de la protéine capturée.

ubiquitiné est reconnu et dégradé par le protéasome 26S [169]. Si la protéine ubiquitinée est déubiquitinée par des isopeptidases alors elle aura une seconde chance d'être réparée par les chaperons (voir Figure 7.4). Ainsi, les activités d'ubiquitination et de déubiquitination pourraient contrôler le sort des protéines endommagées. *CHIP* joue un rôle pivot dans le procédé de triage des protéines endommagées [169].

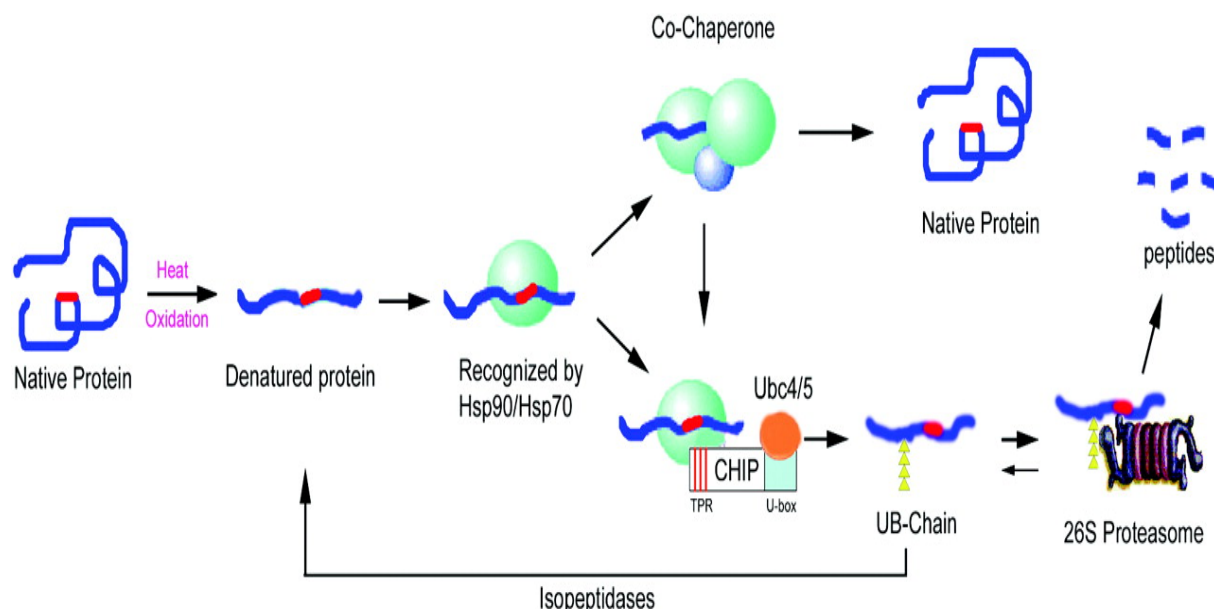


FIG. 7.4: Modèle de triage du système de contrôle qualité des protéines : interaction entre les chaperons moléculaires et l'UPP proposé par [169]. Sous conditions de stress environnementaux, tel que les stress thermique ou oxydant, les protéines peuvent être endommagées. La protéine dénaturée est reconnue par *HSP70* ou *HSP90*. Avec l'aide d'autres chaperons et co-chaperons, *HSP70* est capable de replier de manière adéquate la protéine cible de manière ATP dépendante. Si la protéine ne peut être réparée rapidement, *CHIP* qui interagit avec *HSP70* et *HSP90* par son domaine TPR, amorce l'ubiquitination de la protéine dénaturée. La protéine ubiquitinée est reconnue et dégradée par le protéasome 26S. Si la protéine est désubiquitinée par des isopeptidases, alors elle aura une seconde chance d'être réparée par les chaperons moléculaires. Cette relation fonctionnelle parallèle/compétitive entre l'UPP et les chaperons moléculaires assure l'efficacité du système de contrôle qualité des protéines afin d'éliminer les protéines anormales.

La capacité des *HSPs* de promouvoir soit la renaturation ou la destruction des protéines endommagées sous condition de stress leur confèrent un rôle central dans le contrôle qualité des protéines et dans la régulation du tri des protéines. Ce qui dirige la décision réparation ou dégradation est à l'heure actuelle mal connu mais dépend probablement du type et de l'intensité du stress [168]. En conditions de stress, les *HSPs* telles que *HSP70* ou *HSP27* deviennent transitoirement essentielles pour assurer une dégradation simple et rapide de protéines cibles facilitant ainsi la survie de la cellule [168].

Dans les cellules saines, la balance délicate entre l'UPP et les chaperons contrôle le niveau de protéines endommagées à un niveau tolérable [169]. En conditions de stress ou à cause du vieillissement, les fonctions de l'UPP ou des chaperons peuvent être compromises. Des dysfonctionnements du mécanisme de contrôle qualité des protéines pourraient être reliés à l'accumulation de protéines dénaturées et agrégées qui est associée à de nombreuses maladies liées à l'âge [169].

7.5 Mécanismes de réponse au stress thermique

Quel est le mécanisme qui permet l'activation d'*HSF1* en cas de stress ? Comment *HSF1* perçoit-il une augmentation de température en cas de stress thermique ? Les mécanismes d'activation d'*HSF1* sont-ils différents ou font-ils intervenir différents senseurs moléculaires en cas de stress de nature différente ?

Quatre grands mécanismes d'activation d'*HSF1* dans la réponse au stress ont été proposés voir figure 7.5 d'après [5]. Nous détaillerons de manière succincte les trois mécanismes de la réponse au stress thermique : (b) modèle d'un senseur thermique ARN, (c) le modèle intrinsèque et (d) le contrôle neuronal, pour nous concentrer sur le mécanisme d'activation d'*HSF1* par déplacement des chaperons (a) auquel nous nous sommes intéressés.

7.5.1 Modèle d'un ARN senseur thermique

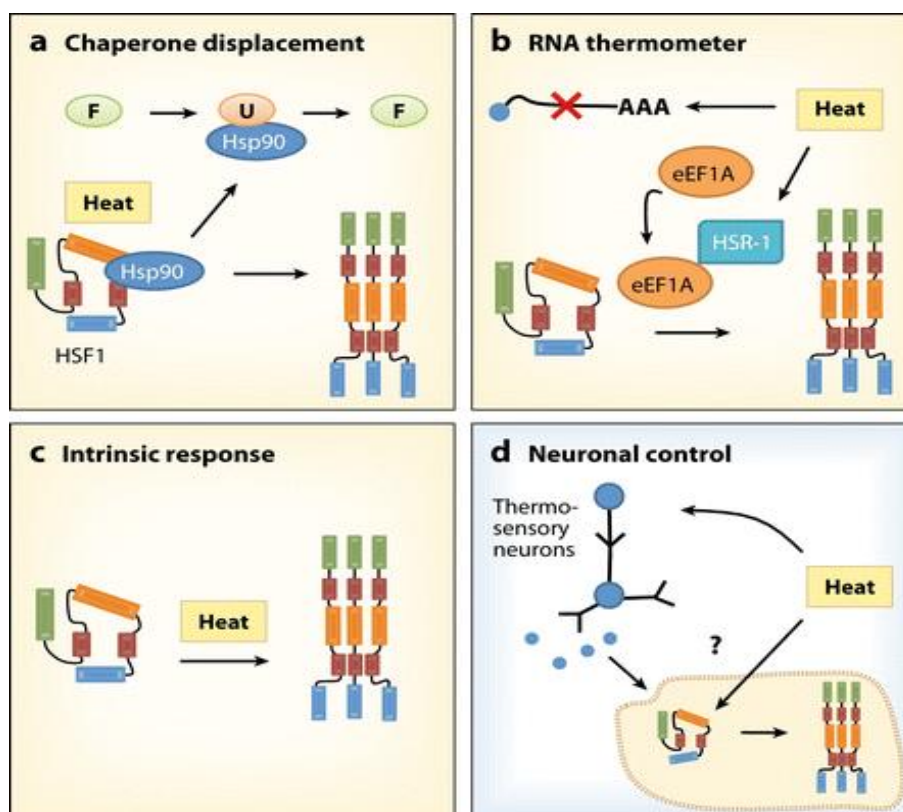
Le mécanisme de répression exercée par les molécules *HSPs* ressemble au modèle du 'dosage des protéines mal repliées' observé dans la réponse au stress thermique chez les procaryotes dans laquelle l'activité de la sous-unité σ^{32} ⁵ de l'ARN polymérase de la bactérie (RNAP) est inhibée par l'accumulation des chaperons [170]. Les caractéristiques identiques observés pour la réponse au stress thermique chez les eucaryotes et les procaryotes suggère que c'est l'équilibre entre le niveau d'*HSP* et la concentration en protéines dénaturées présents dans la cellule qui est le senseur du stress. Cependant chez la drosophile il a été observé une liaison très rapide d'*HSF1* à l'ADN (quelques secondes) et une saturation des promoteurs des gènes cibles en quelques minutes [171]. Un mécanisme d'équilibre *HSP* dommages protéiques ne permet pas d'expliquer une activation aussi rapide d'*HSF1*. Un complexe composé du facteur d'élongation de traduction *eEF1A* et de l'ARN non codant HSR-1 (Heat Shock RNA-1) facilite l'activation d'*HSF1* en cas de stress thermique [172]. Peu de choses sont connues à l'heure actuelle sur HSR-1, mais celui-ci pourrait être un senseur thermique par un changement de conformation sous l'effet d'une augmentation de température [173]. Ainsi la réponse au stress thermique chez les eucaryotes se rapprocherait de celle observée chez les procaryotes où σ^{32} est activé par un changement de conformation en réponse à une élévation de température [174]. Cependant l'activation d'*HSF1* n'est pas sensible à une température absolue mais à une élévation de température comme l'a observé l'équipe d'Abravaya *et al.* en modifiant la température de culture des cellules HeLa [175]. En conséquence l'activation d'*HSF1* par un senseur thermique qui serait sensible à une température absolue de stress semble être sujette à questionnement chez les eucaryotes.

7.5.2 Réponse intrinsèque

HSF1 lui-même semble posséder une sensibilité au stress. Ainsi, des expériences menées sur la protéine *HSF1* ont montré sa propension naturelle à se mettre sous sa forme de trimère capable de se lier à l'ADN en présence de stress thermique, calcique, oxydant ou à pH bas [46, 176–179]. La formation de ponts disulfures entre deux résidus cystéine du DBD d'*HSF1* et une mutation sur l'une de ces cystéines empêchent la liaison d'*HSF1* à l'ADN et compromettant ainsi la réponse au stress thermique [46]. D'autres études ont également montré que dans le trimère d'*HSF1*, des acides aminés aromatiques du DBD aident à la formation de ponts disulfures entre les cystéines entre les monomères d'*HSF1* stabilisant ainsi le trimère d'*HSF1* [180]. Les capacités intrinsèques d'*HSF1* à sa trimérisation spontanée en cas de stress pourraient expliquer l'activation si rapide d'*HSF1*.

⁴Neuroendocrine : Cellules qui sécrètent des hormones (neurohormones) dans la circulation sanguine en réponse à un stimuli du système nerveux.

⁵ σ^{32} : sous-unité de l'ARN polymérase de la bactérie, impliqué dans la régulation de la transcription des gènes de stress thermique.



A Anckar J, Sistonen L. 2011.
R Annu. Rev. Biochem. 80:1089–115

FIG. 7.5: Mécanismes proposés pour l'activation d'*HSF1* d'après [5]. (a) Mécanisme classique de déplacement des chaperons. En absence de stress *HSF1* forme un complexe avec les protéines chaperons (*HSP70* et *HSP90*). Lors de l'exposition à un stress, le nombre de protéines dénaturées augmente nécessitant le recrutement de protéines chaperons pour aider à leur renaturation. *HSF1* se retrouve alors libre pour la trimérisation. U et F représentent les protéines dénaturées et fonctionnelle respectivement. (b) Modèle d'un *ARN* senseur thermique, l'activation d'*HSF1* est médiée par un complexe entre une molécule d'*ARN* senseur thermique (*HSR₁*) et le facteur d'élongation *eEf1A*, reliant ainsi l'activation d'*HSF1* avec l'arrêt de la traduction des protéines en cas de stress thermique. (c) Le modèle intrinsèque suggère qu'*HSF1* lui-même a la capacité de détecter un stress protéotoxique, ceci a été mis en évidence par des études *in vitro* qui ont montré la trimérisation spontanée de la protéine purifiée *HSF1* en cas de stress. (d) Contrôle neuronal de la réponse au stress thermique. Dans *Caenorhabditis elegans* des mutations dans les fonctions des neurones AFD sensibles à la température ou dans les neurones AIY postsynaptique, vont inhiber la réponse entière de l'organisme face au stress thermique. Le mécanisme de réponse au stress thermique contrôlé par les neurones restent à être élucider, dans les cellules non neuronales l'activité d'*HSF1* pourrait être modulée par des signaux neuroendocrines⁴ (cercles bleus) de nature stimulante ou inhibante.

7.5.3 Contrôle neuronal

Les études s'intéressant aux mécanismes de régulation du facteur de transcription en cas de stress ont été conduites principalement *in vitro* ou en cellules. A l'échelle de l'organisme, les mécanismes de réponse au stress décrits en cellule sont-ils encore valables? L'étude menée sur *C. elegans* a montré que la réponse au stress thermique dans cet organisme était sous strict contrôle neuronal [181]. Dans le nématode, des neurones thermosenseurs et des neurones post-synaptiques guident le comportement thermotactique afin de rechercher une température optimale de croissance et de reproduction [181,182]. Ainsi les vers dépourvus de signalisation neuronale thermosensible voit leur

réponse au stress thermique affectée et ainsi leur viabilité diminuée en cas de stress thermique [181]. Les neurones thermosensibles ne semblent pas répondre à des stress engendrés par des concentrations importantes en cadmium, suggérant qu'à l'échelle de l'organisme les mécanismes de réponse au stress dépendent de la nature de celui-ci. Il reste encore à établir si ce contrôle neuronale du stress thermique s'étend chez les mammifères et si ces signaux neuronaux sont capables d'activer *HSF1* dans des conditions de stress autre que le stress thermique.

7.5.4 Déplacement des chaperons

Des stress de nature différente engendrant l'activation d'*HSF1*, ont en commun une augmentation du niveau de protéines dénaturées [15]. Il a été montré que l'injection de protéines dénaturées dans les ovocytes de *Xenopus* suffit à elle seule à déclencher l'expression des gènes *hsp* [7]. Dans la cellule, les chaperons sont responsables du maintien de la protéostasie dans la cellule c'est-à-dire maintenir les protéines dans leur conformation native et de prévenir leur malformation. Lors de l'exposition des cellules eucaryotes à un stress thermique plusieurs étapes vont permettre l'activation d'*HSF1* et la transcription active des gènes *hsp* qui en résulte. En absence de stress *HSF1* est présent sous forme de monomère et réprimé sous forme de complexe avec *HSP70* et d'autres chaperons, il est alors dépourvu d'activité transcriptionnelle [183,184]. La liaison d'*HSF1* à l'ADN ainsi que le domaine de *trans*-activation sont réprimés par des interactions intramoléculaires et la phosphorylation constitutionnelle des sérines [183,185]. Des étapes successives vont permettre l'activation d'*HSF1* et la réponse au stress thermique. En présence d'un stress, l'augmentation de la concentration en protéines dénaturées va être le signal de départ au relargage d'*HSF1* libre dans la cellule, permettant ainsi aux molécules chaperons incluant *HSP70*, *HSP90* et la co-chaperonne *Hdj1* (aussi appelée *HSP40*) de prévenir l'apparition et l'agrégation de protéines dénaturées [152]. Une fois libre *HSF1* va alors pouvoir se trimériser, s'exporter au noyau, être phosphorylé au niveau des résidus sérine et se lier aux *HSE* localisés en amont des gènes *hsp* résultant ainsi en la transcription active des gènes *hsp* [183,185]. La concentration en *HSP* ayant augmentée proportionnellement à la concentration en protéines dénaturées, les chaperons vont s'exporter au noyau et se lier au domaine de *trans*-activation d'*HSF1* réprimant ainsi la transcription des gènes *hsp* [150,184] (Voir Figure 7.6).

7.6 Granules de stress nucléaires en cellules humaines

En cellules humaines, des études ont révélé l'existence d'une réponse rapide et organisée impliquant le recrutement d'*HSF1*, de l'ARN polymérase II et d'autres molécules [187–189] vers des cibles chromosomiques particulières, distinctes des promoteurs des gènes *hsps* lors de l'induction d'un stress [190]. Les structures ainsi formées sont appelées dans la littérature : Nuclear Stress bodies (nSBs) pour corps ou granules de stress nucléaires.

Chez les eucaryotes supérieurs, les trimères d'*HSF1* apparaissent après quelques minutes de stress et se lient aux promoteurs des gènes de stress thermique *hsps* induisant ainsi la transcription de ces gènes.

7.6.1 Composition et fonction

L'activation d'*HSF1* induite par le stress thermique, le sulfate de cadmium, ou par l'acide aminé analogue L-azetidine-2-carboxylique acide, résulte en l'accumulation d'*HSF1* dans un faible nombre de structures nucléaires (4 à 6) avec un diamètre maximum de 2-2,5 μm [191]. De manière surprenante, ces granules d'*HSF1* n'étaient détectés qu'en cellules humaines et de singe et pas chez les rongeurs [192]. Dans la réponse au stress thermique en cellules humaines, la relocalisation d'*HSF1* ne se fait pas seulement vers les promoteurs des gènes *hsp* mais aussi vers des structures appelées corps de stress nucléaire (ou nuclear Stress Bodies : nSBs) qui correspondent à l'accumulation massive de ce facteur de transcription vers la région péricentromérique du chromosome

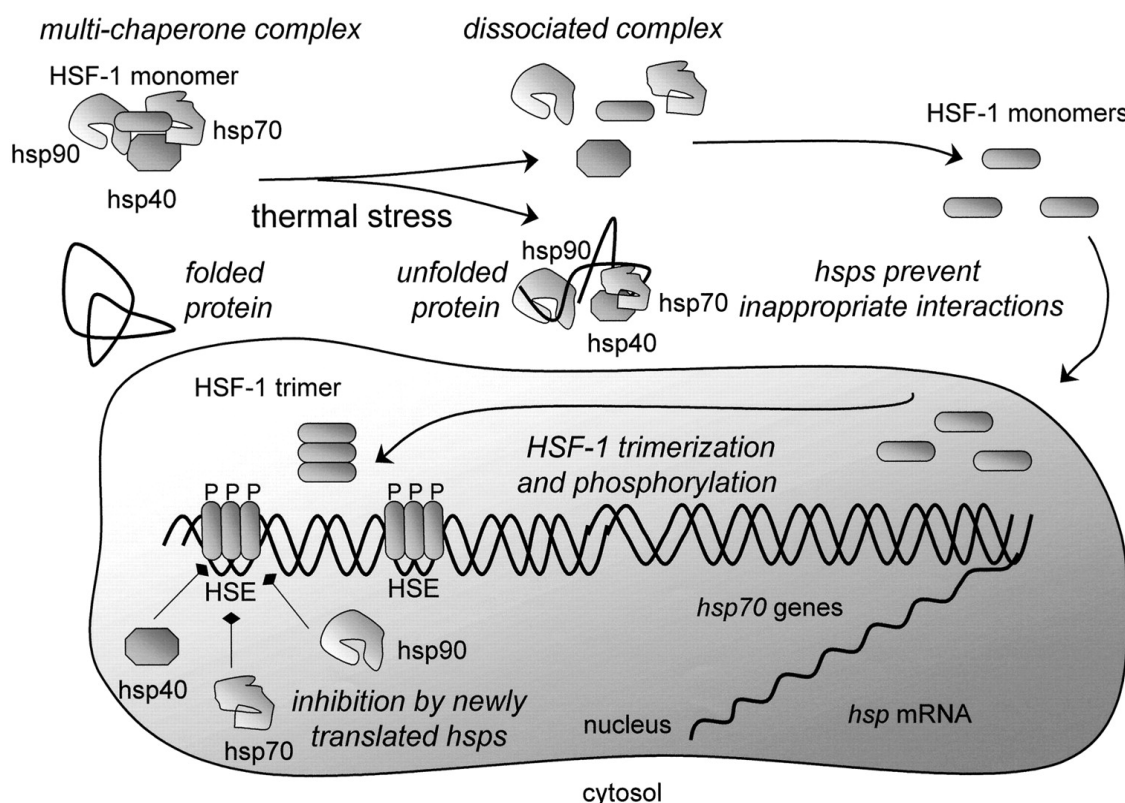


FIG. 7.6: Illustration du mécanisme de régulation de la réponse au stress thermique d'après [186]. En conditions normales, les monomères d'*HSF1* sont associés avec les protéines chaperons (*HSP*). En conditions de stress, la formation de protéines dénaturées induit la dissociation du complexe *HSF1* : *HSP*. Les monomères libres d'*HSF1* forment alors des trimères qui se lient aux Heat Shock Element (*HSE*) et sont alors actifs pour la transcription après phosphorylation. Le niveau d'*HSP* augmente, et la ré-association avec *HSF1* conduit à la répression de l'expression des gènes *hsp*.

9 (9q12) [193–195]. *HSF1* est envoyé vers ce locus via une interaction directe protéine-ADN avec les séquences répétées du satellite (sat) III. Les granules de stress nucléaires correspondent à des usines de transcription où les séquences de sat III sont transcrites relativement à l'activité de l'ARN polymérase II (pol II) et d'*HSF1* dans des transcrits de taille hétérogène [189,196]. Ces granules de stress d'*HSF1* sont des sites d'accumulation d'*HSF1*, de coeurs d'histones acétylées, de facteurs d'épissage, de recrutement de l'ARN polymérase II (pol II) et de la transcription des séquences répétées des satellite III [187–189]. Les fonctions de ces corps de stress nucléaires et des transcrits de sat III sont inconnus à l'heure actuelle. Les transcrits de sat III restent associés au locus 9q12 plusieurs heures après leur synthèse avec certains facteurs d'épissage [197,198]. Deux hypothèses majeures ont été proposées : un rôle dans la régulation des activités d'épissage pendant et après le stress thermique et un rôle dans la structure et la fonction de la chromatine [20,192,199].

7.6.2 Cibles chromosomiques

Le nombre de granules a dans un premier temps été corrélé à la ploïdie de la cellule [190]. Quelques années plus tard, l'équipe de Jolly *et al.* a montré qu'alors que deux foci d'*HSF1* sont détectés sur des cellules primaires [193,194], le nombre de ces foci détectés dans des cellules transformées varient de cellule à cellule sans corrélation claire avec la ploïdie de la cellule, suggérant l'existence de nombreuses cibles chromosomiques d'*HSF1* et non une seule [200]. L'équipe de Jolly *et al.* a montré que la région péricentromérique de 14 chromosomes humains est capable de lier de manière efficace *HSF1 in vitro* et *in vivo* [200]. Ces locis sont caractérisés par le fait qu'ils

contiennent des séquences répétées des Satellite II et III. Les régions péri-centromériques des chromosomes 9, 12 et 15 sont les cibles privilégiées de ces granules de stress nucléaires, auxquels viennent s'ajouter les régions péri-centromériques d'autres chromosomes résultant en la formation de granules de stress nucléaires secondaires observés sur des lignées de cellules cancéreuses (qui contiennent plus d'*HSF1* que les cellules primaires) ou des cellules surexprimant *HSF1* [200]. L'apparition de ces granules secondaires semble donc dépendre de la concentration en *HSF1*. Ainsi le stress thermique induit une transcription large du génome via la transcription des séquences des satellite III liée à la concentration d'*HSF1*.

7.6.3 Dynamique temporelle et spatiale

La cinétique de formation et de disparition de ces structures dépend de la nature et de la sévérité (durée, et concentration ou intensité) de l'inducteur du stress. Des études d'immunofluorescence⁶ sur cellules fixées ont montré que les corps de stress nucléaires sont détectés en 5 minutes de stress thermique et disparaissent pendant la phase d'atténuation de la réponse au stress thermique [190, 193].

Des informations plus précises sur la cinétique de formation et de disparition de ces granules de stress nucléaires ont été observées en cellules vivantes par vidéo-microscopie en utilisant des cellules Hela exprimant de manière transitoire⁷ la construction *HSF1* – *GFP* [201]. Dans cette étude, un appareil de contrôle de température adapté pour microscope permet une montée en température en ~ 5 s. Les granules d'*HSF1* sont des structures très dynamiques et réversibles. En absence de stress, *HSF1* est localisé de manière homogène dans le noyau, à l'exception du nucléole. Lors d'un stress thermique de 3 min à 42°C, les corps de stress nucléaires sont détectés en 30 s. L'intensité, la taille et le nombre de granules augmentent pendant l'exposition à 42°C [201]. Quand les cellules retournent à 37°C, l'intensité des granules diminue et la localisation cytoplasmique diffuse d'*HSF1* est retrouvée après 7-8 min de recouvrance à 37°C. La disparition des granules est liée à l'intensité du stress thermique initial, ainsi pour un stress thermique de 15 min à 42°C les granules persistent au delà de 30 min de recouvrance à 37°C. La disparition des granules dépend également de la température puisque celle-ci n'est pas observée quand la température de recouvrance est de 4°C, suggérant un phénomène ATP dépendant [201].

L'équipe de Jolly *et al.* s'est également intéressée à la dynamique temporelle et spatiale de ces granules en cas de stress successifs. Ainsi, un premier stress à 42°C pendant 3 min est appliqué et après 40 min de recouvrance à 37°C, un second stress identique est réalisé. La cinétique de formation des granules et leur localisation est la même que lors du premier stress. Les granules d'*HSF1* sont donc des structures transitoires très dynamiques associées à la réponse au stress thermique. Le fait que la localisation reste identique confirme l'existence de cibles chromosomiques particulières observées quelques années plus tard [195, 200, 202].

7.6.4 Structure d'*HSF1* dans les granules et relation avec la transcription des gènes *hsp*s

Les propriétés de liaison à l'ADN d'*HSF1* à l'intérieur des granules de stress nucléaires au cours d'un stress thermique ont été analysées par des expériences de retard sur gel⁸ et l'état de

⁶Immunofluorescence : technique utilisée pour la microscopie de fluorescence. Cette technique utilise la spécificité des anticorps pour leurs antigènes pour accrocher des molécules fluorescentes à des biomolécules cibles spécifiques à l'intérieur de la cellule et permet ainsi la visualisation de distribution de la molécule cible dans l'échantillon.

⁷Ceci est réalisé grâce à un procédé de transfection. La transfection est un processus de transfert de gènes, c'est-à-dire l'introduction d'ADN exogène dans des cellules eucaryotes, non médié par un virus par opposition à la transduction. Elle est souvent réalisée par l'ouverture transitoire de trous dans les cellules afin de permettre l'entrée de molécules extracellulaires, comme un plasmide d'ADN superenroulé, un petit ARN interférent ou autres.

⁸Le retard sur gel, (ou gel mobility shift assay) est une technique de biologie moléculaire permettant de détecter une interaction entre une protéine et de l'ADN ou de l'ARN.

phosphorylation par western blot ⁹ [201]. La présence des granules d'*HSF1* correspond à la forme inductible phosphorylée, trimérique et liée à l'ADN d'*HSF1*. Confirmant la corrélation positive entre les granules de stress nucléaires et la forme inductible phosphorylée d'*HSF1* pourvue d'activité transcriptionnelle [191, 193].

Afin de comparer la cinétique de formation des granules d'*HSF1* à la transcription des gènes *hsp70*, les granules d'*HSF1* ont été visualisés par immunofluorescence et les transcrits d'*HSP70* par FISH ¹⁰ en cellules HeLa. Cette étude montre que la cinétique d'apparition et de relaxation des granules d'*HSF1* coïncide exactement avec la cinétique d'induction et d'atténuation des transcrits d'*HSP70* (des résultats identiques sur les transcrits d'*HSP90α* ont également été observés) [201].

L'étude menée par Nonaka *et al.* a également permis de montrer une corrélation entre le nombre de corps de stress nucléaires d'*HSF1* par cellule et la sévérité du stress thermique appliqué sont corrélés, et a également montré que les granules étaient reliés à l'état phosphorylé d'*HSF1* [203]. Ensemble, les études menées par Jolly *et al.* et Nonaka *et al.* montrent une corrélation entre l'intensité de la band shift d'*HSF1* examiné par western blot et le nombre de granules activés [201, 203]. En conclusion, la présence des granules d'*HSF1* est étroitement corrélée à l'activation de la réponse au stress thermique, révélé par l'activation d'*HSF1* de monomère à trimère et par l'activation de la transcription des gènes *hsp*s.

En conclusion, les granules nucléaires de stress sont un bon indicateur de l'activité transcriptionnelle d'*HSF1* et de l'induction de la réponse au stress thermique. Le suivi cinétique de formation et de relaxation de ces granules permet donc d'obtenir des informations quant à la dynamique de la forme trimérique, phosphorylée et liée à l'ADN d'*HSF1* en condition de stress induisant la réponse au stress thermique.

Les granules d'*HSF1* représentent un nouvel outil pour investiguer les effets d'un stress physiologique à l'échelle de la cellule.

7.7 Questions ouvertes dans la réponse au stress thermique

La présence des corps de stress nucléaires révèle l'activation de la réponse cellulaire et l'induction de l'expression des gènes *hsp* en situation de stress. L'observation de ces structures, leur activation très rapide et leur localisation distincte des locus des gènes *hsp* pose de nombreuses questions non résolues à l'heure actuelle.

7.7.1 Rôle des structures de stress nucléaires

Parmi les hypothèses émises sur les rôles possibles de ces granules de stress nucléaires, on retiendra les principales. Dans une première hypothèse, les structures pourraient servir de compartiment à la régulation dans l'activité d'*HSF1* [201]. Ce compartiment pourrait permettre de réguler de manière coordonnée les différents états d'*HSF1* durant les événements de phosphorylation inductible et de déphosphorylation, l'association avec des chaperons et le régulateur négatif *HSBP1*, et les changements dans l'état d'oligomérisation. Les granules d'*HSF1* pourraient également servir de dépôt à partir desquels les trimères d'*HSF1* actifs seraient disponibles rapidement pour la transcription des gènes de stress thermique [201]. Il a également été suggéré un rôle structural pour ces

⁹Le Western blot est une méthode de biologie moléculaire permettant la détection et l'identification de protéines spécifiques dans un échantillon biologique.

¹⁰L'hybridation *in situ* en fluorescence (de l'anglais Fluorescence In Situ Hybridization, FISH) est une technique de biologie moléculaire d'hybridation *in situ* utilisant des sondes marquées à l'aide d'un marqueur fluorescent et utilisées sur des coupes en microscopie et en imagerie moléculaire. Les sondes peuvent être utilisées sur de l'ADN, de l'ARN ou une protéine. Les sondes à ADN permettent de détecter les centromères des chromosomes, les chromosomes individuellement ou un ou plusieurs gènes particuliers. Le FISH est une technique de cytogénétique permettant de voir des éléments situés à l'intérieur d'une cellule.

granules de stress où ces structures serviraient à protéger une région hypersensible ou fragile du génome lors de l'exposition à un stress [201]. L'observation d'une colocalisation partielle entre ces structures et la protéine U1A qui est impliquée dans l'épissage des ARN messagers (*mRNA*) [203] suggère que ces corps de stress nucléaires pourrait représenter un site d'épissage pour les ARN. Au vue de la localisation de nombreux facteurs d'épissage vers les corps de stress nucléaires, ceci pourrait jouer un rôle dans la quantification de composants clés pourvus d'activités transcriptionnelle ou d'épissage, permettant ainsi de contrôler ces deux fonctions en conditions de stress [188].

7.7.2 Rôle des transcrits des séquences satellite III

La transcription des séquences répétées des satellite III pose elle aussi question. Les transcrits des satellite III restent associés aux locus des chromosomes [189] suggérant un rôle pour ces transcrits dans la structure de la chromatine. Ces transcrits pourraient protéger une région fragile du génome des dommages causés par un stress [189]. La présence des facteurs d'épissage pourraient refléter l'épissage des transcrits des satellite III [197]. La liaison de ces facteurs d'épissage aux transcrits pourrait également permettre de stabiliser ces transcrits [197]. La séquestration des facteurs d'épissage à l'intérieur des granules de stress, via l'association avec des transcrits des satellite III pourrait aussi représenter un mécanisme pour réguler finement les activités d'élongation au cours d'un stress [197]. En plus d'affecter l'épissage alternatif du nucléoplasme environnant, les corps de stress nucléaires pourraient créer une zone du noyau enrichie en protéines impliquées dans la régulation de l'expression des gènes, et pourraient ainsi affecter l'activité des gènes à proximité des séquences satellite III sur le chromosome ou dans le volume du noyau [204]. Des séquences satellite III différentes et des lots de gènes seraient ainsi activés par différents facteurs de transcription spécifiques à un stress donné. Dans cette hypothèse, les séquences satellite III de chromosomes différents agiraient comme des éléments régulateurs pour moduler l'expression de lots spécifiques de gènes en réponse à un stress [204]. Dans une récente étude, l'hypothèse d'une influence de la transcription des blocs d'hétérochromatines sur l'expression des gènes adjacents a été testée [200]. La dérégulation de larges blocs d'hétérochromatine ne semble pas avoir d'effet significatif sur l'expression des gènes voisins dans les cellules stressées thermiquement. Une hypothèse qui reste à tester est si les structures de stress nucléaires pourraient influencer l'expression de gènes distants situés en *trans* en créant des zones actives transcriptionnellement dans l'espace tridimensionnel du noyau [200].

7.7.3 Présence d'*HSF2* dans les corps de stress nucléaire

HSF1 est le facteur de transcription majoritairement impliqué dans la réponse au stress thermique alors qu'*HSF2* semble majoritairement impliqué dans les phénomènes de développement et de différenciation. Ainsi, *HSF1* et *HSF2* forment un complexe et sont colocalisés dans les granules de stress nucléaires lors d'un stress thermique [205]. La localisation d'*HSF1* et *HSF2* dans les granules de stress nucléaires semble interdépendante. L'étude n'a pas permis de révéler si *HSF1* et *HSF2* forment un hétérodimère ou un hétérotrimère ou si l'interaction se fait entre deux oligomères. Il semblerait au vue des similarités structurales qu'*HSF1* et *HSF2* formeraient un hétéro-oligomère de stoechiométrie inconnue à l'heure actuelle [205].

La phase du cycle cellulaire semble importante dans la réponse transcriptionnelle, ainsi que les mécanismes spécifiques pour *HSF1* et *HSF2* dans l'orchestration de la transcription [206]. Ainsi, un accès fortement limité pour *HSF1* à la chromatine pour les cellules en mitose est révélé : de 1242 sites pour des cellules stressées thermiquement non synchronisées à 35 sites pour des cellules arrêtées en mitose. A l'inverse, la fixation d'*HSF2* à la chromatine en mitose montre qu'un grand nombre de sites *HSE* sont accessibles pour *HSF2* durant la division cellulaire.

En condition de stress thermique, *HSF1* et *HSF2* montrent des recrutements cinétiques similaires sur les promoteurs d'*HSP70*, mais *HSF2* est dégradé graduellement des sites *HSE* après 30 *min* de stress, indiquant la nécessité d'une régulation fine de la composition *HSF1* – *HSF2* sur le promoteur [206].

La capacité d'*HSF2* d'interagir avec la chromatine en division, alors qu'*HSF1* est difficilement détectable, semble indiquer un rôle pour *HSF2* dans la régulation épigénétique du destin cellulaire [206]. Ainsi *HSF2* contrôle la transcription à travers la progression du cycle cellulaire. Des études, s'étendant au delà du stress thermique, devrait permettre de comprendre comment les cellules sont capables épigénétiquement de se rappeler des expositions environnementales passées, telles que l'exposition à un stress [206].

7.8 Le laser pour sonder les mécanismes cinétiques biologiques moléculaires

7.8.1 Ordres de grandeur

Dans la réponse au stress thermique, des mécanismes à échelles de temps fortement différentes sont mis en place. Tout d'abord des mécanismes à échelle de temps rapide. La présence des corps nucléaires de stress, qui révèlent la présence de la forme trimérique, phosphorylée, capable de se fixer à l'ADN d'*HSF1* [193,201], est détectée en 30 s de stress thermique [201]. Ces mécanismes de phosphorylation, trimérisation et fixation à l'ADN sont donc très rapides ($\sim$ seconde). La transcription des ARN messagers d'*HSP70* est également un processus rapide.

Des mécanismes à échelle de temps plus longue sont également observés. Deux pics dans l'expression d'*HSP70* sont observés lors de l'induction d'un stress thermique à 42°C pendant 1 à 2 h [207]. Un pic d'expression à 3 et 12 h dans le cytoplasme, et une translocation progressive d'*HSP70* vers le noyau à 6 et 16 h sont observés après stress thermique. Les échelles de temps pour l'expression d'*HSP70* et son retour au noyau se font sur des échelles de plusieurs heures.

On peut ainsi distinguer les mécanismes à échelle de temps courte, tels que la phosphorylation, la trimérisation, la fixation d'*HSF1*₃ à l'ADN ($\sim$ la seconde), des mécanismes à échelle de temps beaucoup plus longue tel que l'expression de la protéine *HSP70* par exemple ($\sim$ plusieurs heures).

En conclusion, la réponse au stress thermique met en jeu des mécanismes réactionnels à échelles de temps très différentes. Afin d'étudier la réponse au stress thermique, il est nécessaire de développer des outils permettant une montée en température rapide et contrôlée, couplés à une détection très précoce de formation des corps nucléaires de stress. Le montage expérimental doit également permettre la détection des granules nucléaires de stress pour des stress prolongés afin d'accéder aux mécanismes à échelles de temps longues.

7.8.2 Corrélation de la dose thermique à la réponse au stress thermique

Comme nous venons de le mentionner, les granules nucléaires de stress sont des structures très dynamiques qui peuvent être détectées quelques secondes seulement après l'induction du stress [201].

De nombreuses études se sont attachées à corréler la dose thermique à la fraction de survie ou de mort cellulaire lors d'un traitement thermique. L'intégrale d'Arrhénius est couramment utilisée pour décrire la mesure des dommages thermiques ou la mort cellulaire en fonction de la température et de la durée d'exposition, telle que :

$$\Omega(\tau) = \ln\left(\frac{C_0}{C_\tau}\right) = A \int_0^\tau \exp \frac{-E_a}{RT(t)} dt \quad (7.1)$$

où, Ω est le dommage cellulaire, définit par le logarithme népérien du ratio des concentrations en cellules saines avant (C_0) et après (C_t) le traitement thermique pour une durée τ (s). A est le facteur de fréquence (s^{-1}), E_a l'énergie d'activation ($J.mol^{-1}$), T (K) la température d'exposition qui est une fonction du temps t (s), et R la constante des gaz parfaits ($R = 8.32 J.mol^{-1}.K^{-1}$) [208].

Quand le taux de dommage (Ω) est égal à 1 (i.e. quand $C_t = 1/e \times C_0$ soit 37 % de viabilité après traitement thermique comparé au contrôle), la relation d'Arrhénius montre que le taux de dommages est linéairement proportionnel à la durée de l'exposition pour une température constante :

$$\ln(\tau) = -\ln(A) + \frac{E_a}{RT} \quad (7.2)$$

L'activation thermique des promoteurs d'*HSP70* est modulée à la fois par la température et la durée du traitement thermique, et la relation entre la température, la durée de l'hyperthermie et l'expression du gène *hsp70* semble suivre une loi d'Arrhénius *in vivo* et *ex vivo* [209].

Cependant, d'autres études semblent montrer les limitations de l'application de la loi d'Arrhénius pour expliquer le niveau d'expression des *HSPs* en condition de stress thermique. Ainsi, la relation entre les protocoles d'hyperthermie, la cinétique d'expression des *HSPs* et la mort cellulaire a été étudiée et un modèle prédictif de la réponse des cellules saines et cancéreuses a été développé [208]. Les données obtenues sur le niveau d'expression des *HSPs* montre que la cinétique d'expression des *HSPs* fait intervenir un phénomène cinétique plus complexe qui ne peut être expliquée par une réaction chimique d'ordre 1, telle que celle décrite par la loi d'Arrhénius [208]. L'équation d'Arrhénius a également été appliquée dans l'étude du rôle d'*HSP70* sur la thermotolérance. Cette étude a également révélé les limites de la relation d'Arrhénius pour décrire des protocoles thermiques biphasiques [210].

Ainsi, des résultats contradictoires émergent de ces études et aujourd'hui de nombreuses questions restent ouvertes pour déterminer la corrélation claire entre la dose thermique, le niveau d'expression des *HSPs* et plus généralement la réponse au stress thermique.

Concernant les granules de stress nucléaires, à l'heure actuelle il n'y a pas à notre connaissance d'étude ayant permis de relier la dose thermique à la dynamique temporelle de ces structures. Ainsi, la dynamique des granules de stress dépend-elle de la manière de monter en température, ou seul le produit temps-intensité du stress compte ? Afin de répondre à ces questions, il est nécessaire d'avoir une très bonne connaissance de la rampe de montée en température du stress, couplée à un moyen de détection précoce des granules de stress nucléaires.

Grâce au Western blot, on peut quantifier des concentrations relatives en protéines pour des durées de stress thermique données. Cependant, avec cette technique, il est difficile de réaliser une mesure quelques secondes après l'induction du stress thermique. Au mieux, des données à l'échelle de quelques minutes peuvent être obtenues. De plus, les mesures sont fastidieuses, gourmandes en temps et relativement coûteuses. La réalisation d'un stress thermique par immersion des boîtes de culture contenant les cellules en bain marie, n'apparaît pas comme un moyen de réaliser une montée en température très précise. En effet, le temps mis par les cellules adhérentes au fond de la boîte de culture pour atteindre la température du bain marie n'est pas parfaitement maîtrisé.

Le suivi de fluorescence des granules nucléaires de stress en microscopie de fluorescence permet de mesurer l'activité transcriptionnelle d'*HSF1* lors d'un stress. Comment réaliser un stress thermique parfaitement contrôlé tout en visualisant simultanément la formation des granules nucléaires de stress ?

La réalisation de systèmes possédant des temps de montée en température extrêmement rapides couplés à l'observation simultanée sous microscope représente un challenge technique. Ainsi, un objectif de microscope préchauffé a été utilisé pour réaliser un stress thermique quasi instantané sur les glandes salivaires de drosophile [211]. Dans une autre étude, la cinétique d'*HSP70* est suivie par microscopie de fluorescence en réalisant un stress thermique à l'aide d'un microscope à platine chauffante [207]. Cet appareil permet de réaliser une montée en température de la température ambiante à 42°C en $\sim 2.5min$. Un contrôleur de température adapté sur microscope a également été développé pour atteindre la température de stress thermique en $\sim 5s$ [201]. On comprend donc

ici l'aspiration des équipes à trouver un moyen rapide d'induction d'un stress thermique couplé à une visualisation par microscopie de fluorescence d'une molécule d'intérêt impliquée dans la réponse au stress thermique (*HSP1* ou *HSP70* notamment), taguée par un chromophore fluorescent.

