

UNIVERSITÉ DE LILLE

THÈSE DE DOCTORAT

École doctorale **Sciences de la Matière du Rayonnement et de l'Environnement**
Unité de recherche **Laboratoire de Physique des Lasers, Atomes et Molécules**

Mort cellulaire initiée par l'oxygène singulet : mise en évidence d'effets à longue portée

Thèse préparée et soutenue publiquement par **Hélène MOULET**
le 5 février 2019 pour obtenir le grade de Docteur en Physique
Spécialité : Milieux dilués et optique

Composition du jury

Mme Céline Frochot	Rapporteur	Directeur de Recherche	Université de Lorraine
Mme Stéphanie Bonneau	Rapporteur	Maître de Conférences	Sorbonne Université
M. Peter Ogilby	Examineur	Professeur	Université de Aarhus
M. Emmanuel Courtade	Directeur de thèse	Maître de Conférences	Université de Lille
M. Marc Douay	Président du Jury	Professeur	Université de Lille

Résumé

Mort cellulaire initiée par l'oxygène singulet : mise en évidence d'effets à longue portée

L'oxygène singulet ($^1\text{O}_2$), premier état électronique excité du dioxygène, est l'agent cytotoxique majeur en photo-thérapie dynamique. Nous avons utilisé l'activation optique directe du dioxygène pour faire un lien quantitatif entre taux de production d' $^1\text{O}_2$ et mort cellulaire.

Dans des sphéroïdes tumoraux, qui reproduisent *in vitro* la géométrie des tumeurs, nous mettons en évidence de la mort cellulaire à longue portée qui ne peut être expliquée par l'action directe de $^1\text{O}_2$. Cette mort est due à de l' $^1\text{O}_2$ produit au sein des sphéroïdes mais à l'extérieur des cellules. Nous avons mis en place une expérience qui nous permet de contrôler spatialement la production de $^1\text{O}_2$ à l'extérieur des cellules. La mort cellulaire observée à longue portée dans ces expériences implique la présence d'espèces réactives de l'oxygène secondaires.

Enfin, certaines modalités de mort sont privilégiées du point de vue thérapeutique pour, entre autres, limiter la réponse inflammatoire. Nous avons mis en place une expérience *in vitro* qui nous permet d'observer différentes modalités de mort en fonction du taux de production de $^1\text{O}_2$ et du temps d'exposition.

Mots clés : oxygène singulet, espèces réactives de l'oxygène, stress oxydant, sphéroïdes tumoraux, mort cellulaire, microscopie optique de cellules vivantes.

Abstract

Cell death initiated by singlet oxygen: highlighting long-range effects

Singlet oxygen ($^1\text{O}_2$) is the first excited state of molecular oxygen. It is the major cytotoxic agent in photo-dynamic therapy. We use direct optical excitation of oxygen to quantitatively estimate $^1\text{O}_2$ production rate in cells and to study its cytotoxic effects.

In multicellular tumor spheroids, which mimic tumor geometry *in vitro*, we highlight long-range cell death that cannot be explained by singlet oxygen alone. This death is caused by $^1\text{O}_2$ generated within spheroids but outside of the cells. We set up an experiment enabling spatial control of extra-cellular $^1\text{O}_2$ production. The measured long-range cell death in these experiments implies the presence of secondary reactive oxygen species.

Lastly, some cell death modalities are preferred from a treatment perspective, in order, for example, to limit inflammatory response. We set up an experiment that enabled us to observe different cell death modalities according to $^1\text{O}_2$ production rates and exposure times.

Key words: singlet oxygen, reactive oxygen species, oxidative stress, tumor spheroids, cell death, optical microscopy of living cells.

Remerciements

Cette thèse fut une aventure, quatre ans (et presque demi) d'essais, erreurs et expériences, de questions, remises en question et découvertes. Tout au long de ces années des personnes m'ont encadrée, formée, aiguillée et soutenue. Sans eux, il n'y aurait pas ce manuscrit.

Je vais commencer par la fin et remercier les membres du jury, qui ont jugé ce travail digne d'être soutenu et d'avoir enrichi cette journée de soutenance par leurs remarques et les discussions qui se sont poursuivies. Je remercie donc les professeurs Céline Frochot et Stéphanie Bonneau d'avoir accepté d'être rapporteurs, et le professeur Peter Ogilby d'avoir accepté d'être examinateur. Enfin, je remercie le professeur Marc Douay, directeur du PhLAM, d'avoir présidé le jury et de m'avoir accordé les délais nécessaires pour terminer sereinement ce travail de recherche.

C'est avec plaisir que je remercie sincèrement mon directeur de thèse, Emmanuel Courtade, et mon co-encadrant Anthony Treizebré, pour leur disponibilité, leur passion pour le sujet, et la qualité de leur implication du début à la fin de cette thèse. Je remercie Emmanuel particulièrement pour sa sérénité, l'autonomie qu'il m'a accordée tout en suivant le projet de près, et pour la lecture et relecture des premières versions du manuscrit. Je remercie Anthony pour son accompagnement en micro-fluidique et en salle blanche, et pour sa gentillesse et sa bonne humeur sans failles.

A ces noms s'ajoutent Alexandra Pruvost et Marie Guilbert, qui m'ont formée sur des techniques de biologie et m'ont imposé une rigueur expérimentale qui aura sans doute évité une hécatombe de cellules. François, pour sa rigueur, sa franchise et son exigence scientifique, source de "bon" stress, et son aide précieuse avec le montage optique expérimental, l'interfaçage des instruments, et l'automatisation des expériences. Jean Pesez, qui a su rendre agréables de longues journées de montage et démontage de systèmes optiques. Mariano Gonzalez et Mélanie Henri qui ont pris le temps de me former à la microscopie confocale. Florent Réal, Jean-Marie Aubry et Alexis Vlandas qui nous ont permis d'aborder des questions en chimie et électrochimie.

L'atelier électronique, Hervé, Philippe, Michel et Thierry, pour leurs réparations de matériel rapides et dans la bonne humeur méritent également d'être salués. Dans l'équipe administrative, un grand merci à Marie-Thérèse et Stéphanie du PhLAM, et Christophe de l'école doctorale SMRE, pour avoir rendu des situations parfois compliquées moins compliquées.

Merci à mes co-bureau du PhLAM, Dana, Darka, Majid et Mohammed qui ont animé et enrichi mon quotidien de discussions scientifiques et moins scientifiques, et de bons cookies maison. Merci à mes co-bureau (ou presque) de l'IEMN, Caroline et Florent, qui n'ont jamais hésité à me prêter leurs neurones malgré des thématiques de travail très différentes, même après leur départ vers de nouveaux horizons scientifiques.

Je me dois également de mentionner les apéros-bières salutaires et parfois étonnamment productifs au PhLAM, et le groupe BioMEMS pour la convivialité (et les croissants) des petits déjeuners du vendredi. Il n'y a malheureusement pas assez de place pour saluer toutes les personnes avec qui j'ai eu des échanges fructueux et qui ont rendu cette thèse plus agréable.

Je remercie enfin ma famille, qui n'a pas toujours compris ce que je faisais, mais qui m'a toujours soutenu en faisant preuve d'une confiance très flatteuse en mes capacités. Et évidemment Félix, mon amour, avec qui tout semble plus facile.

Introduction

J'ai effectué ma thèse dans le laboratoire de Physique des Lasers, Atomes et Molécules (PhLAM) de l'Université de Lille, qui regroupe des chercheurs travaillant sur les interactions lumière-matière. L'équipe Dynamique des Systèmes Complexes (DySCO) du PhLAM rassemble plusieurs groupes autour de thématiques associées à l'étude de systèmes optiques et/ou biologiques. J'ai rejoint en octobre 2014 le groupe "Dynamique du stress en cellules vivantes", qui s'intéresse depuis 2006 à la réponse biologique de cellules humaines à des stress oxydants et thermiques. Notre groupe est composé de physiciens et de biologistes qui mettent en commun leurs expertises afin de répondre à des questions à l'interface de l'optique, de la modélisation des systèmes biologiques, de la biologie des cellules, et de la chimie. Cette interdisciplinarité et la diversité d'approches fait à la fois la complexité et la richesse des projets du groupe, et m'a motivée à les rejoindre, suite à un diplôme d'ingénieur physicien spécialisé en applications à la santé.

L'oxygène singulet ($^1\text{O}_2$), premier état excité du dioxygène, est l'agent cytotoxique majeur en Photo-Thérapie Dynamique (PDT), une technique utilisée, entre autres, pour détruire des tumeurs. La PDT est un traitement qui repose sur l'utilisation combinée de substances photosensibles (photo-agents) et d'une irradiation lumineuse en présence de dioxygène. Les photo-agents irradiés génèrent dans les cellules de l'oxygène singulet et d'autres espèces réactives de l'oxygène qui peuvent provoquer la mort des cellules. L'oxygène singulet peut également être généré par photo-activation directe du dioxygène, sans l'intermédiaire de photo-agents. Contrairement à la PDT, la production d' $^1\text{O}_2$ par photo-activation directe du dioxygène n'a été que très peu testée dans des conditions cliniques. Elle présente néanmoins des avantages intéressants. Par rapport à la production de $^1\text{O}_2$ par l'intermédiaire de photo-agents, la photo-activation directe du dioxygène permet notamment d'estimer plus facilement le taux de production d' $^1\text{O}_2$.

Dans notre groupe, l'oxygène singulet est généré par photo-activation directe du dioxygène à 1270 nm. Deux thèses, celle de François Anquez soutenue en 2010, et celle d'Aude Sivéry en 2014, ont caractérisé la génération d' $^1\text{O}_2$ par excitation optique directe ainsi que la possibilité de pouvoir induire ainsi de la mort cellulaire. Au cours des quatre dernières années, j'ai poursuivi les travaux du groupe sur la mort cellulaire. Cette thèse, intitulée "Mort cellulaire initiée par l'oxygène singulet : mise en évidence d'effets à longue portée", s'articule autour de la thématique de la mort cellulaire suite à la génération d'une dose quantifiée d'oxygène singulet. Ce travail est divisé en trois chapitres.