7.8.3 Cinétique du stress thermique et réponse au stress thermique

La cinétique de montée en température ainsi que la manière d'induire un stress thermique ont fait le sujet d'intensives recherches quant au taux de survie cellulaire observé post stress.

Les courbes théoriques permettant de relier viabilité cellulaire et température de stress sont bien connues. Cette dépendance est ainsi relative à l'effet de température sur l'activité enzymatique via la relation d'Arrhénius (voir discussion précédente). Cependant, le système complexe que représente la cellule ne peut être assimilée à une simple enzyme. Les modifications éventuelles d'intégrité membranaire, l'accumulation de protéines chaperons induite par la réponse au stress thermique sont autant de mécanismes pouvant influencer cette relation température/viabilité. Ainsi, des mécanismes passifs (préservation de l'intégrité de la membrane plasmique) et actifs (production de chaperons induite par la réponse au stress thermique) peuvent permettre à la cellule de prévenir les effets cytotoxiques induits par le stress [212].

Influence de la cinétique de montée en température sur la viabilité cellulaire

Des études sur divers types cellulaires (CHO [213], L1210 [214], *S. cerevisiae* [212, 215, 216] et différentes souches *E. coli* [217, 218]) ont montré l'effet drastique de la cinétique de montée en température sur la viabilité cellulaire post stress. Ainsi, une montée en température lente permet d'augmenter le taux de viabilité cellulaire. Par exemple, des cellules *S. cerevisiae* stressées thermiquement de 25 à 50°C via une rampe de température de 0.5°C /min présentent un taux de survie 50 fois plus élevé que des cellules ayant subi un stress thermique soudain [216].

Une montée lente en température permet ainsi à la cellule d'acquérir un certain degré de thermotolérance au stress thermique. Cette thermotolérance acquise via une montée lente en température apparaît au dessus d'une température seuil. En effet, l'acquisition de ce phénomène ne se fait qu'au dessus de 40°C, soit au dessus de la température maximale de croissance des cellules (T_{max} de 36°C) [215].

L'induction dans l'expression des *HSPs* semble dépendre du protocole de traitement thermique

Le niveau d'*HSP70* semble déterminer la sensibilité thermique lorsque les stress thermiques sont réalisés de manière fractionnée [219, 220]. Cependant, l'étude menée par Burns *et al.* [214] montre que le taux de synthèse des *HSPs* semble très faible pour les cellules thermotolérantes contrairement aux thermosensibles. Cette étude ne permet cependant pas d'évaluer l'expression d'*HSP70* pendant la rampe de température. L'augmentation de synthèse des *HSPs* en cas de thermotolérance induite par montée en température transitoire est observée alors qu'une thermotolérance induite par une montée en température lente montre une synthèse en *HSPs* plus faible que les cellules ayant subi un choc thermique soudain [221]. En conclusion, la synthèse ou non des *HSPs* semble être fortement conditionnée par la manière dont le phénomène de thermotolérance est acquis.

La voie de mort cellulaire dépend du traitement thermique

En cas de choc thermique soudain un relargage important de K^+ , Na^+ et Ca^{2+} ainsi qu'une perméabilisation soudaine de la membrane plasmique sont observés [215]. Cette perte d'intégrité membranaire est la principale cause de la mort cellulaire. En cas de rampe de montée en température, le relargage observé est nul, et la perméabilisation membranaire observée pour les cellules mortes semble être une conséquence de la mort cellulaire.

Des phénomènes passifs, tels que des changements structuraux dans la membrane plasmique pourraient expliquer la mort cellulaire induite par choc thermique soudain [217]. En effet, des modifications du volume cellulaire [212,213], une augmentation de fluidité de la membrane plasmique [217,218], le relargage d'ions (K^+ , Na^+ et Ca^{2+}) [215] et la perméabilisation membranaire [215,217] sont observées en cas de choc thermique soudain et ne sont pas observées pour une montée lente en température. Suggérant ainsi, que durant la montée lente en température, la réorganisation des phospholipides aurait le temps de s'effectuer sans causer de dommages à la membrane plasmique [216]. Après une rampe de montée en température, la morphologie et la perméabilité membranaire des cellules mortes semblent ne pas être affectées, contrairement aux cellules mortes par choc thermique soudain qui présentent un changement dramatique de l'intégrité cellulaire et une augmentation de la perméabilité cellulaire importants [217].

Ainsi, la létalité d'un choc thermique soudain semble être principalement induite par des phénomènes de type passifs engendrant des dommages irréversibles sur la membrane plasmique (i.e. perméabilisation). Les phénomènes passifs (telles que les propriétés de la membrane plasmique) en comparaison des mécanismes actifs (telle que la production de chaperons) semblent jouer le rôle principal dans l'acquisition du phénomène de thermotolérance induit par une rampe thermique lente [216]. Des morphologies cellulaires différentes observées par Guyot *et al.* [217] sur les cellules mortes par choc thermique soudain ou par montée lente en température pourraient refléter des voies de mort cellulaires distinctes (nécrose, apoptose ou autophagie).

En conclusion, toutes ces observations révèlent un effet important de la cinétique de montée en température sur la viabilité cellulaire, la synthèse des *HSPs* et la voie de mort cellulaire. En cas de choc thermique soudain, la perméabilisation membranaire est principale cause de mort cellulaire. En cas de rampe en température lente, la maintenance de l'intégrité de la membrane plasmique (structure, fluidité et perméabilité) et de manière minoritaire la synthèse des *HSPs* sont responsables du phénomène de thermotolérance. Des mécanismes de type passifs et actifs pouvant agir de manière parallèle, le protocole thermique peut modifier la prévalence d'un mécanisme par rapport à l'autre, conduisant ainsi à l'effet observé sur la viabilité cellulaire, la synthèse des *HSPs* et la voie de mort cellulaire.

La connaissance de la cinétique de montée en température est donc primordiale pour l'évaluation de la réponse au stress thermique engendrée.

7.8.4 Induction d'un stress thermique par laser

Il a été montré que des irradiations laser permettaient d'induire la réponse au stress thermique et de causer des dommages cellulaires en quelques secondes dans différents types cellulaires [222–224]. Quel est l'intérêt du laser dans l'induction d'un stress thermique comparé au traitement thermique standard ?

Si la température induite par absorption d'énergie lumineuse du laser infrarouge sur le plan des cellules est bien maîtrisée, alors le laser devient un outil intéressant pour l'induction d'un stress thermique et la compréhension des mécanismes moléculaires de la réponse au stress thermique.

En modulant l'intensité du laser, il est possible de contrôler parfaitement la cinétique du stress thermique. On peut ainsi évaluer la sensibilité des cellules face à une montée en température plus ou moins rapide. Le laser induit un échauffement très rapide du plan des cellules (quelques secondes), et permet ainsi l'observation très précoce de formation des granules nucléaires de stress par microscopie de fluorescence pendant le traitement thermique. Il permet également de réaliser des stress continus et ainsi d'obtenir des informations sur les mécanismes de réponse au stress thermique à échelle de temps plus longue. L'induction de stress plus ou moins espacés dans le temps permet également de sonder les effets de mémoire au stress.

7.9 Axes et objectifs de mon travail de thèse

Le réseau de régulation du stress thermique est un système complexe, faisant apparaître de nombreux partenaires réactionnels et de nombreux mécanismes à échelle de temps très différentes. L'objectif de la seconde partie de mon travail de thèse était de hiérarchiser les mécanismes réactionnels du réseau de régulation de la réponse au stress thermique afin de mettre en lumière les mécanismes et les partenaires clés de ce système. Pour y répondre, j'ai développé un modèle mathématique minimal de titration des chaperons ainsi qu'un dispositif expérimental d'induction d'un stress thermique par laser.

L'analyse de la dynamique temporelle de granules de stress nucléaires couplée à la modélisation des mécanismes moléculaire impliqués dans la réponse au stress thermique a été la base de la deuxième partie de mon travail de thèse.

Dans un premier temps, un modèle mathématique minimal de titration des chaperons, a été proposé afin de (i) rendre compte des observations expérimentales et (ii) identifier les mécanismes et partenaires clés du réseau de régulation de la réponse au stress thermique. Dans un second temps, j'ai réalisé un montage expérimental permettant l'induction d'un stress thermique par laser couplée à l'observation cinétique de formation et relaxation des corps nucléaires de stress. La dynamique temporelle de ces corps de stress nucléaires permet de sonder les mécanismes moléculaires impliqués dans la réponse au stress thermique. Enfin, nous présenterons les résultats préliminaires sur les prédictions du modèle vis-à-vis de stress thermiques particuliers.

Chapitre 8

Modélisation de la réponse au stress thermique

Parmi les mécanismes de régulation proposés pour décrire la réponse au stress thermique (voir Chap. 7), le modèle de titration (ou de déplacement des chaperons) est celui qui est le plus étudié et modélisé numériquement. Les partenaires et mécanismes réactionnels qui ont été découverts jusqu'à présent, permettent d'étayer ce modèle de titration.

Cependant, les modèles mathématiques de titration actuels ne permettent pas de hiérarchiser les partenaires et mécanismes clés de la réponse au stress thermique. Ces modèles ne permettent pas une vision simple de l'évolution des espèces réactionnelles ni d'appréhender de manière intuitive le comportement du réseau de régulation face à une condition de stress. De même, la complexité des modèles actuels rend délicate la connexion avec d'autres réseaux de régulation connus pour être interconnectés avec la réponse au stress thermique.

Dans ce contexte, j'ai développé un modèle de titration minimal permettant de hiérarchiser les mécanismes réactionnels et visant à (i) décrire les expériences et (ii) être prédictif.

Cette étude a donné lieu à une collaboration avec Quentin Thommen, membre de l'équipe "Dynamique des réseaux biologiques" du laboratoire PhLAM de l'Université de Lille 1.

8.1 Modèle mathématique de titration de la réponse au stress thermique

8.1.1 Intérêt de modéliser et de simplifier le réseau de régulation du stress thermique

L'intérêt de modéliser un système biologique est de comprendre les mécanismes biologiques mis en jeu dans un mécanisme de régulation cellulaire, et également de faire des prédictions sur le comportement dynamique de ce réseau lorsque celui-ci est soumis à un stimulus particulier. La simplification des mécanismes de régulation permet de connecter ensemble différents réseaux tels que le rythme circadien, le métabolisme ou le cycle cellulaire.

Des modèles mathématiques ont été développés [225–228] dans le but de reproduire les données expérimentales obtenues sur la cinétique du facteur de transcription *HSF1* lors d'un stress thermique en cellules HeLa [175]. Ces modèles complexes comportant des dizaines d'équations différentielles ordinaires ne permettent pas de guider l'intuition et de comprendre "avec les mains" le réseau de régulation du stress thermique. De plus, ces modèles récents [225–228] décrivent mal les données expérimentales, notamment pour l'activation constante de la forme active d'*HSF1* au delà d'une température donnée en stress long (4 h) [175]. Un modèle développé récemment par l'équipe de K. Sriram *et al.* [229] est capable de reproduire ces données expérimentales mais ne fait pas de lien direct entre la température expérimentale de stress et le niveau de stress, ce qui ne permet pas de faire des prédictions sur une réponse cellulaire. Ce modèle complexe utilise une analyse de

bifurcations et rend difficile la compréhension du réseau de régulation du stress thermique.

C'est dans ce contexte que j'ai développé un modèle mathématique minimal décrivant à la fois les résultats expérimentaux d'activation d'*HSF1* [175] et de thermotolérance et de viabilité cellulaire [230]. Ce modèle permet d'appréhender de manière simple l'évolution de chaque espèce réactionnelle dans une condition de stress thermique donnée. La titration des chaperons par *HSF1* apparaît comme élément clé du modèle. Le mécanisme de réparation/dégradation des protéines dénaturées apparaît comme dépendant de la sévérité du traitement thermique. Ce modèle fait également apparaître trois régimes de température différents avec une température critique au delà de laquelle le réseau de régulation n'est plus capable d'enrayer les dégâts.

8.1.2 Modèles de titration actuels

Des équipes se sont attachées à développer une modélisation mathématique des mécanismes moléculaires de réponse au stress thermique basée sur le mécanisme de titration [225–228]. Des modèles stochastiques ont également été proposés pour comprendre le réseau de régulation du stress thermique [231, 232].

Les modèles mathématiques de titration sont basés sur un réseau de régulation très proche [225–228]. Nous avons choisi de présenter le modèle établi par l'équipe de I. Petre qui est représentatif de plusieurs modèles mathématiques [225–228]. Ce modèle comprend trois parties : la dynamique d'activation des gènes codant pour les gènes *hsp*, leur répression et l'activité de chaperonne des *hsp*. Nous allons détailler l'ensemble des mécanismes réactionnels mis en jeu dans ce modèle.

Modèle moléculaire

Nous allons détailler ici le modèle développé dans [225]. En absence de stress, les protéines *HSF1* sont présentes sous forme de monomères, majoritairement liées à des protéines de choc thermique (*HSP*). Lors d'un stress, leur concentration demeure constante. Sous stress thermique les facteurs de transcription forment des trimères (*HSF1*₃), qui sont des composés actifs, capables de se lier aux régions *HSE* [183, 185]. Une fois les *HSF1*₃ liées aux *HSE*, la transcription des gènes codant pour les *HSP* est supposée activée. La liaison de la machinerie transcriptionnelle aux régions promotrices des gènes codant pour les protéines *HSP*, la production des *ARNm* des *HSP*, leur transport, etc. n'est pas prise en compte. Seule une forme active codant pour les gènes *hsp* qui conduira éventuellement à la synthèse de nouvelles molécules *HSP* est modélisée (voir réaction (4) de la table 8.1). Les protéines de choc thermique ont une affinité pour les *HSF1* et donc, si elles sont présentes en quantité suffisantes, elles sont capables de réprimer leur propre synthèse : une *HSP* contribue à la dissociation d'un trimère *HSF1*₃ d'un site *HSE*, voir réaction (8) de la table 8.1 [175, 184]. Le schéma illustrant le mécanisme de réponse au stress thermique par titration est représenté dans la Fig. 8.1.

La dénaturation des protéines induite par la chaleur est représentée dans ce modèle par une réaction transformant une protéine native (*PROT*) vers une protéine dénaturée (*MFP*, pour misfolded protein). La constante de réaction dépend exponentiellement de la température de l'environnement via une loi de type Arrhénius [233, 234]. Une protéine de choc thermique peut chaperonner une protéine dénaturée et faciliter sa reformation. La liste de toutes les réactions du modèle [225] est présentée dans la table 8.1.

Dans ce modèle, il y a trois relations de conservation. Une concerne la concentration totale en *HSF1* :

$$[HSF1] + 2[HSF1_2] + 3[HSF1_3] + 3[HSF1_3 : HSE] + [HSP : HSF1] = \text{constante} \quad (8.1)$$

La seconde concerne la concentration totale en protéines, autres que les *HSP* et *HSF* :

$$[PROT] + [MFP] + [HSP : MFP] = \text{constante} \quad (8.2)$$

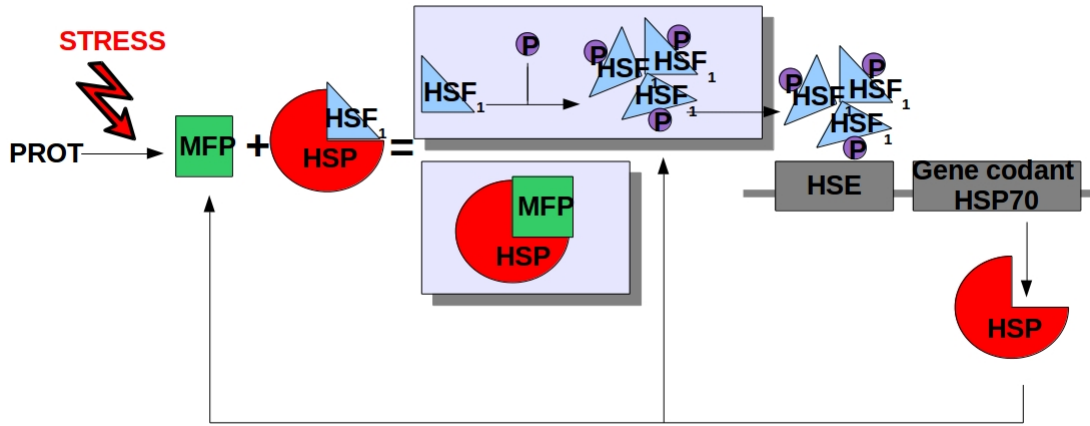


FIG. 8.1: Schéma des mécanismes moléculaires de la réponse au stress thermique. En conditions de stress, les protéines natives ($PROT$) sont dénaturées et engendrent la formation des MFP . Le dimère $HSP : HSF1$ se dissocie pour permettre la libération d' $HSF1$ et la fixation des HSP sur les MFP pour chaperonnage. Une fois libre, $HSF1$ se trimérise pour former l'homotrimère $HSF1_3$. Une fois phosphorylé et fixé sur les sites HSE , ce complexe induit la transcription active des gènes hsp . Les HSP ainsi produites vont alors pouvoir réparer les MFP et réprimer leur propre transcription en dissociant le complexe $HSF1_3 : HSE$.

Réactions	Numéro de la réaction
$2 HSF1 \leftrightarrow HSF1_2$	(1)
$HSF1 + HSF1_2 \leftrightarrow HSF1_3$	(2)
$HSF1_3 + HSE \leftrightarrow HSF1_3 : HSE$	(3)
$HSF1_3 : HSE \rightarrow HSF1_3 : HSE + HSP$	(4)
$HSP + HSF1 \leftrightarrow HSP : HSF1$	(5)
$HSP + HSF1_2 \rightarrow HSP : HSF1 + HSF1$	(6)
$HSP + HSF1_3 \rightarrow HSP : HSF1 + 2HSF1$	(7)
$HSP + HSF1_3 : HSE \rightarrow HSP : HSF1 + HSE + 2HSF1$	(8)
$HSP \rightarrow$	(9)
$PROT \rightarrow MFP$	(10)
$HSP + MFP \rightarrow HSP : MFP$	(11)
$HSP : MFP \rightarrow HSP + PROT$	(12)

TAB. 8.1: Liste des réactions du modèle moléculaire de I. Petre *et al.* [225] pour la réponse au stress thermique.

La troisième concerne la concentration totale en HSE :

$$[HSE] + [HSF1_3 : HSE] = \text{constante} \quad (8.3)$$

La seule variable du modèle qui n'est pas soumise à une loi de conservation est HSP , qui est la cible de régulation de la réponse au stress thermique.

Modèle mathématique

Lors d'un stress thermique, le niveau de protéines dénaturées MFP augmente dans la cellule. La dénaturation des protéines induite par la chaleur a été étudiée par l'équipe de Lepock *et al.* [233] sur

les cellules CHL V79 par DSC (Differential Scanning Calorimetry) ¹. Le taux de protéines dénaturées par heure a ensuite été déduite par Peper *et al.* [234]. La fonction ϕ_T (s^{-1}) décrit le taux de protéine dénaturée par seconde :

$$\phi_T = \alpha \left(1 - \frac{0.4}{e^{T-37}}\right) \times 1.4^{T-37} \quad \text{pour } T \text{ (°C)} \in [37, 45] \quad (8.4)$$

où T est la température en degrés Celsius et α est une constante à déterminer. Cette formule est valide pour des températures comprises entre 37 et 45°C. Le niveau de protéines dénaturées est donc fonction de l'intensité et de la durée du stress.

Ce modèle de titration comprend 10 équations différentielles détaillées en annexe dans la table E.1. Sur ces 10 équations, compte-tenu des équations de conservation de la matière (Eqs. 8.1, 8.2, 8.3), seules 7 équations sont indépendantes.

Dans ce modèle, 17 paramètres indépendants et 10 conditions initiales doivent être déterminés. Avec les trois relations de conservation de la matière, il reste 7 conditions initiales à déterminer.

Estimation des paramètres

Nous avons réalisé un meilleur ajustement des données par la méthode des moindres carrés sur les données expérimentales obtenues par l'équipe de K. Abravaya *et al.* [175]. Nous avons cherché les jeux de paramètres qui minimisent l'erreur quadratique moyenne entre la solution numérique et les données [175]. Pour mesurer l'efficacité du meilleur ajustement pour un jeu de paramètres, nous avons défini l'erreur quadratique moyenne (RMSE, pour root mean square error) entre les données expérimentales et les données numériques pour la variable $HSF1_3$: HSE .

L'erreur quadratique moyenne se définit comme :

$$RMSE = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (X_{i,modele} - X_{i,exp})^2}{n}} \quad (8.5)$$

où $X_{i,modele}$ et $X_{i,exp}$ sont les vecteurs des données obtenues avec le modèle et des données expérimentales pour chaque point (i), et n est le nombre de points expérimentaux. Ainsi, plus l'écart entre les résultats numériques et les données expérimentales est faible, plus faible sera le RMSE et meilleur est le modèle. Le programme cherche le meilleur jeu de paramètres qui minimise le RMSE.

Le meilleur ajustement est réalisé en utilisant une procédure d'optimisation non linéaire basée sur un algorithme modifié de Levenberg-Marquardt (logiciel MINPACK [235]). La procédure d'optimisation est initialisée par un choix aléatoire des valeurs des paramètres. L'intégration numérique des équations différentielles ordinaires est réalisée grâce à l'algorithme SEULEX [236] qui est bien adapté aux problèmes stiff (problème qui comporte des mécanismes avec des échelles de temps fortement différentes). La convergence dans l'ajustement des données est contrôlée en vérifiant que l'optimum est atteint à plusieurs reprises.

Quatre stress de nature différente issus de cette étude vont servir de données expérimentales pour réaliser le meilleur ajustement par la méthode des moindres carrés. Des cellules HeLa ont été cultivées à 37°C pendant 4 jours avant d'être soumises à des stress thermiques à 41, 42 et 43°C pendant 4 h. Les niveaux relatifs d' $HSF1$ activé ont été mesurés dans des expériences de retard sur gel. Les concentrations en $HSF1_3$: HSE sont ajustées sur les données expérimentales d' $HSF1$ activé de K. Abravaya *et al.* [175].

¹La calorimétrie différentielle à balayage (ou Differential Scanning Calorimetry, DSC en anglais), est une technique d'analyse thermique. Elle mesure les différences des échanges de chaleur entre un échantillon à analyser et une référence. Elle permet de déterminer des transitions de phase : des températures de fusion, des enthalpies de réaction ...

La table E.2 en annexe présente les constantes de réaction du modèle de I. Petre *et al.* obtenus après meilleur ajustement sur les données expérimentales d'après [175]. Les concentrations initiales de chaque espèce sont obtenues lorsque celles-ci atteignent un état d'équilibre pour un temps infiniment long à 37°C. La table E.3 en annexe présente les concentrations initiales de chaque espèce à 37°C.

Résultat de l'ajustement des paramètres

Sur la figure 8.2 l'évolution d' $HSF1_3 : HSE$ est représentée ainsi que les données expérimentales obtenues pour $HSF1$ activé d'après [175].

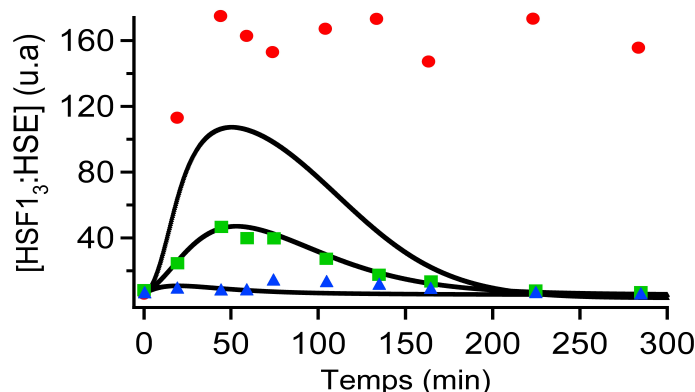


FIG. 8.2: Résultats numériques (lignes noires) du modèle de titration de I. Petre *et al.* obtenus par meilleur ajustement par la méthode des moindres carrés sur les données expérimentales de l'étude menée par K. Abravaya *et al.* [175], pour les stress continus à 41 (triangles bleus), 42 (carrés verts) et 43°C (ronds rouges).

On observe pour les stress à 41 et 42°C de 4 h, un bon accord entre le modèle et les résultats expérimentaux. Les niveaux relatifs ainsi que les temps pour le maximum d'activation et l'obtention d'une relaxation totale sont bien reproduits. Cependant, l'accord est nettement moins bon pour le stress à 43°C. En effet, le modèle ne permet pas de reproduire l'activation constante à 43°C après 4 h de stress.

8.1.3 Conclusions

En conclusion, les modèles actuels de titration reproduisent les données expérimentales observées pour les stress de 4 h à 41 et 42°C. Pour le stress de 4 h à 43°C, les modèles ne permettent pas d'observer un plateau pour $HSF1_3 : HSE$. Au delà d'une certaine température ($> 42^\circ\text{C}$), pour les stress thermique continus (plusieurs heures) les données expérimentales montrent une activation constante d' $HSF1$ activé non régulée par les mécanismes de réponse au stress thermique. Il semblerait donc que les modèles actuels de titration soient incomplets ou inexacts.

Pour expliquer ce désaccord entre la modélisation et les données expérimentales du stress continu à 43°C, plusieurs pistes ont été envisagées par les équipes de modélisation. Ainsi il a été proposé [225] que des facteurs d'initiation eucaryotes pourraient réprimer la traduction des hsp en situation de stress thermique [237, 238]. Ainsi, si les HSP ne sont pas efficacement traduites à températures élevées, elles ne participeraient pas à l'autorégulation de leur expression. De plus, d'autres phénomènes telle que la séquestration des chaperons par les protéines mal formées devrait également être prise en compte pour comprendre les mécanismes de régulation du stress thermique en situation de stress prolongé [225]. Il a été proposé qu'en cas de stress continu à 43°C, tous les $HSF1$ sont libérés, or la vitesse de transcription et de translation des hsp étant plus faible que celle de libération des

HSF1, les trimères d'*HSF1* activés demeurent jusqu'à ce que de nouvelles hsp soient synthétisés [227]. D'autres mécanismes non pris en compte tels que la formation d'agrégats de protéines ou d'effets dissipatifs sont proposés pour expliquer le mauvais accord entre le modèle et les données expérimentales du stress continu à 43°C [227].

Comme nous l'avons énoncé précédemment, l'intérêt d'un modèle est de pouvoir appréhender et comprendre de manière simple un réseau de régulation moléculaire. C'est pourquoi, partant des mécanismes connus du stress thermique, nous avons développé un modèle mathématique de titration minimal.

8.2 Modèle mathématique minimal de titration

8.2.1 Introduction et description d'un modèle mathématique minimal

Le modèle que nous avons développé implique 5 partenaires réactionnels : *HSF1*, les protéines de stress thermique *HSP*, le complexe *HSP : HSF1*, les protéines dénaturées *MFP* et le complexe *HSP : MFP*.

Notre modèle est minimal dans le sens où il ne tient pas compte de : (i) la trimérisation et la phosphorylation d'*HSF1*, (ii) la dynamique de l'*ARNm* d'*HSP*, et (iii) la dynamique de liaison d'*HSF1* à l'ADN qui sont supposés être des mécanismes rapides. Nous nous sommes intéressés dans un premier temps aux stress continus, ce qui permet d'éliminer de manière adiabatique ces mécanismes à échelle de temps rapide.

La description mathématique par la loi d'action des masses de notre modèle simplifié conduit à un système à 5 dimensions d'équations différentielles couplées que nous allons détailler ici. *HSF1* et *HSP* possèdent des taux de transcription basales (voir Fig 8.3) et la transcription d'*HSP* induite par *HSF1* est également prise en compte.

La dénaturation des protéines induite par la chaleur est décrite par la fonction k_d 8.7 [234].

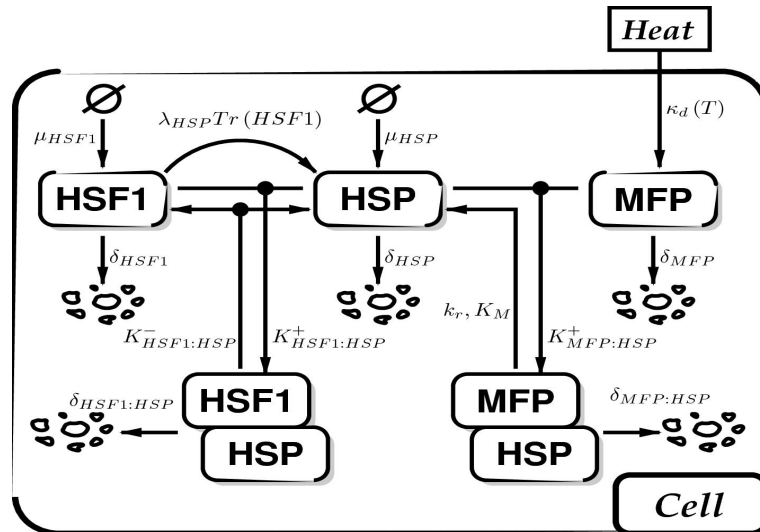


FIG. 8.3: Schéma du modèle mathématique minimal de la réponse au stress thermique. Le modèle comprend 5 espèces réactionnelles : *HSF1*, *HSP*, *HSP : HSF1*, *MFP* et *HSP : MFP*. Les taux de transcription basale (μ_i), les taux de dégradation linéaires (δ_i), ainsi que les constantes de réaction cinétique pour l'hétérodimérisation (K_i) sont indiqués pour chaque espèce. La formation des *MFP* est induite par un stress thermique : fonction de dénaturation des protéines k_d .

Le procédé de dissociation d'*HSP* de la molécule chaperonnée suit une loi cinétique de type

Michaelis-Menten pour prendre en compte les ressources énergétiques limitées de la cellule. La transcription d'*HSP* induite par *HSF1* est décrite par la fonction $T_r(HSF1)$ telle que :

$$T_r(HSF1) = \frac{[HSF1]^3}{P_0^3 + [HSF1]^3} \quad (8.6)$$

Cette fonction de transcription prend en compte la régulation d'un site *HSE* par un trimère d'*HSF1* où P_0 est le seuil de régulation. Le fait d'inclure dans le modèle la synthèse et le taux de dégradation des protéines permet l'analyse des états stationnaires qui reflètent les concentrations des espèces à l'équilibre. L'ensemble des équations différentielles ordinaires relatives aux 5 partenaires réactionnels du modèle simplifié est représenté dans la table 8.2.

Équation	Numéro de l'équation
$d[MFP]/dt = k_d(T) - K_{HSP:MFP}^+[HSP].[MFP] - \delta_{MFP}[MFP]$	(1)
$d[HSP : MFP]/dt = K_{HSP:MFP}^+[HSP].[MFP] - k_r \frac{HSP:MFP}{K_M + [HSP:MFP]}$	(2)
$-\delta_{HSP:MFP}[HSP : MFP]$	
$d[HSF1]/dt = \mu_{HSF1} - \delta_{HSF1}[HSF1] - K_{HSF1:HSF}^+[HSF1].[HSF]$	(3)
$+K_{HSF1:HSF}^-[HSF1 : HSF]$	
$d[HSP]/dt = \mu_{HSP} + \lambda_{HSP}T_r([HSF1]) - \delta_{HSP}[HSP]$	(4)
$-K_{HSF1:HSF}^+[HSF1].[HSP] + K_{HSF1:HSF}^-[HSF1 : HSF]$	
$-K_{HSP:MFP}^+[HSP].[MFP] + k_r \frac{HSP:MFP}{K_M + [HSP:MFP]}$	
$d[HSF1 : HSF]/dt = +K_{HSF1:HSF}^+[HSF1].[HSF] - K_{HSF1:HSF}^-[HSF1 : HSF]$	(5)
$-\delta_{HSF1:HSF}[HSF1 : HSF]$	

TAB. 8.2: Équations différentielles ordinaires relatives aux cinq espèce réactionnelles de notre modèle minimal.

Le paramètre δ_i est le taux de dégradation linéaire, K_i est la constante de réaction cinétique pour l'hétérodimérisation, μ_i le taux de transcription basale (i est l'espèce réactionnelle considérée). $\mu_{HSP} + \lambda$ est le taux de transcription maximal d'*HSP*. La fonction de transcription 8.6 admet implicitement un pseudo-equilibre pour $[HSF1]$, $[HSF1_3]$ et $[HSF1_3 : HSE]$. Dans notre système, la concentration en $HSF1_3 : HSE$ est donnée par la fonction de transcription $T_r(HSF1)$. La fonction de dénaturation $k_d(T)$ est donnée par :

$$k_d(T) = k_d(1 - 0.4 \times e^{37-T}) \times 1.4^{T-37} \quad (8.7)$$

où T est la température en degré Celcius. L'unité de la fonction $k_d(T)$ est l'inverse d'un temps.

8.2.2 Intégration de la viabilité cellulaire au modèle

La viabilité cellulaire observée après traitement thermique est une question biologique importante, notamment dans les thérapies du cancer pour la définition de dose thermique. De nombreuses expériences ont été faites concernant la thermotolérance qui relie la fraction de cellules survivantes à la dose thermique reçue durant un stress thermique. La fraction de cellules survivantes est alors

définie comme la fraction de cellules dans une colonie dont le taux de croissance n'est pas affectée par le traitement thermique.

Le mécanisme spécifique de la mort cellulaire par hyperthermie n'est pas connu, mais la forte énergie d'activation nécessaire pour tuer les cellules (100 à 200 *kcal/mole*) suggère que la dénaturation des protéines est l'étape limitante [239]. Il y a une bonne corrélation entre la dénaturation des protéines et la réponse cellulaire [240]. Ainsi, environ 5 % de dénaturation sur le niveau de protéines total est nécessaire pour détecter la mort cellulaire et à 10 % de dénaturation $\sim$ 95 % des cellules V79 sont tuées [240].

Pour établir un lien entre la fraction de cellules survivantes et les variables de notre modèle, nous avons considéré que les cellules pouvaient être dans deux états différents : un état 1 où la division se fait et un état 2 où la division est impossible. La transition de l'état 1 vers l'état 2 est supposée être simplement proportionnelle à la fraction de protéines dénaturées. Cette hypothèse modélise l'effet létal d'un manque de protéines fonctionnelles dans la cellule. Ainsi, la fraction de cellules survivantes suit une loi exponentielle proportionnelle à l'intégrale de la concentration totale en protéines dénaturées dans la cellule dans le temps. Mathématiquement la fraction de cellules survivantes est calculée par l'expression :

$$P(t) = \exp[-\alpha \int_0^t ([MFP](u) + [HSP : MFP](u)).du] \quad (8.8)$$

où l'intervalle de temps $[0, t]$ est l'intervalle de temps de l'expérience et α est une constante indépendante du stress thermique appliqué.

8.2.3 Résultats numériques

Nous avons testé les capacités de notre modèle simplifié à décrire en même temps les données obtenues par K. Abravaya *et al.* [175] pour les stress continus à 41, 42 et 43°C ainsi que pour les données de viabilité cellulaire de G. Gerner *et al.* [230].

Le niveau d' $HSP13 : HSE$ est représenté par la fonction de transcription 8.6. Nous avons donc cherché les meilleurs jeux de paramètres minimisant l'erreur des moindres carrés entre les données expérimentales et notre modèle.

Sur la figure 8.4 (A) est représentée l'évolution temporelle de la fonction de transcription d' HSP induite par $HSP1$ ($\frac{HSP1^3}{P_0^3 + HSP1^3}$) du modèle de titration minimal ainsi que les données expérimentales de K. Abravaya *et al.* [175]. Le modèle reproduit correctement les données expérimentales. Les niveaux relatifs des stress continus sont bien reproduits ainsi que les relaxations à 41 et 42°C. L'activation constante à 43°C est également reproduite.

Sur la figure 8.4 (B) est représenté le taux de survie cellulaire d'après les données expérimentales de G. Gerner *et al.* [230] pour une exposition des cellules à 41, 42, 43, 44 et 45°C pour un temps de stress donné. Notre modèle est capable de reproduire quantitativement et qualitativement les probabilités de survie.

En conclusion, le modèle de titration minimal est capable de reproduire les données expérimentales sur l'activation d' $HSP1$ et sur les taux de survie cellulaire pour des conditions de stress thermique données. Celui-ci semble donc contenir tous les ingrédients clés de la réponse au stress thermique.

Les données expérimentales étant mesurées à un facteur d'échelle arbitraire, la solution numérique du modèle donne un nombre infini de jeux de paramètres dépendant de l'échelle utilisée. Pour fixer le jeu de paramètres obtenu dans la table 8.3, la concentration totale en hsp (i.e $[HSP] + [HSP : HSP1] + [HSP : MFP]$) est fixée à l'unité à l'état d'équilibre à 37°C. Ce choix de normalisation est motivé par le fait que la concentration totale des hsp est d'environ 1 % de la

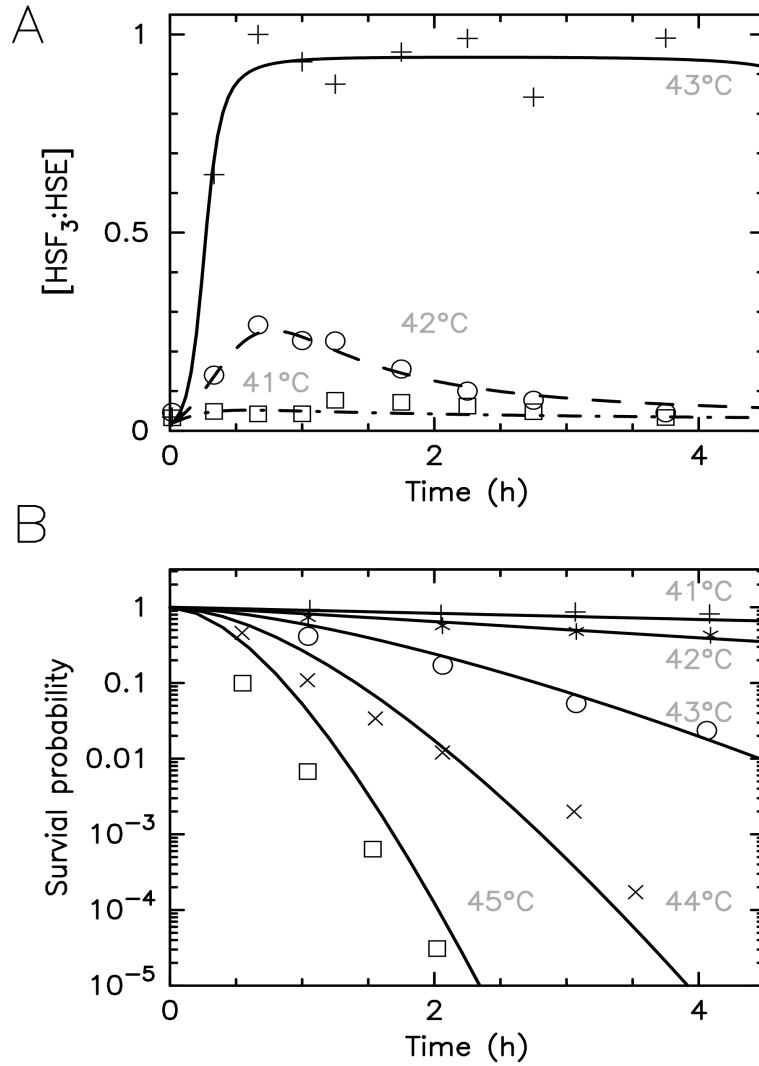


FIG. 8.4: Résultats du modèle mathématique minimal après meilleur ajustement. (a) Les données expérimentales de K. Abravaya *et al.* [175] sont représentées par des carrés, cercles et croix pour les stress continus à 41, 42 et 43°C respectivement. Les lignes sont les résultats numériques du modèle simplifié pour la variable $\frac{HSF1^3}{P_0^3 + HSF1^3}$: points et pointillés, pointillés et ligne pleine pour les stress continus à 41, 42 et 43°C respectivement. (b) Les données expérimentales de G. Gerner *et al.* [230] pour les taux de survie pour des stress à 41 (croix), 42 (étoiles), 43 (ronds), 44 (croix) et 45°C (carrés) sont représentés. Les lignes sont les résultats numériques du modèle simplifié pour la variable $P(t)$. Au temps initial, les espèces réactionnelles sont à l'état stationnaire à 37°C.

concentration de toutes les protéines à 37°C [241]. Ce choix de normalisation n'affecte ni les taux de dégradation δ_i ni les taux de dissociation K_i^- qui sont des échelles de temps pures.

La table 8.3 présente le jeu de paramètres obtenu ainsi que les concentrations des espèces à l'état stationnaire à 37°C. A 37°C, la plupart des hsf1 sont en complexe avec les hsp alors que la plupart des hsp sont libres et donc disponibles pour former des protéines nouvellement synthétisées. La concentration en mfp est très faible et la plupart sont en complexe avec les *HSP*. Les concentrations de chaque espèce à l'état stationnaire sont donc conformes à celles attendues dans le réseau de régulation du stress thermique bien qu'aucune demande spécifique n'ait été faite pendant la procédure d'optimisation des paramètres. Cette observation est donc uniquement supportée par les données expérimentales.

L'estimation de paramètres ne fournit pas un jeu de paramètres unique mais un grand nombre qui peuvent être classés par leur score d'ajustement. Pour mesurer la dispersion des jeux de paramètres,

Paramètre	Unité	Description	valeur
$ln(2)/\delta_{HSF1}$	(h)	demi-vie d' <i>HSF1</i>	11.09
$ln(2)/\delta_{HSP}$	(h)	demi-vie d' <i>HSP</i>	7.22
$ln(2)/\delta_{HSP:HSF1}$	(h)	demi-vie d' <i>HSP : HSF1</i>	8.86
$ln(2)/\delta_{HSP:MFP}$	(h)	demi-vie d' <i>HSP : MFP</i>	18.99
$ln(2)/\delta_{MFP}$	(h)	demi-vie des <i>MFP</i>	2.90
μ_{HSF1}	($\mu M.h^{-1}$)	taux de transcription basal d' <i>HSF1</i>	$0.907.10^{-3}$
μ_{HSP}	($\mu M.h^{-1}$)	taux de transcription basal d' <i>HSP</i>	$73.70.10^{-3}$
λ_{HSP}	($\mu M.h^{-1}$)	taux de transcription activé d' <i>HSP</i>	1.05
P_0	(μM)	seuil de régulation de transcription d' <i>HSP</i>	$3.37.10^{-3}$
$K_{HSP:HSF1}^+$	($\mu M.h^{-1}$)	affinité de liaison d' <i>HSP : HSF1</i>	45.96
$K_{HSP:HSF1}^-$	(h^{-1})	taux de dissociation <i>HSP : HSF1</i>	3.6
$K_{HSP:MFP}^+$	($\mu M.h^{-1}$)	affinité de liaison d' <i>HSP : MFP</i>	$1.73.10^3$
k_d	($\mu M.h^{-1}$)	taux de dénaturation	1.13
k_r	($\mu M.h^{-1}$)	taux de dissociation maximale du complexe <i>HSP : MFP</i>	8.21
K_M	(μM)	constante de Michaelis-Menten	0.342
α	($\mu M.h^{-1}$)	taux de mort	0.270
$[HSF1]_{[T=37]}^*$	(μM)	<i>[HSF1]</i> à l'état stationnaire à 37°C	$0.91.10^{-3}$
$[HSP]_{[T=37]}^*$	(μM)	<i>[HSP]</i> à l'état stationnaire à 37°C	0.96
$[HSP : HSF1]_{[T=37]}^*$	(μM)	<i>[HSP : HSF1]</i> à l'état stationnaire à 37°C	0.01
$[HSP : MFP]_{[T=37]}^*$	(μM)	<i>[HSP : MFP]</i> à l'état stationnaire à 37°C	0.03
$[MFP]_{[T=37]}^*$	(μM)	<i>[MFP]</i> à l'état stationnaire à 37°C	$0.41.10^{-3}$
$\sum [HSF1]_{[T=37]}^*$	(μM)	$\sum [HSF1]$ à l'état stationnaire à 37°C	0.01
$\sum [HSP]_{[T=37]}^*$	(μM)	$\sum [HSP]$ à l'état stationnaire à 37°C	1.00
$\sum [MFP]_{[T=37]}^*$	(μM)	$\sum [MFP]$ à l'état stationnaire à 37°C	0.03

TAB. 8.3: Estimation des paramètres et concentrations à l'état d'équilibre pour les 5 espèces réactionnelles à 37°C.

on a représenté la valeur du paramètre, pour les 400 meilleurs jeux de paramètres obtenus, en fonction du score normalisé au maximum (voir Fig .E.1 en annexe). La forte dispersion des paramètres n'est pas surprenante compte-tenu de la précision des données expérimentales. Cependant, tous les jeux de paramètres obtenus se trouvent dans la même région de l'espace des paramètres, ce qui veut dire que le meilleur jeu de paramètres présenté dans la table 8.3 est représentatif de toutes les solutions.

Nous avons également étudié la dispersion des états d'équilibre à 37°C pour les différents jeux de paramètres (voir Fig. E.2 en annexe). Les concentrations relatives sont fortement conservées d'un jeu de paramètres à l'autre. Par exemple, tous les jeux de paramètres indiquent (i) une très faible valeur pour la concentration totale en *MFP* dont une grande partie en complexe avec les *hsp* et (ii) la plupart des *HSF1* sont en complexe avec les *HSP*.

8.2.4 Évolution temporelle des espèces réactionnelles

Nous avons représenté dans la figure 8.5 l'évolution temporelle pour chaque espèce réactionnelle ainsi que pour la concentration totale en *HSF1* et *HSP*. L'estimation des paramètres à l'état stationnaire est extrapolée pour des stress plus longs (12 h) pour laisser le système atteindre son état d'équilibre.

Pour les stress à 41 et 42°C, la production de *MFP* est régulée par les *HSP* initialement présentes sans nécessité de dissocier totalement le complexe *HSP : HSF1*. Ainsi, la transcription des *HSP* augmente légèrement du fait de l'augmentation faible du niveau d'*HSF1* libre. Une fois les *MFP* régulée par les *HSP*, celles-ci sont disponibles pour venir dissocier le complexe *HSF1₃ : HSE*. Pour le stress à 43°C, durant les premières heures, toutes les *HSP* libres se lient aux *MFP*. Puis le complexe *HSP : HSF1* se dissocie pour libérer *HSF1* et *HSP*. Le niveau d'*HSF1* libre augmente. Les *HSF1* se trimérisent alors rapidement et activent la transcription d'*HSP* (révélée par l'augmentation de la concentration totale en *HSP*). Une fois que la transcription des *HSP* est

suffisante pour réguler les *MFP* (aux environs de 4 h de stress thermique), le monomère d'*HSP* libre est disponible pour se lier au monomère d'*HSF1* et réprimer sa propre transcription. La concentration totale en *HSP* augmente alors plus lentement. La concentration en *MFP* libre est maintenue à une valeur très basse et toutes les espèces relaxent alors vers leur nouvel état d'équilibre.

Le fait que la durée du plateau à 43°C correspond exactement à celle observée expérimentalement par K. Abravaya *et al.* [175] n'est pas un point critique. Le plateau peut être prolongé en modifiant légèrement un des paramètres tel que la constante de Michaelis-Menten K_M ou le niveau de régulation P_0 .

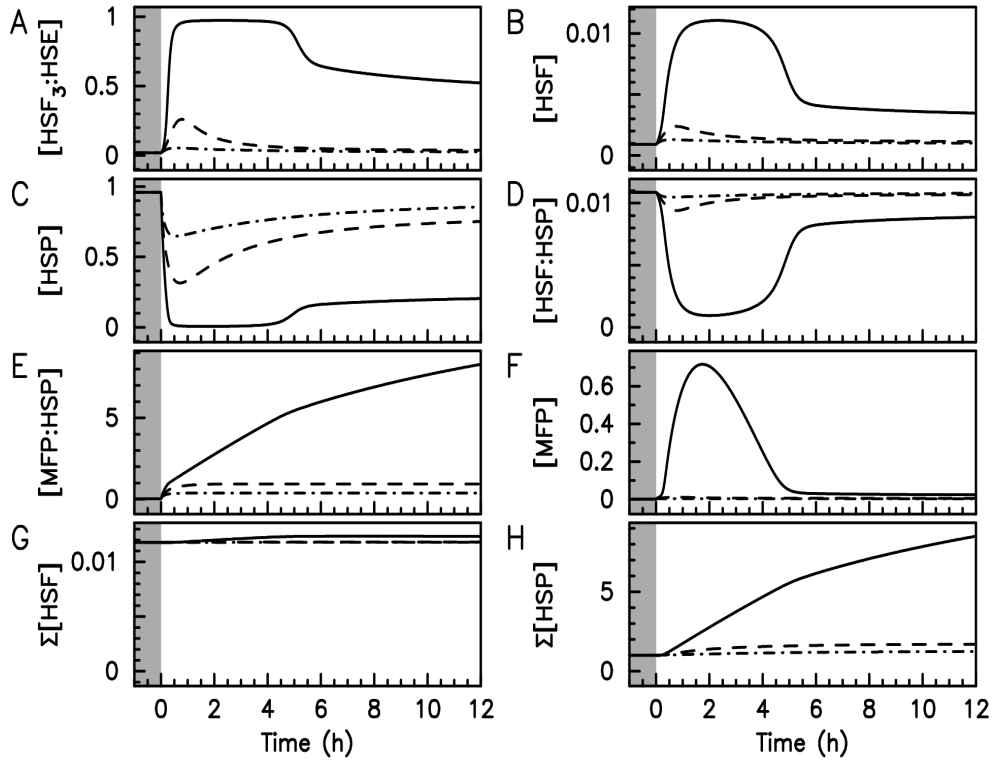


FIG. 8.5: Évolution temporelle de toutes les espèces réactionnelles du modèle minimal. La dynamique de chaque espèce est représentée pour les stress continu à 41 (points et pointillés), 42 (pointillés) et 43°C (ligne pleine).

8.2.5 Conclusions du modèle de titration minimal

Mise en évidence de trois régimes de température

La figure 8.6 représente la variation relative des états stationnaires pour le jeu de paramètres de la table 8.3 pour une large gamme de température. Pour illustrer le déplacement de l'état d'équilibre avec la température, nous avons défini pour les 5 espèces réactionnelles du modèle minimal, la variation relative $\sigma_i(T)$:

$$\sigma_I(T) = \frac{[I]_T^*}{[I]_{37C}^*} \quad (8.9)$$

qui normalise la concentration d'une espèce à l'état stationnaire à la température T à la concentration de cette espèce à l'état stationnaire à 37°C (I est une des 5 espèces réactionnelles).

Ce résultat montre l'existence de deux seuils de température dénommés T_{th} et T_{bk} caractérisant la dépendance de l'état stationnaire avec la température. Pour une élévation de température en dessous de $T_{th} \simeq 42^\circ\text{C}$, on observe une faible variation de l'état stationnaire avec la température.

Pour une élévation de température continue au dessus de T_{th} et en dessous de T_{bk} , la variation est forte et il n'y a plus d'état stationnaire au delà de T_{bk} .

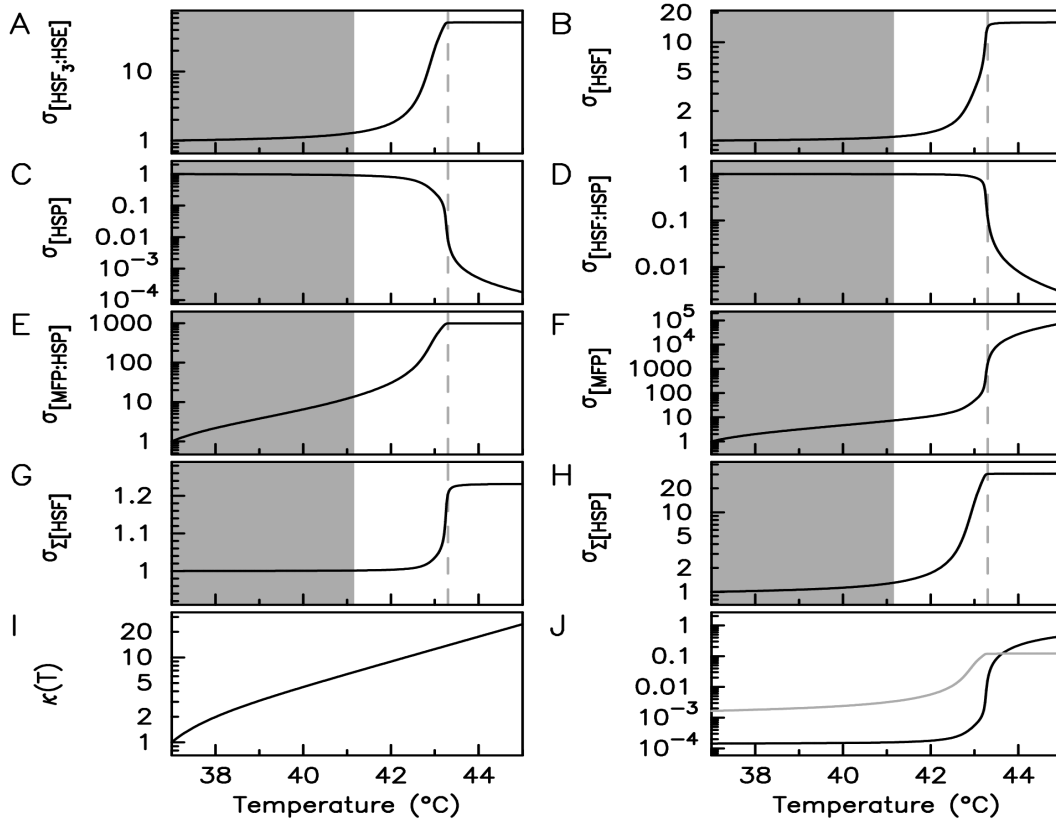


FIG. 8.6: La variation relative σ de l'état stationnaire de chaque espèce réactionnelle induite par une élévation de température continue est déterminée numériquement pour le modèle minimal pour le jeu de paramètres reporté dans la table 8.3. La variation relative est définie comme le rapport entre l'état stationnaire à la température T et l'état stationnaire à 37°C . La variation relative est représentée en échelle logarithmique pour le taux de transcription des *HSP* ((A) : $[HSF1_3 : HSE]$), pour chaque espèce réactionnelle ((B) : $[HSF1]$, (C) : $[HSP]$, (D) : $[HSF1 : HSP]$, (E) : $[HSP : MFP]$, (F) : $[MFP]$) et pour les concentrations totales en *HSF1* et *HSP* ((G) : $\sum[HSF1]$, (H) : $\sum[HSP]$). Le régime de pseudo-adaptation thermique est grisé sur la figure.

Nous avons défini T_{th} comme la limite de température au dessus de laquelle la variation relative des états stationnaires est inférieure à 15 % pour les espèces centrales de la réponse au stress thermique (*HSF1*, *HSP*, et *HSP : HSF1*). Pour une élévation de température continue en dessous de T_{th} , les *MFP* produites sont régulées par les *HSP* initialement présentes sans augmenter significativement le taux de transcription des *HSP*. Dans cette gamme de température, le système montre une **pseudo-adaptation thermique**.

Quand l'élévation de température dépasse T_{th} , la concentration initiale en chaperonne est insuffisante pour réguler les *MFP*, alors le complexe *HSP : HSF1* se dissocie et la transcription des *HSP* est activée. Or, le taux de transcription des *HSP* est limité, un changement de régime apparaît pour une élévation de température continue au dessus de T_{bk} quand la vitesse de transcription des *HSP* n'est pas assez rapide pour dominer, par liaison, le taux de protéines dénaturées. Dans ce **régime de température critique**, la concentration en *HSP : MFP* augmente continuellement dans le temps et il n'y a donc plus d'états stationnaires pour les espèces réactionnelles.

Les valeurs des deux seuils de température T_{th} et T_{bk} définissant les régimes de pseudo-adaptation thermique et de température critique respectivement, sont fortement conservées sur les meilleurs

jeux de paramètres (voir Fig. E.2). Cette conservation montre que ces deux régimes de température sont fortement soutenus par les données expérimentales.

Titration des *HSP* par *HSF1* comme mécanisme clé

Le modèle simplifié met en évidence le mécanisme clé de titrage des *HSP* par *HSF1*. Ainsi, l'affinité importante d'*HSP* envers les *MFP* conditionne la prévalence du complexe *HSP : MFP* par rapport au complexe *HSP : HSF1*, et la dissociation du complexe *HSP : HSF1* lors d'un fort accroissement du niveau de *MFP*. La répression d'*HSF1* par *HSP* ne peut donc intervenir avant que toutes les *MFP* n'aient été dégradées ou réparées.

Mise en évidence du procédé de triage des protéines dénaturées

Notre modèle du stress thermique met en jeu différentes voies pour prendre en charge les protéines dénaturées : celles-ci peuvent être directement dégradées avec un taux δ_{MFP} ou elles peuvent être complexées par les chaperons. Le complexe chaperonne-protéine dénaturée peut soit être dégradé avec un taux $\delta_{MFP:HSP}$, impliquant la destruction de la protéine dénaturée et de la chaperonne, soit conduire à la renaturation de la protéine dénaturée avec un taux $k_r/(K_M + [HSP])$. Dans ce dernier cas, seule la protéine dénaturée disparaît alors que la chaperonne est relarguée du complexe et est donc disponible pour chaperonner d'autres protéines dénaturées.

Le procédé de renaturation est ainsi la voie dominante en cas de stress modéré. On peut alors définir deux indices de flux η_1 et η_2 :

$$\eta_1 = \frac{\delta_{MFP}}{\delta_{MFP} + K_{MFP:HSP}^+ [HSP]}; \eta_2 = \frac{\delta_{MFP:HSP}}{\delta_{MFP:HSP} + k_r/(K_M + [HSP])} \quad (8.10)$$

dont la valeur est comprise entre $[0, 1]$ pour les deux. Une faible valeur de η_1 (respectivement η_2) indique une prévalence de la complexation *MFP : HSP* par rapport à la dégradation des *MFP* (respectivement une prévalence du procédé de renaturation comparé à la dégradation du complexe *MFP : HSP*). Pour des stress de faible intensité ($T < T_{BK}$), η_1 et η_2 sont inférieurs à 10 %, le procédé de renaturation étant le procédé dominant (voir Fig. 8.7). A l'inverse au delà de T_{BK} , η_1 atteint une valeur proche de 1 alors que η_2 reste à une valeur constante de 0.12. Ceci indique une prévalence de la dégradation des *MFP* comparé à leur complexation avec les chaperons, due à un manque de chaperons libres et disponibles.

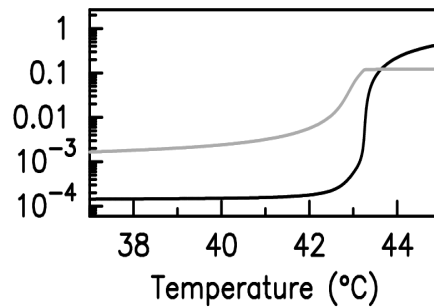


FIG. 8.7: Indices de flux η_1 (noir) et η_2 (gris) pour le chaperonnage des protéines dénaturées.

D'un point de vue biologique, le procédé de chaperonnage des protéines dénaturées par les chaperons n'est pas un processus simple et deux voies distinctes entre en compétition. Une voie de renaturation où la protéine dénaturée est réparée et une voie de dégradation où la protéine dénaturée est amenée au protéasome pour dégradation. Ainsi, de nombreuses études ont démontré la complexité du procédé de renaturation des protéines dénaturées et le mécanisme de triage de ces

protéines (voir chapitre 7). Une hypothèse intéressante explique l'équilibre entre le taux de protéines dénaturées et la capacité des chaperons à les réparer, et établit un lien avec la survie cellulaire [242].

(1)-**En cas de stress 'compensé'** : la transduction des signaux de prolifération est effective, les cellules peuvent être temporairement arrêtée, mais finalement elles se divisent normalement.

(2)-**En condition de stress 'modéré'** : les chaperons régulent les protéines dénaturées, les signaux de prolifération cellulaire sont stoppés, le cycle cellulaire est interrompu de manière irréversible et la cellule entre dans une phase de sénescence.

(3)-**Si le stress devient 'létal' pour la cellule** : les chaperons ne sont plus opérationnelles, les protéines kinases de stress sont activées et l'inhibition du protéasome conduit à l'apoptose.

(4)-**En condition de stress 'supralétal'** : il y a une perte complète de l'activité de chaperonne, accumulation de céramides et déplétion de l'ATP qui conduit à la nécrose de la cellule.

Les stress continus à 41 et 42°C, seraient alors des stress 'compensés' ou 'modérés' où les chaperons seraient capables de réguler les dégâts des protéines dénaturées. Le stress continu à 43°C serait alors un stress 'létal' où la capacité des chaperons à réparer les dégâts serait totalement dépassée et la cellule ne serait plus capable de maintenir sa protéostasie.

8.2.6 Prédications du modèle minimal sur la thermotolérance

Une des premières fonction physiologique associée à l'accumulation induite par le stress des *HSP70* inductibles, est la thermotolérance. La thermotolérance se définit comme la capacité d'une cellule ou d'un organisme à devenir résistant au stress thermique après un premier stress non létal [243]. On différencie la thermotolérance aiguë ("acute thermotolerance") obtenue après un traitement thermique bref à 42-45°C suivie d'une recouvrance à 37°C de la thermotolérance chronique ("chronic thermotolerance") obtenue par une exposition prolongée à des températures non létales de 38-40°C [240].

Le phénomène de thermotolérance est transitoire et dépend majoritairement de la sévérité du premier traitement thermique : en général plus le traitement thermique initial est important, plus grande sera l'amplitude et la durée de la thermotolérance. Cet état de thermotolérance qui suit le premier traitement thermique apparaît après plusieurs heures et dure entre 3 et 5 jours [243]. Des études ont permis de mettre en évidence le lien entre la cinétique de l'induction et de la décroissance de la thermotolérance à des changements parallèles dans l'induction et la dégradation d'*HSP70* [244, 245].

Nous avons voulu tester les prédictions du modèle sur le comportement cellulaire vis-à-vis de la thermotolérance. Les expériences de thermotolérance consiste à "préparer" les cellules à un choc thermique, par un pré-traitement thermique visant à préparer la cellule à répondre au stress. Les cellules, cultivées à 37°C, sont soumises à un stress de 1 h à 44°C suivi d'une recouvrance à 37°C de durée différente et ensuite une second stress de 1 h à 44°C est appliqué. Le niveau de survie relatif est défini comme le rapport du taux de survie pour une durée de recouvrance donnée sur le taux de survie pour une durée de recouvrance nulle. Les résultats expérimentaux (points de la figure 8.8 (A)) montre qu'une durée de recouvrance supérieur à 3 h multiplie par 5 la fraction de cellules survivantes. En d'autres termes, un stress de 2 h à 44°C fait plus de dégâts que deux stress de 1 h séparés par un temps de recouvrance à 37°C.

Les résultats numériques concernant les expériences de thermotolérance sont en bon accord avec les données expérimentales (voir Fig. 8.8 (A)). Même si l'accord n'est pas optimal pour des durées de recouvrance inférieure à 3 h, la valeur du niveau asymptotique est correcte.

Nous avons détaillé l'évolution du niveau total des protéines dénaturées (i.e $[MFP] + [MFP : HSP]$) dans ces expériences de thermotolérance (Fig. 8.8 (B)). A 42°C, l'intégrale sous la courbe grise (correspondant à un stress de 2 h) est quasiment identique à la somme des deux courbes noires (correspondant aux deux stress de 1 h). En conclusion, il n'y a pas de bénéfice pour la cellule

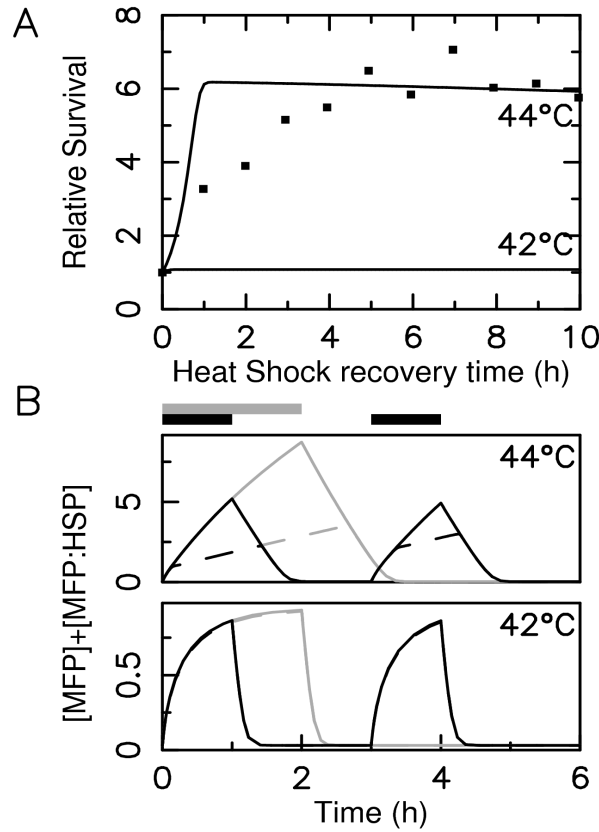


FIG. 8.8: (A) Fraction de survie cellulaire relative pour deux stress thermique de 1 *h* séparés par un temps de recouvrance donné à 37°C pour une élévation de température de 42 et 44°C. Les données expérimentales sont représentées par des points et les lignes pleines représentent les résultats numériques de notre modèle minimal. (B) Résultats numériques du modèle pour la variable $[MFP] + [MFP:HSP]$ à 42 et 44°C, en gris pour un stress de 2 *h* et en noir pour deux stress de 1 *h* séparés par une recouvrance de 2 *h* à 37°C.

à fractionner le traitement thermique. Ceci est en accord avec la figure 8.8 (A) qui indique un taux de survie identique quel que soit la durée de recouvrance à 37°C. Le comportement à 44°C est radicalement différent, où l'intégrale sous la courbe grise est supérieure à la somme des deux courbes noires. La concentration totale en protéines dénaturées est plus importante pour un stress de 2 *h* que pour deux stress de 1 *h* séparés par une recouvrance de 2 *h* à 37°C. Ceci est en adéquation avec la figure 8.8 (A) où le niveau de survie est supérieur lors du fractionnement du traitement thermique à 44°C.

En conclusion, au delà de T_{BK} , le fractionnement du traitement thermique est bénéfique pour la cellule et l'effet de thermotolérance apparaît. Lors du premier choc thermique la cellule se prépare en augmentant son niveau basal de chaperons, elle peut alors affronter le second traitement thermique avec un état initial apte à faire face à un stress thermique, réduisant ainsi le taux de mortalité cellulaire.

8.3 Discussion et conclusions

Notre modèle minimal permet de mettre en évidence les ingrédients clés de la réponse au stress thermique et de comprendre de manière simple l'évolution de chaque espèce réactionnelle. Le centre de la réponse au stress thermique est la compétition entre deux complexes : $HSP : HSF1$ et

HSP : MFP. L'affinité de liaison de ces deux complexes diffère de plusieurs ordres de grandeur et induit la prédominance du complexe *HSP : MFP* face au complexe *HSP : HSF1*.

De nombreuses études ne parviennent pas à expliquer le plateau observé pour le stress continu à 43°C même avec des modèles mathématiques détaillés [225–227]. L'ingrédient clé de notre modèle simplifié est la cinétique de Michaelis-Menten pour la dissociation d'*HSP* de la molécule chaperonnée. D'un point de vue biologique, cela peut se comprendre simplement en termes de ressources énergétiques de la cellule. Les fonctions de renaturation ou de conduite à dégradation des protéines dénaturées des *HSP*, sont des mécanismes nécessitant de l'énergie sous forme d'ATP. Les ressources énergétiques de la cellule étant limitées, ce mécanisme de chaperonnage des *MFP* par les *HSP* sature quand la quantité de *MFP* produite dépasse les capacités de régulation de la cellule.

Un modèle mathématique développé par Sriram *et al.* [229] utilise les mêmes données expérimentales pour l'estimation des paramètres et ont une approche similaire à la nôtre pour la description quantitative des données. Ce modèle très détaillé (27 équations différentielles ordinaires), décrit les étapes de trimérisation d'*HSF1*, de phosphorylation et les changements de conformation des *HSP90* nouvellement synthétisées. Mais l'interaction entre *HSP90* et les protéines dénaturées n'est pas décrite. Il est également difficile de comprendre la relation claire entre l'élévation de température expérimentale et la sévérité du stress dans le modèle. Ce modèle ne permet pas d'appréhender de manière simple la dynamique du réseau de régulation du stress thermique. En comparaison, notre modèle est simpliste mais donne un accord similaire avec les données expérimentales, il permet d'établir un lien direct avec l'élévation de température expérimentale.

L'analyse des états stationnaires des espèces réactionnelles du modèle minimale fait apparaître trois régimes de stress :

- Les stress 'normaux' : pour $T < 42^{\circ}\text{C}$** caractérisé par une pseudo-adaptation thermique.
- Les stress 'modérés' : pour $42 < T < 43.3^{\circ}\text{C}$** où la transcription des chaperons est activée et où la cellule est capable de réguler le niveau de protéines dénaturées.
- Les stress 'sévéres' : $T > 43.3^{\circ}\text{C}$** où la cellule est incapable de réguler la production des protéines dénaturées qui s'accumulent dans la cellule. Ce type de stress pourrait conduire à la mort cellulaire.

Il est intéressant de noter que Sriram *et al.* [229] ont également trouvé ces trois régimes de température en utilisant un autre modèle mathématique. Dans notre modèle, ce qui est surprenant est que les températures limites pour ces trois régimes sont fortement conservées sur l'ensemble des jeux de paramètres. Cette conservation montre une corrélation très forte entre l'existence de ces trois régimes de température et les données expérimentales. Ces trois régimes de température rejoignent la classification des stress proposée par C. Söti *et al.* [242] avec des stress 'compensés' ou 'modérés' où les chaperons régulent les *MFP*, et les stress 'létaux' ou 'supralétaux' où les protéines chaperons sont dépassées et la survie de la cellule compromise.

Les valeurs obtenues pour les concentrations des espèces réactionnelles à l'équilibre sont en accord avec ce que l'on attend pour le réseau de régulation du stress thermique : peu de *MFP*, les *HSF1* majoritairement en complexe avec les *HSP*, une concentration suffisante en *HSP* pour conformer les protéines nouvellement synthétisées, alors qu'aucun ajustement n'a été effectué dans ce sens. Cette cohérence globale des résultats indique certainement que notre modèle est bien adapté aux jeux de données expérimentales.

Un point original de ce modèle simplifié est le lien entre le réseau de régulation du stress thermique et la probabilité de survie cellulaire. Bien que le lien utilisé soit purement phénoménologique (aucun lien direct de couplage entre la réponse au stress thermique et le cycle cellulaire n'a été utilisé), cette description basique permet de relier les variations de viabilité cellulaire à l'intensité et à la durée des traitements thermiques. Ces résultats préliminaires de couplage entre le réseau de régulation du stress thermique et la survie cellulaire sont encourageants. Ils montrent qu'un modèle

simple permet de décrire quantitativement les résultats expérimentaux de la réponse cellulaire au stress thermique. Sans aucun ajustement, notre modèle minimal est aussi capable de reproduire avec un bon accord les expériences de thermotolérance. Notre étude permet de faire le lien entre le réseau de régulation du stress thermique et la probabilité de survie cellulaire face aux fractionnements d'un stress thermique.

***SIRT1* : à la croisée du stress thermique et du métabolisme**

Une étude a permis de révéler que le niveau de protéines de stress thermique affecte la vitesse de désassemblage des trimères d'*HSF1*, mais qu'un autre mécanisme, jusqu'alors inconnu, semblait contrôler la dissociation de la forme active d'*HSF1* sur les *HSE* [246]. Ainsi, la phase d'atténuation de la réponse au stress thermique ne semblerait pas uniquement dépendante du niveau intracellulaire d'*HSP70*. D'autres études ont montré que l'activation de la déacétylase *SIRT1* prolonge la fixation d'*HSF1* aux promoteurs des gènes d'*HSP70* en maintenant *HSF1* dans un état déacétylé capable de se lier à l'ADN [41]. À l'inverse, la régulation négative de *SIRT1* accélère l'atténuation de la réponse au stress thermique et la dissociation d'*HSF1* des sites *HSE*. *SIRT1* joue un rôle dans l'atténuation de la réponse au stress thermique. Des modifications dans la concentration et l'activité de *SIRT1* régulent l'atténuation de la réponse au stress thermique. Un mécanisme possible est que l'acétylation de la lysine K80 d'*HSF1* entraîne le relargage des trimères d'*HSF1* de l'ADN, et représente une étape dans l'atténuation de la réponse au stress thermique. Ainsi, ces deux études semblent mettre en évidence un nouveau mécanisme clé dans la phase d'atténuation de la réponse au stress thermique dans lequel *SIRT1* jouerait un rôle clé en prolongeant (activation de *SIRT1*) ou écourtant (régulation négative de *SIRT1*) la fixation d'*HSF1* sur les sites *HSE*.

HSF1 est au centre d'un réseau de régulation dans lequel la nutrition cellulaire, le stress et la durée de vie sont liés [41]. De nombreux facteurs de transcription régulés par *SIRT1*, incluant *FOXO3*, *p53* et *NF-κB* ont des rôles importants dans la réponse cellulaire au stress. L'addition d'*HSF1* à ces réseaux de régulation du stress souligne le rôle central de *SIRT1* dans la protéostasie [41] et pourrait lier la réponse moléculaire du stress thermique aux demandes métaboliques. Le déclin de la réponse au stress thermique semble fortement lié à l'âge, et pourrait s'expliquer au moins en partie par le contrôle de *SIRT1* sur l'activité d'*HSF1*. À l'échelle de l'organisme, la régulation des gènes cibles d'*HSF1* pourrait être influencée par les régimes ou la nutrition [41].

Un modèle mathématique prenant en compte l'activité de *SIRT1* sur la dynamique du complexe *HSF1*₃ : *HSE* en conditions de stress thermique permettrait de comprendre le rôle de cette sirtuine dans les mécanismes de régulation et également de faire le lien entre réseaux de régulation du stress thermique et du métabolisme.

La simplification de la réponse au stress thermique présente un avantage certain pour faire le lien entre différents réseaux de régulation, tels que (1) le cycle cellulaire [247, 248] (via les interactions entre *HSF1* et *P53*, *HSP* et *P21* pour étudier la viabilité cellulaire et raffiner la description de la thermotolérance, (2) l'horloge circadienne [249, 250] (via la régulation négative d'*HSF1* sur l'activité transcriptionnelle *BMAL1* : *CLOCK1*) pour élucider l'influence du stress thermique sur l'horloge circadienne, (3) le métabolisme (via les interactions entre *HSF1* et *SIRT1*) [41].

Modifications post-traductionnelles d'*HSF1* : pour une régulation fine d'*HSF1*

Il apparaît que les modifications post-traductionnelles (PTMs) d'*HSF1* (notamment sa phosphorylation) sont des étapes nécessaires à l'activité transcriptionnelle de celui-ci. Ainsi, des niveaux de phosphorylation différents pourraient réguler l'activité transcriptionnelle d'*HSF1* (voir discussion dans 2.3). Les PTMs d'*HSF1* induisent une régulation fine de l'activité d'*HSF1*.

La hiérarchisation des mécanismes fins de régulation par rapport à la description "gros grains" des mécanismes réactionnels de titration n'est pas clairement établie à l'heure actuelle. Ainsi, la prise en compte des modifications post-traductionnelles d'*HSF1* dans un modèle mathématique, permettrait

de sonder l'importance de ces mécanismes réactionnels dans la réponse au stress thermique et si ces PTMs apparaissent comme des mécanismes clés du réseau de régulation.

Chapitre 9

Induction d'un stress thermique par laser

Nous avons développé un modèle de titration minimal capable de reproduire les expériences d'activation d'*HSF1* et de viabilité cellulaire.

Cependant, très peu de données sur la dynamique de réponse au stress thermique existent dans la littérature. Une vision statique du réseau de régulation du stress thermique, résultant en une description détaillée de toutes les espèces réactionnelles, ne suffit pas à appréhender les mécanismes de régulation. En complément, l'étude de la dynamique d'un système permet de révéler des mécanismes de réponse et de sonder les échelles de temps de ces processus. Aujourd'hui, les granules de stress nucléaires apparaissent comme des candidats intéressants pour évaluer la dynamique temporelle de réponse au stress thermique.

C'est dans ce contexte que j'ai réalisé un dispositif expérimental permettant d'étudier la cinétique temporelle des granules de stress nucléaires, par microscopie de fluorescence, lors de l'induction d'un stress thermique par laser. Dans une dernière étape, nous avons testé de manière préliminaire les prédictions du modèle de titration minimal pour des conditions de stress thermique données.

9.1 Dispositif expérimental pour l'induction d'un stress thermique par laser

9.1.1 Introduction

Pour se diviser et vivre de manière optimale, les cellules sont cultivées dans un milieu de culture leur apportant les nutriments et minéraux essentiels à leur croissance. En culture, les cellules sont maintenues à 37°C dans un incubateur possédant une atmosphère humidifiée à 5 % de CO_2 pour maintenir un pH optimal.

Afin de maintenir les cellules dans des conditions de croissance optimale, un "mini incubateur" régulé en gaz et en température a été développé par notre équipe. Les cellules sont cultivées dans des boîtes en polystyrène (35 cm^2) et sont placées dans cet incubateur pour leur observation sous microscope. Le débit des gaz N_2 , O_2 et CO_2 est contrôlé de manière à maintenir l'incubateur à la composition atmosphérique en gaz (75 % N_2 , 20 % O_2 , 5 % CO_2). Un réservoir d'eau placé à l'intérieur permet de saturer l'atmosphère en H_2O . Cet incubateur possède des ouvertures optiques permettant de visualiser en microscopie les cellules adhérentes aux fond des boîtes de culture (cf Fig. 9.1).

Nous avons vérifié que les cellules se divisent de manière normale lorsqu'elles sont placées à l'intérieur de cet incubateur. Les cellules peuvent ainsi être observées durant 2 à 3 jours en vidéo-microscopie. Dans notre étude, nous avons utilisé des cellules HEK (cellules embryonnaires de rein humaines) transfectées de manière stable. Ces cellules expriment de manière stable le facteur de transcription *HSF1* taguée par la protéine fluorescente *eGFP*. Cette lignée a été obtenue par l'équipe de C. Vourc'h et C. Souchier au sein de l'institut Albert Bonniot de Grenoble dont le détail est présenté en annexe C.1.

9.1.2 Description du dispositif expérimental

Afin d'induire un stress thermique par laser, un laser infrarouge (IR) Raman à fibre accordable autour de 1270 nm est injecté dans le microscope à l'aide d'une lentille (L_1) de focale $f_t = 200\text{ mm}$. Un miroir dichroïque (D_{vis-IR})¹ placé à 45° permet de réfléchir le faisceau laser IR et son injection au travers d'un objectif de grandissement $40\times$. La distance L_1 /objectif est ajustée de manière à collimater au mieux le faisceau laser derrière l'objectif. La taille FWHM du faisceau laser derrière l'objectif $40\times$ est $\sim 34\text{ }\mu\text{m}$.

Le miroir dichroïque permet de transmettre la lumière visible pour visualiser les cellules. L'image des cellules est ensuite projetée dans le plan de la caméra à l'aide d'une lentille de fin de tube (L_t) de focale $f_t = 200\text{ mm}$.

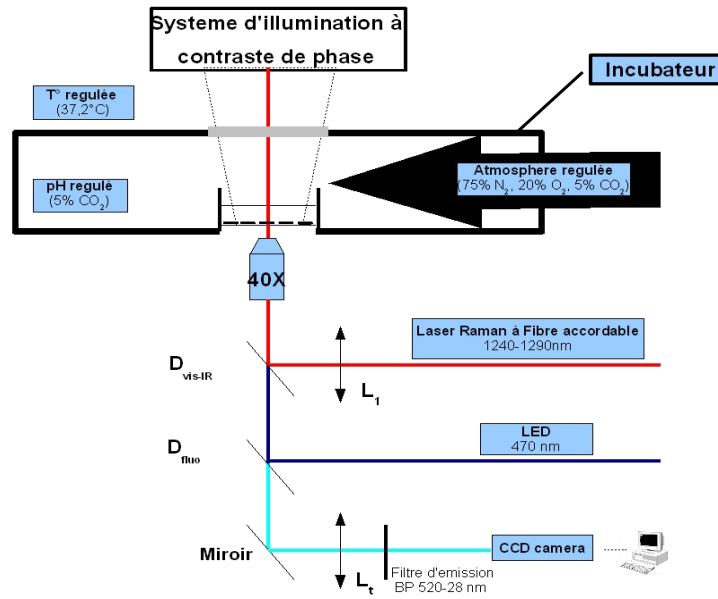


FIG. 9.1: Schéma du dispositif expérimental pour l'induction d'un stress thermique par laser.

Les cellules peuvent être observées en transmission à l'aide de ce dispositif. Nos cellules sont transfectées, et expriment de manière stable la facteur de transcription *HSF1* tagué par la protéine fluorescente *eGFP*. Les caractéristiques spectrales de l'*eGFP* sont $\lambda_{max,ex} = 470\text{ nm}$ pour l'excitation et $\lambda_{max,em} = 514\text{ nm}$ pour l'émission (voir Fig. 9.2).

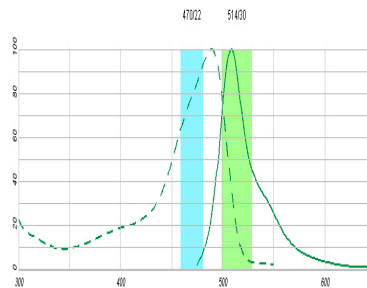


FIG. 9.2: Spectre d'excitation et d'émission de l'*eGFP*.

Dans notre dispositif expérimental, une LED² émettant à 470 nm est utilisé pour l'excitation de l'*eGFP*. Le faisceau lumineux à 470 nm est réfléchi à l'aide d'un miroir dichroïque (D_{fluo}) placé à

¹Miroir dichroïque : Composant optique permettant la séparation de deux ondes lumineuses de deux longueurs d'onde différentes. L'une est transmise et l'autre est réfléchie.

²LED pour light emitting diode

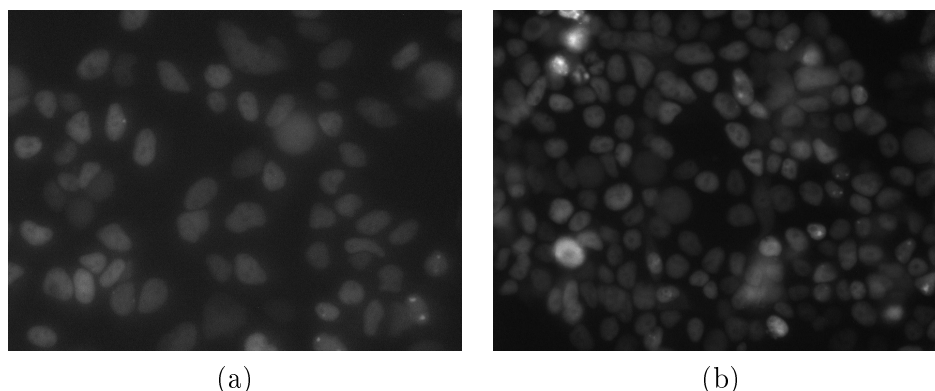


FIG. 9.3: (a) et (b) Images de fluorescence des cellules HEK *HSF1-eGFP* observées au travers un objectif 40 $\times$ sur le microscope. L'excitation est réalisée avec une LED émettant à $\lambda_{ex} = 470$ nm. La collection de la fluorescence de l'*eGFP* est réalisée avec une caméra CCD comportant un filtre BP_{520} (28 nm).

45°, et passe au travers de l'objectif 40 $\times$ pour venir exciter l'*eGFP*. Un filtre (BP_{520}) placé devant la caméra permet de collecter de manière sélective l'émission de l'*eGFP*. Ce dispositif comprend également un obturateur positionné devant le laser infrarouge, ce qui permet de réaliser des séries temporelles souhaitées pour les traitements thermiques. On peut ainsi réaliser des stress courts ou longs, et également jouer sur un temps inter stress en cas de stress successifs.

9.1.3 Premières observations en absence de stress

Les images 9.3 montrent les cellules HEK transfectées *HSF1-eGFP* placées dans l'incubateur, observées au travers l'objectif 40 $\times$ par microscopie de fluorescence.

On observe une fluorescence répartie de manière homogène dans le noyau des cellules. En absence de stress le facteur de transcription *HSF1* tagué par l'*eGFP* est localisé de manière prépondérante dans le noyau des cellules et semble être exclu du cytoplasme et des nucléoles. L'intensité de fluorescence est variable d'une cellule à l'autre (± 20 %). Certaines cellules présentent également des granules de stress spontanés, i.e des granules présents en absence de stress. Des granules de stress secondaires sont observés en cellules tumorales contenant un plus grand nombre d'*HSF1* que les cellules primaires, ou dans les cellules surexprimant *HSF1* [200]. Ainsi, la fixation d'*HSF1* vers des cibles chromosomiques secondaires dépend de la quantité d'*HSF1*. L'observation de granules spontanés pourraient donc être liée à la surexpression d'*HSF1* induite par l'insertion dans le génome du facteur de transcription *HSF1-eGFP*.

9.2 Détermination de l'élévation de température

9.2.1 Méthode

Il est difficile d'évaluer l'élévation de température induite par la laser IR pour les cellules adhérentes au fond de la boîte de culture. En fluide, l'utilisation de la rhodamine B est pertinente dans le but d'obtenir une information spatio-temporelle sur le champ de température pour l'étude de la convection au dessus d'une plaque horizontale chauffée [251]. Cette technique a été ensuite exploitée en microfluidique et en microscopie pour évaluer l'échauffement induit par les lasers dans les expériences de piège optique [252, 253].

Nous allons ici décrire le principe de la mesure à l'aide d'un colorant dont la fluorescence dépend de la température. Puis, nous verrons comment de potentiels effets de lentille thermique peuvent conduire à une mesure de température erronée et nous montrerons que l'utilisation d'un colorant

de référence est nécessaire. Nous décrirons ensuite la réalisation pratique de la mesure cinétique de température en détaillant le dispositif expérimental.