Les travaux antérieurs s'étaient limités à l'étude de la mort dans des cellules cultivées *in vitro* en mono-couches. Je me suis intéressée à un modèle cellulaire plus proche des tumeurs. *In vivo*, les tumeurs sont des structures biologiques complexes, composées de cellules dysfonctionnelles à la croissance dérégulée et au métabolisme altéré. L'organisation des cellules en agrégats de forme globalement sphérique, dits "sphéroïdes", modifie le métabolisme des cellules le rapprochant du métabolisme *in vivo* et permet de reproduire certaines propriétés physiques des tissus vivants. En effet, l'organisation tri-dimensionnelle des cellules a un impact sur la pénétration de la lumière dans les sphéroïdes et est à l'origine de la formation de gradients en dioxygène entre le

cœur des sphéroïdes et la surface. Ces facteurs affectent la quantité d'oxygène singulet générée par photo-production. Ainsi, afin de comparer la réponse de mono-couches et de sphéroïdes à un stress oxydant initié par de l' $^1\text{O}_2$ généré au moyen d'une source laser gaussienne à 1270nm, il est nécessaire d'estimer au préalable le taux de production d' $^1\text{O}_2$ dans des sphéroïdes. J'ai par conséquent mesuré le coefficient de diffusion de la lumière à 1270nm dans des sphéroïdes de cellules de la lignée MCF-7 (cellules humaines cancéreuses du sein), et simulé numériquement la distribution de la lumière et la concentration en dioxygène (chapitre 2). En sphéroïdes, de la mort à longue distance du faisceau laser gaussien est mesurée pour une fraction significative de cellules. La quantité totale d' $^1\text{O}_2$ générée dans ces cellules est inférieure de plusieurs ordres de grandeur à la quantité d' $^1\text{O}_2$ létale en mono-couches. La différence de réponse des cellules cultivées en mono-couches et en sphéroïdes diminue fortement lorsqu'un désactivateur extracellulaire d' $^1\text{O}_2$ élimine l'oxygène singulet généré en dehors des cellules.

Suite à ces résultats, nous formulons l'hypothèse qu' $^1\text{O}_2$ réagit dans le milieu extra-cellulaire pour former des espèces toxiques capables de diffuser sur des distances plus longues. Nous définissons ainsi deux types de dommages provoqués par l'oxygène singulet : des dommages directs, provoqués par l'interaction d' $^1\text{O}_2$ avec les cellules, et des dommages indirects, provoqués par une ou plusieurs autres espèces toxiques, produits de l'oxygène singulet dans le milieu extracellulaire. Afin de confirmer l'existence d'espèces réactives de l'oxygène dites "secondaires" produites par $^1\text{O}_2$, nous avons mis en place une expérience *in vitro* qui favorise la production extracellulaire d' $^1\text{O}_2$. Le laser est focalisé à l'extérieur de cellules cultivées en mono-couches et la majorité de l' $^1\text{O}_2$ est produit dans un volume de quelques micromètres cube. J'ai mesuré de la mort cellulaire à plusieurs dizaines de micromètres du laser, qui ne peut s'expliquer que par la formation d'espèces secondaires en quantités toxiques. Nous cherchons, dans le chapitre 3, à identifier les espèces produites et les mécanismes de réaction associés.

Nous nous sommes enfin également intéressés aux différents modes de mort des cellules suite à une irradiation. En effet, il peut y avoir un intérêt thérapeutique à privilégier une modalité de mort plutôt qu'une autre, par exemple l'apoptose pour éviter une réaction inflammatoire. J'explore donc, dans le chapitre 4, le lien entre l'intensité du stress oxydant initié par $^1\text{O}_2$ et le type de mort subi par les cellules stressées. Je distingue, dans des cellules cultivées en mono-couches, deux modes de la mort, caractérisés au moyen de marqueurs fluorescents, de critères morphologiques, et d'informations sur la cinétique de mort. Une mort de type nécrotique est associée à des stress intenses, et une mort de type apoptotique associée aux stress plus faibles. Pour des stress intermédiaires, la mort est mixte, les ratios de morts apoptotiques et nécrotiques sont comparables. Lors des stress intermédiaires, certaines cellules présentent des symptômes associés généralement à une autophagie. Pour une même quantité totale d'oxygène singulet générée, ces cellules sont plus fréquentes pour des durées d'irradiation courtes. Nous concluons ainsi que la quantité d' $^1\text{O}_2$ générée dans les cellules ne détermine pas à elle seule la réponse des cellules à un stress. La mort est à la fois déterminée par le taux de production d' $^1\text{O}_2$ et la durée d'exposition des cellules.

Table des matières

Introduction	vii
1 L'oxygène singlet pour éradiquer des cellules indésirables	1
1.1 Photo-production d'oxygène singlet en biologie	1
1.1.1 Génération optique par l'intermédiaire de photo-agents	2
1.1.2 $^1\text{O}_2$: agent cytotoxique majeur de la PDT	3
1.1.3 Génération optique directe de $^1\text{O}_2$	4
1.2 Oxygène singlet, stress oxydant et mort cellulaire	4
1.2.1 Demi-vie et diffusion de l'oxygène singlet en solution	5
1.2.2 Dommages provoqués par l'oxygène singlet	5
1.2.3 Stress oxydant et mort cellulaire	6
1.3 Estimation du taux de production d' $^1\text{O}_2$	8
1.3.1 Taux de production d' $^1\text{O}_2$ en PDT	8
1.3.2 Taux de production d' $^1\text{O}_2$ lors d'une génération optique directe à 1270nm	10
2 Irradiation de sphéroïdes tumoraux : mise en évidence de mort à longue portée	13
2.1 Introduction	14
2.1.1 Modèles cellulaires : mono-couches et sphéroïdes	14
2.1.2 Traitement PDT et sphéroïdes	16
2.1.3 Réponse à un traitement PDT de mono-couches et de sphéroïdes dans la littérature	16
2.1.4 Dose d'oxygène singlet et physico-chimie en PDT	18
2.1.5 Photo-excitation directe du dioxygène et dose d' $^1\text{O}_2$ dans un sphéroïde	19
2.2 Protocoles et méthodes	21
2.2.1 Dispositif expérimental	21
2.2.2 Interaction de la lumière à 1270nm avec des sphéroïdes	24
2.2.3 Dépendance spatiale du taux de production de $^1\text{O}_2$	29
2.2.4 Mesure de la mort cellulaire	31
2.2.5 Mesure de la viabilité	34
2.3 Résultats	36
2.3.1 Existence de deux zones de mort dans sphéroïdes irradiés	36
2.3.2 Zone de mort centrale et physico-chimie	42
2.3.3 $^1\text{O}_2$ et mort cellulaire en mono-couches et sphéroïdes	45
2.3.4 Mort cellulaire et jonctions communicantes inter-cellules	46
2.3.5 Influence de $^1\text{O}_2$ extra-cellulaire	49
2.4 Conclusion et perspectives	52
2.4.1 Conclusion	52
2.4.2 Intérêt de la photo-excitation directe du dioxygène	53

3	A la recherche d'espèces toxiques secondaires générées par $^1\text{O}_2$	55
3.1	Introduction	55
3.1.1	Génération extra-cellulaire de $^1\text{O}_2$ par photo-excitation directe du dioxygène à 1270nm.	56
3.1.2	ERO potentiels produits de l'oxygène singulet	57
3.2	Protocoles et Méthodes	60
3.2.1	Dispositif expérimental et expérience d'irradiation	60
3.2.2	Dispositif d'irradiation sous flux	61
3.2.3	Mesure de la fraction de cellules mortes	64
3.2.4	Simulations de la concentration de $^1\text{O}_2$ et des ERO	66
3.2.5	Concentration cumulée de $^1\text{O}_2$ dans les cellules	67
3.2.6	Fraction de cellules mortes en fonction de la concentration cumulée de $^1\text{O}_2$	69
3.2.7	Désactivateurs de ERO	72
3.3	Résultats	76
3.3.1	Mise en évidence de dommages indirects	76
3.3.2	Effet du taux de production d'oxygène singulet sur les dommages indirects.	77
3.3.3	Mort en présence d'un désactivateur extra-cellulaire d' $^1\text{O}_2$	78
3.3.4	Estimation du temps de vie des ERO secondaires	80
3.3.5	Influence des désactivateurs d'ERO sur la mort cellulaire	83
3.3.6	Bilan : ERO secondaires générées par $^1\text{O}_2$	88
3.4	Conclusion et Perspectives	97
3.4.1	Détection des produits de $^1\text{O}_2$ et identification des mécanismes de génération	97
3.4.2	Dommages indirects en sphéroïdes et mono-couches de cellules	98
4	Contrôle par $^1\text{O}_2$ du mode de mort de cellules cultivées en mono-couches	105
4.1	Introduction : mort cellulaire et modalités de mort	105
4.1.1	Modes de mort	106
4.1.2	Stress oxydant et modes de mort cellulaire	107
4.1.3	Mort programmée et plasticité des voies de signalisation	108
4.1.4	Un contrôle possible du type de mort ?	108
4.2	Protocoles et Méthodes	109
4.2.1	Expérience et dispositif d'irradiation	109
4.2.2	Caractérisation des modalités de mort cellulaire	111
4.2.3	Stress oxydant et modalités de morts cellulaires	115
4.2.4	Mort cellulaire : données expérimentales	116
4.3	Résultats	118
4.3.1	Paramètres d'irradiation et mode de mort des cellules	118
4.3.2	Cinétique de mort et corrélation fluence/date de mort	120
4.3.3	Mort cellulaire et dose de $^1\text{O}_2$	122
4.3.4	Symptômes d'autophagie : une sous-population de cellules particulière	124
4.4	Conclusion et perspectives	127
4.4.1	Les modes de mort, déterminées à la fois par la concentration cumulée d' $^1\text{O}_2$ et la durée d'exposition	127
4.4.2	Voies de signalisation et mort cellulaire	128
4.4.3	Réponse cellulaire et dose d'oxygène singulet	128
4.4.4	Intérêt thérapeutique	129
	Conclusions	131
	Annexes	135

A	Culture et caractérisation des cellules et des sphéroïdes	137
A.1	Culture cellulaire	137
A.1.1	Culture cellulaire en mono-couches	137
A.1.2	Culture de sphéroïdes	137
A.2	Caractérisation des cellules en mono-couches	138
A.3	Croissance et caractérisation des sphéroïdes	139
A.3.1	Protocole	139
A.3.2	ATP en mono-couches et sphéroïdes	140
A.3.3	Diamètre et nombre de cellules	140
A.3.4	Étapes de croissance des sphéroïdes.	140
A.3.5	CellTiter Glo et viabilité des sphéroïdes après irradiation laser	143
A.3.6	Géométrie des sphéroïdes	143
B	Laser : caractérisation du faisceau	147
B.1	Mesure expérimentale du rayon du faisceau laser	147
B.1.1	Méthode	147
B.1.2	Résultats	148
C	Simulations numériques de concentration d'espèces : dioxygène, ERO et ERO en présence de désactivateurs.	151
C.1	Vérification de l'outil de simulation	151
C.1.1	Vérification 1 : simulation sans diffusion des espèces	151
C.1.2	Vérification 2 : diffusion à partir d'une source ponctuelle	152
C.2	Déplétion en dioxygène lors de photo-production par excitation optique directe de $^1\text{O}_2$	153
C.2.1	Déplétion en dioxygène dans des sphéroïdes	154
C.2.2	Déplétion en dioxygène dans des cellules cultivées mono-couches	156
C.3	Profils de concentration de $^1\text{O}_2$ et des ERO secondaires	158
C.3.1	Impact de la puissance laser sur la concentration en $^1\text{O}_2$	159
C.3.2	Concentration d'ERO secondaires d'ordre 1	159
C.3.3	Concentration d'ERO secondaires d'ordre 2	160
C.3.4	Concentration en superoxyde en fonction de la puissance laser	162
C.4	Action des désactivateurs d'ERO sur les concentrations	162
C.4.1	Albumine de sérum bovin (BSA)	162
C.4.2	Catalase : désactivateur de H_2O_2	165
C.4.3	Iodure de potassium (KI) : désactivateur de $\text{HO}\cdot$ et O_3	167
C.4.4	Superoxyde dismutase (SOD) : désactivateur de O_2^-	169
C.4.5	Pyridine	171
D	Irradiation de cellules en flux	173
D.1	Culture cellulaire	173
D.2	Concentrations des espèces chimiques	173
D.2.1	Vitesse de flux	174
D.2.2	Simulation de la concentration d'espèces	174
	Bibliographie	177

Chapitre 1

L'oxygène singulet pour éradiquer des cellules indésirables

Dans cette thèse, nous nous intéressons à la mort de cellules humaines cultivées *in vitro* suite à la génération d'oxygène singulet par photo-production. L'oxygène singulet, $^1\text{O}_2$, est un état électronique excité du dioxygène. Cette molécule appartient à la famille des espèces réactives de l'oxygène et provoque des dommages, dit stress oxydant, lorsqu'elle est générée dans des cellules vivantes en quantités toxiques.

L'oxygène singulet est l'agent cytotoxique majeur produit en Photo-Thérapie Dynamique (PDT), une technique utilisée notamment dans le cadre de traitements contre le cancer. En photo-thérapie dynamique, l'oxygène singulet, et d'autres espèces réactives de l'oxygène, sont produites par irradiation lumineuse de photo-agents en présence de dioxygène. La cible biologique des photo-agents dépend de leur nature : ils peuvent se fixer à l'intérieur des cellules ou, par exemple, dans les vaisseaux sanguins.

Ce chapitre présente les deux modes de photo-production de $^1\text{O}_2$, l'action de $^1\text{O}_2$ et des espèces réactives de l'oxygène sur les cellules vivantes, et l'estimation quantitative du taux de production d'oxygène singulet associée à chaque mode de photo-production. Nous montrons que la production d' $^1\text{O}_2$ par photo-excitation directe du dioxygène permet d'estimer plus facilement le taux de production de $^1\text{O}_2$. Nous générons pour cette raison de $^1\text{O}_2$ par photo-excitation directe à 1270nm dans le cadre de cette thèse.

1.1 Photo-production d'oxygène singulet en biologie

La dioxygène est à un état fondamental triplet, $\text{O}_2[{}^3\Sigma_g^-]$, que nous noterons ${}^3\text{O}_2$, et a deux états excités de basse énergie à +0.97 et +1.63 eV du niveau d'énergie fondamental, respectivement $\text{O}_2[{}^1\Delta_g]$ et $\text{O}_2[{}^1\Sigma_g^+]$ [23;55]. En pratique $\text{O}_2[{}^1\Sigma_g^+]$ se désexcite très rapidement ($\sim\text{ps}$ [60]) en $\text{O}_2[{}^1\Delta_g]$, qui est donc considéré l'état singulet responsable des effets biologiques observés. Dans la suite de ce manuscrit, nous noterons l'oxygène singulet dans son premier état excité ($\text{O}_2[{}^1\Delta_g]$) ${}^1\text{O}_2$.

L'oxygène singulet peut être le produit d'une décharge gazeuse, de réactions chimiques, ou par photo-production. La photo-production traditionnelle, utilisée dans le cadre de la PDT, consiste à produire de l'oxygène singulet en excitant des molécules photosensibles, dits photo-agents. La photo-production directe, à l'inverse, ne requiert pas de photo-agents : le dioxygène est excité directement dans son état singulet. De nombreuses études, répertoriées dans la revue de A. Blazquez Castro [55] et le chapitre 4 du livre *Singlet Oxygen* [56], se sont intéressées à la transition directe du dioxygène en oxygène singulet. Toutefois, les effets cytotoxiques de

l'oxygène singulet produit par photo-activation directe du dioxygène ne sont étudiés à ce jour que par quelques groupes en plus de notre équipe^[1-4], notamment ceux de P.R. Ogilby^[23;53;54;188], de I.O. Zolotovskii^[57-59] et de E.U. Rafailov^[10;59]. Enfin, A.S. Yusupov *et al.*^[9], issus de la même équipe que I.O. Zolotovskii *et al.* sont à notre connaissance les seuls à avoir traité une tumeur superficielle de la peau sur une patiente par excitation directe du dioxygène à 1262nm.

1.1.1 Génération optique par l'intermédiaire de photo-agents

La photothérapie dynamique (PDT, pour PhotoDynamic Therapy) est une technique qui utilise de la lumière visible afin de générer des espèces chimiques toxiques à forte concentration. Les premières études pré-cliniques et cliniques ont eu lieu dans les années 70^[11;12], et la PDT est depuis notamment utilisée dans le cadre thérapeutique en dermatologie, ophtalmologie ou dans le cadre de traitements de cancers de la prostate, du sein ou du poumon^[13-15]. L'utilisation de la lumière comme source d'excitation limite actuellement la PDT aux tumeurs superficielles (ou facilement accessibles avec une source guidée). La photo-thérapie se base exclusivement sur de la photo-production indirecte. Des photo-agents (PS, pour Photo-Sensitizers) sont injectés chez le patient avant le traitement. Chaque type de PS a des cibles qui lui est propre, par exemple des compartiments cellulaires spécifiques^[50;51] dans le cas des PS intra-cellulaires.

Les mécanismes de la PDT et photo-réactions sont schématisés [figure 1.1](#). Lorsque les PS sont excités à une longueur d'onde spécifique, ils passent de leur état électronique fondamental (S_0) à un état électronique excité (S_1). Ces PS vont alors subir une conversion inter-système vers un état électronique triplet (T_1). Ces derniers (PS^*) vont pouvoir réagir avec des molécules proches (dioxygène ou biomolécules) : on parle de photo-réaction. Enfin une fraction des PS excités se désexcitent en émettant des photons par fluorescence ou phosphorescence (retour à l'état fondamental S_0), sans avoir généré de 1O_2 .

Il existe deux types de photo-réactions^[15;16]. Les photo-réactions de type I regroupent les réactions des PS excités (PS^*) avec les substrats biologique (membrane cellulaire, protéines, ADN, etc.) Ces réactions prennent la forme d'un transfert de proton (H^+) ou d'électron, et produisent des radicaux libres. Les radicaux libres vont générer en cascade d'autres espèces à fort impact sur l'environnement biologique. Le plus souvent, le transfert de proton se fait du PS vers le substrat. Le PS, devenu ion, peut alors transférer son électron en excès à une molécule d'oxygène, créant des radicaux superoxyde, O_2^- . Les radicaux superoxyde réagissent à leur tour pour former d'autres espèces, dont le peroxyde d'hydrogène, H_2O_2 , une molécule toxique plus stable, qui peut diffuser sur de longues distances dans la cellule.

Lorsque le PS excité (PS^*) réagit avec du dioxygène par transfert d'énergie, il s'agit d'une photo-réaction de type II. Le dioxygène, initialement dans son état électronique fondamental, 3O_2 , est excité dans son premier état singulet, $O_2[^1\Delta_g]$. L'ensemble des radicaux et molécules produits par ces réactions avec le dioxygène (1O_2 , O_2^- , H_2O_2 , $HO\cdot$ etc.) constituent une famille appelée Espèces Réactives de l'Oxygène (ERO). Les dommages liés à une accumulation de ERO dans les cellules sont qualifiés de stress oxydant.

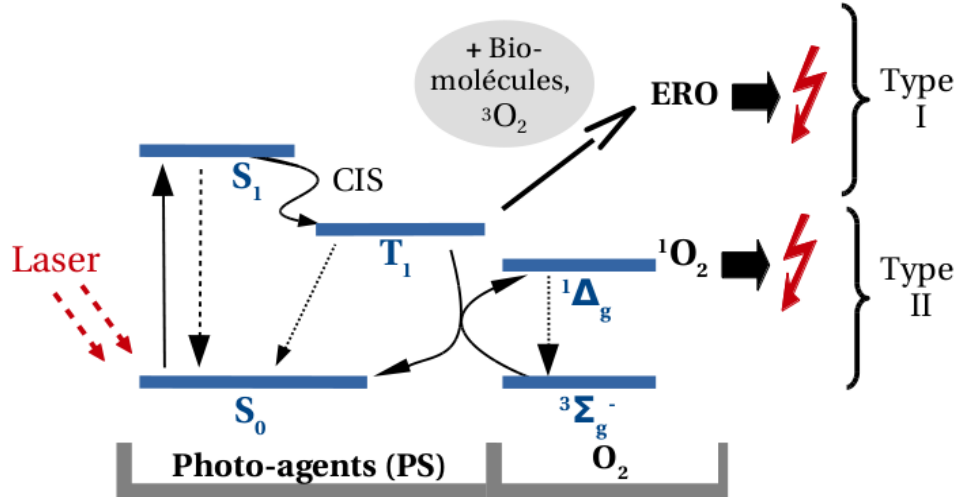


FIGURE 1.1 – **Photo-excitation indirecte.** Diagramme de Jablonski illustrant le principe de la photothérapie dynamique. Des molécules photosensibles (PS) absorbent la lumière laser et passent d'un état fondamental (S_0) à un état excité (S_1). Suite à une conversion inter-système (CIS) de l'état électronique excité S_1 à l'état triplet T_1 , le PS (PS^*) peut réagir avec des biomolécules (photo-réaction de type I) pour produire des radicaux, qui, en présence de dioxygène forment des Espèces Réactives de l'Oxygène (ERO). PS^* peut également réagir directement avec des molécules de dioxygène (photo-réaction de type II) et, par transfert d'énergie, excite le dioxygène de son état triplet stable $O_2[{}^3\Sigma_g^-]$ à un état singulet $O_2[{}^1\Delta_g]$. 1O_2 et les autres ERO provoquent des dommages aux cellules biologiques (symbole éclair) et peuvent entraîner la mort à forte concentration.

1.1.2 1O_2 : agent cytotoxique majeur de la PDT

Dans un environnement où la concentration en dioxygène est plus élevée que la concentration de substrat biologique, la photo-réaction de type II est favorisée, et inversement.

B.C. Wilson, M.S. Patterson *et al.* s'intéressent depuis plus de 20 ans aux mécanismes de PDT dans des modèles *in vitro*^[17;19] et *in vivo*^[20-22]. L' 1O_2 généré par PDT qui ne réagit pas avec les substrats biologiques se désexcite en émettant un signal lumineux à 1270nm. B.C. Wilson, M.S. Patterson *et al.* ont mesuré ce signal afin d'estimer la concentration et le taux de production de 1O_2 associés à des irradiations en PDT. Ils ont montré, lors de PDT en présence de PS intra-cellulaires, que la mort cellulaire est directement proportionnelle au taux de production d'oxygène singulet^[18;20] et conclu que l' 1O_2 est l'agent cytotoxique majeur en PDT. Le fait de pouvoir attribuer la mort cellulaire principalement à 1O_2 justifie son intérêt comme sujet d'étude.