Principe de la mesure

La mesure de température repose sur l'utilisation de composés fluorescents. Nous allons rappeler ici brièvement cette notion de fluorescence. La fluorescence est un processus de désexcitation radiatif. Une molécule exposée à une onde électromagnétique résonante absorbe une partie de l'énergie de l'onde. La molécule subit une transition entre l'état fondamental (dénoté S_0) et un état électronique excité (S_1). Deux voies de désexcitation sont alors possibles : radiative ou non radiative (voir Fig. 9.4).

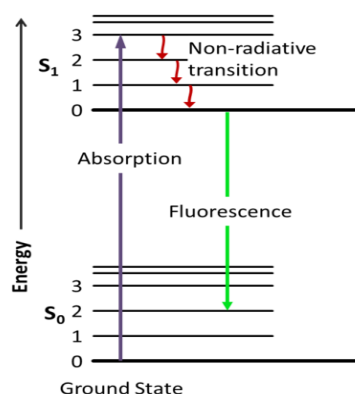


FIG. 9.4: Diagramme de Jablonski simplifié.

Le premier processus est radiatif : il y a émission d'un photon, c'est la fluorescence. L'énergie du photon réémis dépend de l'écart entre le niveau excité et le niveau fondamental. La fluorescence est en général précédée par une relaxation vibrationnelle, la longueur d'onde du photon émis est alors supérieure à la longueur d'onde d'excitation [254].

Le second processus est non radiatif : le surplus d'énergie est dissipé dans le solvant sous forme de chaleur [254]. La molécule excitée peut également se désexciter de manière non radiative par collision avec le solvant.

L'efficacité quantique (ϕ) du mécanisme de fluorescence se définit comme le ratio entre l'énergie lumineuse émise et l'énergie absorbée. L'énergie lumineuse par unité de volume (I en $W.m^{-3}$), émise par fluorescence s'écrit :

$$I = I_0 \cdot \phi \cdot [S_0] \cdot \epsilon \quad (9.1)$$

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

Pour la plupart des colorants organiques, l'efficacité quantique dépend de la température. La part de désexcitation non radiative (collisions avec le solvant) augmente avec l'agitation thermique. Ainsi, la part de désexcitation radiative (fluorescence) diminue avec la température. Cette dépendance du rendement quantique avec la température est souvent faible. Cependant, pour quelques composés comme la rhodamine B, la variation peut atteindre $\frac{1}{\phi} \cdot \frac{\delta \phi}{\delta T} \sim 2 \%K^{-1}$, alors que le coefficient varie peu : $\frac{1}{\epsilon} \cdot \frac{\delta \epsilon}{\delta T} \sim 0.05 \%K^{-1}$ [251].

On peut donc utiliser cette variation de fluorescence pour mesurer la température. Ayant calibré au préalable l'intensité de fluorescence de la rhodamine B avec la température, il suffit alors de

faire une image du plan des cellules par microscopie de fluorescence en présence du faisceau laser IR. A partir d'une image de l'intensité de fluorescence de la rhodamine B, on peut déterminer la cartographie de température induite par le laser.

Problème de lentille thermique

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. Nous avons observé une modification notable de la propagation d'un faisceau laser rouge (633 nm) traversant le milieu de culture en présence du faisceau laser à 1270 nm. Ceci indique un effet de lentille thermique.

Origine de cet effet :

Pour la plupart des milieux denses, l'indice de réfraction varie de manière significative avec la température. C'est le cas de l'eau par exemple, dont l'indice de réfraction passe de 1.33211 à 20°C à 1.32972 à 40°C [255]. La boîte de culture des cellules présente elle aussi une variation de son indice de réfraction avec la température $\frac{\delta n}{\delta T}$ (voir Fig. 9.5).

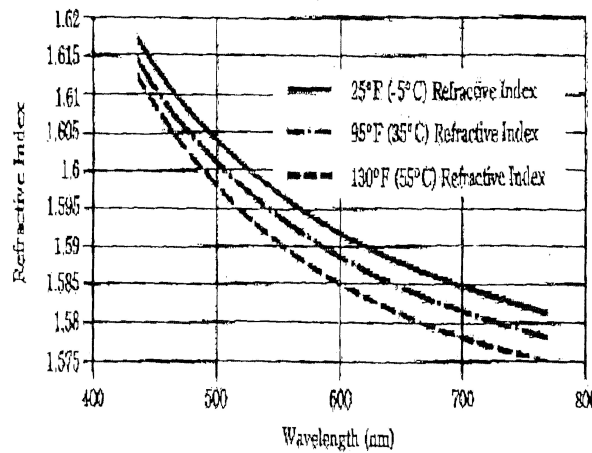


FIG. 9.5: Variation de l'indice de réfraction de la boîte de Petri en fonction de la température et de la longueur d'onde (données constructeur).

Ainsi, une variation locale de la température va induire une variation locale de l'indice de réfraction qui suit le profil de température. Ce champ d'indice va alors modifier la propagation d'un faisceau lumineux le propageant, c'est ce qu'on appelle l'effet de lentille thermique.

On peut écrire le développement de Taylor pour l'indice de réfraction, tel que :

$$n(T(M)) \approx n(T_0) + \frac{\delta n}{\delta T} \times (T(M) - T_0) \quad (9.2)$$

Si on considère une onde plane incidente sur le champ de température (voir Fig. 9.7), l'élévation de température $T(M) - T_0$ est positive au centre et l'indice de réfraction décroît avec la température ($\frac{\delta n}{\delta T} < 0$). Donc l'indice de réfraction est plus petit au niveau de l'élévation de température qu'au loin. L'épaisseur de la boîte de culture, chauffée très localement se comporte donc comme une lentille divergente coïncidant avec le faisceau laser et ses dimensions.

Ce champ d'indice va également influencer la propagation de la lumière d'excitation, la lentille divergente va tendre à diminuer l'intensité d'excitation au niveau de l'élévation de température. Ceci peut donc fausser la mesure, car tout se passe comme si le colorant fluorescait moins au centre du faisceau laser qu'à l'extérieur. On surestimerait ainsi la température.

Afin de s'affranchir de cet effet de lentille thermique, il est nécessaire de compenser les variations locales de lumière incidente et émise, en utilisant un colorant de référence dont l'efficacité quantique ne dépend pas de la température [251]. Si les propriétés spectrales (longueurs d'onde d'excitation et d'émission) des deux colorants sont les mêmes, les déformations induites par le champ de température seront les mêmes. La mesure du ratio des intensités de fluorescence des deux colorants va donc permettre l'évaluation de la cartographie thermique tout en s'affranchissant des effets de lentille thermique [251].

9.2.2 Réalisation pratique

Nous avons choisi d'utiliser la rhodamine 110 comme colorant de référence. En effet, comme le montre la table 9.1, les longueurs d'excitation et d'émission sont assez proches. La même source lumineuse va donc pouvoir être utilisée pour les deux colorants afin de s'affranchir des effets thermiques. On s'intéresse ici à la mesure de température au niveau du plan des cellules, c'est-à-dire un plan infiniment petit ($\sim \mu m$) en comparaison de l'épaisseur de la boîte de culture (1 mm) qui contribue à l'effet de lentille thermique. La variation d'indice de réfraction du plastique est identique à 520 nm (maximum d'émission de la rhodamine 110) qu'à 575 nm (maximum d'émission de la rhodamine B). La rhodamine 110 est donc un bon candidat en tant que colorant de référence.

TAB. 9.1: Caractéristiques spectrales de la rhodamine B et de la rhodamine 110 dans l'eau à 20°C. Valeurs extraites de documentations techniques en accord avec les valeurs publiées [251].

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

Deux solutions de rhodamine B et 110 ont été formulées dans l'eau (voir annexe F.1 pour le détail de la formulation). L'eau est un bon modèle pour évaluer l'échauffement dans le milieu de culture car celui-ci est composé à 80 % d'eau. De plus, le coefficient d'absorption du milieu de culture à 1270 nm est identique à celui de l'eau.

Calibration élévation de température

Le dispositif expérimental utilisé pour la calibration et la mesure de température est identique à celui utilisé dans les expériences d'irradiation (voir Fig. 9.1). Dans notre dispositif expérimental, la lumière d'excitation est identique pour les deux colorants. Un filtre d'émission identique est utilisé pour la collection de fluorescence des deux rhodamines sur la caméra. Ce choix est délibéré et il permet l'obtention d'images propres lors de l'analyse du ratio des intensités des rhodamines. Ceci implique la nécessité de séparer les deux colorants dans deux boîtes de culture distinctes.

Afin de réaliser la cartographie thermique du champ de température, il est nécessaire de calibrer le ratio des intensités de fluorescence des deux rhodamines en fonction de la température. Pour ce faire, les deux solutions de rhodamine sont placées dans deux boîtes de culture distinctes à l'intérieur de notre mini-incubateur. L'intensité de fluorescence de chacun des colorants est collectée à l'aide de la caméra pour des températures d'incubateur comprises entre 37 et 60°C. Pour chaque température et chaque colorant, 100 images sont prises. Comme le montre la figure 9.6 (a), la fluorescence de la rhodamine B décroît de manière linéaire avec la température. La fluorescence de la rhodamine 110 est quant à elle quasiment invariante avec la température. Ces images sont ensuite moyennées pour chaque colorant et on obtient ensuite une image du ratio des intensités à l'aide du logiciel ImageJ [256]. On obtient ainsi le ratio des intensités de fluorescence des deux rhodamines calibrés avec la température (cf Fig. 9.6 (b)).

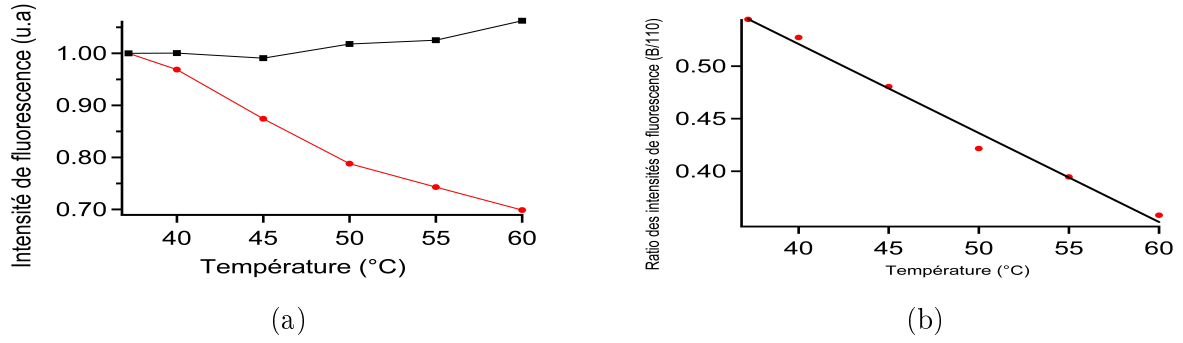


FIG. 9.6: (a) Intensité de fluorescence des rhodamine B (rouge) et 110 (noir) en fonction de la température. (b) Ratio des intensités de fluorescence de la rhodamine B sur la rhodamine 110.

Élévations de température derrière l'objectif de microscope

La même procédure est ensuite appliquée en présence du laser infrarouge en maintenant la température de l'incubateur à 37°C. Le ratio des intensités étant calibré, on peut alors remonter au champ de température induit par le laser. On peut ainsi déterminer la dépendance de l'élévation de température en fonction de la puissance laser (voir Fig. 9.7 (a)). Aux basses puissances laser, cette relation est approximativement linéaire. Aux puissances laser plus importantes, le taux d'accroissement de la température avec la puissance laser semble diminuer. En effet au delà de 400 *mW*, l'élévation de température semble s'affaïsser légèrement.

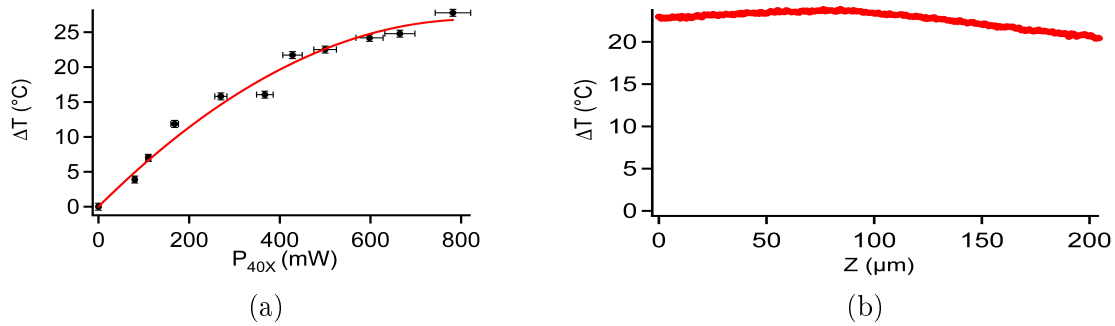


FIG. 9.7: (a) Évolution de l'élévation de température avec la puissance laser infrarouge mesurée derrière l'objectif de microscope 40 *X* (P_{40X}). Les points noirs correspondent aux données expérimentales et la ligne rouge le meilleur ajustement polynomial à l'ordre 2. (b) Profil spatial du champ de température sur le champ de la caméra pour une puissance laser infrarouge derrière l'objectif de microscope de $P_{40X}=500 \text{ mW} \pm 5\%$.

Cartographie thermique au 40X

Les images du ratio des intensités de fluorescence des deux rhodamines permettent d'avoir accès à la cartographie thermique du champ de température, i.e. de connaître l'évolution spatiale du champ de température sur le champ de la caméra.

La figure 9.7 (b) présente l'évolution spatiale du champ de température induit par le laser à 1270 *nm*. Comme on peut s'en rendre compte, le profil spatial du champ de température est sensiblement plat sur les 512×512 pixels du champ de la caméra.

Le profil de température est bien approximée par une fonction gaussienne. La température en un point *M* éloigné d'une distance *r* du centre du spot laser infrarouge est déterminée par l'équation 9.3 :

$$T_{HS} = T_0 + \Delta T \exp^{-2(r/w_{th})^2} \quad (9.3)$$

où, T_{HS} est la température de stress thermique perçue par les cellules située à la distance r du centre du spot laser, T_0 est la température imposée dans l'incubateur qui est de 37.2°C dans nos expériences, ΔT est l'augmentation de température induite par le laser et w_{th} est le rayon de ceinture du profil thermique ($w_0 \sim 500 \mu\text{m}$). Ainsi, à une distance $r = 100 \mu\text{m}$ du centre du spot laser, l'élévation de température est égale à 92 % de l'élévation de température maximum au centre du faisceau laser. Par exemple, pour un stress thermique à 42°C ($\Delta T_{max} = 4.8$), les cellules en bordure de champ subiront une élévation de température de 41.6°C ($\Delta T_{r=100\mu\text{m}} = 4.4$ soit 92 % de ΔT_{max}). Ainsi, le stress thermique subit par les cellules au centre ou sur les bords du champ de la caméra est sensiblement identique.

En pratique, lors de l'exposition des cellules à un stress donné, nous n'avons pas observé de cinétique de réponse des granules de stress nucléaires (activation, temps pour atteindre la maximum et relaxation) de différence forte pour les cellules situées au centre ou sur les bords du champ de la caméra. Cette observation dans la réponse biologique confirme un profil spatial de température sensiblement plat mesuré expérimentalement à l'aide des rhodamines.

Le fait d'avoir un champ de température plat sur le champ de la caméra est un point intéressant dans l'étude de la dynamique du stress thermique en cellules vivantes. En effet, le champ de la caméra couvre une surface de $200 \times 200 \mu\text{m}^2$, ce qui permet l'observation d'approximativement 50 cellules. Ainsi, lors d'une condition de stress donnée, la cinétique des granules contenus dans toutes ces cellules va nous permettre d'avoir accès à la variabilité cellulaire dans la réponse au stress.

Cinétique de l'élévation de température par laser

Le laser induit, comme nous venons de l'évoquer, un champ de température local au niveau du plan des cellules. Nous avons voulu déterminer quelle était la cinétique de cette élévation de température ainsi que la cinétique de dissipation de chaleur lorsque le laser est coupé. Connaître la cinétique d'établissement du profil stationnaire du champ de température est fondamental si l'on veut comprendre et être capable de corréler le traitement thermique appliqué avec la réponse des cellules au stress.

Pour ce faire, nous avons déclenché le laser infrarouge à l'aide d'un obturateur pendant une durée d'environ 50 s, puis l'obturateur est refermé. Un programme a été conçu afin de synchroniser le déclenchement de l'obturateur, l'allumage de la LED et la prise d'images. Ainsi, une image est prise toutes les 250 ms pendant le déclenchement du laser et lors de sa coupure afin de mesurer la variation d'intensité de fluorescence dans le temps pour chacune des deux rhodamines. La figure 9.8 présente la cinétique d'établissement du profil stationnaire de température pour différentes puissances laser.

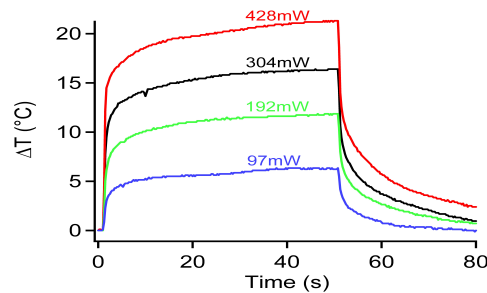


FIG. 9.8: Cinétique d'établissement du profil stationnaire de température induite par laser IR. Le temps d'établissement du profil stationnaire de température est de ~ 3 s.

On observe ainsi que l'état stationnaire pour le champ de température est atteint en quelques secondes (~ 3 s) et que ce temps pour atteindre l'état stationnaire semble augmenter avec la puissance laser (i.e. plus la puissance laser est importante, plus l'état stationnaire est atteint lentement). Lorsque le laser est éteint, la température initiale est rétabli en quelques secondes également ($\sim$

5 s). La dissipation de chaleur est plus lente pour les puissances laser plus importantes ce qui se comprend simplement de manière intuitive : l'élévation de température étant plus importante, la dissipation de chaleur prend alors plus de temps.

9.2.3 Peut-on s'affranchir du stress oxydant ?

Les stress thermiques sont réalisés à la longueur d'onde de 1250 nm soit ~ 20 nm en dessous de la longueur d'onde du maximum d'excitation de l'oxygène moléculaire pour la transition $^3O_2[^3\Sigma_g^-] \longrightarrow ^1O_2[^1\Delta_g]$. Expérimentalement, pour des stress thermiques à priori non létaux, nous avons observé la mort de quelques cellules autour d'une région centrée sur le spot laser (sur un diamètre d'environ 60 μm). Ces cellules meurent rapidement, en ~ 2 heures (visible en transmission) alors que les cellules environnantes continuent à vivre.

Dans les expériences en cuvette dans D_2O , nous avons évalué une section efficace d'absorption à 1250 nm d'environ 8,5 % de celle à 1270 nm (voir Chap. 5). Derrière l'objectif 40 X, l'intensité laser est importante, de l'ordre de 10^4 W.cm $^{-2}$. Même si on est éloigné du maximum de la transition $^3O_2[^3\Sigma_g^-] \longrightarrow ^1O_2[^1\Delta_g]$, l'intensité est telle que la création d'oxygène singulet est non négligeable à 1250 nm. On peut montrer que sur un cercle de diamètre 60 μm pour une puissance laser de 250 mW $\pm 5\%$, l'intensité à 1250 nm est de ~ 650 W.cm $^{-2}$ (pour un faisceau laser de largeur à mi-hauteur de 25 μm , soit de rayon de ceinture $w_0 \sim 21,2$ μm), multipliée par la probabilité d'absorption à 1250 nm (soit 8,5 %), on obtient une intensité d'environ 50 W.cm $^{-2}$.

Les travaux menés par notre équipe ont déterminé une dose seuil pour l'observation de la mort cellulaire à 100 W.cm $^{-2}$.h [79]. Nos observations concernant la mort des cellules centrées sur un diamètre de 60 μm autour du spot laser ainsi que le calcul des doses seuil d'observation de la mort cellulaire semblent indiquer un effet dû à l'oxygène singulet. En pratique, les cellules (soit 3 à 4 cellules) centrées autour du spot laser sont donc soumises à la fois à un stress oxydant et à un stress thermique. Cet effet sera pris en compte lors du traitement des données.

9.3 Résultats expérimentaux

9.3.1 Les granules de stress nucléaires révèlent l'activation de la réponse au stress thermique

Introduction

Les granules de stress nucléaires sont un bon indicateur de l'activation de la réponse au stress thermique. En effet, la cinétique des granules de stress nucléaires est corrélée à l'activation de la transcription des gènes de stress thermique [201,203].

Les cellules (HEK) sont des lignées non cancéreuses, et majoritairement, quel que soit le stress thermique effectué, nous avons observé deux granules majoritaires, c'est-à-dire possédant une intensité de fluorescence importante par cellule. Certaines cellules peuvent présenter des granules secondaires, mais toujours d'intensité plus faibles. Nous avons ainsi pu observer pour quelques cellules jusqu'à 10 granules secondaires. Une corrélation entre le nombre de granules activés et l'intensité du stress a été observée [203], avec des cellules pouvant comporter jusqu'à 7 granules en condition de stress thermique. Cependant, cette étude a été réalisée sur une lignée de cellules cancéreuses (lignée cellulaire du cancer de l'oesophage humain TE-2). Le nombre de granule par cellule est un moyen semi-quantitatif pour évaluer la sévérité d'un stress thermique [203]. Nous avons également observé en cellules MCF7, qui sont une lignée de cellules de cancer du sein, de nombreux granules.

Alors que deux granules sont présents en cellules primaires, le nombre de granules détectés varie d'une lignée cellulaire à une autre sans corrélation claire avec la ploïdie cellulaire [190,193]. Les granules secondaires sont observés principalement dans les lignées de cellules tumorales qui

contiennent un niveau plus important d'*HSF1* que les cellules primaires, ou dans les cellules surexprimant *HSF1* [199]. Ceci est en accord avec nos observations, où notre lignée cellulaire surexprimant *HSF1*, montre des cellules possédant deux granules intenses et pour certaines cellules des granules secondaires d'intensité plus faible.

Intensité de fluorescence des granules de stress nucléaires pour évaluer l'activation de la réponse au stress thermique

Les granules de stress nucléaires sont des structures extrêmement dynamiques révélant l'activation de la réponse au stress thermique. Afin de détecter l'apparition précoce de ces structures, de les suivre lors des séries temporelles et de détecter leur disparition, un programme de détection et de suivi des granules a été élaboré (détail de l'analyse d'images présenté en annexe G).

Dans notre étude, pour la lignée cellulaire étudiée (HEK), nous n'avons pas observé de variation significative du nombre de granules par cellule en fonction de l'intensité ou de la durée du stress. Majoritairement, quel que soit le traitement thermique, deux granules très brillants sont activés (cellules diploïdes). L'apparition ou non de granules secondaires ne semblent pas, pour les cellules HEK, liée à une sévérité de stress.

Quelque soit le stress thermique effectué, nous avons mesuré des tailles de granules de $\sim 2-3 \mu m$ de diamètre, ce qui est en accord avec [201, 203]. La seule variation significative dans la taille ou la forme de ces structures est observée lors des stress continus sévères, lorsque les granules restent constamment activés. Les granules prennent alors la forme de "donuts", et leur taille tend à augmenter avec des diamètres de l'ordre de $5 \mu m$. La taille des granules ne semblent donc pas non plus liée à la sévérité du stress.

Pour évaluer la cinétique d'activation des granules de stress nucléaires, nous nous sommes intéressés à l'intensité de fluorescence du granule. Celle-ci est définie sur une image comme suit :

$$I_{fluo} = \frac{I_{gr} - I_{fond}}{I_{cell} - I_{fond}} \quad (9.4)$$

où, I_{gr} , I_{cell} et I_{fond} sont les intensités de fluorescence du granule, de la cellule et du fond respectivement.

9.3.2 Confirmation de l'élévation de température induite par laser sur les cinétiques des granules de stress nucléaires

Afin de vérifier la pertinence de la mesure de température par fluorescence avec la rhodamine, nous avons soumis les cellules à différents type de stress et observé leur réponse via la dynamique des granules de stress.

Température minimale pour l'activation des granules

Nous avons soumis les cellules HEK transfectées *eGFP* à des stress de puissance laser faible (i.e. dizaine de *mW*) et nous avons alors déterminé la puissance laser minimale nécessaire pour observer l'activation des granules. Expérimentalement, la température minimale d'activation déterminée $T_{min} \sim 40-41^\circ C$ est en accord avec le modèle (réponse au stress thermique très faible en dessous de $41^\circ C$) mais également avec la température de début de dénaturation des protéines en cellules humaines comprises entre $41-42^\circ C$ [240].

Également, pour une température de stress thermique plus élevée, l'activation des granules nucléaires de stress se fait autour d'une zone étendue autour du centre du spot laser. En effet, comme nous l'avons décrit dans la partie 9.2.2, le profil de température induit par le laser est gaussien et donc la température diminue au fur et à mesure que l'on s'éloigne du centre du spot laser. Ainsi, pour un stress thermique à $43^\circ C$, les granules de stress nucléaires se forment autour d'une zone de

rayon $r \sim 250 \mu m$ centré sur le spot laser. Compte-tenu du profil thermique, cela nous donne une température minimale d'activation de $\sim 41^\circ C$.

Activation constante des granules de stress nucléaires pour une température seuil en stress continu

L'équipe d'Abravaya *et al.* [175] a étudié la cinétique d'activation d'*HSF1* pour des stress thermiques de 41, 42 et 43°C en stress continu (4 h) par retard sur gel sur cellules HeLa. On observe une transition forte entre 42 et 43°C avec une relaxation dans l'activation d'*HSF1* à 42°C et une activation constante d'*HSF1* à 43°C (voir Fig. 9.10 (a)). Cette différence nette sur l'activation d'*HSF1* entre 42 et 43°C est une signature biologique forte, et va nous permettre de vérifier la mesure de l'élévation de température induite par le laser infrarouge mesurée à l'aide des rhodamines.

Afin de vérifier la mesure de l'élévation de température (voir Chap. 9.2), nous avons soumis les cellules HEK transfectées *HSF1 - eGFP* à des stress continus (4 h) par laser à 41, 42 et 43°C. La figure 9.9 montre les images de fluorescence des cellules *HSF1 - eGFP* pour différents instants lors d'un stress thermique à 43°C.

La figure 9.10 (b) représente l'intensité de fluorescence des deux granules d'une cellule unique pour des stress continus à 41, 42 et 43°C. Nous n'avons pas observé d'effet significatif entre l'intensité de fluorescence du granule et l'intensité du stress (i.e. certains granules à 41°C sont plus intenses qu'à 43°C). C'est pourquoi, nous avons fait le choix de représenter l'intensité de fluorescence du granule normalisée au maximum d'intensité.

Les deux granules de la même cellule possèdent des cinétiques de réponse au stress thermique identiques quel que soit le type de stress (pour différents type de stress : d'intensité et/ou de durée différentes, ceci est toujours observé). A 41 et 42°C, l'intensité de fluorescence du granule passe par un maximum à $\sim 10-20 \text{ min}$ de stress, puis l'intensité diminue et le granule disparaît totalement à 120 $\sim$ de stress. A 43°C, l'intensité de fluorescence du granule passe également par un maximum à $\sim 10 \text{ min}$ de stress, après avoir légèrement diminué vers 25 min de stress, l'intensité de fluorescence est constante, i.e. le granule demeure constamment activé.

Bien que la dynamique temporelle des deux variables (cinétique d'activation, temps pour atteindre niveau maximum et cinétique de relaxation) soit sensiblement identique, les niveaux relatifs sont différents. En effet, nous n'avons pas observé de corrélation entre l'intensité de fluorescence des granules et l'intensité du stress.

On observe sur l'intensité de fluorescence du granule une 'hyperactivation' sur la cinétique à 43°C (voir Fig. 9.10 (b)). Le niveau d'*HSF1* activé passe par un maximum à $\sim 10 \text{ min}$ de stress puis relaxe vers un niveau plus faible vers 25 min de stress.

En conclusion, l'élévation de température induite par laser estimée avec les rhodamines, est en bon accord avec les signatures biologiques attendues sur l'activation de la réponse au stress thermique en condition de stress thermique. La confiance sur l'élévation de température induite par laser est donc bonne et l'incertitude sur cette élévation est estimée à $\pm 0.5^\circ C$. Au vue de la sensibilité cellulaire face au stress thermique (de l'ordre d' $1^\circ C$ pour la population cellulaire), notre incertitude sur la mesure de la température du stress est donc suffisante.

9.3.3 Effet de la cinétique de montée en température sur la cinétique des granules de stress nucléaires

Nous avons testé la réponse des cellules vis-à-vis d'une montée en température différente pour évaluer la sensibilité cellulaire face au stress. La cellule est-elle sensible à une température seuil, n'y a-t-il pas de réponse avant d'atteindre une température critique ? Ou alors, la réponse est-elle modulée par cette montée en température ?

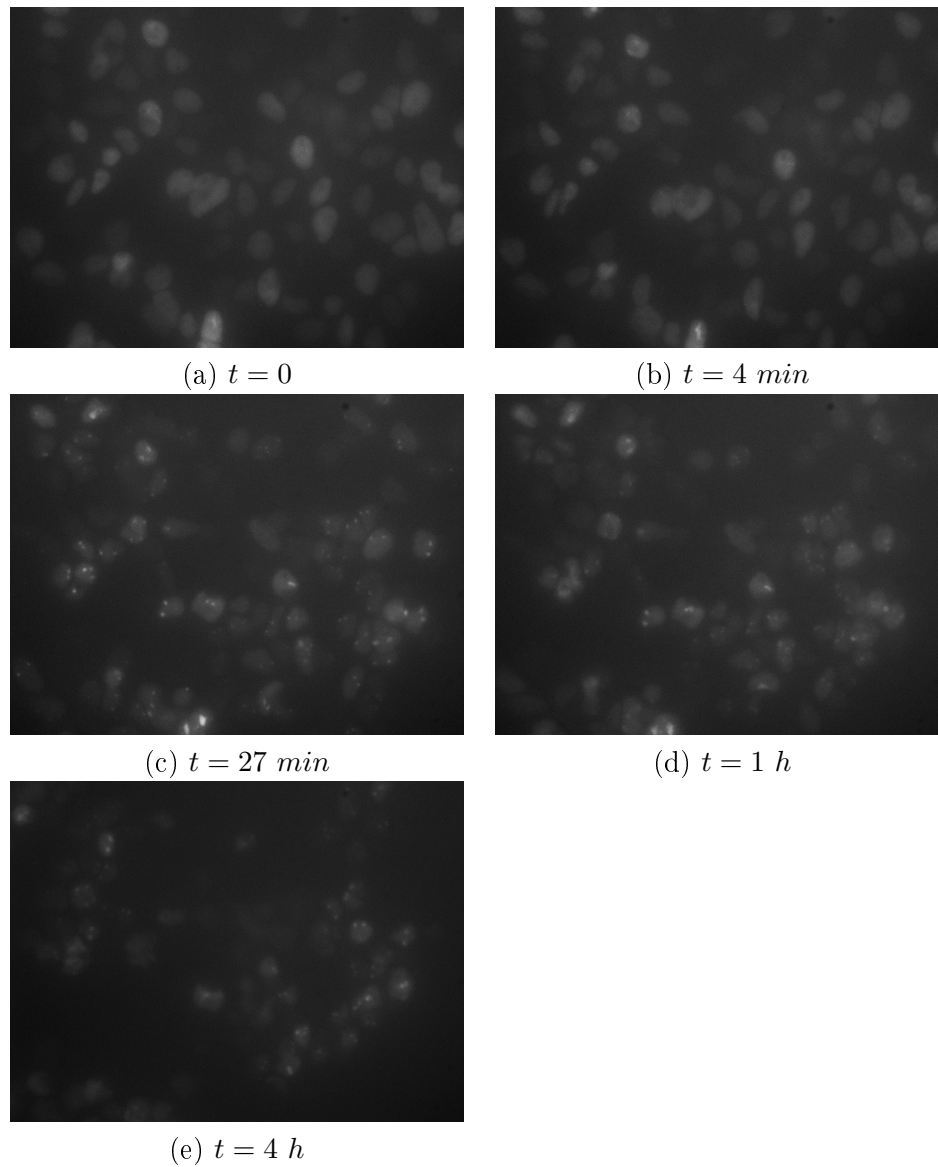
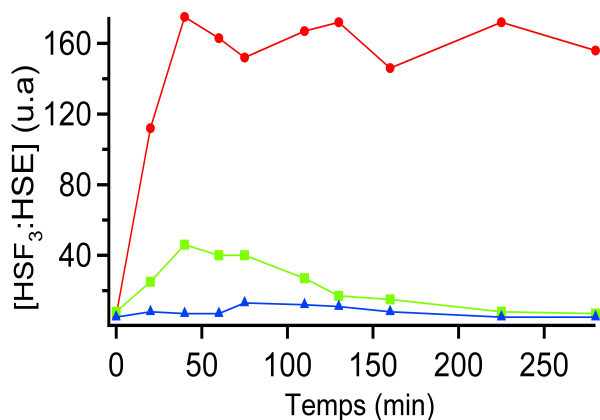
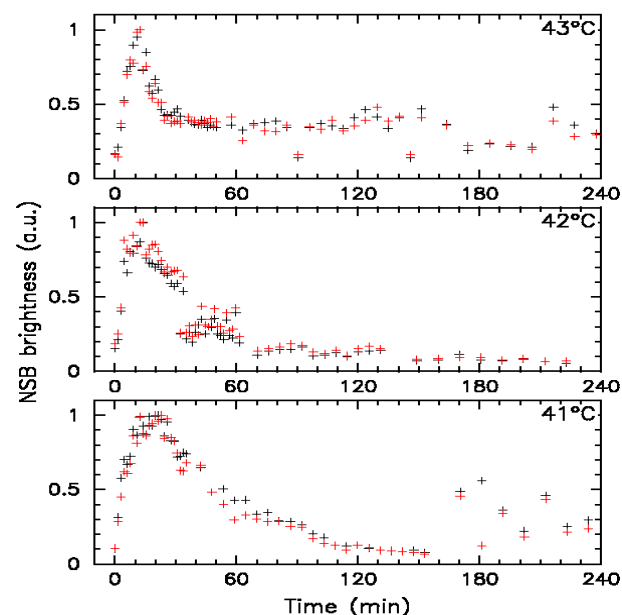


FIG. 9.9: Images de fluorescence des cellules HEK *HSF1-eGFP* soumise à un stress thermique à 43°C pendant 4 h . Les images (a), (b), (c), (d) et (e) sont prises durant le stress thermique au temps indiqué. Environ 50 cellules sont détectées sur le champ de la caméra.



(a)



(b)

FIG. 9.10: (a) Données expérimentales issues de [175] sur les expériences de retard sur gel pour l'activation d'*HSF1* en condition de stress continu (4 h) à 41 (ligne bleue), 42 (ligne verte) et 43°C (ligne rouge). (b) Intensité de fluorescence des 2 granules d'une cellule normalisée à l'intensité maximale, pour les stress continus (4 h) à 41, 42 et 43°C.

Afin d'évaluer l'effet de la cinétique de montée en température sur la dynamique temporelle des granules de stress nucléaires, nous avons modulé la montée en température des cellules induite par le laser. Pour cela, sur le trajet optique du faisceau laser en amont du microscope, une lame demi-onde placée entre deux cubes polarisants est insérée. Ainsi, en jouant sur la vitesse de rotation de la lame (propriétés de polarisation de la lumière), on peut contrôler la puissance du laser en sortie du dispositif. Nous avons ainsi, pour les stress continus à 41, 42 et 43°C comparé un choc thermique soudain (~ 3 s pour atteindre la température de stress) à une rampe de température sinusoïdale permettant d'atteindre la température de stress en ~ 20 min et simuler une montée lente en température de type bain-marie.

Lors de la montée lente par laser (~ 20 min) 9.11 (b), les cinétiques d'activation des granules de stress nucléaires sont identiques en comparaison d'une montée en température soudaine (~ 3 s) 9.11 (a), les courbes pour une montée lente en température sont uniquement translatées dans le temps. Cet effet est particulièrement marqué pour les stress à 42 et 43°C. La manière de montée en température (pour une montée en température en 20 min) ne semble donc pas modifier la cinétique de formation et de relaxation des granules pour les stress à 41, 42 et 43°C. Ces résultats suggèrent que la formation des granules nécessite l'atteinte d'une température seuil.

Des phénomènes de thermotolérance ont été observés à 42°C sur des cellules CHO pour des durées de stress supérieures à 3 h [213]. Ainsi, une rampe de montée en température au dessus de 3 h permet d'observer un réel gain sur le taux de survie. De même, un stress thermique soudain à 42°C permet l'observation de thermotolérance pour un temps supérieur à 3 h. La rampe de montée en ~ 20 min (soit 12-18°C/h) est peut être insuffisante pour observer une réponse au stress thermique différente. Il serait intéressant dans nos conditions expérimentales de réaliser une montée en température plus lente et d'observer la formation des granules de stress nucléaires. La rampe de montée en température doit ainsi être adaptée aux constantes de temps cellulaire. La production d'*HSP70* étant observée plusieurs heures après stress thermique [207], une montée en température de l'ordre de 1-2°C/h devrait nous permettre de sonder l'effet d'accumulation des *HSP70* sur la formation des granules de stress nucléaires.

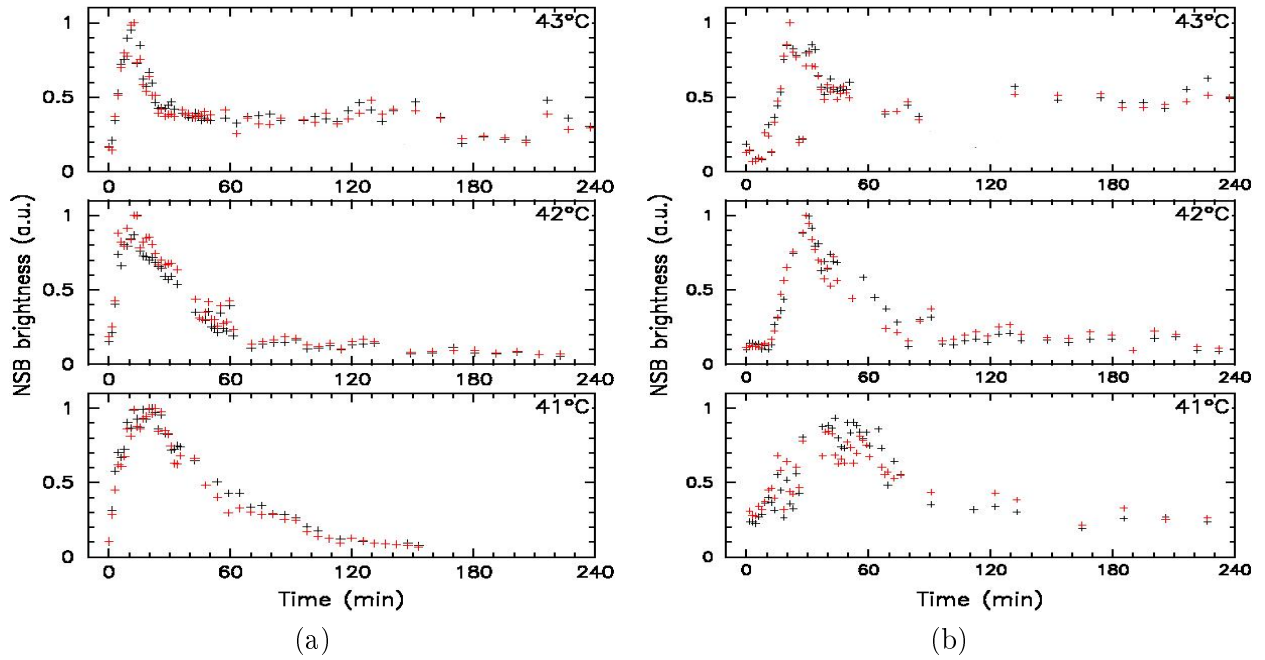


FIG. 9.11: Intensité de fluorescence des deux granules d'une cellule normalisée à l'intensité maximale, pour un stress continu (4 h) à 41, 42 et 43°C en choc thermique soudain (~ 3 s) (a) et en rampe thermique lente (montée à la température de stress en ~ 20 min) (b).

9.3.4 Observations expérimentales d'un effet lié à l'oxygène sur les granules de stress nucléaires

Nous avons vu dans le chapitre 2.3 que les réponses au stress thermique et oxydant sont liées. Nous avons voulu vérifier expérimentalement les liens entre stress thermique et oxydant.

Formation des granules de stress nucléaires par stress oxydant

Nous avons abaissé la puissance du laser infrarouge afin de voir s'il était possible, en stress oxydant pur, d'induire la formation des granules de stress nucléaires. La puissance du laser est abaissée à ~ 27 mW $\pm 5\%$, correspondant à une température au niveau des cellules de $\sim 39^\circ\text{C}$.

On observe sur un rayon de ~ 30 μm , la formation de granules de stress nucléaires pour une irradiation laser à 1270 nm (voir Fig. 9.12). En dehors de la zone centrale, aucune activation de granules n'est observée. Comme nous l'avons détaillé dans la partie 9.2.2, le champ de température est sensiblement plat sur tout le champ de la caméra. En conclusion, un stress thermique n'est pas impliqué dans la formation des granules de stress nucléaires pour l'îlot central. La formation de ces granules est donc nécessairement liée à l'induction d'un stress oxydant par excitation optique directe de l'oxygène moléculaire.

On observe pour l'induction des granules de stress nucléaires par stress oxydant une cinétique de formation des granules très différente de celle d'un stress thermique. En effet, la formation des granules apparaît comme décalée dans le temps. Alors qu'en condition de stress thermique, les granules sont observés quelques secondes seulement après stress, en condition de stress oxydant, les granules apparaissent au bout de plusieurs minutes de stress. Ainsi, pour un stress à 27 mW $\pm 5\%$ pendant 15 min, les granules de stress nucléaires apparaissent après ~ 6 min de stress. La taille des granules est sensiblement plus importante qu'en cas de stress thermique. On peut également observer que 6 h post stress 9.12 (c), les granules de stress demeurent continuellement activés.