Ces études^[18;21;33] soulèvent également les difficultés d'estimation du taux de production d' 1O_2 à partir des paramètres d'irradiation seuls (intensité laser et durée d'irradiation des cellules), à cause des nombreux facteurs qui déterminent la concentration de 1O_2 . Nous nous intéresserons à l'estimation du taux de production d' 1O_2 dans un second temps. Dans un premier temps, nous allons présenter une alternative à la photo-production par l'intermédiaire de photo-agents : l'excitation optique directe du dioxygène et nous intéresser aux effets cytotoxiques de 1O_2 .

1.1.3 Génération optique directe de $^1\text{O}_2$

Dans cette étude, nous utilisons une source laser^[5] à 1270nm pour provoquer une transition directe du dioxygène à son premier état excité $\text{O}_2[{}^1\Delta_g]$. La transition directe du dioxygène à son premier état excité (figure 1.2) est une transition dite interdite. Elle n’obéit pas aux règles de sélection de la mécanique quantique. En pratique, dans les solvants, la transition est possible^[61], mais la section efficace associée est beaucoup plus faible que celle des photo-agents. La transition à 1270nm par exemple est 10^6 à 10^7 fois moins efficace^[1;2;6;7] que la transition par l’intermédiaire de photo-agents. Toutefois, *in vitro*, il est possible de compenser cette faible efficacité en augmentant la puissance de la source d’excitation et la durée d’irradiation, afin de produire des quantités d’ $^1\text{O}_2$ comparables aux traitements PDT.

Contrairement à la PDT, l’excitation optique directe du dioxygène produit exclusivement $^1\text{O}_2$. Ainsi, elle permet d’étudier la réponse de cellules vivantes à une source d’ $^1\text{O}_2$ seul, et non à une source de multiples ERO.

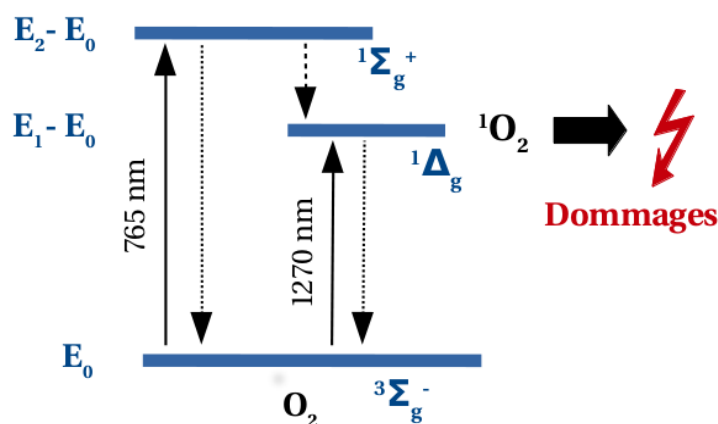


FIGURE 1.2 – **Photo-excitation directe.** Transfert de molécules de dioxygène d’un état triplet fondamental (${}^3\text{O}_2$) à un état singulet excité (${}^1\text{O}_2$). L’apport de photons à 1270nm excite le dioxygène à son premier état électronique $\text{O}_2[{}^1\Delta_g]$. $E_1 - E_0 = 0.97\text{eV}$. A 765nm, le dioxygène est excité dans son deuxième état singulet, $\text{O}_2[{}^1\Sigma_g^+]$. $E_2 - E_0 = 1.63\text{eV}$. La transition interne $\text{O}_2[{}^1\Sigma_g^+] \rightarrow \text{O}_2[{}^1\Delta_g]$ est très rapide ($< \text{ps}$), les dommages cellulaires sont donc attribués à $\text{O}_2[{}^1\Delta_g]$.

Les longueurs d’onde identifiées à ce jour comme aptes à favoriser une transition du dioxygène vers l’oxygène singulet sont listées dans la revue de A. Blasquez-Castro^[55] et le chapitre 4 du livre *Singlet Oxygen*^[56]. Des effets cytotoxiques de l’oxygène singulet produit par photo-activation directe du dioxygène ont notamment été mis en évidence pour des excitations autour de 1270nm^[3;4;10;57-59] et 765nm^[23;53;54;188]. A 765nm, le dioxygène est excité à son second état excité $\text{O}_2[{}^1\Sigma_g^+]$ avant de se désexciter à l’état singulet $\text{O}_2[{}^1\Delta_g]$.

1.2 Oxygène singulet, stress oxydant et mort cellulaire

L’oxygène singulet, comme de nombreuses Espèces Réactives de l’Oxygène (ERO), est généré par les cellules et impliqué dans de nombreux processus cellulaires^[65;70]. La cellule dispose de mécanismes de régulation pour maintenir la concentration d’ERO à des niveaux physiologiques non toxiques. On parle d’homéostasie redox. La génération de $^1\text{O}_2$ par un stimulus externe tel que la photo-production perturbe cette homéostasie. Les dommages associés sont qualifiés de stress oxydant et peuvent aboutir à la mort des cellules. En concentrations non-létales, $^1\text{O}_2$ peut stimuler la prolifération des cellules^[65;66], ou à l’inverse provoquer un arrêt de cycle cellulaire^[67].

Une étude récente de P.R. Ogilby *et al.* [68] suggère en outre qu'il est possible de moduler le cycle cellulaire à travers le contrôle précis du lieu d'irradiation (noyau ou cytoplasme) et de la quantité d' $^1\text{O}_2$ générée. Dans cette thèse, nous ne nous intéresserons qu'aux effets létaux.

1.2.1 Demi-vie et diffusion de l'oxygène singulet en solution

Les dommages provoqués par $^1\text{O}_2$ sont la conséquence de réactions entre $^1\text{O}_2$ et des biomolécules présentes dans les cellules. Le temps de demi-vie de $^1\text{O}_2$, ses propriétés de diffusion et son lieu de génération vont ainsi déterminer la localisation spatiale des dommages.

Le temps de demi-vie $\tau_{1/2}$ de l'oxygène singulet en solution est la résultante de deux phénomènes : l'interaction de $^1\text{O}_2$ avec le solvant, et, dans des milieux plus complexes, la réaction de $^1\text{O}_2$ avec d'autres espèces chimiques. Dans de l'eau pure, $\tau_{1/2} \sim 3.5 \mu\text{s}$ [23]. Dans les cellules, les réactions impliquant $^1\text{O}_2$ et des biomolécules réduisent son temps de demi-vie. B.C. Wilson *et al.* [19] estiment dans des cellules cultivées *in vitro* une durée de vie de l'oxygène singulet de 0.05-0.25 μs . Cette valeur est obtenue par la mesure de la cinétique de photo-blanchiment de photo-agents et repose sur l'hypothèse que le coefficient de diffusion de l'oxygène singulet dans les cellules est similaire à celui dans l'eau. Dans un milieu aqueux, le coefficient de diffusion du dioxygène et de l'oxygène singulet est estimé à $D=2 \times 10^{-9} \text{m}^2 \text{s}^{-1}$, soit une distance de parcours d'environ 40 μm en 1s. $^1\text{O}_2$ parcourt ainsi environ 0.1 μm dans de l'eau pure avant de se désactiver, et 10 à 100 fois moins dans une cellule avant de réagir. A titre de comparaison, le diamètre des cellules est de l'ordre de quelques dizaines de micromètres. L'oxygène singulet réagit donc à proximité de son lieu de production et la distribution spatiale d'oxygène singulet. En PDT, la distribution spatiale de $^1\text{O}_2$ est très dépendante à la distribution des photo-agents dans les cellules (pour les PS intra-cellulaires ou membranaires) ou dans les vaisseaux.

J.W. Snyder *et al.* [24] proposent une durée de vie plus longue dans les cellules en mesurant directement la phosphorescence à 1270nm émise par $^1\text{O}_2$. Cette valeur est estimée à partir de la mesure du temps de demi-vie de $^1\text{O}_2$ dans des cellules incubées dans une solution de D_2O saline. La faible durée de vie de $^1\text{O}_2$ dans de l'eau pure rend en effet la mesure de la cinétique de $^1\text{O}_2$ difficile. Dans du deutérium D_2O , la demi-vie de $^1\text{O}_2$ est de 67 μs [24;25]. Au vu des résultats obtenus, la demi-vie pour des cellules cultivées dans une solution saline à base de H_2O est ainsi estimée à 3 μs . La distance de parcours, de moins de 0.02 μm , est très proche de celle évaluée par B.C. Wilson *et al.* J.W. Snyder *et al.* contestent toutefois l'hypothèse d'un coefficient de diffusion dans les cellules identique à celui dans l'eau. Les cellules vivantes sont un environnement inhomogène, dont le coefficient de diffusion moyen a en effet été estimé entre 2 et $4 \times 10^{-10} \text{m}^2 \text{s}^{-1}$ [23;24], soit cinq à dix fois inférieur au coefficient de diffusion dans de l'eau pure.

Cette différence de temps de demi-vie a des implications importantes sur la réactivité de l'oxygène singulet et l'évaluation de sa toxicité : dans l'hypothèse d'une réduction dans les cellules du temps de demi-vie de $^1\text{O}_2$ de 3.5 à 3 μs , seul près de 10% de $^1\text{O}_2$ généré a réagi avec des biomolécules, contre plus de 95% dans l'hypothèse d'un temps de demi-vie réduit à 0.25 μs .

1.2.2 Dommages provoqués par l'oxygène singulet

La photo-production d'oxygène singulet par PDT, ou par excitation directe du dioxygène, permet de générer $^1\text{O}_2$ en quantités toxiques et de provoquer un stress oxydant. Un ensemble d'études théoriques et expérimentales ont proposé et/ou mesuré des réactions de l'oxygène singulet avec des lipides [69], des protéines [71-74], et de l'ADN [75;76]. L'oxydation de ces éléments par $^1\text{O}_2$ peut être à l'origine de la perte de leur fonction et entraîner la mort des cellules.

La réaction de $^1\text{O}_2$ avec les biomolécules peut initier une chaîne de réactions chimiques.

Par exemple, $^1\text{O}_2$ produit H_2O_2 en réagissant avec l'ascorbate [77;78], et de nombreuses réactions d'oxydation [74;79;80] produisent O_2^- par transfert de proton. Enfin, le très toxique radical hydroxyle $\text{HO}\cdot$ a été identifié comme produit lors de réaction de $^1\text{O}_2$ et du cofacteur d'oxydoréduction NADPH [81;82]. Deux exemples de chaînes de réactions initiées par $^1\text{O}_2$ sont représentés figure 1.3.

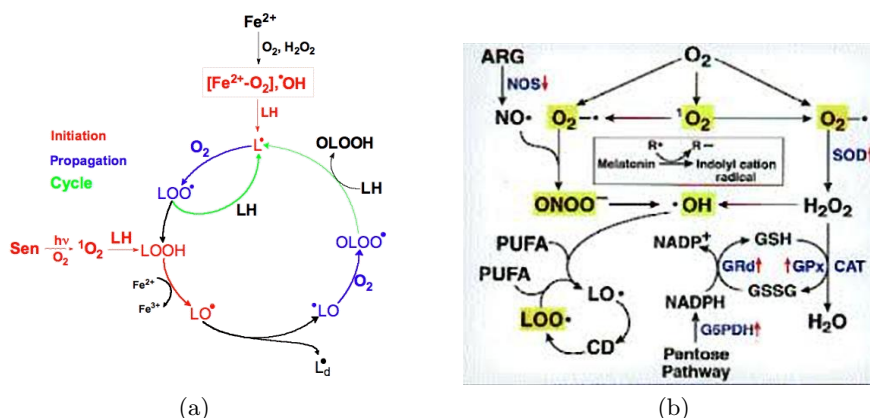


FIGURE 1.3 – Réactions initiées par $^1\text{O}_2$. (a) Exemple de cycle de réactions initiées par la peroxydation des lipides par $^1\text{O}_2$. Schéma tiré du site de Buettner [83]. (b) Exemple de réactions initiées par la réaction de $^1\text{O}_2$ avec une protéine, la mélatonine (hormone/protéine) : $^1\text{O}_2$ réagit avec la mélatonine pour former le radical anion superoxyde O_2^- , ce qui déclenche une série de réactions chimiques impliquant des espèces réactives de l'oxygène ($^1\text{O}_2$, O_2^- , $\cdot\text{OH}$, H_2O_2), de l'azote (ONOO^-) et des biomolécules. (PUFA : acides gras polyinsaturés.) Schéma tiré de l'étude de Reiter [84].

Ainsi, $^1\text{O}_2$ est source de radicaux et d'autres 'Espèces Réactives de l'Oxygène (ERO). Les ERO sont générées de manière endogène [70] par les cellules, par exemple lors de réactions chimiques essentielles au bon fonctionnement de la cellule, telle la conversion du glucose en ATP (adénosine triphosphate), principale source d'énergie des cellules. Elles sont impliquées dans de nombreuses voies de signalisation [85;86] qui régulent l'expression génétique, la prolifération, ou encore l'activation de mécanismes de défense des cellules.

Une accumulation de ERO est toutefois néfaste, causant entre autres des dommages à l'ADN [91-93], aux protéines [87;88], et aux membranes (lipides) [69;89;90] des cellules. Le stress oxydant est considéré un acteur majeur du vieillissement [94-96] et du développement de cancers [93;97;98]. Il est impliqué dans de nombreuses pathologies, telles que le diabète [99;100], les pathologies neurodégénératives [101;102], ou encore l'infertilité masculine [103].

Des mécanismes régulent la concentration intra-cellulaire de ERO afin de préserver les voies de signalisation tout en protégeant la cellule. On parle de maintien de l'homéostasie redox, c'est-à-dire de l'état d'équilibre garant du bon fonctionnement de la cellule. Cette régulation fait intervenir entre autres des enzymes qui neutralisent les ERO, telles la superoxyde dismutase, la catalase ou la glutathion peroxydase [104;105]. Lorsque les variations de la concentration des ERO sont trop importantes, les mécanismes de maintien l'homéostasie redox ne suffisent plus. La cellule enclenche alors des cascades de réactions biochimiques pouvant entraîner sa mort.

1.2.3 Stress oxydant et mort cellulaire

Un stress oxydant est dit létal lorsqu'il entraîne la mort de la cellule stressée. La sévérité d'un stress létal détermine le mode de mort subi par les cellules [14;106-109]. La mort cellulaire

peut être programmée, c'est-à-dire l'aboutissement de processus biochimiques enclenchés par la cellule, ou accidentelle. En cas de stress trop violent, la cellule est détruite sans avoir pu contrôler son mode de mort par le déclenchement de voies de signalisation spécifiques.

Les stress létaux moins sévères sont associés à de la mort programmée par apoptose^[106;107], caractérisée par la fragmentation des cellules et, *in vivo* la phagocytose des fragments par les macrophages. Les stress plus sévères sont associés à une mort par nécrose, caractérisée par une rupture de la membrane cellulaire et un déversement de ses contenus dans le milieu extracellulaire. Ce déversement peut être à l'origine de réactions inflammatoires.

Historiquement, le terme nécrose était associé à une mort accidentelle, mais des processus de mort programmée qui aboutissent à une morphologie de mort caractéristique de la nécrose ont été mis en évidence. Ce mode de mort est parfois qualifiée de "nécroptose"^[119;296]. Un troisième mécanisme, l'autophagie, est caractérisé par la formation de vésicules intra-cellulaires dans lesquelles sont séquestrées des éléments contenus dans le cytoplasme, en vue de leur élimination. L'autophagie fut longtemps considérée forme alternative de mort à l'apoptose, mais de nombreuses études^[110-114] discutent de la causalité réelle entre processus d'autophagie et mort cellulaire. Certains proposent que l'autophagie est une stratégie d'adaptation, et que la mort de la cellule est un symptôme de son échec^[110;112;114;296].

La figure 1.4 donne un aperçu des différentes modalités de mort que peuvent subir les cellules suite à un stress oxydant. Cette classification reste très simpliste ; de nombreux types et sous-types de mort, caractérisés par des critères morphologiques et l'enclenchement de voies de signalisation plus ou moins spécifiques sont décrits dans la littérature^[117;118;296].

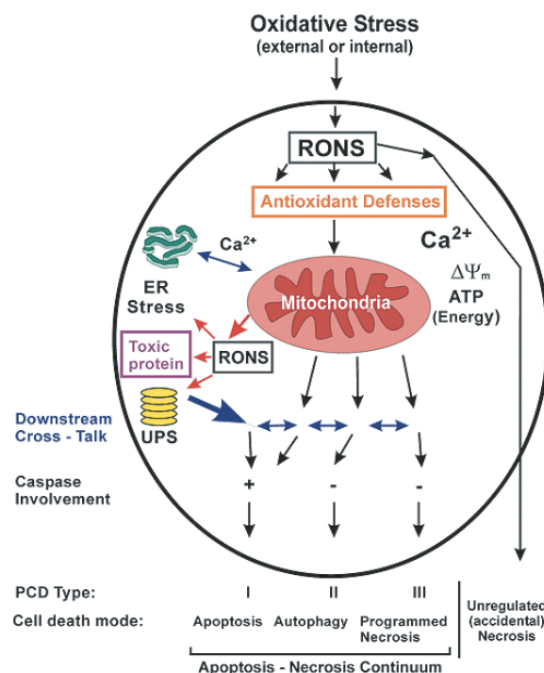


FIGURE 1.4 – **Schéma simplifié de la réponse cellulaire à un stress oxydant.** Suite à un stress oxydant, les mécanismes anti-oxydants de la cellule sont mobilisés afin de réduire le niveau d'espèces réactives de l'oxygène (ERO). Si l'intensité de stress est trop sévère, la cellule subit une nécrose dite non-programmée, ou accidentelle. Lorsque le stress est plus modéré, mais que les ERO sont présentes en quantités trop importantes pour assurer la viabilité de la cellule, la cellule enclenche des voies de signalisation associées à la mort cellulaire. Les modalités de mort dépendent des voies mobilisées. Les caspases notamment, sont traditionnellement associées à de la mort par apoptose.

Tiré de la revue de G.C. Higgins *et al.*^[120]

Plusieurs études^[111;120;121] ont mis en évidence la plasticité des cellules et la capacité de basculer d’une modalité de mort à une autre lors de l’inhibition artificielle de certaines voies de signalisation. Ces études soulèvent des questions associées aux couplages des voies de signalisation, à une éventuelle compétition entre les mécanismes de mort, et aux rôles des différents acteurs biochimiques de la mort cellulaire. Nous étudierons le lien entre dose d’ $^1\text{O}_2$ et mode de mort cellulaire dans le chapitre 4.

1.3 Estimation du taux de production d’ $^1\text{O}_2$

Dans cette thèse, nous souhaitons estimer quantitativement le taux de production de $^1\text{O}_2$ dans les cellules afin d’interpréter la mort cellulaire mesurée. Nous allons montrer que la photo-excitation directe du dioxygène, contrairement à la PDT, se prête à une estimation précise du taux de production de $^1\text{O}_2$, et donc permet d’évaluer la quantité d’ $^1\text{O}_2$ générée dans les cellules sans avoir recours à une méthode de mesure directe.

1.3.1 Taux de production d’ $^1\text{O}_2$ en PDT

Dans le but de faire un lien quantitatif en production d’ $^1\text{O}_2$ et mort cellulaire en PDT, plusieurs études^[19–22;33–36], estiment le taux de production d’ $^1\text{O}_2$. Il n’est uniquement question de PS intra-cellulaires. Le taux de production d’ $^1\text{O}_2$ est soit estimé à partir de la mesure du signal de phosphorescence à 1270 nm émis lors de la désexcitation $^1\text{O}_2$ ^[20–22], soit au moyen de modèles mathématiques rendant compte des cinétiques de réaction entre les photo-agents, le dioxygène, l’oxygène singulet et le substrat biologique^[33–36]. La dose d’ $^1\text{O}_2$ correspond dans ces études à la concentration d’ $^1\text{O}_2$ cumulée, $[\text{}^1\text{O}_2]_C$, c’est-à-dire la quantité totale (en mol/L) d’ $^1\text{O}_2$ générée au cours de l’irradiation laser. La toxicité de $^1\text{O}_2$ est alors caractérisée au moyen de concentrations cumulées seuil, associés à une fraction de cellules mortes donnée ($1/e=0.36$ ou 0.5, en fonction des études). Les concentrations cumulées seuil sont de l’ordre de 0.1-1mmol *in vivo* sur des modèles murins^[20;36], et 0.1-10mmol *in vitro*^[19;33;34].

Dans les études où la production d’ $^1\text{O}_2$ n’est pas mesurée, la dose est définie comme la fluence de lumière^[27–31], soit l’intensité I (également appelée irradiance) cumulée sur la durée de l’exposition Δt (équation (1.1)).

$$F(\text{J}/\text{cm}^2) = I * \Delta t \quad (1.1)$$

La fluence reste la métrique la plus couramment utilisée en PDT pour caractériser l’efficacité d’un traitement. En effet, les paramètres d’irradiation laser I et Δt sont connus, contrairement au taux de production de $^1\text{O}_2$, plus complexe à estimer. Toutefois, la fluence n’est pas directement proportionnelle à la concentration cumulée d’oxygène singulet et deux irradiations à fluence égale peuvent ne pas produire la même concentration cumulée d’ $^1\text{O}_2$ ^[18;21;33]. Nous allons détailler les facteurs qui rendent complexe l’estimation de la production de $^1\text{O}_2$ en PDT.