Ces observations conduisent aux hypothèses suivantes. Premièrement, la concentration en oxygène singulet créée à 1270 nm étant très faible, il faut atteindre une concentration cumulée en oxygène singulet suffisante pour induire la formation des granules de stress nucléaires. Deuxièmement,

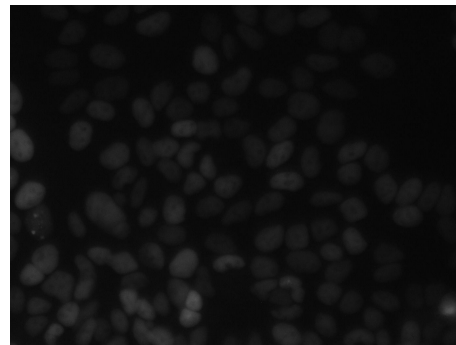
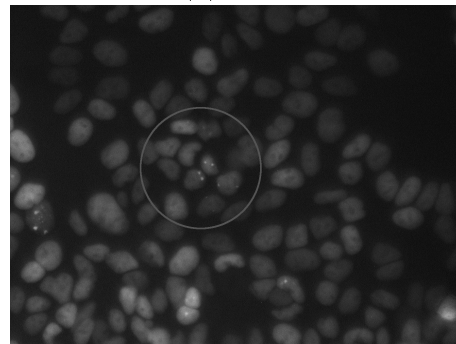
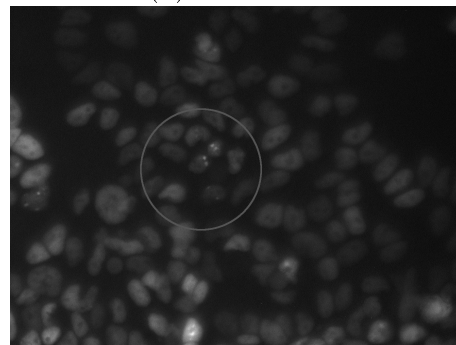
(a) $t = 0$ (b) $t = 15min$ (c) $t = 6h$

FIG. 9.12: Activation des granules de stress nucléaires par irradiation laser à 1270 nm . Les images sont prises à (a) $t = 0$ et (b) $t = 15min$ d'irradiation. L'image (c) est prise $t = 6h$ après irradiation. Le cercle gris de rayon $r \sim 30\text{ }\mu m$ entoure la zone d'activation des granules de stress nucléaires.

l'oxygène singulet lui-même n'active pas la réponse au stress thermique mais les ERO secondaires qu'il engendre vont être capables d'induire la réponse au stress thermique et la formation des granules. La cascade de réactions engendrant la production d'ERO secondaires va ainsi décaler dans le temps la formation des granules. Une accumulation d' H_2O_2 (peroxyde d'hydrogène), a ainsi été observée dans l'eau durant des expériences d'irradiation laser à 1264 nm [257]. Nous avons par ailleurs observé expérimentalement l'activation des granules de stress nucléaires lorsque les cellules sont exposées à H_2O_2 , confortant ainsi l'idée qu' H_2O_2 est capable d'activer la formation des granules de stress nucléaires. Le suivi simultané de la formation des granules et d'une sonde spécifique à H_2O_2 permettrait de vérifier si la cinétique de formation des granules est corrélée à la formation d' H_2O_2 induite par la production de 1O_2 à 1270 nm. Des quenchers spécifiques à H_2O_2 (tels que la catalase ou l'hypochlorite de sodium) permettrait également de vérifier si H_2O_2 est effectivement nécessaire à la formation des granules de stress nucléaires. Troisièmement, les mécanismes d'activation et de fixation d'*HSF1* sur les cibles chromosomiques sont peut être fondamentalement différents entre les stress thermique et oxydant, révélant des cinétiques distinctes pour la fixation d'*HSF1* à l'ADN.

Enfin, une nouvelle vision tend à montrer que les dommages induits par l'oxygène singulet résulteraient d'un déséquilibre de l'homéostasie rédox cellulaire [258]. Or, des études révèlent qu'*HSF1* est capable de sentir directement le stress oxydant via des changements de son état rédox [46]. Ainsi, un déséquilibre de l'état rédox cellulaire induit par la production de 1O_2 , est peut être le signal initiateur à l'activation d'*HSF1*.

Effet d'hypoxie sur la formation des granules de stress nucléaires induits par stress thermique

Nous avons évalué expérimentalement l'effet de la concentration en oxygène sur la formation des granules de stress nucléaires. Pour ce faire, les cellules sont privées d'oxygène grâce au contrôle de l'atmosphère de l'incubateur. Ainsi, la composition de l'air soufflée dans l'incubateur est de 5 % en CO_2 et 95 % en N_2 pendant la durée de l'expérience.

Dans ces conditions d'hypoxie, les cellules sont irradiées à 1250 nm, à une température de stress de 42°C pendant 4 h. La mort des cellules au niveau de l'îlot central ($r = 30 \mu m$) n'est pas observé au bout de 2 h de stress, confirmant un phénomène oxygène dépendant en condition atmosphérique normale.

Les cellules présentent une activation des granules de stress nucléaires plus faible qu'en condition normale. En effet, très peu de cellules (moins de 10 %) présentent des granules de stress nucléaires et ceux-ci sont difficilement détectables (intensité de fluorescence très faible). De plus, la morphologie cellulaire, habituellement arrondie après un stress thermique de 4 h à 42°C en condition atmosphérique normale, n'est pas observée pour le même stress thermique en condition d'hypoxie. Cette morphologie cellulaire arrondie témoigne d'une souffrance cellulaire importante et préfigure la mort des cellules observée après traitement thermique.

En conclusion, l'hypoxie semble diminuer la formation des granules de stress nucléaires, et prévenir la mort cellulaire induite par le stress thermique. Ces résultats confirment que les effets cytotoxiques du stress thermique nécessite la présence d'oxygène [259].

Ces observations expérimentales révèlent ainsi l'étroite interconnexion entre stress thermique et oxydant. Des conditions d'hypoxie permettent d'éviter les effets cytotoxiques induits par le stress thermique. De plus, le stress oxydant induit par la production d'oxygène singulet permet la formation des granules nucléaires de stress, et révèle des cinétiques de formation de ces structures fondamentalement différentes du stress thermique. Des expériences complémentaires, notamment le suivi cinétique parallèle de sonde spécifique de H_2O_2 (HyPer par exemple) et de formation des granules permettront dans le futur d'identifier les mécanismes d'activation de la réponse au stress thermique induit par une augmentation de température et/ou la création de 1O_2 .

9.3.5 Conclusions

Notre estimation de température induite par laser a pu être corrélée à une signature biologique forte, nous permettant d'avoir une bonne confiance dans cette mesure (i.e. transition forte en stress continu entre 42 et 43°C). Le suivi cinétique de l'intensité de fluorescence du granule nous a permis d'évaluer la réponse au stress thermique dans une cellule unique.

L'analyse de l'intensité de fluorescence du granule révèle que les deux granules d'une même cellule possèdent des cinétiques de réponse au stress thermique identiques. La comparaison entre les expériences d'Abravaya *et al.* [175] et nos données expérimentales révèle des cinétiques d'activation d'*HSF1* sensiblement identiques malgré des niveaux relatifs différents.

Les cinétiques d'activation des granules de stress nucléaires sont identiques pour un choc thermique soudain ou une montée lente en température de ~ 20 min. Nos observations révèlent ainsi que l'activation des granules de stress dépend d'une température seuil et n'est pas modifiée pour une montée en température en 20 min. Cependant, comme nous l'avons évoqué, cette échelle de temps pour la montée en température est probablement insuffisante pour observer un effet de thermotolérance sur la cinétique d'activation d'*HSF1*. Des expériences de cinétique de montée en température plus lente devraient prochainement nous permettre d'étayer cette hypothèse.

La création d'oxygène singulet à 1270 nm permet d'activer la réponse au stress thermique. Nos résultats ont permis de révéler des cinétiques d'activation des granules de stress nucléaires très différentes pour les stress thermique et oxydant, soulevant des questions sur les mécanismes moléculaires d'activation d'*HSF1* de ces deux réseaux de régulation. Nos résultats révèlent également que des conditions d'hypoxie inhibent la formation des granules de stress nucléaires et semblent prévenir la mort cellulaire induite par le stress thermique.

L'équipe a réalisé des tests préliminaires sur HyPer (sonde spécifique d' H_2O_2). Prochainement, le suivi cinétique parallèle d'HyPer et d'*HSF1* devrait permettre de corréler les cinétiques d'activation de la réponse au stress thermique à la production d'ERO secondaires induite par 1O_2 .

9.3.6 Discussion

Relation entre le niveau d'activation d'*HSF1* et la sévérité du stress

L'analyse de l'intensité de fluorescence des granules de stress nucléaires révèlent des cinétiques d'activation d'*HSF1* identiques aux expériences d'Abravaya *et al.* [175], cependant les niveaux relatifs ne sont pas reproduits.

Nous n'avons pas observé de relation entre l'intensité de fluorescence des granules de stress et une sévérité de stress. Ainsi, le niveau d'intensité des granules peut être supérieur pour un stress d'intensité plus faible. Cependant, l'intensité de fluorescence du granule a été évaluée dans des expériences distinctes, donc nécessairement dans des cellules différentes. Or, on observe une intensité de fluorescence nucléaire différente d'une cellule à l'autre. Le niveau d'expression d'*HSF1* diffère donc d'une cellule à l'autre. Pour corréler la sévérité du traitement thermique à une intensité de fluorescence du granule il est donc nécessaire d'avoir des cellules comportant le même niveau basal de fluorescence ou de réaliser le stress sur la même cellule. Nous avons évalué avec le modèle l'effet de surexpression d'*HSF1* sur la dynamique d'*HSF1*₃ : *HSE*. Les résultats préliminaires révèlent que des cinétiques différentes sont observées en cas de surexpression forte (taux de production d'*HSF1* – *eGFP* double de celui d'*HSF1* basal).

La fluorescence du granule peut provenir à la fois des trimères d'*HSF1* activés effectivement fixés sur les sites sat III mais également de l'accumulation d'*HSF1* à proximité des sites sat III mais non fixé. Il est donc difficile de corréler de manière simple le niveau d'intensité de fluorescence du granule de stress à des expériences de retard sur gel. De plus, les constantes de fixation d'*HSF1* sur les sites *HSE* sont potentiellement différentes de celles des sites sat III. Une différence d'affinité de fixation

d'*HSF1* sur ces deux types de site pourrait entraîner des niveaux relatifs de fixation différents. Cette hypothèse a été testée de manière préliminaire dans le modèle, et on observe effectivement qu'une différence d'affinité d'*HSF1* pour les sites *HSE* et sat III peut entraîner des niveaux relatifs à 41, 42 et 43°C différents.

Enfin, la relation entre phosphorylation d'*HSF1* et apparition des granules nucléaires de stress peut être limitée. En effet, l'apparition des granules nucléaires de stress est observée en cas d'inhibition du protéasome, de stress par métaux lourds et lors de l'exposition des cellules à l'azétidine. Cependant, bien que l'hyperphosphorylation d'*HSF1* soit observée dans les deux premières conditions de stress, celle-ci n'est pas observée lors du traitement des cellules à l'azétidine [203].

Phénomène d'hyperactivation du granule de stress nucléaire

On observe pour un stress thermique à 43°C, une hyperactivation du granule de stress nucléaire. L'intensité de fluorescence du granule passe par un maximum à 10 *min* de stress, puis relaxe vers un niveau constant vers 25 *min* de stress.

En cellules eucaryotes, l'ADN est compacté sous forme de chromatine, ce qui fournit une structure dynamique pour le contrôle de la transcription. L'unité fondamentale de la structure chromatinienne, le nucléosome, est formé par un fragment d'ADN enroulé autour d'un octamère formé par quatre types d'histones.

Les modifications post-traductionnelles des histones sont associées à des différences dans l'expression des gènes [260]. Parmi ces modifications, l'acétylation est considérée comme clé du contrôle épigénétique³ de l'expression génétique [260]. Le stress thermique induit un remodelage chromatinien massif qui implique une déacétylation rapide (significative à 1 *h* de stress thermique) et réversible du coeur d'histones en cellules HeLa et MEF (mouse embryonic fibroblast) [260]. *HSF1* s'associe spécifiquement avec et utilise les histones déacétylases *HDAC1* et *HDAC2* pour déclencher la déacétylation des histones en condition de stress thermique. *HSF1* est considéré comme un régulateur majeur de l'acétylation globale de la chromatine en réponse au stress thermique.

En cellules humaines, des études récentes ont révélé une fixation et une capacité d'activation d'*HSF1* extrêmement limitées quand la cellule est en phase de mitose [206]. La mitose inhibe l'activité transcriptionnelle et rend la chromatine inaccessible pour *HSF1*. Ainsi, la structure chromatinienne influe sur la capacité de fixation d'*HSF1* à l'ADN.

Des différences dans la texture chromatinienne dès 15 *min* de stress thermique avec un remodelage très important après 1 *h* de stress ont été révélés par imagerie confocale sur des cellules HeLa [261].

Chez la levure (*Saccharomyces cerevisiae*) le remodelage chromatinien des gènes HSP est détecté en quelques secondes et est total après 15 *min* de stress thermique [262]. Le remodelage chromatinien est une étape critique pour l'activation des gènes HSP [263]. Si le remodelage chromatinien est paralysé, deux étapes importantes de l'activation des gènes sont entravées : la fixation de la molécule activatrice et l'assemblage du complexe d'initiation de la transcription. Cette étude montre l'orchestration fine des éléments dans le temps : remodelage chromatinien, fixation du facteur de transcription et assemblage du complexe d'initiation de la transcription.

L'induction du stress par laser étant très rapide (~ 3 s), il est possible que dans un premier temps, la libération massive d'*HSF1* entraîne son accumulation importante autour des zones sat III. Cette arrivée d'*HSF1* devance le remodelage de la chromatine. Le remodelage chromatinien va ensuite limiter la fixation d'*HSF1* vers ses cibles spécifiques, ce qui entraîne une diminution de l'intensité de fluorescence du granule.

Cependant, pour une montée en température plus lente (20 *min*), le phénomène d'hyperactivation du granule de stress thermique est également observé, celui-ci est simplement décalé dans

³L'épigénétique désigne l'étude des influences de l'environnement cellulaire ou physiologique sur l'expression des gènes (définition de Conrad Waddington en 1942).

le temps. Il serait intéressant ici de modifier la cinétique de montée en température pour observer l'effet d'une rampe thermique plus lente sur le phénomène d'hyperactivation.

Des études complémentaires seront nécessaires pour évaluer l'impact du remodelage chromatinien sur la cinétique des granules. L'étude cinétique des histones déacétylases *HDAC1* et *HDAC2* combinée à l'étude de l'activation d'*HSF1* dans les granules de stress pourraient permettre d'apporter des éléments de réponse et de comprendre le phénomène d'hyperactivation du granule.

9.4 Hétérogénéité dans la réponse au stress

Le champ de température induit par le laser est approximativement plat comme nous l'avons détaillé dans la partie 9.2.2. En moyenne, pour un type de stress donné, les cellules présentent des cinétiques de réponse identique : l'apparition des granules se fait avec la même échelle de temps, le pic d'intensité de fluorescence du granule apparaît au même moment et la relaxation (ou non) des granules se fait dans les mêmes délais.

Cependant, on observe une certaine hétérogénéité dans la réponse des cellules. Pour un stress où la majorité des granules relaxent après recouvrance à 37°C, certaines cellules vont par exemple présenter des granules non relaxés. Cette hétérogénéité est observée quelle que soit la température de stress, et n'est pas liée au laser car elle est également observée lorsque les cellules sont stressées thermiquement en augmentant la température de l'incubateur.

9.4.1 Réponse localisée de réponse au stress : possible rôle des communications cellulaires

Nous avons également pu observer que la réponse des cellules semblent être localement similaire. Des cellules spatialement proches (groupe de 3 à 4 cellules voisines) semblent présenter des cinétiques de réponse identique. Cette réponse a également été observée pour un stress thermique réalisé avec l'incubateur et n'est donc pas lié au gradient de température induit par le laser. A l'heure actuelle, deux idées principales sont envisagées.

La transduction du signal, qui désigne le mécanisme par lequel une cellule répond à l'information qu'elle reçoit, permet à une cellule de répondre et de s'adapter aux stimuli provenant des autres cellules et de l'environnement. Grâce à la communication intercellulaire, une cellule peut influencer le comportement d'une autre cellule. Elle se fait au moyen de centaines de molécules (protéines, peptides, acides aminés, cytokine ⁴ inflammatoires, gaz dissous (*NO* ou *CO*)...). Ces molécules peuvent être solubles, fixées sur la matrice nucléaire ou sur la surface d'une cellule voisine et peuvent agir selon plusieurs millions de combinaisons. La communication intercellulaire se fait par le biais de trois principales modalités : adhérence intercellulaire, jonctions communicantes (jonctions GAP), et signaux chimiques.

Ainsi, les signaux de communication intercellulaires permettent aux cellules de communiquer entre elles sur des distances relativement restreintes (transmission synaptique, communications paracrines et autocrines) ou plus importantes (sécrétion endocrine). Les messagers moléculaires sont impliqués dans la survie, la division, la mort cellulaire (apoptose), l'homéostasie ...

En situation de stress, la cellule sécrète des messagers chimiques qui vont être signal d'alerte pour les cellules environnantes. Par exemple, l'ATP, intermédiaire dans la communication cellulaire (dans la transmission synaptique entre neurones notamment), est un nucléotide qui peut être relargué en grandes quantités par des cellules en condition de stress (inflammation, hypoxie, trauma).

⁴Les cytokines sont des facteurs solubles de communication intercellulaire entre différents partenaires et sont induites par un stress. Les cytokines induisent une réponse inflammatoire à une agression. Elles contrôlent les principaux phénomènes biologiques : la prolifération, la différenciation ou encore l'apoptose, ce qui permet d'avoir un équilibre entre ces processus.

Concernant le stress oxydant, des études ont montré l'importance d'effets bystander ⁵ dans des colonies cellulaires. Ainsi, la communication entre cellule dans une colonie joue un rôle dans l'induction de l'apoptose de cellules photosensibilisées [264].

Sur un autre plan, il a été montré que les *HSP70* ne sont pas trouvés uniquement dans le milieu intracellulaire, mais également dans le milieu extracellulaire où elles ont la capacité d'activer le système immunitaire [265,266]. *HSP70* est transloqué dans la membrane plasmique après stress et est relargué dans le milieu extracellulaire dans des structures associées à la membrane [267]. Cette forme d'*HSP70* liée à la membrane est capable d'activer les macrophages. Les *HSPs* relargués dans le milieu extracellulaire fonctionneraient ainsi comme des signaux d'alerte pour les cellules environnantes, particulièrement les cellules du système immunitaire, pour éviter la propagation des dommages et permettre la réparation [267]. Ainsi, les *HSPs* contribuent à la fois à la réponse intra et extracellulaire en conditions de stress physiologiques.

Les communications intercellulaires pourraient donc expliquer une réponse localisée au stress thermique. Des expériences complémentaires permettront d'apporter des éléments de réponse à cette hypothèse.

9.4.2 Effets du cycle cellulaire et du métabolisme

Il est connu que les stress thermiques courts et modérés induisent des blocages transitoires dans les phases du cycle cellulaire majoritairement à deux checkpoints G_1/S et G_2/M [247]. De plus, les cellules de mammifères sont plus sensibles lorsqu'elles sont soumises à un traitement thermique durant la phase de mitose, suivi en second de la phase *S*. Les cellules sont bien plus résistantes lorsqu'elles subissent un stress thermique en G_1 [240]. La phase du cycle dans laquelle la cellule se trouve va donc conditionner la cinétique de réponse au stress thermique. Pour des cellules non synchronisées, on peut s'attendre à observer des cinétiques de réponse différentes.

Au cours du cycle cellulaire, les niveaux relatifs en protéines peuvent différer. Ainsi, en cellules humaines, le niveau d'expression d'*HSP70* est fortement régulé durant le cycle cellulaire [268] : en phase *S*, un pic dans la synthèse des protéines *HSP70* coïncide avec une concentration élevée de l'*ARNm* d'*HSP70* détecté dans le cytoplasme. Dans le modèle de titration que nous avons développé, la réponse au stress est fortement conditionnée par les niveaux relatifs en chaperonnes et facteur de transcription. Ainsi, la sensibilité au stress va être fortement dépendante de la phase du cycle dans laquelle se trouve la cellule.

En plus de contrôler la prolifération cellulaire, les régulateurs du cycle cellulaire ont un rôle critique dans le contrôle du métabolisme [269]. Ainsi, les régulateurs du cycle tels que *E2F1*, *cdk4* et *pRB*, permettent de contrôler la synthèse des lipides, la production de glucose, la sécrétion d'insuline et le métabolisme glycolytique. Or, les réserves énergétiques de la cellule influence la réponse au stress. Ainsi, une activation constante des granules est observée lorsque la recouvrance après stress est réalisée à 4°C, contrairement à une recouvrance à 37°C où les granules relaxent [201]. Cette observation sur la relaxation des granules suggèrent ainsi un mécanisme ATP dépendant.

Aujourd'hui, les découvertes récentes mettent en lumière la plasticité d'*HSF1* comme régulateur de la transcription, et montre que la transcription médiée par *HSF1* est fortement dépendante du type cellulaire, des conditions métaboliques et de la phase du cycle cellulaire [270].

En conclusion, cycle cellulaire, métabolisme et réponse au stress thermique sont interconnectés.

La perspective principale de cette étude expérimentale est d'évaluer les effets du cycle cellulaire sur la cinétique des granules. On peut ainsi imaginer de synchroniser les cellules dans une phase

⁵L'effet bystander se réfère à l'induction d'effets biologiques dans des cellules qui n'ont pas été directement touchées par le stress initial.

du cycle et d'observer ensuite la réponse des cellules face à un type de stress donné. Cette étude permettrait de comparer l'hétérogénéité observée sur la réponse au stress thermique pour des cellules synchronisées et des cellules non synchronisées. L'équipe a démarré les transfections des marqueurs du cycle cellulaire (*PremoTM* FUCCI Cell Cycle Sensor), qui permettront de déterminer la phase du cycle cellulaire dans laquelle la cellule se trouve en microscopie de fluorescence. Ceci permettra de faire le lien entre phase du cycle cellulaire et sensibilité dans la réponse au stress thermique.

Une autre perspective envisagée par l'équipe est l'étude de la mémoire épigénétique cellulaire, comment la cellule est-elle capable de se remémorer des événements passés ? Ainsi, après exposition d'une cellule à un stress, la transmission d'une mémoire épigénétique de sensibilité au stress, pourrait influencer la réponse des générations futures au stress.

9.5 Perspectives : Vers un couplage modélisation/expériences

Nous avons développé un modèle mathématique minimal pour sonder les mécanismes de régulation du stress thermique. Ce modèle permet de reproduire les données expérimentales obtenues sur la dynamique d'activation d'*HSF1* [175] et des expériences de viabilité cellulaire [230]. Une expérience d'induction d'un stress thermique par laser a également été mise en place et l'estimation de température induite par laser a pu être corrélée à une signature biologique forte (i.e. transition forte entre 42 et 43°C en stress continu).

Le modèle permet d'établir des prédictions sur le comportement d'*HSF1* activé dans des conditions données de stress. La perspective de ce travail est donc de combiner approche expérimentale et modélisation pour (i) tester les prédictions du modèle dans le but de tester la validité de celui-ci (confrontation du modèle à l'expérience) et (ii) guider l'expérimentateur dans le choix des expériences significatives à réaliser. Le retour constant entre expérience et modélisation est un point important afin d'affiner la compréhension des mécanismes dans la réponse au stress.

9.5.1 Effet de la cinétique de montée en température

Nous avons évalué les capacités du modèle minimal de titration des chaperonnes à reproduire l'effet cinétique de la montée en température sur la dynamique temporelle des granules nucléaires de stress.

Partant du meilleur jeu de paramètres obtenu lors de la procédure d'ajustement des données (voir Chap. 8), nous avons testé l'effet d'une montée en température lente sur la dynamique d'*HSF1₃ : HSE*. La figure 9.13 (a) présente les résultats expérimentaux pour une choc thermique soudain et une montée en température en 20 *min* pour mimer la montée en température d'un bain marie. Le modèle révèle que la dynamique d'*HSF1₃ : HSE* est identique pour les deux types de stress, la cinétique est uniquement décalée dans le temps. Ceci est en accord avec nos observations expérimentales (voir Fig. 9.11) où la montée lente en température (20 *min*) n'influe pas sur la dynamique temporelle des granules de stress nucléaires, mais translate la courbe dans le temps. En conclusion, bien qu'aucun ajustement n'ai été fait sur les paramètres, le modèle est en bon accord qualitatif avec les observations expérimentales.

En conclusion, le modèle est en bon accord avec les résultats expérimentaux pour la modulation de montée en température du stress. L'expérience et le modèle nous permettent de sonder la sensibilité de la cellule face au stress. Pour une montée lente en 20 *min*, l'apparition des granules de stress ne dépend pas de la manière dont le stress est réalisé mais de l'atteinte d'une température seuil.

Cependant, pour une rampe cinétique plus lente en température (i.e. 180 *min*), le modèle prédit une dynamique temporelle du granule sensiblement différente d'une montée raide ou en 20 *min* (voir Fig. 9.13 (b) en comparaison de 9.13 (a)). Cette fois, le comportement cinétique d'*HSF1₃ : HSE*

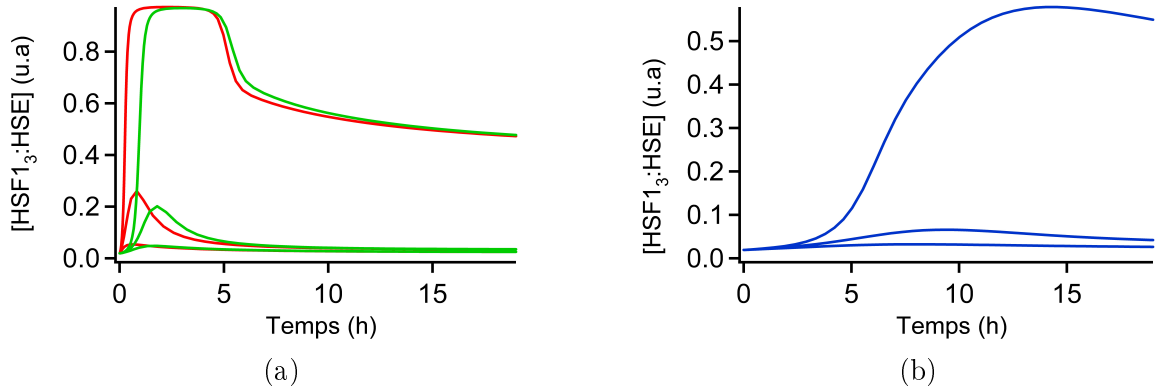


FIG. 9.13: Résultats du modèle pour des stress à 41, 42 et 43°C pendant 4 h. (a) Pour un choc thermique soudain (trait plein rouge), une montée lente (20 min) (trait plein vert) et (b) une montée lente en 180 min (trait plein bleu) en température.

n'est pas seulement décalé dans le temps, mais le plateau observé pour le choc thermique soudain ou la montée en 20 min, n'est plus observé à 43°C. Ceci est dû à l'augmentation de la concentration en *HSP* dans le temps, et donc une capacité pour la cellule de faire face aux dommages sans nécessité de saturer le niveau d' $HSF1_3 : HSE$.

Au vue des résultats apportés par le modèle, il sera donc intéressant expérimentalement de moduler la cinétique de rampe thermique pour accéder à des montées en température plus lente et observer l'effet sur la dynamique des granules nucléaires de stress.

9.5.2 Stress thermiques courts ($\sim min$)

Bien que les échelles de temps courtes ait été éliminé du modèle, nous avons évalué sa capacité à reproduire les dynamiques temporelles des granules de stress nucléaires pour des stress thermiques courts (i.e. $\sim min$).

Partant du meilleur jeu de paramètres obtenu lors de la procédure d'ajustement des données (voir Chap. 8), nous avons testé les prédictions du modèle sur les stress thermiques de 1, 2 et 3 min à 42°C.

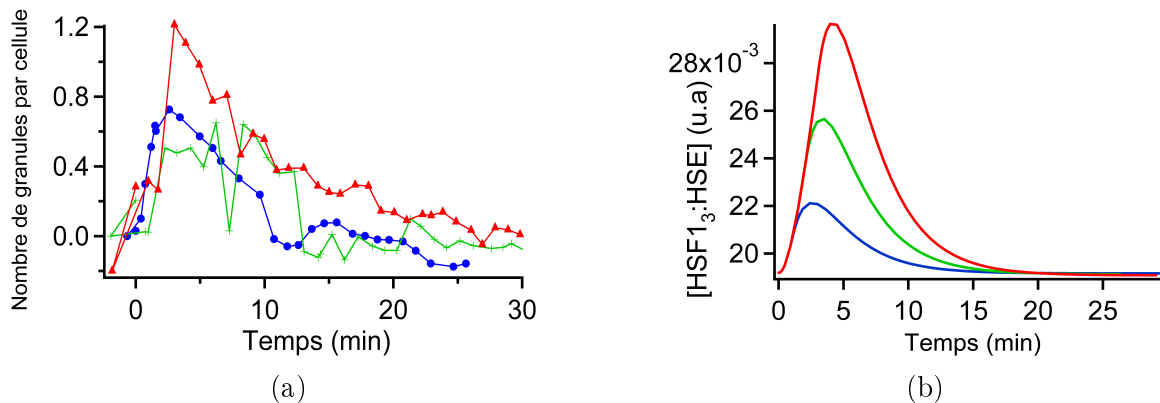


FIG. 9.14: (a) Résultats expérimentaux pour les stress de 1 (bleu), 2 (vert) et 3 (rouge) min à 42°C. (b) Simulation numérique du modèle de titration minimal pour des stress de 1 (bleu), 2 (vert) et 3 (rouge) min à 42°C.

Expérimentalement, pour les trois stress, le nombre de granules par cellule passe par un maximum à 4 min de stress. Le modèle est en bon accord puisqu'il prédit un maximum vers 5 min de stress.

Concernant la relaxation du granule, le modèle montre une relaxation légèrement plus rapide ($\sim 15\text{-}20\text{ min}$) que l'expérience ($\sim 20\text{-}25\text{ min}$).

En conclusion, bien que les mécanismes à échelles de temps courtes aient été éliminés du modèle, les prédictions du modèle pour les stress thermiques courts sont en bon accord qualitatif avec les résultats expérimentaux.

9.5.3 Discussion et conclusions

Nous avons évalué les prédictions du modèle pour des stress thermiques particuliers. Le modèle minimal de titration permet de reproduire les tendances observées expérimentalement sur une rampe de montée en température de 20 min et également les stress courts. Il permet de reproduire des expériences à échelle de temps différentes. Ainsi, le modèle minimal de titration des chaperonnes est suffisant pour décrire les expériences des stress thermiques continus (4 h), la modulation de la montée en température (pour une montée en 20 min) et les stress thermiques courts (quelques minutes).

A l'heure actuelle, la fonction de dénaturation des protéines utilisée comme déclencheur de la réponse au stress thermique a été déterminée d'après des mesures de DSC [233]. La réponse cellulaire vis-à-vis de stress thermiques courts (quelques minutes) à différentes températures devrait permettre d'évaluer la validité de cette fonction et éventuellement de définir pour un type cellulaire donné la fonction de dénaturation adéquate.

Le modèle mathématique, tel que nous le concevons est un outil extrêmement intéressant qui doit **être couplé à l'expérience**. En effet, il existe des multitudes de combinaison de traitement thermique possibles et évaluer la réponse cellulaire face à chacun de ces traitements demanderait un temps important. A l'inverse, le modèle permet de définir des comportements forts ou des signatures biologiques fortes (i.e. une transition forte entre 42 et 43°C) qui permettent de guider l'expérimentateur dans le choix des expériences clivantes à réaliser. La confrontation ultérieure des résultats et du modèle permet ensuite de raffiner le modèle et de comprendre les mécanismes clés du réseau de régulation.

Le modèle révèle une dépendance forte de la cinétique d'activation d'*HSF1* à la concentration basale d'*HSP*. Ce qui se comprend facilement au vue de la concentration d'*HSP* vis-à-vis des autres espèces réactionnelles (la concentration en *HSP* totale est de 1% , comparé à $\sim 0.01\%$ pour la concentration totale en *HSF1* et *MFP*). Cette concentration basale d'*HSP* peut dépendre de la phase du cycle cellulaire dans laquelle la cellule se trouve. Ainsi, une connexion entre le modèle minimal de titration et le cycle cellulaire peut être faite via le niveau basal d'*HSP*.

De même, la régulation des *MFP* médiée par *HSP* nécessite des ressources énergétiques. En fonction de l'activité métabolique de la cellule, le processus de réparation/dégradation des protéines dénaturées peut être déplacé en faveur d'un mécanisme par rapport à l'autre. Ainsi, un lien entre le modèle minimal et le métabolisme peut être fait via l'équilibre de tri réparation/dégradation des *MFP* (indices de flux η_1 et η_2).

Conclusions

La première partie de mon travail de thèse, a porté sur le stress oxydant, et plus particulièrement l'étude du taux de production et la réactivité de l'oxygène singulet créé à 1270 nm.

Dans un premier temps, je me suis intéressée à l'oxygène singulet en solvants organiques, là où la grande majorité des sondes de 1O_2 sont solubles et leurs réactivités avec 1O_2 maîtrisées. Nous avons développé un dispositif expérimental couplé à une analyse cinétique nouvelle des mécanismes réactionnels, permettant l'obtention simultanée du taux de production et de la réactivité de l'oxygène singulet avec un piège chimique spécifique de 1O_2 lors de l'excitation optique directe du dioxygène à 1270 nm. Cette étude a permis de valider la méthode de détection de l'oxygène singulet ainsi que l'analyse cinétique des mécanismes réactionnels.

En milieu aqueux, la problématique est plus délicate au vue de la non solubilité des sondes usuelles de 1O_2 . Nous avons utilisé des nanocapsules lipidiques (LNCs) permettant de piéger un piège chimique insoluble dans l'eau. J'ai alors développé pour ce système hétérogène, représenté par les dispersions de LNCs en milieu aqueux, un modèle cinétique à deux pseudophases. Ce modèle a permis d'étudier l'évolution de la section efficace d'absorption pour la transition $^3O_2[{}^3\Sigma_g^-] \longrightarrow ^1O_2[{}^1\Delta_g]$ à 1270 nm de l'oxygène moléculaire, et de la réactivité de 1O_2 avec le DPIBF, en fonction de la complexité de l'environnement représentée par la fraction volumique de LNCs. Cette étude en milieu hétérogène et le modèle cinétique à deux pseudophases, sont des étapes préliminaires à l'étude en milieu cellulaire.

En cellules vivantes, notre étude nous a permis d'étudier la réactivité de l'oxygène singulet avec un piège chimique spécifique. Le résultat obtenu quant au temps de vie de l'oxygène singulet, bien que préliminaire, est en bon accord avec la valeur basse du temps de vie de 1O_2 en cellule.

Pour affiner l'étude de l'oxygène singulet en cellule, plusieurs projets sont en cours. A l'heure actuelle, la résolution transversale du microscope est insuffisante pour observer des cinétiques de réaction de 1O_2 distinctes dans des compartiments cellulaires. Pour une étude cinétique de 1O_2 résolue spatialement, l'amélioration de la résolution transversale du microscope sera nécessaire. La permutation de l'eau protonée intracellulaire par de l'eau deutérée, devrait permettre d'obtenir simultanément le taux de production et la réactivité de l'oxygène avec un piège chimique spécifique. Ceci permettra d'obtenir la section efficace d'absorption pour la transition $^3O_2[{}^3\Sigma_g^-] \longrightarrow ^1O_2[{}^1\Delta_g]$ à 1270 nm de l'oxygène moléculaire en cellules.

L'équipe envisage de focaliser le laser à l'échelle d'une cellule unique. Cette étude permettra de sonder le rôle des communications intercellulaires et notamment l'importance des effets bystander. La focalisation du laser à l'échelle d'un organite, permettra de sonder la sensibilité des différents compartiments cellulaire face au stress oxydant. Enfin, le modèle cinétique à deux pseudophases appliqué à l'étude de la dynamique d'interaction de 1O_2 avec une cible biologique (notamment NAD(P)H, qui a l'avantage de posséder une fluorescence naturelle) permettra de comprendre les mécanismes réactionnels entre ces deux espèces et de sonder la réactivité de 1O_2 dans la cellule.

Des études récentes tendent à changer la vision simple de dosimétrie de l'oxygène singulet. En effet, un déséquilibre de l'homéostasie rédox cellulaire serait responsable des dommages induits par la création d'oxygène singulet [258]. Ces découvertes récentes sont intéressantes et posent de nombreuses questions sur les mécanismes moléculaires impliqués dans la régulation du stress oxydant, et le système "pur" de création d'oxygène singulet à 1270 nm apparaît particulièrement adapté pour tenter de répondre à ces questions.

Dans un second temps, je me suis intéressée à la dynamique temporelle du stress thermique en cellules vivantes.

A l'heure actuelle, bien que de nombreux partenaires et mécanismes réactionnels du stress thermique aient été découverts, les modèles mathématique de titration (ou de déplacement des protéines chaperons) actuels reproduisent mal les observations expérimentales de la littérature. De plus, bien

que très détaillés, ces modèles ne permettent pas de hiérarchiser les mécanismes clés de ce réseau de régulation et de comprendre intuitivement l'évolution temporelle de chacune des espèces réactionnelles.

C'est dans ce contexte que j'ai développé un modèle minimal de titration visant à mettre en lumière les partenaires et mécanismes de régulation clés, afin de (i) reproduire les observations expérimentales et (ii) être prédictif.

Le modèle minimal de titration reproduit les données expérimentales de réponse au stress thermique [175] et de viabilité cellulaire [230]. Les mécanismes clés de la réponse au stress thermique, tels que le titrage des protéines chaperons par *HSF1* et le mécanisme de triage des protéines dénaturées ont été révélés. Trois régimes de température clés ont été mis en évidence, permettant de classer les stress selon leur niveau d'induction de transcription de nouvelles *HSPs*. *HSP* apparaît au coeur du réseau de régulation de la réponse au stress thermique. Le modèle de titration minimal permet de relier de manière simple les variations de viabilité cellulaire à l'intensité du traitement thermique. Enfin, le modèle de titration reproduit les résultats expérimentaux des stress thermiques fractionnés, et contient donc les éléments clés pour expliquer les mécanismes de thermotolérance.

Bien qu'une description détaillée des partenaires clés du réseau de régulation de la réponse au stress thermique existe, cette vision statique ne permet pas d'appréhender la dynamique temporelle d'interaction entre ces espèces ni de rendre compte des échelles de temps de ces mécanismes. Les granules de stress nucléaires d'*HSF1*, qui révèlent l'activation de la réponse au stress thermique, sont de bon candidats pour évaluer la cinétique du stress.

Un montage expérimental permettant d'induire un stress thermique par laser a été développé, permettant l'étude en cellules vivantes de la dynamique temporelle d'*HSF1* en conditions de stress thermique. La modulation du stress, facilement réalisable par laser, a permis d'évaluer la sensibilité cellulaire face à au stress thermique. Ainsi, pour une montée en température en ~ 20 min, la cellule n'est pas sensible à la manière de montée en température, mais plutôt à un seuil de température. Notre étude a également permis de révéler l'activation des granules de stress nucléaires par création d'oxygène singulet à 1270 nm, et montre des cinétiques d'activation de ces structures fondamentalement différentes de lors d'un traitement thermique. Ces observations soulèvent des questions sur des mécanismes d'activation différents d'*HSF1* induit par des stress thermique ou oxydant.

Enfin, nous avons confronté les prédictions du modèle de titration minimal aux résultats expérimentaux pour des rampes cinétiques de montée en température et des stress thermiques courts. Bien que cette étude soit préliminaire, les résultats sont encourageants, puisqu'ils révèlent que le modèle décrit qualitativement bien les cinétiques de ces différents types de stress. Le modèle révèle ainsi, qu'une montée en température en 3 h, change de manière significative la dynamique temporelle d'activation d'*HSF1*. Expérimentalement, moduler la montée en température du laser permettra d'évaluer l'effet des cinétiques de montée en température sur la cinétique des granules de stress nucléaires.

L'équipe a commencé la transfection des marqueurs du cycle cellulaire (*PremoTM* FUCCI Cell Cycle Sensor), ce qui permettra prochainement de faire le lien entre sensibilité dans la réponse au stress thermique et la phase du cycle cellulaire dans laquelle la cellule se trouve. La simplification du modèle de la réponse au stress thermique prendra alors tout son sens et permettra de combiner de manière plus simple, la réponse au stress thermique au cycle cellulaire.

De plus, des études préliminaires sur le modèle révèle une forte dépendance de l'activation d'*HSF1* avec la concentration en *HSP*. Le niveau basal d'*HSP* pouvant varier significativement au cours du cycle cellulaire, une connexion entre réponse au stress thermique et cycle peut être faite via le niveau basal d'*HSP*.

Également, l'équilibre de tri réparation/dégradation des protéines chaperons nécessite de l'énergie et peut donc varier en fonction de l'activité métabolique de la cellule. Un lien entre métabolisme et modèle de titration peut être fait via ce processus de tri.

Le modèle révèle une sensibilité cellulaire accrue lorsque que le niveau d'*HSP* total est faible. Ainsi, le modèle peut être utilisé pour évaluer la fonction de température nécessaire pour abaisser fortement le niveau d'*HSP* libre et ainsi diminuer la cytoprotection cellulaire. Ce pré-traitement amenant la cellule dans un état critique, inapte à faire face à un traitement thermique (ou oxydant) secondaire. Le modèle devient alors un outil prédictif intéressant d'un point de vue thérapie, dans le but de sensibiliser fortement les cellules à un stress ou un traitement secondaire.

Aujourd'hui, la compréhension du réseau de régulation du stress oxydant est bien moins aboutie que celle du stress thermique. Le grand nombre de partenaires ainsi que les cascades de mécanismes réactionnels engendrées par le stress oxydant, font de celui-ci un enjeu pour le dessin d'un réseau de régulation génétique et la modélisation. La production "pure" d'oxygène singulet à 1270 nm, apparaît alors comme un schéma intéressant dans le but de comprendre les mécanismes moléculaires impliqués dans le stress oxydant. A terme, la perspective du projet est d'étendre l'approche de modélisation minimale au stress oxydant avec un couplage fort entre expériences et modélisation. A plus long terme, le projet vise à **coupler ensemble les réseaux de régulation du stress oxydant, du stress thermique, du métabolisme et du cycle cellulaire.**

Annexes

Annexe A

Expériences complémentaires pour l'étude de l'oxygène singulet en milieu aqueux

A.1 Élévation de température induite par le laser infrarouge dans D_2O et H_2O

A.1.1 Mesure de l'élévation de température

J'ai mesuré l'élévation de température dans la cuve contenant D_2O et H_2O en fonction de la puissance laser IR d'irradiation à 1270 nm (voir Fig. A.1). Nous avons vérifié que la présence de RTC dans la solution n'influe pas sur l'élévation de température mesurée.

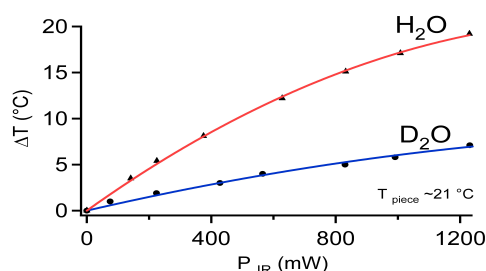


FIG. A.1: Elevation de température dans D_2O (points noirs) et H_2O (triangles noirs) en fonction de la puissance laser IR à 1270 nm. Les lignes pleines (bleu et rouge dans le cas de D_2O et H_2O , respectivement) représentent le meilleur ajustement polynôme à l'ordre 2 dans les deux solvants.