1.3.1.1 Production d’oxygène singulet en l’absence de substrat biologique

Afin d’estimer le taux de production d’oxygène singulet en PDT, plaçons nous dans un premier temps dans un cas simple, où les photo-agents (PS) sont dilués dans un solvant homogène sans substrats biologiques, par exemple de l’eau pure. Ainsi nous ne considérons que les photo-réactions de Type II, c’est-à-dire la génération d’oxygène singulet suite au transfert d’énergie de photo-agents excités PS^* au dioxygène dissous (équations (1.2) et (1.3)).



Le schéma présenté précédemment, [figure 1.1](#), illustre les possibilités d'excitation et de désexcitation associées à chaque état électronique (S_0 , S_1 , et T_1) des PS. Le taux de production de 1O_2 est ainsi la résultante de ces mécanismes en compétition. En première approche, il est tentant de proposer que plus la fluence laser est importante, plus la proportion de PS excités PS* est importante, et donc plus la quantité d'oxygène singulet généré est grande, dans la limite de la concentration de dioxygène 3O_2 disponible. Le schéma ne traduit toutefois pas les interactions entre les molécules photosensibles, le dioxygène et l'oxygène singulet.

Photo-blanchiment. Le photo-blanchiment [\[21;38;39;52\]](#) est l'altération des propriétés optiques PS, dû à leur dégradation. L'oxydation des PS par réaction 1O_2 a été identifiée comme la source principale de photo-blanchiment [\[39\]](#) ([équation \(1.4\)](#)). L'oxygène à l'état fondamental peut toutefois également réagir avec les PS [\[39\]](#) ([équation \(1.5\)](#)). A ces réactions s'ajoute le photo-blanchiment dû à l'irradiation laser : plus l'intensité lumineuse est forte, plus la dégradation des PS est rapide. Plus l'irradiation est longue, plus la probabilité de dégradation du PS est élevée. Les PS altérés (PS_X) produisent moins, ou pas, d'oxygène singulet.



Description analytique du taux de production d' 1O_2 . Les interactions potentielles entre molécules de dioxygène (3O_2 et 1O_2) et PS (dans l'état énergétique S_0 , S_1 ou T_1) ont été modélisées par I. Georgakoudi *et al.* [\[39\]](#). Cinq équations différentielles couplées décrivent l'évolution temporelle des concentrations de PS (à l'état fondamental S_0), PS_{Ex} (excité à l'état S_1), PS* (à l'état T_1), 1O_2 et 3O_2 . Une description analytique, et la définition des constantes de réaction associées, est proposée par K.K.H. Wang *et al.* [\[41\]](#). Cette description est établie en attribuant les effets de photo-blanchiment exclusivement aux interactions de 1O_2 avec les PS.

Nous reprenons les équations de K.K.H. Wang *et al.* afin de décrire le taux de production Γ (en M/s) d'oxygène singulet. Ce taux de production dépend des concentrations en photo-agent [PS] et en dioxygène [3O_2] dont la cinétique est décrite [équations \(1.8\) et \(1.9\)](#).

$$\frac{d[^1O_2]}{dt} = I \frac{\sigma_\lambda}{h\nu_\lambda} \Phi_\Delta [PS] f([^3O_2]) \quad (1.7)$$

$$\frac{d[^3O_2]}{dt} = - I \frac{\sigma_\lambda}{h\nu_\lambda} \Phi_\Delta [PS] f([^3O_2]) + D \quad (1.8)$$

$$\frac{d[PS]}{dt} = - I \frac{\sigma_\lambda}{h\nu_\lambda} \Phi_\Delta g([^3O_2], [PS]) \quad (1.9)$$

L'intensité laser I (en W/cm^2) est fixée par l'expérimentateur ou le médecin. La section efficace σ_λ (en cm^2) traduit la probabilité d'interaction entre photons et PS en présence de 3O_2 pour produire 1O_2 , à la longueur d'onde d'excitation λ utilisée. $h\nu_\lambda$ (en J) est l'énergie d'un photon à la longueur d'onde d'excitation λ . Le nombre de photons nécessaires pour produire une molécule d'oxygène singulet détermine le rendement quantique Φ_Δ . σ_λ et Φ_Δ sont des propriétés physiques intrinsèques à chaque photo-agent. De nombreux PS sont caractérisés dans la littérature [\[42–46\]](#) : la majorité des PS utilisés en PDT ont comme propriétés $\lambda=600-750nm$, $\sigma_\lambda=10^{-16}-10^{-17} cm^2$ dans de l'eau, et $\Phi_\Delta=0.30-0.85$.

Le terme D (en mol/L/s) traduit l'apport en dioxygène lié à la diffusion. La diffusion des espèces est négligée pour les PS (considérés fixes dans les cellules) et 1O_2 (au temps de demi-vie considéré suffisamment court pour négliger la diffusion). La fonction $f([^3O_2])$ est sans unité, sa valeur est comprise entre 0 et 1 et donne la dépendance en [3O_2] de la génération d'oxygène

singulet. Si la concentration en dioxygène est suffisamment élevée, la production d'oxygène singulet est proportionnelle à la concentration en PS ($f([\text{}^3\text{O}_2])=1$). Si $[\text{}^3\text{O}_2]$ est trop faible, les PS excités (PS^*) se dés excitent avant d'avoir pu entrer en contact avec une molécule de ${}^3\text{O}_2$. La production de ${}^1\text{O}_2$ est alors réduite. Enfin la fonction $g([\text{}^3\text{O}_2],[\text{PS}])$, en mol/L, traduit les effets du photo-blanchiment et donc la dégradation des PS. En l'absence d'effets de photo-blanchiment $g([\text{}^3\text{O}_2],[\text{PS}])=0$: la concentration en PS resterait constante pendant l'irradiation. Une description plus détaillée des fonctions f et g est proposée par K.K.H. Wang *et al.*^[41]. Leur évaluation requiert une connaissance des constantes de réaction entre les différentes espèces (PS , ${}^3\text{O}_2$, ${}^1\text{O}_2$) et sont spécifiques à la nature du PS utilisé.

En conclusion, même dans un milieu simple, sans substrats biologiques, une estimation quantitative du taux de production d'oxygène singulet en PDT requiert non seulement la caractérisation des propriétés physiques des photo-agents, mais également la prise en compte des phénomènes de photo-blanchiment qui affectent l'efficacité des PS et la concentration en dioxygène.

1.3.1.2 Production en présence de substrat biologiques

Dans des cellules vivantes, les substrats biologiques sont une source d'interaction supplémentaire qui rendent l'estimation de la quantité d' ${}^1\text{O}_2$ produite encore plus complexe^[19;39;47-49]. Les substrats biologiques sont en outre une source de photo-réactions de Type I : ${}^1\text{O}_2$ n'est plus la seule espèce réactive produit par photo-réaction. La réponse cellulaire ne peut donc pas être attribuée exclusivement à des effets initiés par ${}^1\text{O}_2$. Négligeons néanmoins les produits de photo-réactions autres que ${}^1\text{O}_2$. Plusieurs facteurs affectent le taux de production d'oxygène singulet, dont l'assimilation de photo-agents, leur distribution dans les cellules, et la réaction éventuelle de photo-agents avec des substrats biologiques. Ces facteurs dépendent tous du type cellulaire^[143] et de la nature du photo-agent.

Avant un traitement PDT, une concentration $[\text{PS}]_0$ de photo-agents est administrée au patient (ou, *in vitro*, ajoutée au milieu de culture des cellules) et diffuse jusqu'aux cellules. Une fraction de cette concentration, qui dépend de la nature du photo-agent et du type de cellules, est dégradée ou évacuée par l'organisme. $[\text{PS}]_0$ est généralement de l'ordre 1-10 μM . A l'intérieur des cellules, les PS se fixent dans des compartiments spécifiques de la cellule^[50;51], tels que la mitochondrie, le lysosome ou le réticulum endoplasmique. La répartition de PS est donc hétérogène. Dans le cas de structures cellulaires tridimensionnelles, et notamment de tumeurs *in vivo*, les propriétés de diffusion des PS déterminent leur capacité à pénétrer au cœur des tumeurs : la concentration en PS est plus importante dans les zones plus vascularisées. Enfin, comme pour les PS, un gradient de concentration en dioxygène s'établit entre les zones plus vascularisées et les reste de la tumeur, rendant l'estimation de la concentration en dioxygène plus complexe. A ces considérations s'ajoutent enfin les propriétés de diffusion et d'absorption de la lumière laser par les tissus irradiés^[125] qui affectent la distribution de l'intensité lumineuse dans les tissus.

Ainsi l'estimation du taux de production d' ${}^1\text{O}_2$ dans les cellules vivantes requiert la caractérisation des propriétés d'assimilation des PS par les cellules afin d'évaluer la concentration en photo-agent, l'estimation de la concentration en dioxygène dans les tissus, de l'intensité laser au vu des propriétés optique des tissus, et de prendre en compte les interactions chimiques entre photo-agents, dioxygène, oxygène singulet et substrats biologiques. La multiplicité des acteurs et des interactions est difficilement compatible avec une estimation précise du taux de production.

1.3.2 Taux de production d' ${}^1\text{O}_2$ lors d'une génération optique directe à 1270nm

La photo-excitation directe du dioxygène permet de s'affranchir des photo-agents, et donc des problématiques associées à la distribution des PS et au photo-blanchiment. Le taux de

production d'oxygène singulet Γ (en mol/L/s), et la quantité cumulée d'oxygène singulet, $[^1O_2]_C$ (en mol/L), ne dépendent que de la concentration de dioxygène dissous $[^3O_2]$ dans les cellules et le milieu extra-cellulaire (équations (1.10) et (1.11)).

$$\Gamma(t) = \frac{\sigma_{1270nm}}{h\nu} [^3O_2](t) I(t) \quad (1.10)$$

$$[^1O_2]_C = \frac{\sigma_{1270nm}}{h\nu} \int_{t_0}^{t_f} [^3O_2] I dt \quad (1.11)$$

Les propriétés d'excitation de l'oxygène à 1270nm (et la mesure directe de la production d' 1O_2) ont été caractérisées dans différents solvants lors d'études antérieures^[1;2] et par A. Krasnovsky Jr. *et al.*^[6-8] : la section efficace dans l'eau pure a été évaluée à $\sigma_{1270nm} \sim 10^{-23} \text{cm}^2$, et dans d'autres solvants tels l'acétone ou l'éthanol.

Lorsque le taux de production de 1O_2 , Γ , est suffisamment faible, la concentration en dioxygène $[^3O_2]$ peut être considérée constante dans le temps. La concentration cumulée d' 1O_2 générée lors d'une irradiation de durée Δt est alors proportionnelle à la fluence laser $F = I \times \Delta t$ (équation (1.12)).

$$[^1O_2]_C = \frac{\sigma_{1270nm}}{h\nu} [^3O_2] I \Delta t \quad (1.12)$$

Des travaux antérieurs dans notre groupe^[3;4] ont montré des effets cytotoxiques *in vitro* dans des mono-couches de cellules MCF-7 (cellules humaines du sein cancéreuses), suite à une irradiation laser de l'ordre de l'heure, avec un faisceau laser gaussien de rayon à $1/e^2$ (waist) $\omega=0.25\text{mm}$ et une intensité maximale de l'ordre de $200\text{W}/\text{cm}^2$. La production Γ vaut alors $\sim 5 \mu\text{M}/\text{s}$, et des concentrations cumulées toxiques de l'ordre de quelques millimolaires. Expérimentalement, l'atmosphère des cellules a été successivement enrichie et appauvrie en dioxygène afin d'étudier l'impact de l'oxygénation sur la mort des cellules. Par simulation numérique, nous pouvons également estimer l'évolution temporelle de la concentration en dioxygène. La méthode de simulation et les équations associées seront décrites par la suite. Dans les conditions expérimentales ci-dessus, la concentration en dioxygène reste $>90\%$ de la concentration initiale pendant l'irradiation. L'hypothèse d'une concentration en dioxygène constante semble donc raisonnable.

Enfin, en PDT, l'oxygène singulet n'est produit qu'au niveau des lieux de fixation des PS, donc à l'intérieur des cellules. La photo-excitation directe permet d'exciter le dioxygène dissous dans le milieu extra-cellulaire, et de potentiellement provoquer des réactions qui n'ont pas lieu en PDT. Nous montrerons dans cette thèse que la génération d' 1O_2 extra-cellulaire peut avoir un impact fort sur la mort des cellules.

En conclusion, l'excitation directe du dioxygène permet de produire exclusivement de l'oxygène singulet et d'écarter les effets chimiques et physiques associées aux interactions entre photo-agents, dioxygène et substrats biologiques. Le taux de production d'oxygène singulet est ainsi plus simple à estimer. Toutefois, autour de 1270nm, ce mode de photo-production provoque une augmentation de la température à proximité du faisceau laser. Les effets thermiques *in vitro* ont été caractérisés dans notre groupe lors d'études précédant cette thèse^[3;4] afin de confirmer l'absence de stress thermique létal dans la gamme de paramètres d'irradiation étudiée. Lors de cette thèse, des expériences de contrôle seront effectuées afin de confirmer que la réponse cellulaire observée n'est pas la conséquence d'un stress thermique.

Chapitre 2

Irradiation de sphéroïdes tumoraux : mise en évidence de mort à longue portée

Cette thèse s’articule autour de la thématique de la mort cellulaire suite à la génération d’une concentration cumulée quantifiée d’oxygène singulet. Dans ce chapitre nous souhaitons comparer la réponse à un stress oxydant initié par l’oxygène singulet de cellules cultivées en mono-couches et en sphéroïdes. Nous générons ainsi de l’oxygène singulet dans des cellules cultivées en mono-couches et dans des sphéroïdes par photo-excitation du dioxygène à 1270nm, estimons la production de $^1\text{O}_2$ et mesurons la mort cellulaire.

Les sphéroïdes sont des agrégats tridimensionnels de cellules qui reproduisent *in vitro* la géométrie de micro-tumeurs avasculaires. Plus complexes que les cultures de cellules en mono-couches traditionnelles, ils sont considérés un modèle plus pertinent^[122–124] pour étudier la réponse cellulaire à un traitement ou un stress. Un certain nombre d’études, rassemblées dans la revue de A. Blazquez-Castro^[55], ont été faites sur la réponse de cellules cultivées en mono-couches à une génération d’oxygène singulet, au moyen d’une excitation directe du dioxygène. A notre connaissance, nos travaux sont originaux dans l’étude de la réponse des sphéroïdes à un stress oxydant provoqué par la génération optique directe de l’oxygène singulet.

L’organisation tridimensionnelle des sphéroïdes affecte leurs propriétés physiques et biologiques. Plusieurs études signalent une différence de réponse des cellules à un même protocole de photo-thérapie dynamique entre sphéroïdes et cultures en mono-couches. En PDT, le taux de production d’ $^1\text{O}_2$ dans les cellules varie en fonction de l’organisation spatiale des cellules. Nous souhaitons donc estimer quantitativement la concentration cumulée d’oxygène singulet généré dans des cellules MCF-7 cultivées en mono-couches et en sphéroïdes et mesurer la mort cellulaire associée, afin de déterminer si les capacités anti-oxydantes des cellules sont liées à leur organisation spatiale.

Nous montrons que la résistance apparente des sphéroïdes observée dans la littérature peut être expliquée par la différence de taux de production d’oxygène singulet dans des cellules cultivées en sphéroïdes et en mono-couches, pour des mêmes fluences laser. Nous mettons de plus en évidence un effet de mort à longue portée dans les sphéroïdes, initié par l’oxygène singulet généré au sein du sphéroïde mais en dehors des cellules. Cela nous mène à formuler l’hypothèse de la génération, par l’oxygène singulet, d’espèces réactives secondaires toxiques dans l’espace inter-cellules.

2.1 Introduction

L'étude de la réponse cellulaire associée à la Photo-Thérapie Dynamique (PDT) a pour but d'améliorer la compréhension des mécanismes biologiques impliqués et, à terme, l'efficacité des thérapies actuelles. Nous nous focalisons sur la toxicité de l'oxygène singulet, identifié comme l'agent cytotoxique majeur en PDT.

L'expérimentation sur les êtres vivants présente de fortes contraintes de coût, de temps, et éthiques. A cela s'ajoute la grande complexité biologique associée à l'expérimentation *in vivo*. Des modèles *in vitro* plus simples et maîtrisés ont donc été développés, avec pour but de trouver un compromis entre le respect des propriétés biologiques des organismes vivants et le côté pratique de l'expérimentation *in vitro*. Dans cette thèse, nous étudions la mort de cellules cultivées *in vitro* en mono-couches et en sphéroïdes.

2.1.1 Modèles cellulaires : mono-couches et sphéroïdes

2.1.1.1 Mono-couches de cellules

Conçues à partir des années 1950^[135] des lignées de cellules cancéreuses animales et humaines, aisément cultivables et observables par microscopie optique, se sont imposées comme modèle incontournable de la recherche biologique. Ces cellules s'organisent en couche d'une cellule d'épaisseur (mono-couche) comme illustré [figure 2.1a](#). Ces lignées, au génotype connu, permettent de faire des expériences reproductibles et à grande échelle. Un arsenal d'outils d'imagerie, de marqueurs biochimiques et de protocoles standardisés ont été développés pour répondre aux interrogations de la communauté scientifique, en particulier sur la réponse des cellules à une perturbation. C'est sur ces mono-couches que notre groupe a effectué les premières études sur la mort cellulaire suite à un stress oxydant généré par photo-excitation directe du dioxygène^[3;4].

Dans le corps humain, les cellules sont intégrées dans une matrice extra-cellulaire (MEC). Les interactions mécaniques et biochimiques inter-cellules et MEC-cellules déterminent l'organisation tridimensionnelle des cellules et leur expression génétique. Les cellules cultivées *in vitro* en mono-couches, privées de ces interactions, n'ont pas les mêmes propriétés que des cellules de même lignée *in vivo*^[122]. Ainsi, les réponses cellulaires mesurées dans des mono-couches ne sont pas forcément reproduites *in vivo*. Des modèles cellulaires plus proches des tissus vivants ont pour cette raison été développés^[122].

2.1.1.2 Sphéroïdes : une géométrie simplifiée de tumeurs

In vivo des cellules deviennent tumorales lorsqu'elles accumulent un ensemble de mutations qui les rend malignes et leur permet de se soustraire aux mécanismes de régulation garants du bon fonctionnement du métabolisme^[131]. Si l'on adopte une vision très simplifiée, les tumeurs sont des structures cellulaires aberrantes, qui prolifèrent de manière anarchique. Cette prolifération anarchique crée des zones peu ou pas vascularisées, dans lesquelles les cellules souffrent de carence en dioxygène (hypoxie) et en nutriments. La diffusion des molécules thérapeutiques (dont les photo-agents en PDT) dans ces zones est un enjeu dans la lutte contre le cancer et d'autres pathologies.

La géométrie de tumeurs avasculaires peut être reproduite de manière simplifiée *in vitro* en cultivant des agrégats de cellules globalement sphériques, qualifiés de sphéroïdes. Le sphéroïde est un modèle relativement simple, reproductible, qui s'est imposé dès la fin des années 90^[122-124;132;133] comme outil majeur de la recherche thérapeutique. De nombreux travaux, rassemblés par F. Hirschhaeuser *et al.*^[134], sur des traitements photo-dynamiques, par rayonnement, par hyperthermie, et, plus récemment, sur des thérapies géniques et des immunothérapies,

étudient la réponse de sphéroïdes et les comparent à des études *in vitro* sur des mono-couches et *in vivo* sur des tumeurs.

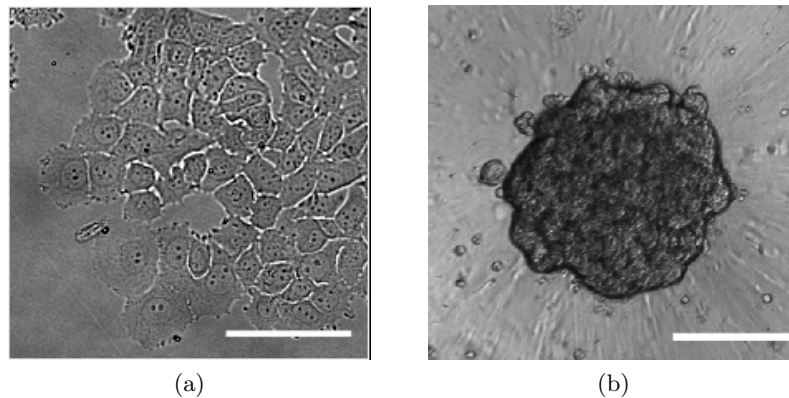


FIGURE 2.1 – **Images de cellules cancéreuses humaines du sein (lignée MCF-7).** **Figure (a)** Culture de cellules en mono-couches (2D). **Figure (b)** Agrégat de cellules MCF-7 : sphéroïde (3D). Image par transmission en lumière blanche. Barres d'échelle : $100\mu\text{m}$.

Nous cultivons des sphéroïdes MCF-7 dans du milieu de culture sans ajout de matrice extracellulaire. Les cellules de la lignée MCF-7 s'organisent spontanément en sphéroïdes lorsqu'elles ne sont pas en contact avec une surface adhérente, et sont donc adaptées à ce type de cultures. Il s'agit en outre d'une lignée largement utilisée dans la littérature, aux propriétés bien caractérisées.

La culture d'une lignée unique de cellules et l'isolement des sphéroïdes par rapport aux tumeurs *in vivo*, dont le métabolisme reflète une grande pluralité d'acteurs (vascularisation, interactions entre différents types de cellules, interaction avec le système immunitaire etc.), n'a pas pour ambition de reproduire à l'identique la réponse des cellules à un stress initié par l'oxygène singulet. Il permet néanmoins, contrairement aux mono-couches, de reproduire les hétérogénéités liées à la diffusion des espèces (dioxygène, nutriments, PS etc.) dans des structures tri-dimensionnelles.