Cette élévation de température due à l'absorption d'énergie lumineuse du faisceau laser à 1270 nm par les molécules de solvant, va modifier la concentration en oxygène dissous et le temps de vie de 1O_2 .

A.1.2 Influence de l'élévation de température sur la concentration en oxygène dissous et sur le temps de vie de 1O_2

Concentration en oxygène dissous dans l'eau en fonction de la température

La figure A.2 montre l'évolution de la concentration en oxygène dissous dans l'eau en fonction de la température pour des températures comprises entre 20 et 40°C.

Ainsi, connaissant l'élévation de température induite par le laser à 1270 nm, on peut déterminer la concentration en oxygène dissous en fonction de la puissance laser.

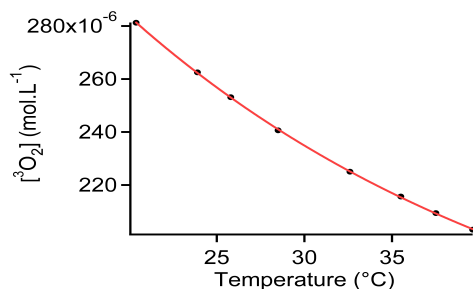
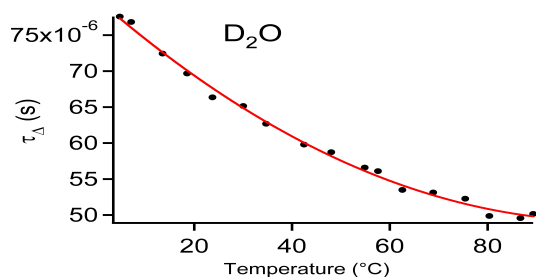
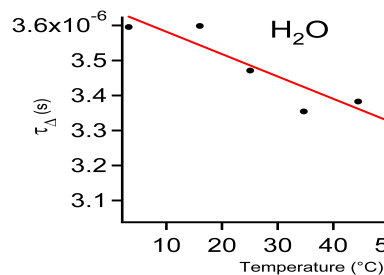


FIG. A.2: Evolution de la concentration en oxygène dissous en fonction de la température dans H_2O d'après [118] pour des températures comprises entre 20 et 40°C. La ligne pleine rouge représente le meilleur ajustement exponentiel.



(a)



(b)

FIG. A.3: Evolution du temps de vie de l'oxygène singulet en fonction de la température dans D_2O (a) et H_2O (b) d'après les données publiées dans [67]. Les lignes pleines rouges représentent le meilleur ajustement : polynomiale à l'ordre 2 dans le cas de D_2O et linéaire pour H_2O .

Temps de vie de 1O_2 en fonction de la température

L'évolution du temps de vie de l'oxygène singulet en fonction de la température dans D_2O et H_2O d'après les données publiées par P. R. Ogilby *et al.* [67] sur la constante de désexcitation non radiative de l' 1O_2 avec les molécules de solvant k_{nr} et la densité du solvant $[M]$ avec $\tau_{Delta} = 1/(k_{nr}[M])$ est représenté dans la Fig. A.3.

On observe une forte variation pour τ_{Delta} avec la température dans le cas de D_2O ($\sim 35\%$ sur 70°C), alors que dans les cas de H_2O la décroissance de τ_{Delta} avec la température est beaucoup moins forte ($\sim 10\%$ sur 70°C) (voir Fig. A.3). La correction sur le temps de vie de 1O_2 avec la température (donc avec la puissance du laser IR à 1270 nm) sera prise en compte dans les calculs de cinétique chimique.

A.2 Evolution du coefficient d'absorption linéaire α dans D_2O en fonction de la longueur d'onde

L'absorption dans D_2O varie avec la longueur d'onde d'irradiation entre 1247 et 1288 nm. La figure A.4 représente l'évolution du coefficient d'absorption linéaire α dans D_2O pour des longueurs d'onde allant de 1247 à 1288 nm.

Ainsi, lors de l'étude du spectre d'absorption de l'oxygène pour la transition $^3O_2[{}^3\Sigma_g^-] \longrightarrow ^1O_2[{}^1\Delta_g]$ dans D_2O , la variation du coefficient d'absorption linéaire α avec la longueur d'onde sera prise en compte dans l'analyse.

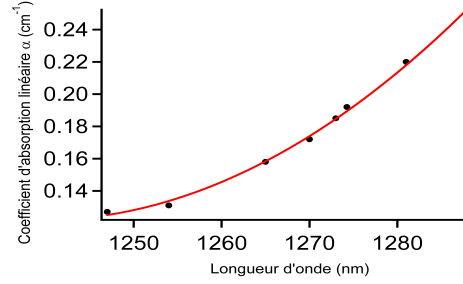


FIG. A.4: Evolution expérimentale du coefficient d'absorption linéaire α dans D_2O avec la longueur d'onde. La ligne pleine rouge représente le meilleur ajustement polynômiale à l'ordre 2.

A.3 Expériences complémentaires

A.3.1 Saturation des solutions de RTC en O_2 ou N_2

Les solutions de RTC dans D_2O sont saturées en dioxygène afin d'augmenter d'un facteur 5 la concentration en oxygène dissous. Afin de vérifier si on retrouve bien ce facteur 5 sur le taux de production d'oxygène singulet, nous avons réalisé une expérience d'irradiation laser à même puissance laser IR $P \sim 1.1W$ mais sans bullage, donc avec la solution saturée à l'air. La figure A.5 présente les résultats obtenus sur la cinétique de dégradation du piège pour des solutions de RTC saturées à l'air, en dioxygène et en diazote également.

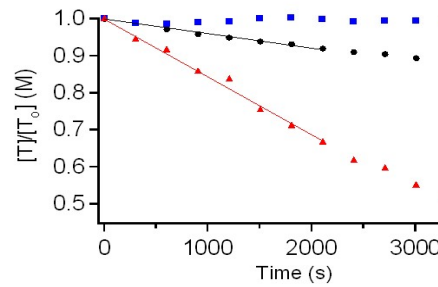


FIG. A.5: Effet de saturation des solutions de RTC dans D_2O en air (ronds noirs), dioxygène (triangles rouges) et diazote (carrés bleus) sur la cinétique de dégradation du RTC pour des concentrations initiales de $100 \mu M$ à la puissance laser IR d'irradiation de $P \sim 1.1W$.

L'analyse de la pente des courbes pour de faibles variations d'absorbance montre que le taux de production d'oxygène singulet Γ est multiplié par un facteur ~ 5.1 ($\Gamma = 3.43 \times 10^{-8} M.s^{-1}$ pour la solution saturée en oxygène comparé à $6.76 \times 10^{-9} M.s^{-1}$ pour la solution saturée à l'air, avec $\beta = 90 \times 10^{-6} M$ [106]). Nous n'avons pas observé de dégradation de la solution de RTC saturée en diazote sur une durée d'irradiation d'1 h à $1270 nm$.

A.3.2 Influence des produits d'oxydation sur la cinétique de disparition du RTC

La figure A.6 représente la cinétique de disparition du RTC dans D_2O pour tester l'influence des produits d'oxydation sur la cinétique de réaction. Une première solution de RTC dans D_2O est irradiée à $1270 nm$ à $P \sim 1.1W$. Une fois la solution totalement dégradée, du RTC est de nouveau dissous dans la cuve avec la même concentration initiale, soit $[T_0] \sim 100 \mu M$. Cette nouvelle solution est irradiée à même puissance laser IR. Les produits d'oxydation ont peu d'effet sur la cinétique de réaction.

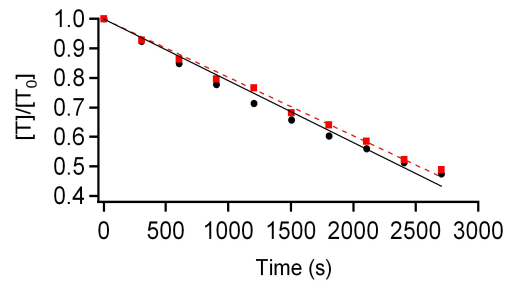


FIG. A.6: Vérification de l'influence des produits d'oxydation sur la cinétique de réaction. Après une première dégradation complète (carrés rouges), $100 \mu M$ de RTC sont dissous dans la solution contenant les produits dégradés. Cette nouvelle solution est de nouveau irradiée à même puissance laser (ronds noirs) $P \sim 1.1W$. Les lignes en pointillée rouge et en trait plein noir représentent le meilleur ajustement linéaire sur la première et la seconde expérience, respectivement.

Annexe B

Dispersions de nanocapsules lipidiques en milieu aqueux

B.1 Détail de l'analyse cinétique du modèle à deux pseudophases dans les dispersions de LNCS en milieu aqueux

Nous allons détailler ici l'analyse cinétique que nous avons développée pour les dispersions de LNCS en milieu aqueux.

Une approche similaire à celle de Lee and Rodgers [110] a été développée, avec un substrat (T) inclu dans le modèle comme dans [113].

La concentration moyenne en 1O_2 dans le mélange D_2O -LNCS, dénommée $[^1O_2]$ est donnée par l'Eq. B.1 où f_{LNC} et $(1 - f_{LNC})$ sont les fractions volumiques des phases LNCS et D_2O , respectivement.

$$[^1O_2] = f_{LNC}[^1O_2]_{LNC} + (1 - f_{LNC})[^1O_2]_{D_2O} \quad (B.1)$$

En dérivant par rapport au temps l'Eq. B.1, l'Eq B.2 est obtenue :

$$\frac{d[^1O_2]}{dt} = f_{LNC} \frac{d[^1O_2]_{LNC}}{dt} + (1 - f_{LNC}) \frac{d[^1O_2]_{D_2O}}{dt} \quad (B.2)$$

Le taux de réaction de 1O_2 dans chaque pseudophase peut être écrit comme suit :

$$\frac{d[^1O_2]_{LNC}}{dt} = \sigma_{LNC} I[^3O_2]_{LNC} - k_{d,LNC}[^1O_2]_{LNC} - k_{r,LNC}[^1O_2]_{LNC}[T]_{LNC} \quad (B.3)$$

$$\frac{d[^1O_2]_{D_2O}}{dt} = \sigma_{D_2O} I[^3O_2]_{D_2O} - k_{d,D_2O}[^1O_2]_{D_2O} \quad (B.4)$$

où, le flux de photons à 1270 nm (I) est identique dans les deux pseudophases.

La solubilité relative de 3O_2 entre les deux pseudophases est gouverné par la constante d'équilibre K où, $K = \frac{[^3O_2]_{LNC}}{[^3O_2]_{D_2O}}$. De plus, il a été montré que la constante d'équilibre K de l' 1O_2 entre les deux pseudophases est proche du ratio des solubilités de l'oxygène moléculaire dans les alcanes correspondants et dans l'eau [92]. Ainsi, $K_{eq} \approx K$. Finalement, en considérant que $[^3O_2]_{LNC} = K[^3O_2]_{D_2O}$ et $[T] = f_{LNC}[T]_{LNC}$ correspondant à la concentration en DPIBF dans le volume global, on obtient alors :

$$\begin{aligned} \frac{d[^1O_2]}{dt} &= I[^3O_2]_{D_2O} [f_{LNC}(K\sigma_{LNC} - \sigma_{D_2O}) + \sigma_{D_2O}] \\ &\quad - [^1O_2] \frac{[f_{LNC}(Kk_{d,LNC} - k_{d,D_2O}) + k_{d,D_2O}]}{Kf_{LNC} + (1 - f_{LNC})} \\ &\quad - [^1O_2][T] \frac{k_{r,LNC}K}{Kf_{LNC} + (1 - f_{LNC})} \end{aligned} \quad (B.5)$$

Les systèmes microhétérogènes peuvent être considérés comme un mélange homogène caractérisé par des constantes de réaction apparentes [113]. Dans les dispersions de LNC, le taux de réaction de 1O_2 peut ainsi être exprimé avec des constantes de réaction apparentes Γ_{app} , $k_{d,app}$ et $k_{r,app}$ correspondant respectivement au taux de production de 1O_2 , la constante de désactivation de l'oxygène singulet par le solvant et la constante de quenching chimique par T . Le taux de réaction de 1O_2 peut alors s'exprimer comme suit :

$$\frac{d[^1O_2]}{dt} = \Gamma_{app} - (k_{d,app} + k_{r,app}[T])[^1O_2] \quad (B.6)$$

Ainsi, la comparaison des Eq. B.5 et Eq. B.6 conduit à l'obtention du (i) taux de production apparent de 1O_2 (Eq. B.7), (ii) constante de désactivation non radiative de 1O_2 par le solvant (Eq. B.8) et (iii) la constante de quenching chimique de 1O_2 par le substrat T (Eq. B.9).

$$\Gamma_{app} = I[^3O_2]_{D2O} [f_{LNC}(K\sigma_{LNC} - \sigma_{D2O}) + \sigma_{D2O}] \quad (B.7)$$

$$k_{d,app} = \frac{f_{LNC}(Kk_{d,LNC} - k_{d,D2O}) + k_{d,D2O}}{Kf_{LNC} + (1 - f_{LNC})} \quad (B.8)$$

$$k_{r,app} = \frac{k_{r,LNC}K}{Kf_{LNC} + (1 - f_{LNC})} \quad (B.9)$$

L'équation B.7 conduit à l'obtention de σ_{app} , la section efficace d'absorption de 3O_2 pour la transition $^3O_2[^3\Sigma_g^-] \rightarrow ^1O_2[^1\Delta_g]$ à 1270 nm (Eq. B.10).

$$\sigma_{app} = \frac{\Gamma_{app}}{I[^3O_2]_{D2O}} = [f_{LNC}(K\sigma_{LNC} - \sigma_{D2O}) + \sigma_{D2O}] \quad (B.10)$$

L'indice de réactivité $\beta_{app} = k_{d,app}/k_{r,app}$, qui représente la concentration en piège pour laquelle le quenching de 1O_2 par les molécules de solvant ($k_{d,app}$) est égal à la désactivation par le quenching total par le substrat T ($k_{r,app}[T]$), est donné par :

$$\beta_{app} = \frac{1}{Kk_{r,LNC}} [f_{LNC}(Kk_{d,LNC} - k_{d,D2O}) + k_{d,D2O}] \quad (B.11)$$

Ainsi, σ_{app} et β_{app} sont des fonctions linéaires de f_{LNC} .

B.2 Formulation des nanocapsules lipidiques

La formulation des nanocapsules lipidiques a été réalisée par Alexandre Barras au sein de l'Institut de Recherche Interdisciplinaire de Villeneuve d'Ascq (IRI).

B.2.1 Réactifs et solvants utilisés

Les nanocapsules lipidiques (LNCs) sont composées du LabrafacTM Lipophile WL 1349 (triglycéride caprylique/caprique), de PhospholiponTM 90G (soybean lecithin à 97.1% de phosphatidylcholine), et de SolutolTM HS15 (un mélange de free polyethylene glycol 660 et de polyethylene glycol 660 hydroxystearate) généreusement fourni par Gattefosse S.A.S. (Saint-Priest, France), Phospholipid GmbH (Köln, Germany), et Laserson (Etampes, France), respectivement. L'eau distillée est obtenue par un système Milli-Q plus (Millipore, Paris, France). Les solvants proviennent de Sigma-Aldrich (Saint-Quentin Fallavier, France) et sont utilisés tel que reçus.

B.2.2 Préparation des LNCs chargées en DPIBF

Les LNCs sont formulées à une taille nominale de 25 nm dans D_2O en utilisant une méthode d'inversion de phase d'un système huile/eau, comme décrit dans [109]. Brièvement, la phase huileuse contenant le Labrafac (252 mg) et le Phospholipon 90G (37.5 mg) sont mélangés avec la quantité adéquate de Solutol (408 mg), de D_2O (540 μL) et de NaCl (44 mg), et chauffés sous agitation magnétique jusqu'à 80°C. Le mélange est soumis à 2-3 cycles de température entre 40 to 70°C sous agitation magnétique. Ensuite, il est refroidi à 55°C, 3.3 mL de D_2O (0°C) sont ajoutés, et la suspension (4.2 mL) est de nouveau agitée à température ambiante dans le noir pendant 10 min avant d'être utilisée. Les LNCs chargées en DPIBF sont préparées de deux manières distinctes. Pour les faibles quantités de DPIBF (< 1% phase huileuse), le DPIBF est solubilisé dans l'acétone (10 mg/mL). Ensuite, les cycles de chauffage sont mis en place et le volume approprié de solution de DPIBF est introduit au début du dernier refroidissement. Pour les fortes quantités de DPIBF (> 1% phase huileuse), le DPIBF est directement dissous dans la phase huileuse et les cycles de chauffage sont réalisés comme décrit ci-dessus. Ensuite, les LNCs chargées en DPIBF sont purifiées grâce à des colonnes PD-10 desalting (SephadexTM G-25 pour phase stationnaire de la gel filtration, Amerpurifiedsham Biosciences). La colonne est stabilisée avec 25 mL de D_2O . Ensuite 2 mL de suspensions de LNCs sont déposées en haut de la colonne, 0.5 mL de D_2O sont ajoutés pour compléter le volume mort de la colonne, puis 4 mL de D_2O sont élués et les LNCs purifiées sont collectées dans l'éluant (le facteur de dilution de la gel filtration est de 2). Le volume de LNCs est estimé à $\sim 0.63 \pm 0.06$ mL dans 8.4 mL de suspensions purifiées. Ainsi, pour la formulation initiale, la fraction volumique de LNCs dans D_2O ($f_{LNC} = V_{LNC}/(V_{LNC} + V_{D_2O})$ où, V_{LNC} et V_{D_2O} sont les volumes de LNCs et de D_2O , respectivement) est ~ 0.075 .

B.2.3 Détermination de la concentration en DPIBF dans les LNCs

Les concentrations en DPIBF dans les suspensions de LNCs sont déterminées par reversed phase - high performance liquid chromatography (RP-HPLC). Les analyses RP-HPLC sont réalisées sur l'appareil Shimadzu LC2010-HT (Shimadzu, Tokyo, Japan). Une colonne de 5 μm C4 QS UptisphereTM 300 Å, 250 $\times$ 4.6 mm (Interchim, Montluçon, France) est utilisée comme colonne analytique. La colonne est chauffée à 40°C. La phase mobile est un mélange de l'éluant A (acide trifluoroacétique 0.05% dans H_2O) et l'éluant B (acide trifluoroacétique 0.05% dans CH_3CN) à un débit de 1 mL/min. Le gradient linéaire est de 0% to 80% de l'éluant B en 30 min et la détection est réalisée à 410 nm. Une solution mère à 10 mM de DPIBF est préparée dans le diméthylsulfoxyde pour la courbe de calibration. Des concentrations entre 10 - 100 μM de DPIBF dans le diméthylsulfoxyde sont préparées à partir de cette solution mère. Chaque échantillon est injecté (40 μL) dans la colonne RP-HPLC. Les courbes de calibration ($y = 54872x$, $r^2 = 0.9999$) sont obtenues par régression linéaire pour l'aire du pic (y) en fonction de la concentration en DPIBF(x , μM).

B.3 Expériences complémentaires

B.3.1 Formation de deux produits d'oxydation durant l'irradiation à 1270 nm

Nous avons analysés les dispersions de LNCs chargées en DPIBF dans D_2O avant et après irradiation à 1270 nm par HPLC avec une détection à 215 nm. Après 1 h et 2 h d'irradiation à une puissance laser de 1.0 W, 28 et 47 % de DPIBF est dégradé, respectivement. Deux produits d'oxydation absorbant à 215 nm sont détectés, et leurs proportions augmentent avec la durée d'irradiation. Les deux produits d'oxydation n'ont pas été identifiés.

B.3.2 Analyse des fuites de DPIBF et des produits d'oxydation formés

La figure B.2 représente les chromatogrammes HPLC des LNCs chargées en DPIBF après 1 h (a) et 2 h (b) d'irradiation à 1270 nm, pour les dispersions de LNCs filtrées et non filtrées. Environ

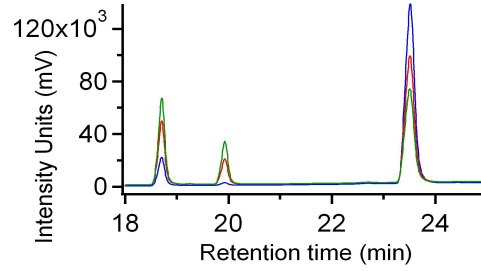


FIG. B.1: Chromatogrammes HPLC des LNCs chargées en DPIBF dans D_2O avec $[T_0] = 120 \times 10^6 \text{ mol.L}^{-1}$ et $f_{LNC} = 0.006$ avant et après irradiation à 1270 nm (détection à 215 nm). Les dispersions non irradiées (ligne pleine bleue), irradiées 1 h (ligne pleine rouge) et irradiées 2 h (ligne pleine verte) ont été analysées.

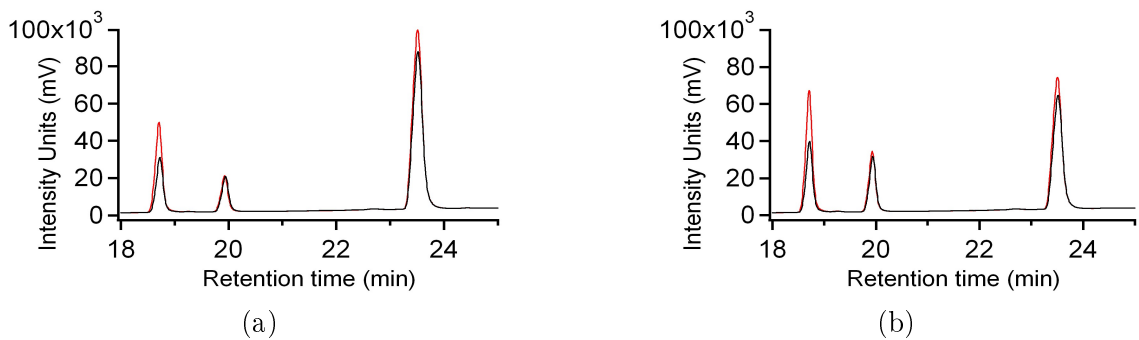


FIG. B.2: Chromatogrammes HPLC pour les LNCs chargées en DPIBF pour $f_{LNC} = 0.006$ pour $[T_0] = 120 \times 10^6 \text{ mol.L}^{-1}$ après 1 h (a) ou 2 h d'irradiation à 1270 nm pour $P = 1 \text{ W}$ (détection réalisée à 215 nm). Les dispersions de LNCs avant (trait plein rouge) et après filtration (trait plein noir) ont été analysées.

90 % du DPIBF est à l'intérieur des capsules après 1 et 2 h d'irradiation. Le produit d'oxydation le plus hydrophobe est présent majoritairement dans les nanocapsules (à 95 %) alors que le plus hydrophile est trouvé à 60 % à l'intérieur des LNCs.

B.3.3 Effet de l'irradiation à 1270 nm sur la stabilité des LNCs

Pour évaluer l'effet de l'irradiation laser à 1270 nm sur la stabilité des LNCs nous avons réalisé deux expériences. Dans une première étude, nous avons mesuré l'absorbance des LNCs à vide à 405 nm au cours de l'irradiation laser à 1270 nm (voir Fig. B.3 (a)). Aucune variation d'absorbance n'a été mesurée pour les valeurs limites des f_{LNC} étudiées. Dans une seconde étude, nous avons mesuré la taille des LNCs chargées en DPIBF avant et après 8 h d'irradiation à 1270 nm . Le diamètre moyen des LNCs est sensiblement identique avant et après l'irradiation.

B.4 Effet de solvant sur la vitesse de dégradation du DPIBF dans les dispersions de LNCs en milieu aqueux

Afin d'évaluer l'influence du solvant dans lequel les LNCs sont dispersées, nous avons mesuré dans H_2O et D_2O , la cinétique de disparition du DPIBF pour une fraction volumique de LNCs identique.

La concentration normalisée en DPIBF pour les dispersions de LNCs dans D_2O et H_2O sous irradiation laser à 1270 nm est représentée (Fig. B.4). Les pentes des courbes $\Gamma_{app}/([T_0] + \beta_{app})$ sont égales à $7.6 \times 10^{-6} \text{ mol.L}^{-1}$ et $5.3 \times 10^{-5} \text{ mol.L}^{-1}$ dans le cas de H_2O et D_2O , respectivement. La

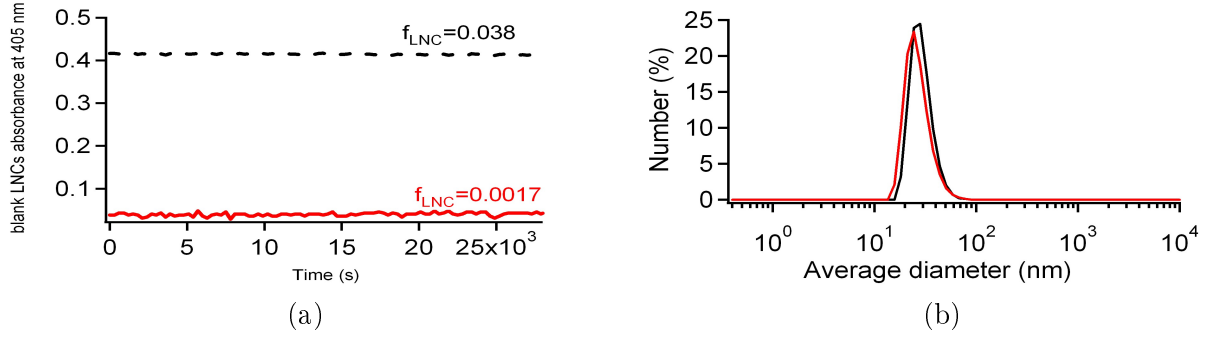


FIG. B.3: (a) Mesure d'absorbance à 405 nm des LNCs à vide sous irradiation à 1270 nm pour $P = 1.0 W$ et $f_{LNC} = 0.0017$ (trait plein rouge), et $f_{LNC} = 0.038$ (trait pointillé noir). (b) Diamètre moyen des LNCs chargées en DPIBF dans D_2O pour $[T_0] = 120 \times 10^{-6} mol.L^{-1}$ et $f_{LNC} = 0.0017$, avant (trait plein noir) et après (trait plein rouge) 8 h d'irradiation à 1270 nm ($P = 1.0 W$). Les mesures ont été faites par dynamic light scattering (DLS) avec l'appareil ZetasizerTM Nano ZS (Malvern Instrument S. A., Worcestershire, U. K).

concentration initiale en DPIBF est de $140 \times 10^{-6} mol.L^{-1}$ et $120 \times 10^{-6} mol.L^{-1}$, la concentration en oxygène dissous est de $2.04 \times 10^{-4} mol.L^{-1}$ et $2.46 \times 10^{-4} mol.L^{-1}$ dans H_2O et D_2O , respectivement.

Normalisé au même flux de photons et considérant $\sigma_{h2o} = \sigma_{d2o}$, $k_{r,LNC} = 2.56 \times 10^5 s^{-1}$ et les temps de vie respectif pour 1O_2 dans H_2O et D_2O , le ratio des deux pentes est de ~ 4.4 contre une valeur théorique de 4 (voir Eq. B.12).

$$\frac{[^3O_2]_{d2o}}{[^3O_2]_{h2o}} \times \frac{[T_0]_{h2o} + \beta_{app,h2o}}{[T_0]_{d2o} + \beta_{app,d2o}} \quad (B.12)$$

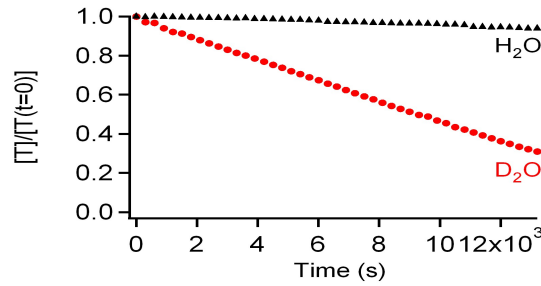


FIG. B.4: Concentration normalisée en DPIBF pour les dispersions de LNCs dans H_2O (carrés noirs) et D_2O (ronds rouges) sous irradiation laser à 1270 nm pour $P = 1.2 W$ pour $f_{LNC} = 0.0017$.

Annexe C

Protocole de culture cellulaire

C.1 Lignée cellulaire HEK transfectées *HSF1* – *eGFP*

C.1.1 Plasmide et transfection cellulaire

La construction du plasmide et la transfection sur la lignée de cellules rénales embryonnaires humaines (HEK, pour Human Embryonary Kidney) ont été réalisés par Gaétan Herbomel au sein de l'institut Albert Bonniot de Grenoble sous la direction de Claire Vourc'h et Catherine Souchier. La Lignée cellulaire HEK transfectées *HSF1* – *eGFP* utilisée ici a donc été fournie par cette équipe.

Ainsi, G. Herbomel a réalisé la fusion de la protéine humaine complète *HSF1* à la protéine *eGFP*. Pour cela, la séquence codante de la protéine *hHFS1* a été insérée dans un plasmide *peGFP* – *N3/C3* – *hHFS1*. La séquence codante de la protéine *hHFS1* est constituée de 1950 nucléotides, formant une protéine de 529 acides aminés. La protéine *eGFP* est constituée de 239 acides aminés. Le détail des constructions et transfections est extrait de la thèse de G. Herbomel [261].

Construction du plasmide *HSF1* – *eGFP*

Pour une fusion de la protéine *eGFP* en C-terminal d'*HSF1*, la séquence codante de *hHFS1* est obtenue par PCR en utilisant deux amorces différentes (détail dans [261]). Le produit de PCR est ensuite digéré avec les enzymes *EcoRI* et *BgIII*, puis inséré dans le plasmide *peGFP* – *N3* entre les sites *EcoRI* et *BamHI* (*BGIII* et *BamHI* étant compatibles).

Transfection cellulaire

Les transfections par les plasmides ont été réalisées avec la lipofectamine™2000 (Life Technologies, Carlsbad, CA). Les cellules sont rincées 24 h après transfection, puis la pression de sélection est ajoutée 48 h après transfection. Les cellules sont ensuite cultivées jusqu'à ce qu'il n'y ait plus de mort induite par l'agent de sélection (soit environ deux semaines). Les cellules exprimant un niveau de fluorescence suffisant pour être détectées en microscopie de fluorescence ont été sélectionnées par cytométrie de flux (cytomètre ARIA, Beckton Dickinson).

C.1.2 Culture cellulaire

Les cellules HEK sont cultivées en routine et en monocouche en présence du milieu de culture DMEM (Dubelcco's modified Eagle medium) à 4.5 g/L de glucose et contenant 10 % de sérum de veau foetal, 4 mM de L-Glutamine (2 %) et 40 U/ml de pénicilline-Streptomycine. Ces cellules sont cultivées à 37°C en atmosphère humide dans un incubateur à 5 % de *CO*₂. Le milieu de culture est renouvelé toutes les 48 h.

C.2 Lignée cellulaire MCF-7

La lignée cellulaire épithéliale de cancer du sein MCF-7 a été fournie par ATCC. Ces cellules sont cultivées en routine et en monocouche en présence du milieu de culture MEM (Minimum Essential Medium Eagle-Earle's BBS) complété à 10 % de sérum de veau foetal, 2 *mM* de L-glutamine et 40 *U/ml* de pénicilline-Streptomycine. Les conditions de culture sont identiques à celles décrites pour les cellules HEK.

Annexe D

Étude de la réactivité de 1O_2 en cellules vivantes

D.1 Protocole de détermination de la concentration intracellulaire en DPIBF

Afin d'obtenir des données quantitatives sur la réactivité de l'oxygène singulet avec le DPIBF en cellules vivantes, il convient de déterminer la concentration intracellulaire en DPIBF. Nous avons élaboré un protocole permettant de déterminer la concentration de DPIBF incubée par les cellules. Ce protocole comprend trois parties que nous allons détailler ici.

D.1.1 Préparation des solutions de DPIBF

Une solution mère de DPIBF dans le DMSO (Sigma) est préparée à $50 \times 10^3 \text{ mol.L}^{-1}$ (dissolution de 13.5 mg de DPIBF dans 1 ml de DMSO). A partir de cette solution mère, trois solutions de DPIBF dans le DMSO sont préparées à 500, 50 et 5 $\mu\text{mol.L}^{-1}$.

Puis, ces solutions sont diluées par 100 dans le milieu de culture complet pour obtenir trois solutions de DPIBF dans le milieu de culture à 5, 0.5 et 0.05 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ à 1 % en DMSO.

D.1.2 Incubation du DPIBF en cellules vivantes

Des cellules MCF7 sont cultivées dans des boîtes de culture en plastique de 75 cm^2 . Elles sont cultivées dans le milieu de culture complet (DMEM, penystrepto, L-Glu) à 37.2°C dans une atmosphère à 5 % de CO_2 . Les cellules sont divisées et dispersées dans une nouvelle boîte 48 h avant l'expérience.

Le jour J, quatre boîtes de culture de confluence importante sont utilisées. Le milieu de culture des trois boîtes est éliminé. Dans chacune des trois boîtes, on ajoute 8 ml de la solution de DPIBF à 1 % de DMSO au concentration de 5, 0.5 et 0.05 $\mu\text{mol.L}^{-1}$. Dans la dernière boîte, qui sert de contrôle, on ajoute uniquement du milieu de culture.

Les quatre boîtes sont remises dans l'incubateur pendant 1 h.

D.1.3 Extraction du DPIBF incubé en cellules

Après 1 h d'incubation, les 4 boîtes sont vidées, rincées deux fois au DMEM et deux fois au PBS. On ajoute alors 1 ml de PBS et des images en fluorescence des cellules sont prises.

Les boîtes sont alors vidées, rincées avec de la trypsine. On ajoute 1 ml de trypsine et on attend environ 10 min pour que les cellules soient bien décollées.

On re-suspend alors les cellules pour bien les disperser et on ajoute 1 ml de milieu de culture complet pour arrêter le procédé de trypsinisation. Les cellules sont alors collectées dans un tube et deux fois 2 ml de DMEM sont ajoutés dans la boîte pour récupérer la totalité des cellules. Les cellules sont alors remises en suspension par pipetages successifs dans les 6 ml de suspension

cellulaire et permettre une bonne dispersion. On prélève $60 \mu\text{L}$ de cette suspension cellulaire (soit 1 %) pour la comptage des cellules sur des lames fast readTM. Un volume précis de suspension cellulaire est déposé sur une lame. La suspension est aspirée par capillarité. La lame est composé d'une grille comportant 10 carrés de volume $0.1 \mu\text{L}$. En comptant le nombre de cellules par carré, on peut remonter au nombre de cellules en suspension dans les 6 ml de milieu de culture.

La suspension cellulaire est alors centrifugée à 4000 rpm pendant 5 min , ce qui permet de récupérer les cellules dans le culot du tube. On ajoute alors $120 \mu\text{L}$ d'éthanol absolu (Sigma, $> 99.8\%$). On agite alors pour permettre au DPIBF contenu dans les cellules d'être relargué dans l'éthanol. A nouveau, le tube est centrifugé à 4000 rpm pendant 5 min .

Ensuite, $100 \mu\text{L}$ du surnageant est prélevé, et placé dans une plaque de fluorescence multipuits (96 puits). La fluorescence des 4 puits (3 boîtes ayant incubées le DPIBF et la boîte contrôle) est analysée en microscopie avec les filtres d'excitation et d'émission du DPIBF. On soustrait pour les 3 puits d'intérêt, le signal de fluorescence de la boîte contrôle.

D.2 Courbe de calibration de fluorescence du DPIBF dans l'éthanol

Pour déterminer la concentration de DPIBF extraite dans l'éthanol, il est nécessaire de connaître la courbe de fluorescence calibrée du DPIBF dans ce solvant. Dans des conditions identiques d'excitation, d'émission et de paramétrage de la caméra, des solutions de DPIBF dans l'éthanol sont analysées par microscopie de fluorescence. On obtient donc la courbe calibrée suivante D.1, qui montre une relation linéaire entre la fluorescence du DPIBF dans l'éthanol et la concentration en éthanol.

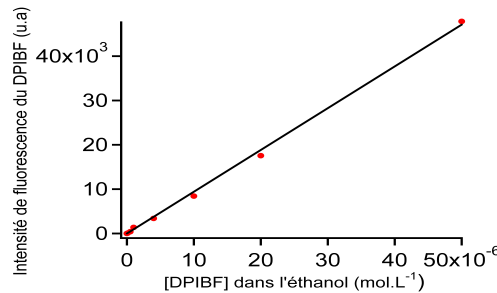


FIG. D.1: Courbe de calibration de fluorescence du DPIBF dans l'éthanol.

D.3 Détermination de la concentration intracellulaire en DPIBF

A partir de la courbe de calibration de fluorescence du DPIBF dans l'éthanol, on peut déterminer la concentration en DPIBF ($[DPIBF]_{EtOH}$) extraite dans l'éthanol pour les trois boîtes de culture ayant incubées le DPIBF.

Connaissant le volume d'EtOH ayant permis l'extraction ($V_{EtOH} = 120 \mu\text{L}$), on détermine alors le nombre de mole de DPIBF extraites dans l'éthanol ($n_{DPIBF,EtOH} = [DPIBF]_{EtOH} \times V_{EtOH}$).

Le comptage des cellules sur les lames fast readTM a permis de calculer un nombre total de cellules par boîtes de culture ($n_{bre_{cellules}}$). Le volume d'une cellule MCF7 ($V_{cellule}$) est de l'ordre de 2.4 pL soit $2.4 \times 10^{-12} \text{ L}$ [131]. On obtient donc une concentration intracellulaire en DPIBF de :

$$[DPIBF]_{intra-cellulaire} = \frac{n_{DPIBF,EtOH}}{n_{bre_{cellules}} \times V_{cellule}} \quad (\text{D.1})$$

L'incertitude sur la détermination de la concentration intracellulaire en DPIBF vient majoritairement du comptage des cellules. Pour déterminer cette incertitude, le comptage des cellules est

réalisé deux fois pour chacune des boîtes. On observe une incertitude sur le comptage des cellules à $\pm 30\%$.

Annexe E

Modélisation du stress thermique

E.1 Modèle mathématique de titration actuel du stress thermique

Nous détaillons ici le système d'équations différentielles du modèle de I. Petre *et al.* [225] ainsi qu'un jeu de paramètre obtenu sur les constantes de réaction et les concentrations initiales après meilleur ajustement sur les données expérimentales de K. Abravaya *et al.* [175].

E.1.1 Systèmes d'équations différentielles ordinaires

Le modèle mathématique de titration développé par I. Petre *et al.* [225] comprend 10 équations différentielles détaillées dans la table E.1. Sur ces 10 équations, compte-tenu des équations de conservation de la matière (voir Eq. 8.1, 8.2, 8.3), seules 7 équations sont indépendantes.

Dans la table E.1, les constantes de vitesse de la réaction irréversible (i) sont notées k_i . Pour les réactions réversibles, les constantes de vitesse de réaction correspondant à la direction 'gauche-vers-droite' de la réaction (i) sont notées k_i^+ alors que k_i^- représente le sens 'droite-vers-gauche' pour tout $1 \leq i \leq 12$. T représente la température de l'environnement.

E.1.2 Jeu de paramètres obtenus

Constante de vitesse de réaction

La table E.2 présente les constantes de réaction du modèle de I. Petre *et al.* obtenues après meilleur ajustement sur les données expérimentales de K. Abravaya *et al.* [175] pour un jeu de paramètres.

Concentrations initiales

Les concentrations initiales de chaque espèce sont obtenues lorsque celles-ci atteignent un état d'équilibre pour un temps infiniment long à 37°C. La table E.3 présente les concentrations initiales de chaque espèce à 37°C.

E.2 Modèle mathématique minimal de titration du stress thermique

La figure E.1 présente la dispersion des concentrations à l'état stationnaire et des température d'adaptation et critique du modèle simplifié sur les 400 meilleurs jeux de paramètres.

La Figure E.2 représente la dispersions des constantes de réaction du modèle simplifié sur les 400 meilleurs jeux de paramètres.

Équation	Numéro de l'équation
$ \begin{aligned} d[HSF1]/dt = & -2k_1^+[HSF1]^2 + 2k_1^-[HSF1_2] \\ & -k_2^+[HSF1][HSF1_2] + k_2^-[HSF1_3] \\ & -k_5^+[HSF1][HSP] + k_5^-[HSP : HSF1] + k_6[HSF1_2][HSP] \\ & + 2k_7[HSF1_3][HSP] + 2k_8[HSF1_3 : HSE][HSP] \end{aligned} $	(13)
$ \begin{aligned} d[HSF1_2]/dt = & k_1^+[HSF1]^2 - k_1^-[HSF1_2] \\ & -k_2^+[HSF1][HSF1_2] + k_2^-[HSF1_3] \\ & -k_6[HSF1_2][HSP] \end{aligned} $	(14)
$ \begin{aligned} d[HSF1_3]/dt = & k_2^+[HSF1][HSF1_2] - k_2^-[HSF1_3] \\ & -k_3^+[HSF1_3][HSE] + k_3^-[HSF1_3 : HSE] \\ & -k_7[HSF1_3][HSP] \end{aligned} $	(15)
$ \begin{aligned} d[HSE]/dt = & -k_3^+[HSF1_3][HSE] + k_3^-[HSF1_3 : HSE] \\ & + k_8[HSF1_3 : HSE][HSP] \end{aligned} $	(16)
$ \begin{aligned} d[HSF1_3 : HSE]/dt = & k_3^+[HSF1_3][HSE] - k_3^-[HSF1_3 : HSE] \\ & -k_8[HSF1_3 : HSE][HSP] \end{aligned} $	(17)
$ \begin{aligned} d[HSP]/dt = & k_4[HSF1_3 : HSE] - k_5^+[HSF1][HSP] + k_5^-[HSP : HSF1] \\ & -k_6[HSF1_2][HSP] \\ & -k_7[HSF1_3][HSP] - k_8[HSF1_3 : HSE][HSP] - k_{11}^+[HSP][MFP] \\ & + (k_{11}^- + k_{12})[HSP : MFP] - k_9[HSP] \end{aligned} $	(18)
$ \begin{aligned} d[HSP : HSF1]/dt = & k_5^+[HSF1][HSP] - k_5^-[HSP : HSF1] \\ & + k_6[HSF1_2][HSP] \\ & + k_7[HSF1_3][HSP] + k_8[HSF1_3 : HSE][HSP] \end{aligned} $	(19)
$d[MFP]/dt = \phi_T[PROT] - k_{11}^+[HSP][MFP] + k_{11}^-[HSP : MFP]$	(20)
$d[HSP : MFP]/dt = k_{11}^+[HSP][MFP] - (k_{11}^- + k_{12})[HSP : MFP]$	(21)
$d[PROT]/dt = -\phi_T[PROT] + k_{12}[HSP : MFP]$	(22)

TAB. E.1: Équations différentielles du modèle mathématique de titration de I. Petre *et al.* [225] pour la description du réseau de régulation du stress thermique.

Constante de vitesse de réaction	Valeur	Unité
k_1^+	5.71	$L.mol^{-1}.min^{-1}$
k_1^-	183.3	min^{-1}
k_2^+	2.35	$L.mol^{-1}.min^{-1}$
k_2^-	0.334	min^{-1}
k_3^+	0.136	$L.mol^{-1}.min^{-1}$
k_3^-	3.21	min^{-1}
k_4	0.148	min^{-1}
k_5^+	19.5	$L.mol^{-1}.min^{-1}$
k_5^-	6.59	min^{-1}
k_6	5.98	$L.mol^{-1}.min^{-1}$
k_7	$9.47.10^{-10}$	$L.mol^{-1}.min^{-1}$
k_8	$1.59.10^{-11}$	$L.mol^{-1}.min^{-1}$
k_9	0.00104	min^{-1}
α	$2.23.10^{-5}$	min^{-1}
k_{11}^+	0.0074	$L.mol^{-1}.min^{-1}$
k_{11}^-	261.6	min^{-1}
k_{12}	17.63	min^{-1}

TAB. E.2: Valeurs des constantes de vitesse de réaction du modèle de I. Petre *et al.* [225] obtenues par meilleur ajustement sur les données expérimentales de [175].

Espèce	Concentration initiale ($mol.L^{-1}$)
$HSF1$	0.0023
$HSF1_2$	49.4
$HSF1_3$	3.69
HSE	110.18
$HSF1_3 : HSE$	0.029
HSP	1068.19
$HSP : HSF1$	2958.32
MFP	132763.31
$HSP : MFP$	116.04
$PROT$	$1.77.10^8$

TAB. E.3: Concentrations initiales pour chaque espèce réactionnelle du modèle de I. Petre *et al.* [225] obtenues par meilleur ajustement sur les données expérimentales de [175].

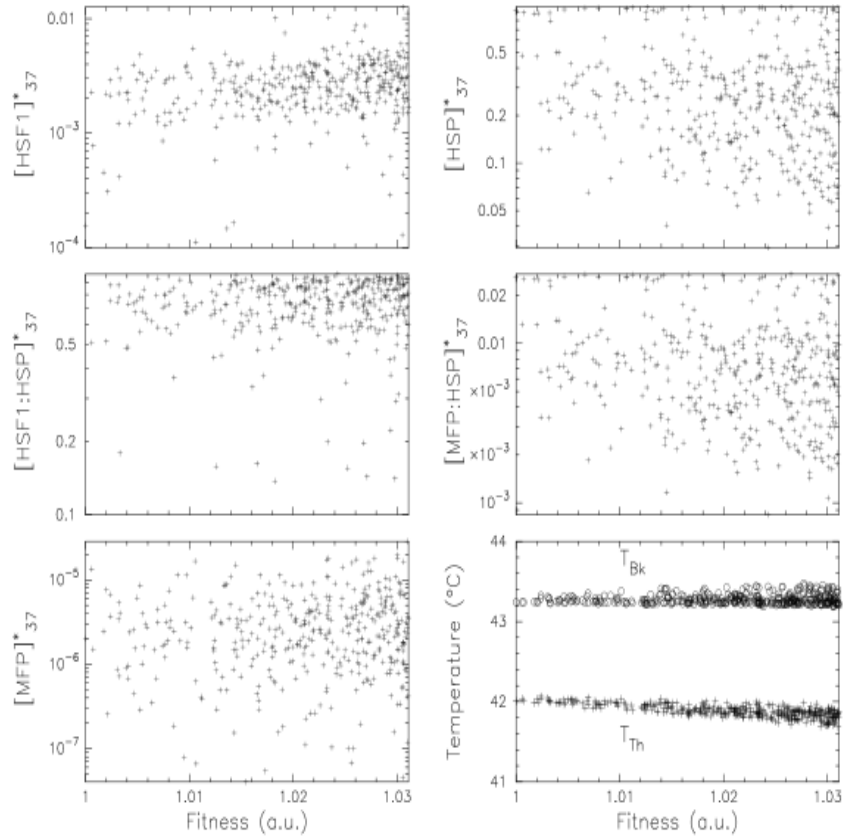


FIG. E.1: Dispersion des concentrations à l'état stationnaire pour les 5 espèces réactionnelles sur les 400 meilleurs jeux de paramètres pour le modèle mathématique minimal. La dispersion pour la température de pseudo-adaptation thermique (T_{th}) et la température critique (T_{bk}) est également représentée sur les 400 meilleurs jeux de paramètres. Les meilleurs jeux de paramètres déterminés par la procédure d'optimisation sont représentés en fonction de leur score d'ajustement normalisé au meilleur score. Chaque encart correspond au paramètre indiqué.

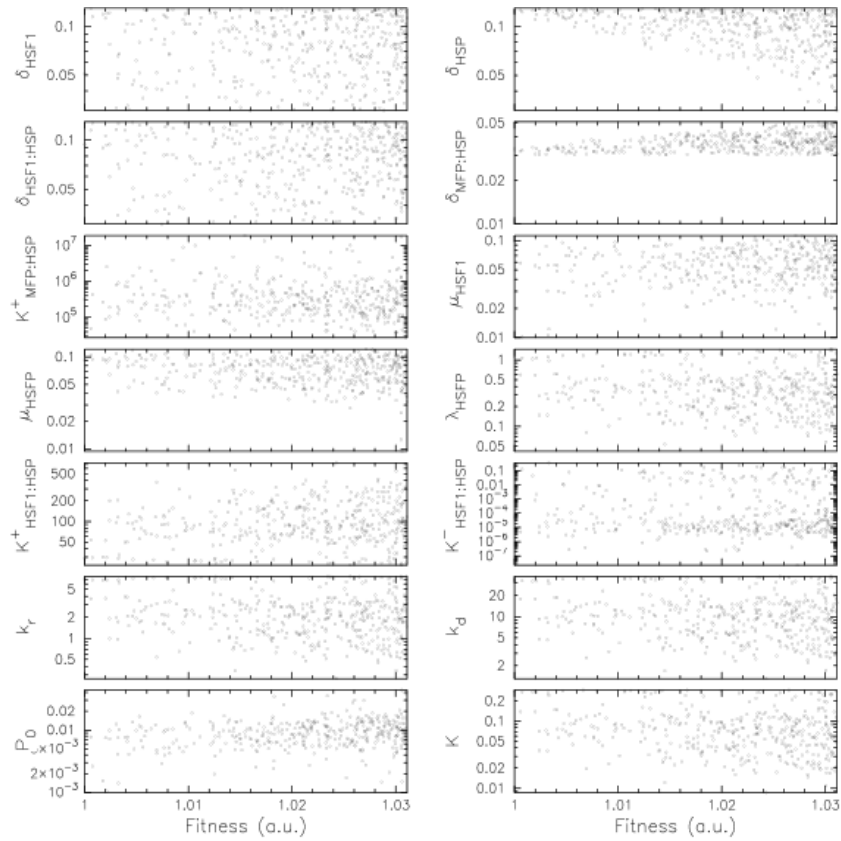


FIG. E.2: Dispersion des 14 paramètres sur les 400 meilleurs jeux de paramètres pour le modèle mathématique minimal. Les 400 meilleurs jeux de paramètres déterminés par la procédure d'optimisation sont représentés en fonction de leur score d'ajustement normalisé au meilleur score. Chaque encart correspond au paramètre indiqué.

Annexe F

Détermination expérimentale de l'élévation de température induite par laser

F.1 Formulation des solutions de rhodamine B et 110

Nous allons détailler ici le protocole de préparation des solutions de rhodamine B et 110 ayant permis de réaliser la cartographie du champ de température lorsque le laser Infra Rouge traverse la boîte de culture remplie de milieu de culture. Nos expériences d'irradiation se font avec 2 ml de milieu de culture, donc les expériences de mesure de température avec la rhodamine sont réalisées dans les mêmes conditions.

F.1.1 Préparation des solutions mères dans l'éthanol

Solution de rhodamine B à $3 \times 10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$ Dans un erlenmeyer, 14.4 mg de rhodamine B (Fluka Sigma, $M_{rhodB} = 479.02 \text{ g.mol}^{-1}$) sont pesés (précision de la balance $\pm 1.10^{-4} \text{ g}$). On ajoute alors, 7.89 g d'éthanol (Sigma, > 99.8%, $d = 0.789 \text{ kg.L}^{-1}$). Afin de dissoudre les cristaux, la solution est maintenue sous agitation magnétique et chauffage doux (afin d'éviter l'évaporation de l'éthanol) pendant 45 min. La solution finale de rhodamine B à $3 \times 10^{-3} \text{ mol.L}^{-1} \pm 1\%$ dans l'éthanol est parfaitement limpide (i.e., il ne reste plus de présence de cristaux non dissous dans la solution).

Solution de rhodamine 110 à $3 \times 10^{-4} \text{ mol.L}^{-1}$ On pèse 11.0 mg de rhodamine 110 (Sigma, $M_{rhod110} = 366.79 \text{ g.mol}^{-1}$) dans une capsule plastique. On mesure un volume de 100 ml d'éthanol dans une fiole jaugée ($\Delta V = \pm 0.1 \text{ ml}$). Dans un flacon en verre, la rhodamine 110 et l'éthanol sont ajoutés. Afin de dissoudre les cristaux, la solution est maintenue sous agitation magnétique et chauffage doux (afin d'éviter l'évaporation de l'éthanol) pendant 45 min. La solution finale de rhodamine 110 à $3.10^{-4} \text{ mol.L}^{-1} \pm 1\%$ dans l'éthanol est parfaitement limpide (i.e., il ne reste plus de présence de cristaux non dissous dans la solution).

F.1.2 Préparation des solutions finales dans l'eau à 1 % d'éthanol

Solution de rhodamine B à $3 \times 10^{-6} \text{ mol.L}^{-1}$ Dans une fiole jaugée de 100 ml, on pèse 0.0789 g de la solution mère de rhodamine B à $3 \times 10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$ dans l'éthanol. On complète alors avec de l'eau mQ jusqu'au trait de jauge. On obtient ainsi une solution limpide de rhodamine B à $3 \times 10^{-6} \text{ mol.L}^{-1} \pm 1\%$ dans l'eau à 1 % d'éthanol.

Solution de rhodamine 110 à $3 \times 10^{-7} \text{ mol.L}^{-1}$ Dans une fiole jaugée de 100 ml, on pèse 0.0789 g de la solution mère de rhodamine 110 à $3 \times 10^{-4} \text{ mol.L}^{-1}$ dans l'éthanol. On complète alors avec de l'eau mQ jusqu'au trait de jauge. On obtient ainsi une solution limpide de rhodamine 110 à $3 \times 10^{-7} \text{ mol.L}^{-1} \pm 1\%$ dans l'eau à 1 % d'éthanol.

F.2 Stockage des solutions de rhodamine

Les solutions de rhodamine étant sensibles à la lumière, les flacons contenant les solutions seront stockées dans le noir. Le pH des solutions (mesuré à 8 lors de la préparation des solutions) doit être vérifié lors de la réutilisation ultérieure des solutions, afin de vérifier la constante de celui-ci. En effet, des modifications de pH peuvent entraîner la modification des propriétés de fluorescence des colorants, et donc entraînerait la non-reproductibilité des résultats sur la calibration de température.

Nous avons choisi d'utiliser l'eau mQ pour la préparation des solutions, afin d'obtenir une solution propre et d'éviter ainsi d'introduire des impuretés dans les solutions.

Nous avons vérifié que les résultats de calibration de fluorescence des deux rhodamines sont reproductibles d'un jour à l'autre (ratio d'intensité de fluorescence des deux rhodamine identique à $\pm 2\%$). En conclusion, la préparation des solutions de rhodamine est satisfaisante pour les mesures de température et les solutions peuvent être réutilisées (sous condition de stockage adéquat) pour des expériences ultérieures.

Annexe G

Programme de détection et de suivi des granules de stress nucléaires

G.1 Développement d'un programme de détection et de suivi des granules

Pour la détection des granules de stress nucléaires, et leur suivi lors des séries temporelles, nous avons développé un programme de détection et de suivi des granules. Ce programme permet de détecter et suivre les granules sur une série temporelle d'images.

A l'image brut (Fig. G.1 (a)) comportant la fluorescence émise par les cellules et les granules, un filtre médian lent est appliqué et permet la détection des variations lentes de fluorescence, soit la détection des cellules (voir Fig G.1 (b)). Un filtre médian rapide est appliqué et permet la détection des variations rapides de fluorescence, soit la détection des granules (voir Fig. G.1 (c)).

L'application des deux filtre médians lent et rapide permet la détection des cellules et des granules contenus à l'intérieur des cellules, ainsi que leur suivi temporel sur la série d'images.

G.2 Illustration sur un exemple

La figure G.2 illustre la détection et le suivi des deux granules d'une cellule pour un stress thermique de 4 h à 43°C. Les granules sont détectés à 1 min 30 s de stress thermique. A 248 min de stress thermique, les granules n'ont pas relaxé. Les deux granules d'une même cellule présente des cinétiques identiques.

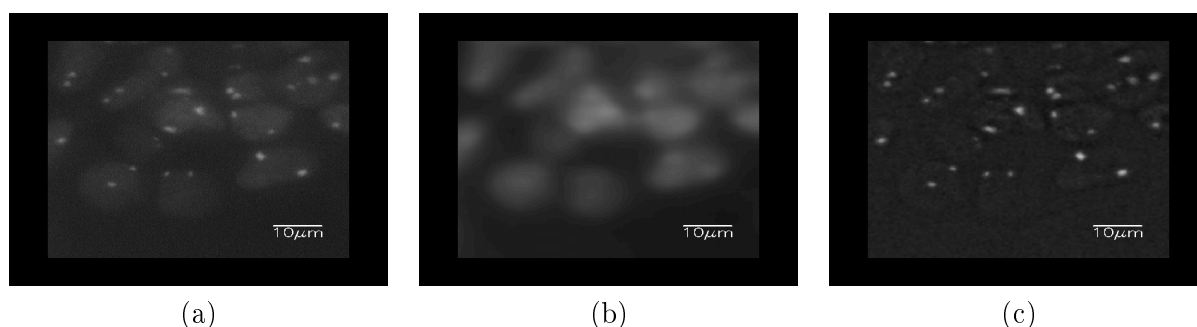


FIG. G.1: (a) Image brut des cellules HEK transfectées *HSF1 – eGFP* en microscopie de fluorescence. (b) Filtre médian lent appliquée à l'image brut permettant la détection des cellules. (c) Filtre médian rapide appliquée à l'image brut permettant la détection des granules contenus à l'intérieur des cellules.

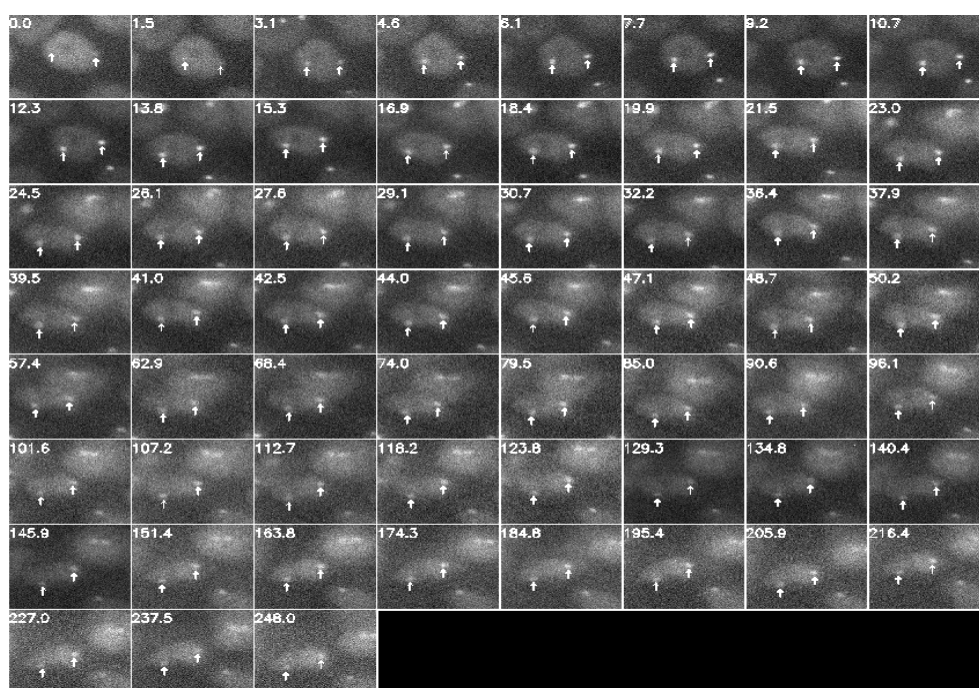


FIG. G.2: Détection et suivi des deux granules d'une cellule pour un stress thermique de 4 h à 43°C.

Annexe H

Diffraction de la lumière, limite de résolution et profondeur de champ

Dans cette partie, les notions de diffraction de la lumière, des limites de résolution et de profondeur de champ sont rappelés. Cette partie est inspirée par le cours des “Bases de la microscopie” de Mr Yves Usson [271].

H.1 Introduction au concept de diffraction des ondes lumineuses

Lorsqu’un rayon lumineux rencontre une petite structure ou le bord d’un objet, une fraction des trains d’onde va se trouver dispersée à l’intérieur d’un cône centré sur la direction de propagation du rayon lumineux. L’ouverture du cône dépendra à la fois de la longueur d’onde de la lumière et de la dimension de la structure. Plus la dimension de la structure est petite, plus le cône est ouvert. Ces rayons diffractés vont pouvoir interférer avec d’autres rayons ce qui entraînera une altération du contraste et de la résolution des images formées par un microscope.

Quand un faisceau lumineux est focalisé par une lentille, la lumière n’est pas focalisée en un point géométrique, mais elle est focalisée sur une région de faible diamètre, entourée de cercles alternativement brillants ou sombres, l’image entière est ce qu’on appelle la tâche de diffraction d’Airy. La théorie ondulatoire de la lumière permet d’expliquer ce phénomène d’étalement de la lumière traversant une ouverture ainsi que la focalisation d’un faisceau lumineux derrière une lentille.

H.2 Formation de l’image par une lentille

H.2.1 Optique géométrique

Dans un microscope, l’image agrandie de l’objet est formée par la lentille de l’objectif. L’objet à observer est placé au voisinage du foyer objet de la lentille. L’image agrandie est formée au delà du foyer image de la lentille. Le grandissement dépendra de la distance du foyer de la lentille au centre de la lentille. Plus cette distance est courte, plus fort est le grandissement. Cependant, il n’est pas possible d’agrandir infiniment un objet en réduisant sa distance au foyer : le pouvoir séparateur de la lentille est limité par la diffraction.

H.2.2 Optique ondulatoire

La formation d’une image dans un microscope est la résultante de deux fonctions de répartition de la lumière :

- La fonction d’étalement du point dans le plan focal qui conditionne la **la résolution latérale** (en X et Y).
- La fonction de défocalisation qui conditionne **la résolution axiale** (en Z)

La fonction d'étalement du point (ou PSF pour point Spread Function) est la description mathématique de l'image du disque d'Airy (Fig. H.1) obtenue lorsqu'on observe un point lumineux idéal (infiniment petit) au travers d'un objectif. Cette image présente un maximum d'intensité entouré d'anneaux de plus en plus sombres qui résulte de l'incapacité de la lentille à collecter la lumière dispersée au-delà d'un angle donné α (demi-angle d'ouverture du cône de lumière entre le foyer et la lentille).

Le cône de lumière entre le foyer et la lentille définit l'ouverture numérique (NA) de l'objectif. La formule de l'ouverture numérique est définie par $NA = n \sin \alpha$, où α est le demi angle du cône et n l'indice de réfraction du milieu.

H.2.3 Limite de résolution transversale du microscope optique

La résolution d'un objectif est dite limitée par la diffraction. Elle résulte des interférences au niveau du plan image, des ondes lumineuses diffractées le long du trajet des rayons.

La résolution d'un microscope désigne sa capacité à séparer des détails très voisins. En effet, du fait de la diffraction, l'image d'un point n'est pas un point, mais une tâche. Cette tâche est appelée tâche d'Airy (ou également la fonction d'étalement du point : PSF pour Point Spread Function). Ainsi, deux points distincts spatialement proches auront pour images deux tâches dont le recouvrement peut empêcher de distinguer les deux points images : les détails ne sont alors plus résolus (voir Fig. H.1).

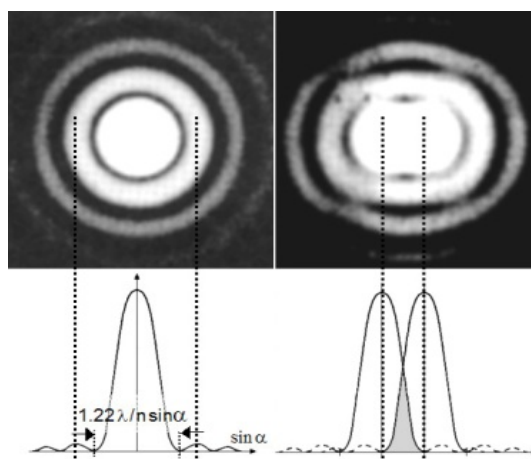


FIG. H.1: Limite de résolution transversale d'un microscope optique et tâche d'Airy disponible sur <http://www.globalsino.com/EM/page3743.html>.

La résolution telle qu'elle est définie par le critère de Rayleigh (d_{min} Rayleigh), correspond à la distance entre deux points objets pour laquelle le maximum d'intensité du disque d'Airy du premier point correspond au premier minimum d'intensité du disque d'Airy du second point.

La limite de résolution (transversale) d'un microscope, qui représente la plus petite distance en dessous de laquelle deux points voisins ne seront plus distingués, peut être exprimée en fonction de la longueur d'onde d'émission λ et de l'ouverture numérique de l'objectif NA , telle que :

$$d_{min} = 0,61\lambda/NA \quad (H.1)$$

Dans nos conditions expérimentales, l'objectif utilisé de grandissement $40\times$ possède une ouverture numérique de 0,6. Ainsi, la résolution optique est de l'ordre de la longueur d'onde d'émission. Dans le cas du DPIBF (longueur d'onde d'émission centrée autour de 450 nm), la limite de résolution transversale est de l'ordre de $0,5\text{ }\mu\text{m}$.

H.2.4 Ouverture numérique

L'ouverture numérique (NA) est une caractéristique essentielle d'un objectif. C'est elle qui est directement responsable de la luminosité et de la résolution d'un objectif. Elle dépend directement de (i) l'indice de réfraction du milieu et (ii) de l'angle formé par trois points particuliers qui sont : le centre de la lentille, le foyer objet de la lentille et le bord de la lentille. Plus cet angle est grand et meilleurs seront la luminosité (plus de rayons lumineux seront collectés) et la résolution.

Un objectif de haute qualité sera caractérisé par une grande ouverture numérique ($1.0 < NA < 1.45$), ce qui entraîne une distance de travail limitée (90 à 180 μm) et une profondeur de champ réduite (effet de sectionnement optique).

Deux autres caractéristiques de l'objectif dépendent de l'ouverture numérique : ce sont la distance de travail et la profondeur de champ (Δz).

H.2.5 Notion de profondeur de champ

La profondeur de champ représente l'épaisseur pour laquelle l'image formée est considérée comme nette sur le plan du capteur. Elle représente la distance séparant le plan d'objet le plus proche du plan d'objet le plus lointain dont les mises au point sont réalisées simultanément (voir Fig. H.2).

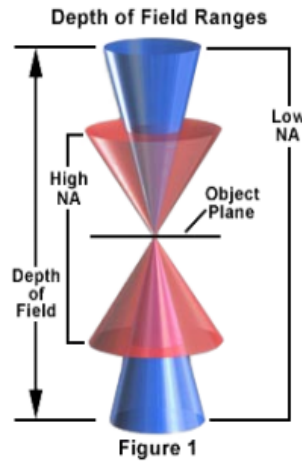


FIG. H.2: Schéma illustrant la notion de profondeur de champ disponible sur <http://www.microscopyu.com/articles/formulas/formulasfielddepth.html>.

La profondeur de champ (Δz) dépend de l'ouverture numérique de l'objectif comme le montre l'Eq. H.2 :

$$\Delta z = \frac{\lambda}{4n(1 - \sqrt{1 - \frac{NA^2}{n^2}})} \quad (H.2)$$

où, n est l'indice de réfraction du milieu traversé, ici $n = 1$. Dans les cas de l'eGFP, la profondeur de champ est $\sim 0,6 \mu m$.

H.3 Focalisation d'un faisceau laser gaussien à travers une lentille

La théorie de la diffraction établit une valeur basse sur la divergence d'un faisceau qui apparaît quand un faisceau laser traverse une ouverture. De ce fait, tous les systèmes optiques réels, contenant des imperfections optiques (variation d'indice de réfraction à travers la propagation dans l'atmosphère etc...) vont posséder une divergence supérieure à celle déterminée par l'équation H.3 :

$$\Theta = \frac{4\lambda_{laser}M^2}{\pi D} \quad (H.3)$$

où, Θ est la divergence du faisceau laser, λ_{laser} la longueur d'onde du laser traversant le système optique, D le diamètre du faisceau laser en entrée du système optique et le facteur de qualité M^2 est défini comme le ratio de la divergence du faisceau considéré sur la divergence d'un faisceau gaussien idéal de répartition TEM_{00} , limité par la diffraction, ayant la même taille et position.

Un faisceau de diamètre fini est focalisé à l'aide d'une lentille pour obtenir un faisceau de plus petit diamètre, (voir figure H.3). Si le diamètre du spot focalisé, d est défini comme le diamètre contenant 86 % de l'énergie focalisée (largeur à $1/e^2$), la dimension du spot est déterminée par :

$$d = f_{obj}\Theta = \frac{4\lambda_{laser}f_{obj}M^2}{\pi D} \quad (H.4)$$

où, d est le diamètre du spot laser focalisé derrière la lentille et f_{obj} la distance focale de l'objectif.

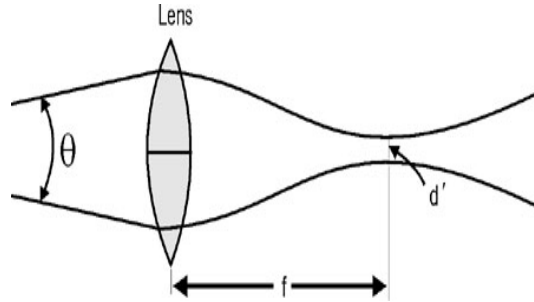


FIG. H.3: Focalisation d'un faisceau laser gaussien par une lentille disponible sur <http://www.cccc.edu/instruction/slympany/ELN/236/Mod9/Mod9.htm>.

Dans nos conditions expérimentales, la largeur à mi-hauteur du faisceau laser infrarouge est $D \sim 2.5mm$, $f_{obj} = 5mm$ et $\lambda = 1270nm$, ce qui nous donne une largeur à mi-hauteur pour le faisceau laser focalisé derrière l'objectif de $\sim 3\mu m$ pour un facteur de qualité $M^2 = 1$.

Bibliographie

Bibliographie

- [1] S. Fulda, A. M. Gorman, O. Hori, and A. Samali. Cellular stress responses : Cell survival and cell death. *International Journal of Cell Biology*, 2010 :1–23, 2010.
- [2] R. I. Morimoto. Proteotoxic stress and inducible chaperone networks in neurodegenerative disease and aging. *Genes Dev.*, 22 :1427–1438, 2008.
- [3] R. I. Morimoto, D. J. Selkoe, and J. W. Kelly. *Protein homeostasis*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2011.
- [4] R. I. Morimoto. *The heat shock response : Systems biology of proteotoxic stress in aging and disease*. Cold Spring Harbor Laboratory press, 2012.
- [5] Anckar J. and Sistonen L. Regulation of hsf1 function in the heat stress response : Implications in aging and disease. *Annu. Rev. Biochem.*, 80 :1089–1115, 2011.
- [6] M. Akerfelt, R. I. Morimoto, and L. Sistonen. Heat shock factors :integrators of cell stress, development and lifespan. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, pages 1–11, 2010.
- [7] J. Ananthan, A. L. Goldberg, and R. Voellmy. Abnormal proteins serve as eukaryotic stress signals and trigger the activation of heat shock genes. *Science*, 232 :522–524, 1986.
- [8] M. Schroder and R. J. Kaufman. The mammalian unfolded protein response. *Ann. Rev. Biochem.*, 74 :739–789, 2005.
- [9] A. M. Gorman, B. Heavey, E. Creagh, T. G. Cotter, and A. Samali. Antioxidant-mediated inhibition of the heat shock response leads to apoptosis. *FEBS Lett.*, 445(1) :98–102, 1999.
- [10] A. M. Gorman, E. Szegezdi, D. J. Quigney, and A. Samali. Hsp27 inhibits 6-hydroxydopamine-induced cytochrome c release and apoptosis in pc12 cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 327(3) :801–810, 2005.
- [11] W. R. Swindel, M. Huebner, and A. P. Weber. Transcriptional profiling of arabidopsis heat shock proteins and transcription factors reveals extensive overlap between heat and non-heat stress response pathways. *BMC Genomics*, 8(article 125).
- [12] U. Feige, R. I. Morimoto, I. Yahara, and B. S. Polla. In *Stress-Inducible Cellular Response*. Birkhauser-Verlag, Basel-Boston-Berlin, 1996.
- [13] S. B. Cullinan and J. A. Diehl. Coordination of er and oxidative stress signaling : the perk/nrf2 signaling pathway. *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, 38(3) :317–332, 2006.
- [14] S. B. Cullinan and J. A. Diehl. Perk-dependent activation of nrf2 contributes to redox homeostasis and cell survival following endoplasmic reticulum stress. *J. Biol. Chem.*, 279(19) :20108–20117, 2004.
- [15] R. I. Morimoto. Regulation of the heat shock transcriptionnal response : cross talk between a family of heat shock factors, molecular chaperones, and negative regulators. *Genes Dev.*, 12 :3788–3796, 1998.
- [16] C. Wu. Heat shock transcription factors : structure and regulation. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.*, 11 :441–469, 1995.
- [17] J. Anckar and L. Sistonen. Heat shock factor 1 as a coordinator of stress and development pathway. *Adv. Exp. Med. Biol.*, 594 :78–88, 2007.

- [18] P. A. Mercier, N. A. Winegarden, and J. T. Westwood. Human heat shock factor 1 is predominantly a nuclear protein before and after heat stress. *J. Cell. Sci.*, 112 :2765–2774, 1999.
- [19] M. Vujanac, A. Fenaroli, and V. Zimarino. Constitutive nuclear import and stress-regulated nucleocytoplasmic shuttling of mammalian heat shock factor 1. *Traffic*, 6 :214–229, 2005.
- [20] G. Biamonti. Nuclear stress bodies : a heterochromatin affair? *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.*, 5 :493–498, 2004.
- [21] G. W. Vuister, S. J. Kim, A. Orosz, J. Marquardt, C. Wu, and A. Bax. Solution structure of the dna-binding domain of *Drosophila* heat shock transcription factor. *Nat. Struct. Biol.*, 5 :605–614, 1994.
- [22] O. Littlefield and H. C. M. Nelson. A new use for the 'wing' of the 'winged' helix-turn-helix motif in the hsf-dna cocrystal. *Nat. Struct. Biol.*, 6 :464–470, 1999.
- [23] H. Xiao, O. Perisic, and J. T. Lis. Cooperative binding of *Drosophila* heat shock factor to arrays of a conserved 5 bp unit. *Cell*, 64 :585–593, 1991.
- [24] P. E. Kroeger and R. I. Morimoto. Selection of new hsf1 and hsf2 dna-binding sites reveals differences in trimer cooperativity. *Mol. Cell. Biol.*, 14 :7592–7603, 1994.
- [25] N. D. Trinklein, J. I. Murray, S. J. Hartman, D. Botstein, and R. M. Myers. The role of heat shock transcription factor 1 in the genome-wide regulation of the mammalian heat shock response. *Mol. Biol. Cell.*, 15 :1254–1261, 2004.
- [26] R. Peteranderl and H. C. M. Nelson. Trimerization of the heat shock transcription factor by a triple-stranded alpha-helical coiled-coil. *Biochem.*, 31 :12272–12276, 1992.
- [27] R. Peteranderl, M. Rabenstein, Y. K. Shin, C. W. Liu, and D. E. Wemmer *et al.* Biochemical and biophysical characterization of the trimerization domain from the heat shock transcription factor. *Biochem.*, 38 :3559–3569, 1999.
- [28] S. K. Rabindran, R. I. Haroun, J. Clos, J. Wisniewski, and C. Wu. Regulation of heat shock factor trimer formation : role of a conserved leucine zipper. *Science*, 259 :230–234, 1993.
- [29] N. Pattaramanon, N. Sangha, and A. Gafni. The carboxy-terminal domain of heat shock factor 1 is largely unfolded but can be induced to collapse into a compact, partially structured state. *Biochem.*, 46 :3405–3415, 2007.
- [30] E. M. Newton, U. Knauf, M. Green, and R. E. Kingston. The regulatory domain of human heat shock factor 1 is sufficient to sense heat stress. *Mol. Cell. Biol.*, 16 :839–846, 1996.
- [31] M. Green, T. J. Schuetz, E. K. Sullivan, and R. E. Kingston. A heat shock-responsive domain of human hsf1 that regulates transcription activation domain function. *Mol. Cell. Biol.*, 15 :3354–3362, 1995.
- [32] M. P. Kline and R. I. Morimoto. Repression of the heat shock factor 1 transcriptional activation domain is modulated by constitutive hyperphosphorylation. *Mol. Cell. Biol.*, 17 :2107–2115, 1997.
- [33] T. Guettouche, F. Boellman, W. S. Lane, and R. Voellmy. Analysis of phosphorylation of human heat shock factor 1 in cells experiencing a stress. *BMC Biochem.*, 6 :4, 2005.
- [34] F. Boellman, T. Guettouche, Y. Guo, M. Fenna, L. Mnayer, and R. Voellmy. DAXX interacts with heat shock factor 1 during stress activation and enhances its transcriptional activity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 101 :4100–4105, 2004.
- [35] C. I. Holmberg, V. Hietakangas, A. Mikhailov, J. O. Rantanen, and M. Kallio *et al.* Phosphorylation of serine 230 promotes inducible transcriptional activity of heat shock factor1. *EMBO J.*, 20 :3800–3810, 2001.
- [36] U. Knauf, E. M. Newton, J. Kyriakis, and R. E. Kingston. Repression of human heat shock factor 1 activity at control temperature by phosphorylation. *Genes Dev.*, 10 :2782–2793, 1996.

- [37] R. Geiss-Friedlander and F. Melchior. Concepts in sumoylation : a decade on. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.*, 8 :947–956, 2007.
- [38] V. Hietakangas, J. K. Ahlskog, A. M. Jakobsson, M. Hellesuo, and N. M. Sahlberg *et al.* Phosphorylation of serine 303 is a prerequisite for the stress-inducible SUMO modification of heat shock factor 1. *Mol. Cell. Biol.*, 23 :2953–2968, 2003.
- [39] V. Hietakangas, J. Ankar, H. A. Blomster, M. Fujimoto, and J. J. Palvimo *et al.* PDSM, a motif for phosphorylation-dependent SUMO modification. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 103 :45–50, 2006.
- [40] J. Ankar and L. Sistonen. Sumo : getting it on. *Biochem. Soc. Trans.*, 35 :1409–1413, 2007.
- [41] S. D. Westerheide, J. Ankar, S. M. Stevens, L. Sistonen, and R. I. Morimoto. Stress-inducible regulation of heat-shock factor 1 by deacetylase SIRT1. *Science*, 323(5917) :1063–1066, 2009.
- [42] P. C. Liu and D. J. Thiele. Modulation of human heat shock factor trimerization by the linker domain. *J. Biol. Chem.*, 274 :17219–17225, 1999.
- [43] J. L. Bruce, B. D. Price, C. N. Coleman, and S. K. Calderwood. Oxidative Injury Rapidly Activates the Heat Shock Transcription Factor but Fails to Increase Levels of Heat Shock Proteins. *Cancer Res.*, 53 :12–15, 1993.
- [44] M. Adachi, Y. Liu, K. Fujii, S. K. Calderwood, A. Nakai, K. Imai, and Y. Shinomura. Oxidative Stress impairs the Heat Stress Response and Delays Unfolded Protein Recovery. *PLoS One*, 4(11) :1–10, 2009.
- [45] B. Kalmar and L. Greensmith. Induction of heat shock proteins for protection against oxidative stress. *Adv. Drug. Deliv. Deliv. Rev.*, 61 :310–318, 2009.
- [46] S. G. Ahn and D. J. Thiele. Redox regulation of mammalian heat shock factor 1 is essential for hsp gene activation and protection from stress. *Genes Dev.*, 17 :516–528, 2003.
- [47] D. Trachootham, W. Lu, M. A. Ogasawara, N. R.-D. Valle, and P. Huang. Redox regulation of cell survival. *Antioxid. Redox Sign.*, 10(8).
- [48] B. Brune. The intimate relation between nitric oxide and superoxide in apoptosis and cell survival. *Antioxid. Redox Sign.*, 7(3-4) :497–507, 2005.
- [49] K. Niizuma, H. Endo, and P. H. Chan. Oxidative stress and mitochondrial dysfunction as determinants of ischemic neuronal death and survival. *J. Neurochem.*, 109 :133–138, 2009.
- [50] S. Orrenius, V. Gogvadze, and B. Zhivotovsky. Mitochondrial oxidative stress : implications for cell death. *Annu. Rev. Pharmacol.*, 47 :143–183, 2007.
- [51] M. Genestra. Oxyl radicals, redox-sensitive signalling cascades and antioxidants. *Cell. Signal.*, 19(9) :1807–1819, 2007.
- [52] D. E. Dolmans, D. Fukumura, and R. K. Jain. Photodynamic therapy for cancer. *Nat. Rev. Cancer*, 3 :380–387, 2003.
- [53] C. S. Foote. Mechanisms of photosensitized oxidations. *Science*, 162 :963–970, 1968.
- [54] C. A. Robertson, E. D. Hawkins, and H. Abrahamse. Photodynamic therapy (PDT) : A short review on cellular mechanisms and cancer research applications for PDT. *J. Photochem. Photobiol. B*, 96 :1–8, 2009.
- [55] W. M. Star, H. P. A. Marijnissen, A. E. Van den Berg-Blok, J. A. C. Versteeg, K. A. P. Franken, and H. S. Reinhold. Destruction of rat mammary tumor and normal tissue microcirculation by hematoporphyrin derivative photoradiation observed *in vi vivo* in sandwich observation chamber. *Cancer Res.*, 46 :513–517, 1986.
- [56] J. Y. Matroule, C. Volanti, and J. Piette. Nf- κ b in photodynamic therapy : Discrepancies of a master regulator. *Photochem. Photobiol.*, 82 :1241–1246, 2006.
- [57] A. W. Girotti. Photosensitized oxidation of membrane lipids : reaction pathways, cytotoxic effects, and cytoprotective mechanisms. *J. Photochem. Photobiol. B*, 63(1-3) :103–113, 2001.

- [58] F. Petrat, S. Pindiur, M. Kirsch, and H. De Groot. NAD(P)H, a primary target of $^1\text{O}_2$ in mitochondria of intact cells. *J. Biol. Chem.*, 278 :3298–3307, 2003.
- [59] C. Schweitzer and R. Schmidt. Physical mechanisms of generation and deactivation of singlet oxygen. *Chem. Rev.*, 103 :1685–1757, 2003.
- [60] M. Niedre, M. S. Patterson, and B. C. Wilson. Direct near infrared luminescence detection of singlet oxygen generated by photodynamic therapy in cells *In Vitro* and tissues *In Vivo*. *Photochem. Photobiol.*, 75 :382–391, 2002.
- [61] 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 projects. *Photochem. Photobiol.*, 82 :1198–1210, 2006.
- [62] J. S. Dysart, G. Singh, and M. S. Patterson. Calculation of singlet oxygen dose from photosensitizer fluorescence and photobleaching during mthpc photodynamic therapy of mll cells. *Photochem. Photobiol.*, 81 :196–205, 2005.
- [63] J. Baier, T. Fu, C. Pollmann, C. Wiesmann, K. Pindl, R. Engl, D. Baumer, M. Maier, M. Landhaller, and W. Bäumler. Theoretical and experimental analysis of the luminescence signal of singlet oxygen for different photosensitizers. *J. Photochem. Photobiol.*, 87 :163–173, 2007.
- [64] I. Georgakoudi, M. G. Nichols, and T. H. Foster. The mechanism of photofrin photobleaching and its consequences for photodynamic dosimetry. *Photochem. Photobiol.*, 65 :135–144, 1997.
- [65] I. Georgakoudi and T. H. Foster. Singlet oxygen *versus* non-singlet oxygen mediated mechanisms of sensitizer photobleaching and their effects on photodynamic dosimetry. *Photochem. Photobiol.*, 67 :612–625, 1998.
- [66] M. D. C. Pazos and H. B. Nader. Effect of photodynamic therapy on the extracellular matrix and associated components. *Braz. J. Med. Biol. Res.*, 40 :1025–1035, 2007.
- [67] P. R. Ogilby. Singlet oxygen : there is indeed something new under the sun. *Chem. Soc. Rev.*, 39(8) :3181–3209, 2010.
- [68] T. G. Owens. Processing of excitation energy by antenna pigments. In *Photosynthesis and the Environment*, volume 5 of *Advances in Photosynthesis and Respiration*, pages 1–23. Springer Netherlands, 2004.
- [69] 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.
- [70] R. S. Mulliken. Interpretation of the atmospheric oxygen bands ; electronic levels of the oxygen molecule. *Nature*, 122(3075) :505–525, 1928.
- [71] C. Long and D. R. Kearns. Selection rules for the intermolecular enhancement of spin forbidden transitions in molecular oxygen. *J. Chem. Phys.*, 59 :5729–5736, 1973.
- [72] P. R. Ogilby. Solvent effects on the radiative transitions of singlet oxygen. *Acc. Chem. Res.*, 32 :512–519, 1999.
- [73] B. F. Minaev and H. Ågren. Collision-induced $b^1\Sigma_g^+ \rightarrow a^1\Delta_g$, $b^1\Sigma_g^+ \rightarrow X^3\Sigma_g^-$ and $a^1\Delta_g \rightarrow X^3\Sigma_g^-$ transition probabilities in molecular oxygen. *J. Chem. Soc. Faraday Trans.*, 93(13) :2231–2239, 1997.
- [74] 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 O_2 . *J. Phys. Chem. A*, 103(31) :6091–6096, 1999.
- [75] A. A. Krasnovsky Jr, Ya. V. Roumbal, A. V. Ivanov, and R. V. Ambartzumian. Solvent dependance of the steady-state rate of $^1\text{O}_2$ 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. *Chem. Phys. Lett.*, 430 :260–264, 2006.

- [76] 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. *Chem. Phys. Lett.*, 400 :531–535, 2004.
- [77] 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. *Chem. Phys. Lett.*, 458 :195–199, 2008.
- [78] F. Anquez, P. Suret, A. Sivéry, 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. *Opt. Express*, 19(22) :22998–22936, 2010.
- [79] F. Anquez, I. El Yazidi-Belkoura, S. Randoux, P. Suret, and E. Courtade. Cancerous Cell Death from Sensitizer Free Photoactivation of singlet oxygen. *Photochem. Photobiol.*, 88(1) :167–174, 2012.
- [80] G. S. Gunther, E. M. Iemp, and A. L. Zanooco. Determination of chemical rate constants in singlet molecular oxygen reactions by using 1,4-dimethylnaphthalene endoperoxide. *J. Photochem. Photobiol. A*, 151 :1–5, 2002.
- [81] 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. *J. Phys. Chem. Ref. Data*, 24(2) :663–1022, 1995.
- [82] A. M. Caminade, F. E. Khatib, M. Koenig, and J. M. Aubry. Ozonides de phosphite source d’oxygène singulet : rendement, mécanisme. *Can. J. Chem.*, 63 :3203–3209, 1985.
- [83] R. Higgins, C. S. Foote, and H. Cheng. Chemistry of singlet oxygen. V. Reactivity and Kinetic Characterization. *Adv. Chem. Ser.*, 77(3) :102–117, 1968.
- [84] S. L. Murov, I. Chermicel, and G. L. Hug. *Handbook of Photochemistry*. Marcel Dekker Inc., New York, Basel, Hong Kong, 1993.
- [85] 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. *Chin. Opt. Lett.*, 3 :S1–S4, 2005.
- [86] A. A. Krasnovsky Jr, A. S. Kozlov, and Ya. V. Roumbal. Photochemical investigation of the IR absorption bands of molecular oxygen in organic and aqueous environment. *Photochem. Photobiol. Sci.*, 11(6) :988–997, 2012.
- [87] P. R. Ogilby and C. S. Foote. Chemistry of singlet oxygen. 42. Effect of solvent, Solvent isotopic Substitution, and temperature on the lifetime of singlet molecular oxygen ($^1\Delta_g$). *J. Am. Chem. Soc.*, 105 :3423–3430, 1983.
- [88] J. R. Kanofsky, P. D. Sima, and C. Richter. Singlet oxygen generation from A2E. *Photochem. Photobiol.*, 77(3) :235–242, 2003.
- [89] K. I. Salokhiddinov, I. M. Byteva, and G. P. Gurinovich. Lifetime of singlet oxygen in various solvents. *Biofizika*, 25 :358, 1980.
- [90] A. P. Losev, I. N. Nichiporovich, I. M. Byteva, N. N. Drozdov, and I. F. Jghgami. The perturbing effect of solvents on the luminescence rate constant of singlet molecular oxygen. *Chem. Phys. Lett.*, 181(1) :45–50, 1991.
- [91] J. M. Aubry, B. Mandard Cazin, M. Rougee, and R. V. Benasson. Kinetics studies of singlet oxygen [4 + 2]-cycloadditions with cyclic 1,3-dienes in 28 solvents. *J. Am. Chem. Soc.*, 117 :9159–9164, 1995.
- [92] L. A. Martinez, C. G. Martinez, B. B. Klopotek, J. Lang, A. Neuner, A. M. Braun, and E. Oliveros. Nonradiative and radiative deactivation of singlet molecular oxygen (1O_2 ($^1\Delta_g$)) in micellar media and microemulsions. *J. Photochem. Photobiol. B*, 58 :94–107, 2000.

- [93] A. A. Krasnovsky Jr. Photoluminescence of singlet oxygen in pigment solutions. *Photochem. Photobiol.*, 29 :29–36, 1979.
- [94] A. Bromberg and C. S. Foote. Solvent Shift of Singlet Oxygen Emission Wavelength. *J. Phys. Chem.*, 93 :3968–3969, 1989.
- [95] C. A. Long and D. R. Kearns. Radiationless decay of singlet molecular oxygen in solution. ii. temperature dependence and solvent effects. *J. Am. Chem. Soc.*, 97(8) :2018–2020, 1974.
- [96] A. U. Khan and M. Kasha. Direct spectroscopic observation of singlet oxygen emission at 1268 nm excited by sensitizing dyes of biological interest in liquid solution. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 76(12) :6047–6049, 1979.
- [97] W. M. Haynes. *Handbook of Chemistry and Physics*. CRC Press/Taylor and Francis, 2012.
- [98] 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. *Biochem. (Moscow)*, 68 :1178–1182, 2003.
- [99] A. Sivéry, F. Anquez, C. Pierlot, J.M. Aubry, and E. Courtade. Singlet oxygen (1O_2) generation upon 1270 nm laser irradiation of ground state oxygen (3O_2) dissolved in organic solvents : simultaneous and independent determination of 1O_2 production rate and reactivity with chemical traps. *Chem. Phys. Lett.*, 555 :252–257, 2013.
- [100] B. Alberts, A. Johnson, J. Lewis, M. Raff, K. Roberts, and P. Walter. *Molecular biology of the cell*. 4th Ed. Garland Science, Taylor and Francis Group, 2002.
- [101] A. A. Krasnovsky Jr, S. A. Akhmanov, and E. B. Chernyaeva. *Advances in Science and Technology.*, volume 3.
- [102] E.A. Lissi F.J. Rodrigues F.R. Trull F. Amat-Guerri, E. Lempe. Water-soluble 1,3-diphenylisobenzofuran derivatives. synthesis and evaluation as singlet molecular oxygen acceptors for biological systems. *J. Photochem. Photobiol.*, 93 :49–56, 1996.
- [103] V. Nardello and J. M. Aubry. Synthesis and Properties of a new cationic Water-Soluble Trap of Singlet Molecular Oxygen. *Tetrahedron Lett.*, 38(42) :7361–7364, 1997.
- [104] V. Nardello, N. Azaroual, I. Cervoise, G. Vermeersch, and J. M. Aubry. Synthesis and Photooxidation of Sodium 1.3-Cyclohexadiene-1,4-Diethanoate : a New Colorless and Water-soluble Trap of Singlet-oxygen. *Tetrahedron Lett.*, 52(6) :2031–2046, 1996.
- [105] J. Rigaudy and N. K. Cuong. Abnormal diene addition in the naphthacene series : the case of rubrene. Direct route to a rubrenedicarboxylic acid and to a rubrenetetra-carboxylic acid. *C. R. Acad. Sci.*, 254 :4184–4186, 1962.
- [106] J. M. Aubry, J. Rigaudy, and N. K. Cuong. Kinetic Studies of Self-sensitized Photooxygenation in H_2O and D_2O of Water-Soluble Rubrene Derivative. *Photochem. Photobiol.*, 33 :155–158, 1981.
- [107] A. Barras, A. Mezzetti, A. Richard, Lazzaroni S., S. Roux, P. Melnyk, D. Betbeder, and N. Monfiliette-Dupont. Formulation and characterization of polyphenol-loaded lipid nanocapsules. *Int. J. Pharm.*, 379(2) :270–277, 2009.
- [108] A. Barras, L. Boussekey, E. Courtade, and R. Boukherroub. Hypericin-loaded lipid nanocapsules for the photodynamic cancer therapy in vitro. *Nanoscale*, 5 :10562–10572, 2013.
- [109] B. Heurtault, P. Saulnier, B. Pech, J. E. Proust, and J. P. Benoit. A novel phase inversion-based process for the preparation of lipid nanocarriers. *Pharm. Res.*, 19(6) :875–880, 2002.
- [110] P. C. Lee and M. A. J. Rodgers. Singlet molecular oxygen in micellar systems. 1. distribution equilibria between hydrophobic and hydrophilic compartments. *J. Phys. Chem.*, 87 :4894–4898, 1983.
- [111] P. C. Lee and M. A. J. Rodgers. Singlet molecular oxygen in micellar systems. 2. quenching behavior in aot reverse micelles. *J. Phys. Chem.*, 88 :3480–3484, 1984.

- [112] C. D. Borsarelli, E. N. Durantini, and N. A. Garcia. Singlet molecular oxygen-mediated photooxidation of nitrophenolic compounds in water-in-oil microemulsions. a kinetic study. *J. Chem. Soc., Perkin Trans.*, 2 :2009–2013, 1996.
- [113] J. M. Aubry and S. Bouttemy. Preparative oxidation of organic compounds in microemulsions with singlet oxygen generated chemically by the sodium molybdate/hydrogen peroxide system. *J. Am. Chem. Soc.*, 119 :5286–5294, 1997.
- [114] N. J. Turro, M. Aikawa, and A. Yekta. Dynamics of molecular oxygen in micellar solutions. *Chem. Phys. Lett.*, 64 :473–478, 1979.
- [115] P. Han and D. M. Bartels. Temperature dependence of Oxygen diffusion in H_2O and D_2O . *J. Phys. Chem.*, 100 :5597–5602, 1996.
- [116] 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.
- [117] R. L. Jensen, J. Arnbjerg, and P. R. Ogilby. Temperature Effects on the Solvent-Dependent Deactivation of Singlet Oxygen. *J. Am. Chem. Soc.*, 132 :8098–8105, 2010.
- [118] R. F. Weiss. The solubility of nitrogen, oxygen, and argon in water and seawater. *Deep Sea Res.*, 17(4) :721–735, 1970.
- [119] R. Battino, T. R. Rettich, and T. Tominaga. The solubility of oxygen and ozone in liquids. *J. Phys. Chem. Ref. Data*, 12(2) :163–178, 1983.
- [120] P. Douzou. Singlet oxygen as oxidizing intermediate and photodynamic action. *Res. Prog. Org. Biol. Med. Chem.*, 3 :37–47, 1972.
- [121] C. S. Foote and E. L. Clennan. *Properties and reactions of singlet dioxygen*. Blackie Academic and Professional, 1995.
- [122] A. Sivéry, A. Barras, R. Boukherroub, C. pierlot, J.M. Aubry, F. Anquez, and E. Courtade. Production Rate and Reactivity of Singlet Oxygen (1O_2 ($^1\Delta_g$)) Directly Photoactivated at 1270 nm in Lipid Nanocapsules Dispersed in Water. *J. Phys. Chem. C*, 118(5) :2885–2893, 2014.
- [123] A. A. Krasnovsky Jr. Luminescence and photochemical studies of singlet oxygen photonics. *J. Photochem. Photobiol. A*, 196 :210–218, 2008.
- [124] B. Halliwell and J. Gutteridge. *Free radicals in Biologie and Medicine*. Oxford. 2007.
- [125] S. J. Strickler and R. A. Berg. Relationship between absorption and intensity fluorescence lifetime of molecules. *J. Chem. Phys.*, 37 :814–822, 1962.
- [126] G. W. Koroll A. Singh and S. A. Antonsen. Possible formation of singlet oxygen from vibrationally excited water. *J. Photochem.*, 25(2-4) :99–104, 1984.
- [127] B. F. Minaev. Theory of influence of solvents on the probability of radiative transitions $a^1\Delta_g \rightarrow X^3\Sigma_g^-$ in oxygen molecules. *Opt. Spectrosc.*, 58 :1238–1241, 1985.
- [128] B. F. Minaev. Electronic mechanisms of activation of molecular oxygen. *Russ. Chem. Rev.*, 76 :1059–1083, 2007.
- [129] A. Gomes, E. Fernandes, and J. L. Lima. Fluorescence probes used for detection of reactive oxygen species. *J. Biochem. Biophys. Methods*, 65(2-3) :45–80, 2005.
- [130] 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 Res.*, 36 :2326–2329, 1976.
- [131] B. C. Baguley and E. Leung. *Heterogeneity of phenotype in breast cancer cell lines*. InTech, 2011.
- [132] S. Hackbarth, J. Schlothauer, A. Preub, C. Ludwig, and B. Roder. Time resolved sub-cellular singlet oxygen detection- ensemble measurements versus single cell experiments. *Laser Phys. Lett.*, 9(6) :474–480, 2012.

- [133] Y. E. Lee Koo, Y. Cao, R. Kopelman, S. M. Koo, M. Brasuel, and M. A. Philbert. Real-time measurement of dissolved oxygen inside cells by organically modified silicate fluorescent nanosensors. *Anal. Chem.*, 76 :2498–2505, 2004.
- [134] 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. *Chem. Phys. Chem.*, 9 :1673–1679, 2008.
- [135] F. Ritossa. A new puffing pattern induced by temperature shock and dnp in *Drosophila*. *Experientia*, 18 :571–573, 1962.
- [136] F. Ritossa. Discovery of the heat shock response. *Cell Stress Chaperon.*, 1 :97–98, 1996.
- [137] S. Lindquist. The heat-shock response. *Annu. Rev. Biochem.*, 55 :1151–1191, 1986.
- [138] A. Tissieres, H. K. Mitchell, and U. M. Tracy. Protein synthesis in salivary glands of *Drosophila melanogaster* : relation to chromosomes puffs. *J. Mol. Biol.*, 84 :389–398, 1974.
- [139] M. Lewis, P. J. Helmsing, and M. Ashburner. Parallel changes in puffing activity and patterns of protein synthesis in salivary glands of *Drosophila*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 72 :3604–3608, 1975.
- [140] A. Spradling, M. L. Pardue, and S. Penman. Messenger rna in heat shocked *Drosophila* cells. *J. Mol. Biol.*, 109 :559–587, 1977.
- [141] P. Kelley and M. J. Schlesinger. The effect of amino acids analogues and heat shock on gene expression in chicken embryo fibroblasts. *Cell*, 15 :1277–1286, 1978.
- [142] H. R. B. Pelham. A regulatory upstream promoter element in the *Drosophila* hsp70 heat-shock gene. *Cell*, 30 :517–528, 1982.
- [143] C. Wu. Activating protein factor binds *in vitro* to upstream control sequences in heat-shock gene chromatin. *Nature*, 311 :81–84, 1984.
- [144] C. S. Parker and J. A. Topol. *Drosophila* rna polymerase ii transcription factor binds to the regulatory site of an hsp70 gene. *Cell*, 37 :273–283, 1984.
- [145] M. Akerfelt, D. Trouillet, V. Mezger, and L. Sistonen. Heat shock factors at a crossroad between stress and development. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 1113 :15–27, 2007.
- [146] L. Nover, K. Bharti, P. Doring, S. K. Mishra, A. Ganguli, and K. D. Scharf. Arabidopsis and the heat stress transcription factor world : how many heat stress transcription factors do we need ? *Cell Stress Chaperon.*, 6(3) :177–189, 2001.
- [147] M. Fujimoto, N. Hayashida, T. Katoh, K. Oshima, T. Shinkawa, R. Prakasam, K. Tan, S. Inouye, R. Takii, and A. Nakai. A novel mouse hsf3 has the potential to activate nonclassical heat-shock genes during heat shock. *Mol. Biol. Cell.*, 21 :106–116, 2010.
- [148] P. Ostling, J. K. Bjork, P. Roos-Mattjus, V. Mezger, and L. Sistonen. Heat shock factor 2 (hsf2) contributes to inducible expression of hsp genes through interplay with hsf1. *J. Biol. Chem.*, 282 :7077–7086, 2007.
- [149] A. Sandqvist, J. K. Bjork, M. Akerfelt, Z. Chitikova, A. Grichine, C. Vourc’h, C. Jolly, T. A. Salminen, Y. Nymalm, and L. Sistonen. Heterotrimerization of heat-shock factors 1 and 2 provides a transcriptional switch in response to distinct stimuli. *Mol. Biol. Cell.*, 20 :1340–1347, 2009.
- [150] R. I. Morimoto and M. G. Santoro. Stress-inducible responses and heat shock proteins : New pharmacologic targets for cytoprotection. *Nat. Biotechnol.*, 16 :833–838, 1998.
- [151] B. C. Freeman and R. I. Morimoto. The human cytosolic molecular chaperones hsp90, hsp70 (hsc70) and hdk-i have distinct roles in recognition of a non-native protein and protein refolding. *Embo J.*, 15 :2969–2979, 1996.
- [152] M. G. Santoro. Heat shock factors and the control of the stress response. *Biochem. Pharma.*, 59 :55–63, 2000.

- [153] S. B. Zimmerman and A. P. Minton. Macromolecular crowding : biochemical, biophysical, and physiological consequences. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.*, 22 :27–65, 1993.
- [154] S. R. Lamand and J. F. Bateman. Procollagen folding and assembly : the role of endoplasmic reticulum enzymes and molecular chaperones. *Semin. Cell Dev. Biol.*, 10 :455–464, 1999.
- [155] H. Saibil. Molecular chaperones : containers and surfaces for folding, stabilizing or unfolding proteins. *Curr. Opin. Struct. Biol.*, 10 :251–258, 2000.
- [156] R. J. Ellis. Molecular chaperones : avoiding the crowd. *Curr. Biol.*, 7 :531–533, 1997.
- [157] K. Ohtsuka and M. Hata. Molecular chaperone function of mammalian hsp70 and hsp40- a review. *Int. J. Hyperthermia*, 16 :231–245, 2000.
- [158] I. G. Hass. Bip - a heat shock protein involved in immunoglobulin chain assembly. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.*, 167 :71–82, 1991.
- [159] S. Gottesman. Proteolysis in bacterial regulatory circuits. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.*, 19 :565–587, 2003.
- [160] S. Srivastava. Interaction of heat shock proteins with peptides and antigen presenting cells : chaperoning of the innate and adaptative immune responses. *Annu. Rev. Immunol.*, 20 :395–425, 2002.
- [161] Y. Wang, T. Whittall, E. McGowan, J. Younson, and C. Kelly *et al.* Identification of stimulating and inhibitory epitopes within the heat shock protein 70 molecule that modulate cytokine production and maturation of dendritic cells. *J. Immunol.*, 174 :3306–3316, 2005.
- [162] L. Sistonen, K. D. Sarge, B. Philips, K. Abravaya, and R. I. Morimoto. Activation of heat shock factor 2 during hemin-induced differentiation of human erythroleukemia cells. *Mol. Cell. Biol.*, 12 :4104–4111, 1992.
- [163] M. G. Santoro, Z. Garaci, and C. Amici. Prostaglandins with antiproliferative activity induce the synthesis of a heat shock protein in human cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 86 :8407–8411, 1989.
- [164] S. Lindquist and E. A. Craig. The heat-shock proteins. *Annu. Rev. Genet.*, 22 :631–677, 1988.
- [165] Parsell D. A. and Lindquist S. *Heat shock proteins an stress tolerance*, volume 320. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor.
- [166] E. A. Craig, B. K. Baxter, J. Becker, J. Halladay, and Ziegelhoffer. *Cytosolic hsp70s of Saccharomyces cerevisiae : Roles in protein synthesis, protein translocation, proteolysis, and regulation*, volume 320. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor.
- [167] T. Langer and W. Neupert. *Chaperoning mitochondrial biogenesis*, volume 320. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor.
- [168] D. Lanneau, G. Wettstein, P. Bonniaud, and C. Garrido. Heat shock proteins in toxicology : Cell protection through protein triage. *TheScientificWorldJournal*, 10 :1543–1552, 2010.
- [169] C. Marques, W. Guo, P. Pereira, A. Taylor, C. Patterson, P. C. Evans, and F. Shang. The triage of damaged proteins : degradation by the ubiquitin-proteasome pathway or repair by molecular chaperones. *Faseb J. FJ Express*, 20 :741–743, 2006.
- [170] E. A. Craig and C. A. Gross. Is hsp70 the cellular thermometer? *Trends Biochem. Sci.*, 16 :135–140, 1991.
- [171] A. K. Boehm, A. Saunders, J. Werner, and J. T. Lis. Transcription factor and polymerase recruitment, modification, and movement on dhsp70 in vivo in the minutes following heat shock. *Mol. Cell. Biol.*, 23 :7628–7637, 2003.
- [172] I. Shamovsky, M. Ivannikov, E. S. Kandel, D. Gershon, and E. Nudler. Rna-mediated response to heat shock in mammalian cells. *Nature*, 440(23) :556–560, 2006.
- [173] J. F. Kugel and J. A. Goodrich. Beating the heat : A translation factor and an rna mobilize the heat shock transcription factor hsf1. *Mol. Cell.*, 22 :153–154, 2006.

- [174] M. T. Morita, Y. Tanaka, T. S. Kodama, Y. Kyogoku, H. Yanagi, and T. Yura. Translational induction of heat shock transcription factor sigma32 : evidence for a built-in rna thermosensor. *Genes Dev.*, 13 :655–665, 1999.
- [175] K. Abravaya, B. Philips, and R. I. Morimoto. Attenuation of the heat shock response in hela cells is mediated by the release of bound heat shock transcription factor and is modulated by changes in growth and in heat shock temperatures. *Genes Dev.*, 5 :2117–2127, 1991.
- [176] D. D. Mosser, P. T. Kotzbauer, K. D. Sarge, and R. I. Morimoto. In vitro activation of heat shock transcription factor dna-binding by calcium and biochemical conditions that affect protein conformation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 87 :3748–3752, 1990.
- [177] M. L. Goodson and K. D. Sarge. Heat-inducible dna binding of purified heat shock transcription factor 1. *J. Biol. Chem.*, 270 :2447–2450, 1995.
- [178] T. Farkas, Y. A. Kutsikova, and V. Zimarino. Intramolecular repression of mouse heat shock factor 1. *Mol. Cell. Biol.*, 18 :906–918, 1998.
- [179] M. Zhong, A. Orosz, and C. Wu. Direct sensing of heat and oxydation by *Drosophila* heat shock transcription factor. *Mol. Cell.*, 2 :101–108, 1998.
- [180] M. Lu, Y. J. Lee, S. M. Park, H. S. Kang, and S. W. Kang. Aromatic-participant interactions are essential for disulfide-bond-based trimerisation in human heat shock transcription factor 1. *Biochem.*, 48 :3795–3797, 2009.
- [181] V. Prahlad, T. Cornelius, and R. I. Morimoto. Regulation of the cellular heat shock response in *Caenorhabditis elegans* by thermosensory neurons. *Science*, 320 :811–814, 2008.
- [182] D. A. Clark, C. V. Gabel, H. Gabel, and A. D. Samuel. Temporal activity patterns in thermosensory neurons of freely moving *Caenorhabditis elegans* encode spatial thermal gradients. *J. Neurosci.*, 27 :6083–6090, 2007.
- [183] R. I. Morimoto, I. Yahara, and B. S. Polla. The transcriptional regulation of heat shock genes : A plethora of heat shock factors and regulatory conditions. 1996.
- [184] Y. Shi, D. D. Mosser, and R. I. Morimoto. Molecular chaperones as hsf1-specific transcriptional repressors. *Genes Dev.*, 12 :654–666, 1998.
- [185] R. Voellmy. *Sensing stress and responding to stress*. Birkhauser-Verlag, Basel-Boston-Berlin, 1994.
- [186] L. Tomanek. The heat-shock response : Its variation, regulation and ecological importance in intertidal gastropods (genus tegula). *Integr. Comp. Biol.*, 42 :797–807, 2002.
- [187] F. Weighardt, F. Cobianchi, L. Cartegni, I. Chiodi, A. Villa, S. Riva, and G. Biamonti. A novel hnRNP protein (hap/saf-b) enters a subset of hnRNP complexes and relocates in nuclear granules in response to heat shock. *J. Cell Sci.*, 112 :1465–1476, 1999.
- [188] M. Denegri, I. Chiodi, M. Corioni, F. Cobianchi, S. Riva, and G. Biamonti. Stress induced nuclear bodies are sites of accumulation of pre-mRNA processing factors. *Mol. Biol. Cell*, 12 :3502–3514, 2001.
- [189] C. Jolly, A. Metz, J. Govin, M. Vigneron, B. M. Turner, S. Khochbin, and C. Vourc'h. Stress-induced transcription of satellite iii repeats. *J. Cell. Biol.*, 164 :25–33, 2004.
- [190] C. Jolly, R. I. Morimoto, M. Robert-Nicoud, and C. Vourc'h. Hsf1 transcription factor concentrates in nuclear foci during heat shock : Relationship with transcription sites. *J. Cell Sci.*, 110 :2935–2941, 1997.
- [191] K. D. Sarge, S. P. Murphy, and R. I. Morimoto. Activation of heat shock gene transcription by heat shock factor 1 involves oligomerization, acquisition of dna-binding activity, and nuclear localization and can occur in the absence of stress. *Mol. Cell Biol.*, 13 :1392–1407, 1993.
- [192] C. Jolly and S. C. Lakhotia. Human sat iii and drosophila hsr omega transcripts : A common paradigm for regulation of nuclear processing in stressed cells. *Nucleic Acids Res.*, 34 :5508–5514, 2006.

- [193] J. J. Cotto, S. Fox, and R. I. Morimoto. Hsf1 granules : a novel-stress induced nuclear compartments of human cells. *J. Cell Sci.*, 110 :2925–2934, 1997.
- [194] C. Jolly, S. Michelland, M. Rocchi, M. Robert-Nicoud, and C. Vourc’h. Analysis of the transcriptionnal activity of amplified genes in tumor cells by fluorescence in situ hybridization. *Hum. Genet.*, 101 :81–87, 1997.
- [195] C. Jolly, L. Konecny, Y. A. Kutsikova, J. J. Cotto, R. I. Morimoto, and C. Vourc’h. In vivo binding of human chromosome 9 heterochromatin during stress. *J. Cell. Biol.*, 156 :775–781, 2002.
- [196] N. Rizzi, M. Denegri, I. Chiodi, M. Corioni, R. Valgardsdottir, F. Cebianchi, S. Riva, and G. Biamonti. Transcriptionnal activation of a constitutive heterochromatic domain of the human genome in response to heat shock. *Mol. Biol. Cell.*, 15 :543–551, 2004.
- [197] A. Metz, J. Soret, C. Vourc’h, J. Tazi, and C. Jolly. A key role for stress-induced satellit iii transcripts in the relocalization of splicing factors into nuclear stress granules. *J. Cell. Sci.*, 117 :4551–4558, 2004.
- [198] Chiodi I., Corioni M., Giordano M., Valgardsdottir R., Ghigna C., Cebianchi F., Xu R. M., Riva S., and Biamonti G. Rna recognition motif 2 directs the recruitment of sf2/asf to nuclear stress bodies. *Nucleic Acids Res.*, 32 :4127–4136, 2004.
- [199] A. Eymery, M. Callanan, and C. Vourc’h. The secret message of heterochromatin : new insights from mechanisms and function of centromeric and pericentric repeat sequence transcription. *Int. J. Dev. Biol.*, 53 :259–268, 2009.
- [200] A. Eymery, C. Souchier, C. Vourc’h, and C. Jolly. Heat shock factor1 binds to and transcribes satellite ii and iii sequences at several pericentromeric regions in heat-shocked cells. *Exp. Cell. Res.*, 316 :1845–1855, 2010.
- [201] C. Jolly, Y. Usson, and R. I. Morimoto. Rapid and reversible relocalization of heat shock factor 1 within seconds to nuclear stress granules. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 96 :6769–6774, 1999.
- [202] M. Denegri, D. Morali, M. Rocchi, M. Biggiogera, E. Raimondi, F. Cebianchi, L. De Caroli, S. Riva, and G. Biamonti. Human chromosomes 9, 12, and 15 contain the nucleation sites of stress-induced nuclear bodies. *Mol. Biol. Cell*, 13 :2069–2079, 2002.
- [203] T. Nonaka, T. Akimoto, N. Mitsuhashi, Y. Tamaki, and T. Nakano. Changes in the number of hsf1 positive granules in the nucleus reflects heat shock semiquantitatively. *Cancer Lett.*, 202 :89–100, 2003.
- [204] R. Valgardsdottir, I. Chiodi, M. Giordano, A. Rossi, S. Bazzini, C. Ghigna, S. Riva, and G. Biamonti. Transcription of satellite iii non-coding rnas is a general stress response in human cells. *Nucleic Acids Res.*, 36(2) :423–434, 2008.
- [205] T. P. Alastalo, M. Hellesuo, A. Sandqvist, V. Hietakangas, M. Kallio, and L. Sistonen. Formation of nuclear stress granules involves hsf2 and coincides with the nucleolar localization of hsp70. *J. Cell Sci.*, 116(17) :3557–3570, 2003.
- [206] A. Vihervaara C. Sergelius, J. Vasara, M. A. Blom, A. N. Elsing, P. Roos-Mattjus, and L. Sistonen. Transcriptional response to stress in the dynamic chromatin environment of cycling and mitotic cells. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 110(36) :E3388–E3397, 2013.
- [207] S. Wang, W. Xie, M. N. Rylander, P. W. Tucker, S. Aggarwal, and K. R. Diller. Hsp70 kinetics study by continuous observation of hsp-gfp fusion protein expression on a perfusion heating stage. *Biotechnol. Bioeng.*, 99(1) :146–154, 2007.
- [208] M. N. Rylander, Y. Feng, K. Zimmerman, and K. R. Diller. Measurement and mathematical modeling of thermally induced injury and heat shock proteins expression kinetics in normal and cancerous prostate cells. *Int. J. Hyperther.*, 26(8) :748–764, 2010.

- [209] R. Deckers, C. Debeissat, P. Y. Fortin, C. T. W. Moonen, and F. Couillaud. Arrhenius analysis of the relationship between hyperthermia and hsp70 promoter activation : A comparison between ex vivo and in vivo data. *Int. J. Hyperther.*, 28(5) :441–450, 2012.
- [210] Beckham J. T. and G. J. Wilmink, Mackanos M. A., Takahashi K., Contag C. H., Takahashi T., and Jansen E. D. Role of hsp70 in cellular thermotolerance. *Lasers in Surgery and Medicine*, 40 :704–715, 2008.
- [211] K. L. Zobeck, M. S. Buckley, W. R. Zipfel, and J. T. Lis. Recruitment timing and dynamics of transcription factors at the hsp70 loci in living cells. *Mol. Cell.*, 40(6) :965–975, 2010.
- [212] P. Gervais and I. Martinez de Maranon. Effect of kinetics of temperature variation on *Saccharomyces cerevisiae* viability and permeability. *Biochim. Biophys. Acta*, 1235 :52–56, 1995.
- [213] T. S. Herman, E. W. Gerner, B. E. Magun, D. Stickney, C. C. Sweets, and D. M. White. Rate of Heating as a Determinant of Hyperthermic Cytotoxicity. *Cancer Res.*, 41 :3519–3523, 1981.
- [214] C. P. Burns, B. J. Lambert, B. N. Haugstad, and M. M. Guffy. Influence of Rate of Heating on Thermosensitivity of L1210 Leukemia : Membrane Lipids and M_r 70,000 Heat Shock Protein. *Cancer Res.*, 46 :1882–1887, 1986.
- [215] I. Martinez de Maranon, N. Chaudanson, N. Joly, and P. Gervais. Slow heat rate increases yeast thermotolerance by maintaining plasma membrane integrity. *Biotechnol. Bioeng.*, 65(2) :176–181, 1999.
- [216] S. Guyot, E. ferret, and P. Gervais. Responses of *Saccharomyces cerevisiae* to thermal stress. *Biotechnol. Bioeng.*, 92(4) :403–409, 2005.
- [217] S. Guyot, L. Pottier, E. Ferret, L. Gal, and P. Gervais. Physiological responses of *Escherichia coli* to different heat-stress kinetics. *Arch. Microbiol.*, 192 :651–666, 2010.
- [218] S. Guyot, L. Pottier, A. Hartmann, M. Ragon, J. H. Tiburski, P. Molin, E. ferret, and P. Gervais. Extremely rapid acclimatation of *Escherichia coli* to high temperature over a few generations of a fed-batch culture during slow warming. *Microbiologyopen*, 3(1) :52–63, 2013.
- [219] G. C. Li. Thermal Biology and physiology in clinical hyperthermia : current status and future needs. *Cancer Res.*, 44 :4886s–4893s, 1984.
- [220] G. C. Li and J. Y. Mak. Induction of heat shock protein synthesis in murine tumors during the development of thermotolerance. *Cancer Research*, 45 :3816–3824, 1985.
- [221] S. P. Tomasovic, P. A. Steck, and D. Heitzman. Heat-stress proteins and thermal resistance in rat mammary tumor cells. *Radiat. Res.*, 95 :399–413, 1983.
- [222] J. T. Beckham, M. A. Mackanos, C. Crooke, T. Takahashi, C. O’Connell-Rodwell, C. H. Contag, and E. D. Jansen. Assessment of cellular response to thermal laser injury through bioluminescence imaging of heat shock protein 70. *Photochem. Photobiol.*, 79(1) :76–85, 2004.
- [223] D. M. Simanovsky, M. A. Mackanos, A. R. Irani, C. E. O’Connell-Rodwell, C. H. Contag, H. A. Schwettman, and D. V. Palanker. Cellular tolerance to pulsed hyperthermia. *Phys. Rev.*, 74 :011915–1–011915–7, 2006.
- [224] R. E. Ferrando, S. T. Schuschereba, J. A. Quong, and P. D. Bowman. Carbon dioxide laser induction of heat shock protein 70 synthesis : Comparison with high temperature treatment. *Lasers in Med. Sci.*, 10 :207–212, 1995.
- [225] I. Petre, A. Mizera, C. L. Hyder, A. Meinander, A. Mikhailov, R. I. Morimoto, L. Sistonen, J. E. Eriksson, and R.J. Back. A simple mass-action model for the eukaryotic heat shock response and its mathematical validation. *Int. J. Hyperther.*, 10 :595–612, 2011.
- [226] T. R. Rieger, R. I. Morimoto, and V. Hatzimanikatis. Mathematical modeling of the eukaryotic heat-shock response : Dynamics of the hsp70 promoter. *Biophys. J.*, 88 :1646–1658, 2005.
- [227] Z. Szymanska and M. Zylicz. Mathematical modeling of heat shock protein synthesis in response to temperature change. *J. Theor. Biol.*, 259 :562–569, 2009.

- [228] D. Remondini, C. Bernardini, M. Forni, F. Bersani, G. C. Castellani, and M. L. Bacci. Induced metastable memory in heat shock response. *J. Biol. Phys.*, 32 :49–59, 2006.
- [229] K. Sriram, M. Rodriguez-Fernandez, and F. J. Doyle. A detailed modular analysis of heat-shock protein dynamics under acute and chronic stress and its implication in anxiety disorders. *PLoS One*, 7(8) :e42958, 2012.
- [230] E. Gerner, R. Boone, W. Connor, J. Hicks, and M. Boone. A transient thermotolerant survival response produced by single thermal doses in hela cells. *Cancer Res.*, 36 :1035–1040, 1976.
- [231] O. Lipan, J. M. Navenot, Z. Wang, L. Huang, and S. C. Peiper. Heat shock response in cho mammalian cells is controlled by a nonlinear stochastic process. *PLOS CB*, 3(10) :1859–1870, 2007.
- [232] A. Mizera and B. Gambin. Stochastic modelling of the eukaryotic heat shock response. *J. Theor. Biol.*, 265 :455–466, 2010.
- [233] J. R. Lepock, H. E. Frey, A. M. Rodahl, and J. Kruuv. Thermal analysis of chl v79 cells using differential scanning calorimetry : Implications for hyperthermic cell killing and the heat shock response. *J. Cell. Physiol.*, 137(1) :14–24, 1988.
- [234] A. Peper, C. A. Grimbergen, J. A. E. Spaan, J. E. M. Souren, and R. Van Wijk. A mathematical model of the hsp70 regulation in the cell. *Int. J. Hyperther.*, 14(1) :97–124, 1998.
- [235] J. More, B. Garbow, and K. Hillstrom. Minpack, version 1. Accessed 15 January 2009.
- [236] E. Hairer and G. Wanner. *Solving Ordinary Differential Equations II. Stiff and Differential Algebraic Problems.*, volume 14. Springer-Verlag, 1996.
- [237] R. Duncan and J. W. Hershey. Heat-shock-induced translationnal alterations in hela cells. initiation factor modifications and the inhibition of translation. *J. Biol. Chem.*, 259 :11882–11889, 1984.
- [238] R. F. Ducan and H. J. Song. Striking multiplicity of eif4e-bp1 phosphorylated isoforms identified by 2d gel electrophoresis regulation by heat-shock. *Eur. J. Biochem.*, 265 :728–743, 1999.
- [239] A. Westra and W. C. Dewey. Variation in sensitivity to heat shock during the cell cycle of chinese hamster cells in vitro. *Int. J. Radiat. Biol.*, 19 :467–477, 1971.
- [240] J. R. Lepock. Cellular effects of hyperthermia : relevance to the minimum dose for thermal damage. *Int. J. Hyperther.*, 19 :252–256, 2003.
- [241] P. Csermely, T. Schnaider, Z. Prohaszka, and G. Nardai *et al.* The 90-kda molecular chaperone family : structure, function, and clinical applications. a comprehensive review. *Pharmacol. Ther.*, 79 :129–168, 1998.
- [242] C. Soti, A. S. Sreedhart, and P. Csermely. Apoptosis, necrosis and cellular senescence : chaperone occupancy as a potential switch. *Aging Cell*, 2 :39–45, 2003.
- [243] K. C. Kregel. Molecular biology of thermoregulation. invited review : heat shock proteins : modifying factors in physiological stress responses and acquired thermotolerance. *J. Appl. Physiol*, 92 :2177–2186, 2002.
- [244] J. Landry, D. Bernier, P. Chretien, L. M. Nicole, R. M. Tanguay, and N. Marceau. Synthesis and degradation of heat shock proteins during development and decay of thermotolerance. *Cancer Res.*, 42 :2547–2461, 1982.
- [245] G. C. Li. Elevated levels of 70,000 dalton heat shock protein in transiently thermotolerant chine hamster fibroblats and in their stable heat resistant variants. *Int. J. Radiat. Ocol. Biol. Phys.*, 11 :165–177, 1985.
- [246] S. K. Rabindran, J. Wisniewski, L. Li, G. C. Li, and C. Wu. Interaction between heat shock factor and hsp70 is insufficient to suppress induction of dna-binding activity in vivo. *Mol. Cell. Biol.*, pages 6552–6560, 1994.

- [247] N. Kuhl and L. Rensing. Heat shock effects on cell cycle progression. *Cell. Mol. Life Sci.*, 57 :450–463, 2000.
- [248] K. Helmbrecht, E. Zeise, and L. Rensing. Chaperones in the cell cycle regulation and mitogenic signal transduction : a review. *Cell prolifer.*, 33 :341–365, 2008.
- [249] H. Reinke, C. Saini, F. Fleury-Olela, C. Dibner, and I. J. Benjamin *et al.* Differential display of dna-binding proteins reveals heat-shock factor 1 as a circadian transcription factor. *Genes Dev.*, 22 :331–345, 2008.
- [250] T. Tamaru, M. Hattori, K. Honda, I. Benjamin, and T. Ozawa *et al.* Synchronisation of circadian per2 rhythms and hsf1-bmal1 : Clock interaction in mouse fibroblasts after short-term heat shock pulse. *Plos One*, 6 :e24521, 2011.
- [251] J. Sakakibara and R. J. Adrian. Whole field measurement of temperature using two-color laser induced fluorescence. *Exp. Fluids*, 26 :7–15, 1999.
- [252] S. Ebert, K. Trvais, B. Lincoln, and J. Gluck. Fluorescence ratio thermometry in a microfluidic dual-beam laser trap. *Opt. Express*, 15 :15493–15499, 2007.
- [253] E. J. G. Peterman, F. Gittes, and C. F. Schmidt. Laser-induced heating in optical traps. *Biophys. J.*, 84 :1308–1316, 2003.
- [254] J. W. Lichtman and JA Conchello. Fluorescence microscopy. *Nat. Methods*, 2 :910–919, 2005.
- [255] David R. Lide. *CRC Handbook of Chemistry and Physics, 89th Edition*. CRC Press/Taylor and Francis, Boca Raton, FL, 2009.
- [256] W. S. Rasband. Imagej. <http://rsb.info.nih.gov/ij/>, National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA, 2009.
- [257] S. V. Gudkov, V. I. Bruskov, M. E. Astashev, A. V. Chernikov, L. S. Yaguzhinsky, and S. D. Zakharov. Oxygen-dependent auto-oscillations of water luminescence triggered by the 1264 nm radiation. *J. Phys. Chem. B*, 115(23) :7693–7698, 2011.
- [258] S. G. Sokolovski, S. A. Zolotovskaya, A. Goltsov, C. Pourreyron, A. P. South, and E. U. Rafailov. Infrared laser pulse triggers increased singlet oxygen production in tumour cells. *Sci. Rep.*, 3(3484) :1–7, 2013.
- [259] J. F. Davidson, B. Whyte, P. H. Bissinger, and R. H. Schiestl. Oxidative stress is involved in heat-induced cell death in *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 93 :5116–5121, 1996.
- [260] S. Fritah, E. Col, C. Boyault, J. Govin, K. Sadoul, S. Chiocca, E. Christians, S. Khochbin, C. Jolly, and C. Vourc'h. Heat-shock factor 1 controls genome-wide acetylation in heat-shocked cells. *Mol. Biol. Cell*, 20 :4976–4984, 2009.
- [261] G. Herbomel. Analyse de la dynamique du facteur de transcription hsf1 "heat shock factor 1" par microscopie de fluorescence. disponible sur <http://tel.archives-ouvertes.fr/tel-00771403>. 2012.
- [262] S. Shivaswamy and V. R. Iyer. Stress-dependent dynamics of global chromatin remodeling in yeast : Dual role for swi/snf in the heat shock stress response. *Mol. Cell. Biol.*, 28(7) :2221–2234, 2008.
- [263] T. Y. Erkina, Y. Zou, S. Freeling, V. I. Vorobyev, and A. M. Erkin. Functional interplay between chromatin remodeling complexes rsc, swi/snf and iswi in regulation of yeast heat shock genes. *Nucleic Acids Res.*, 38(5) :1441–1449, 2009.
- [264] J. Dahle, S. Bagdonas, O. Kaalhus, G. Olsen, H. B. Steen, and Moan J. The bystander effect in photodynamic inactivation of cells. *Biochim. Biophys. Acta*, 1475 :273–270, 2000.
- [265] J. Campisi, T. H. Leem, and M. Fleshner. Stress-induced extracellular hsp72 is a functionnaly significant danger signal to the immune system. *Cell Stress Chaperon.*, 8 :272–286, 2003.

- [266] A. Asea, S. K. Kraeft, E. A. Kurt-Jones, M. A. Stevenson, L. B. Chen, R. W. Finberg, G. C. Koo, and S. K. Calderwood. Hsp70 stimulates cytokine production through a cd14-dependent pathway, demonstrating its dual role as a chaperone and cytokine. *Nat. Med.*, 6 :435–442, 2000.
- [267] V. L. Vega, M. Rodriguez-Silva, T. Frey, M. Gehrmann, J. Carlos Diaz, C. Steinem, G. Multhoff, N. Arispe, and A. De Maio. Hsp70 translocates into the plasma membrane after stress and is released into the extracellular environment in a membrane-associated form that activates macrophages. *J. Immunol.*, 180 :4299–4307, 2008.
- [268] K. L. Milarski and R. I. Morimoto. Expression of human hsp70 during the synthetic phase of the cell cycle. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 83 :9517–9521, 1986.
- [269] L. Fajas. Re-thinking cell cycle regulators : the cross-talk with metabolism. *Front. Oncol.*, 3(4) :1–6, 2013.
- [270] A. Vihervaara and L. Sistonen. Hsf1 at a glance. *J. Cell Sci.*, 127 :261–266, 2014.
- [271] Yves Usson. Microscopie i : Bases de la microscopie. <http://www-timc.imag.fr/Yves.Usson/COURS/BASES-MICROSCOPIE.pdf>.