2.1.1.3 Propriétés physico-chimiques des sphéroïdes

Les sphéroïdes partagent deux propriétés physico-chimiques fondamentales des tumeurs : la présence de gradients de concentration d'espèces chimiques dans le sphéroïde, conséquence de la diffusion des espèces, et la distribution hétérogène de la lumière dans des tissus exposés, due à l'absorption et à la diffusion de la lumière.

Diffusion des espèces chimiques. Les espèces chimiques présentes dans le milieu extracellulaire : dioxygène, nutriments, drogues, photo-agents etc., diffusent avec un coefficient qui leur est propre. L'équilibre entre la diffusion des espèces et leur consommation et/ou l'assimilation par les cellules crée des gradients de concentration. Les cellules au cœur des sphéroïdes sont exposées à des concentrations inférieures d'espèces par rapport aux cellules en périphérie. Plus un sphéroïde est gros, plus les concentrations d'espèces en son cœur sont faibles. Ainsi, lors d'un traitement, la distribution de drogues ou de photo-agents n'est pas homogène dans un sphéroïde^[17;27;136]. Dans le cas, par exemple, des photo-agents E-combretastatines dans des sphéroïdes de mélanomes^[136], dès une distance de $75\mu\text{m}$ à la surface des sphéroïdes, la concentration de photo-agents est divisée par 3 par rapport à la concentration en surface. L'efficacité du traitement a ainsi une composante spatiale. La fluence laser nécessaire pour garantir la mort

des cellules au cœur des tumeurs est supérieure à la fluence nécessaire pour tuer les cellules en surface.

Absorption et diffusion de la lumière. Les tissus vivants sont des objets diffusants^[137]. Chaque cellule est composée d'éléments allant du nanomètre (petites molécules, lipides, protéines) au micromètre (organites). La lumière traversant les cellules est ainsi partiellement absorbée et déviée lorsque la longueur d'onde est du même ordre de grandeur que les constituants de la cellule. La pénétration de la lumière, et la distribution spatiale de la fluence dans un tissu, sont des enjeux en photo-thérapie comme en imagerie. Les photo-agents utilisés en PDT sont généralement excités à 600-800nm. Les coefficients d'absorption et de diffusion de différents tissus biologiques dans le visible et le proche infra-rouge sont présentées dans la revue de S.L. Jacques^[125]. A ces longueurs d'onde, la propagation de la lumière est fortement perturbée. Un état de l'art (2016) des techniques utilisées pour contourner les contraintes de pénétration de la lumière est présenté dans la revue de S. Mallidi *et al.*^[138]. Parmi les solutions proposées, l'utilisation de fibre optiques pour guider la lumière jusqu'à la tumeur, de sources laser bi-photon afin d'augmenter la pénétration de la lumière, de sources laser pulsées plutôt que continues afin d'augmenter la fraction de cellules mortes, ou encore d'administrer la dose de lumière au patient de manière fractionnée, au moyen de plusieurs irradiations successives, afin de limiter la déplétion en dioxygène dans les tissus.

2.1.1.4 Biologie des sphéroïdes

Afin de garantir leur survie et leur prolifération, les cellules ont besoin d'accès à du dioxygène et des nutriments. Les cellules exposées à une concentration en dioxygène réduite arrêtent de proliférer. Si la concentration en dioxygène diminue en deçà d'un certain seuil, les cellules sont en anoxie et meurent. Typiquement, un cœur nécrotique apparaît dans les sphéroïdes de plus de 400-500 μm de diamètre. On peut noter également que le profil de concentration en dioxygène en fonction de la distance à la surface du sphéroïde dépend du type cellulaire^[126;128-130].

En plus des gradients d'oxygène et de nutriments, l'organisation en sphéroïde modifie la structure des cellules par rapport à la culture en mono-couches. La présence accrue de molécules d'adhésion sur les membranes des cellules, telles les E-cadhérines, intégrines, syndécanés et molécules d'adhésion des cellules épithéliales^[139], accompagnée d'une capacité accrue des cellules à migrer^[139], permet aux cellules cancéreuses d'acquérir certaines propriétés caractéristiques des tumeurs. Cette organisation tridimensionnelle altère en outre l'expression de nombreux gènes et donc du métabolisme^[140-142]. Par exemple, pour les cellules MCF-7, les taux de consommation de glucose et de dioxygène sont respectivement 5^[143] et 2^[139] fois plus élevés dans un sphéroïde que dans des mono-couches, et se rapprochent ainsi des paramètres *in vivo*. Ces différences pourraient potentiellement avoir un impact significatif sur les capacités anti-oxydantes des cellules et donc la réponse à un stress initié par $^1\text{O}_2$.

2.1.2 Traitement PDT et sphéroïdes

La différence de réponse de modèles cellulaires bi- et tri-dimensionnels à une génération indirecte de l'oxygène singulet, par photo-thérapie dynamique, est l'objet de nombreuses études^[27-31]. Ces études vont servir de points de départ pour identifier les questionnements associés à la réponse des cellules à une quantité donnée d'oxygène singulet.

2.1.3 Réponse à un traitement PDT de mono-couches et de sphéroïdes dans la littérature

Il se dégage d'études^[27-31] comparant la réponse *in vitro* de sphéroïdes et mono-couches trois conclusions principales :

- 1) la mort des cellules à un stress oxydant est fortement conditionnée (plus d'un ordre de grandeur d'écart sur les doses létales) par le type cellulaire et la nature du photo-agent utilisé.
- 2) Les sphéroïdes sont globalement plus résistants que les cellules cultivées en mono-couches. c'est-à-dire qu'à traitement équivalent (même photo-agent, même concentration de photo-agent incubée avec les cellules, même intensité laser et durée d'irradiation), la fraction de cellules mortes obtenues dans des sphéroïdes est plus faible que la fraction de cellules mortes en mono-couches.
- 3) La résistance augmente avec le diamètre du sphéroïde. Pour des cellules humaines du colon, les sphéroïdes de diamètre $D=100\ \mu\text{m}$, $250\ \mu\text{m}$ et $500\ \mu\text{m}$ sont respectivement 1.8, 2.5 et 22^[27] fois plus résistant que les mêmes cellules en mono-couches. Pour des cellules humaines du sein, les sphéroïdes de diamètre $D=95\ \mu\text{m}$ et $150\ \mu\text{m}$ sont respectivement 2 et 4^[28] fois plus résistants.

Dans les études citées, la dose est définie comme la fluence délivrée par la source de lumière. L'intensité à laquelle sont exposés les sphéroïdes est considérée spatialement homogène. Cet effet est obtenu en irradiant les sphéroïdes avec une source LED de diamètre D_L très supérieur à celui des sphéroïdes, eux-mêmes de diamètre de l'ordre de $100\text{-}500\ \mu\text{m}$. La dose létale est définie comme la fluence à laquelle 50% des cellules irradiées meurent. La mort des cellules est généralement caractérisée à l'aide d'un marquage fluorescent. Pour mesurer la fraction de cellules mortes dans un sphéroïde, le sphéroïde est entièrement dissocié (généralement 24h après irradiation) et des marqueurs fluorescents utilisés pour évaluer la viabilité de chaque cellule individuelle. Nous venons d'établir que les cellules en surface et au centre des sphéroïdes ne sont pas exposées à la même concentration en dioxygène, ou en photo-agent. Ainsi, la quantité d'oxygène singulet générée dans les cellules dépend de leur distance à la surface du sphéroïde. Il est donc difficile d'interpréter la différence de fraction de mort entre une population de cellules en mono-couches dans laquelle est générée une quantité homogène d'oxygène singulet, et une population de cellules d'un sphéroïde dissocié.

Dans le but de quantifier la production d' $^1\text{O}_2$, d'autres études ont mesuré le taux de production d'oxygène singulet *in vitro* dans des sphéroïdes^[32;34] ou des mono-couches^[19], mais n'ont pas comparé les deux modèles. Dans ces études la dose létale est définie par la concentration cumulée associée à une fraction de cellules mortes de $1/e$ (36%)^[19] ou 50%^[32;34].

Des concentrations cumulées d'oxygène singulet létales obtenues dans la littérature sont rassemblés [tableau 2.1](#). Les concentrations cumulées estimées sont comprises entre 0.3 et 10mM. T.H. Foster *et al.* ont de plus appliqué leur modèle^[32] à des études précédentes (sur d'autres lignées cellulaires et avec d'autres photo-agents) et estimé des doses létales de 0.9 et 22mM. Afin de compléter ce tableau, nous avons de plus estimé des doses létales à partir de valeurs de fluences létales de la littérature (références marquées d'une astérisque * dans la table). En première approximation, la concentration cumulée $[^1\text{O}_2]_C$ est estimée en utilisant l'équation (2.1). Les concentrations cumulées ainsi obtenues sont comprises entre 1 et 40mM, soit globalement du même ordre de grandeur.

$$[^1\text{O}_2]_C = \frac{\sigma\Phi_\Delta}{h\nu} [PS] I \Delta t \quad (2.1)$$

L'efficacité du photo-agent est caractérisé par sa section efficace σ et son rendement quantique Φ_Δ du photo-agent. $h\nu$ est l'énergie d'un photon à la longueur d'onde d'excitation. La dose de lumière (fluence) est définie par l'intensité laser I et la durée d'irradiation Δt . Enfin, dans cette équation, la concentration de PS dans les cellules, $[PS]$, est considérée égale à la concentration incubée avec les cellules et constante pendant l'irradiation. Les phénomènes de photo-blanchiment

	Cellules	$[^1\text{O}_2]_C$ 2D	$[^1\text{O}_2]_C$ 3D	PS (μM)	Φ_Δ	σ	I	Δt
[19]	MLL	1.3-1.8	-	mTHPC (0.7)	0.30-0.43	0.13	2-22	0.5-5
[32]	EMT6/Ro	-	0.3	Photofrin (8.5)	0.9	0.30	25-200	5-40
[34]	Colo 26	-	7.8 +/- 2.2	mTHPC (7.3)	0.30-0.43	0.13	5-90	1-150
[33]*	EMT6/Ro	-	40	Photofrin (8.5)	0.9	0.3	25-200	5-40
[28]*	T47D	10	20/40**	MB (10)	0.52 ^[46]	0.14 ^[43]	12	0-60
[29]*	PANC1	1.5	4	BPD (1)	~ 0.80 ^[43;45]	0.06 ^[45]	50-100	~ 5

TABLE 2.1 – **Estimation de la concentration cumulée d' $^1\text{O}_2$ létale ($[^1\text{O}_2]_C$, en mmol/L) en PDT *in vitro*.** Les cellules sont des lignées mammifères cancéreuses (MLL : prostate rat, EMT6/Ro : mammaire souris, Colo 26 : colon souris, T47D : sein humain, et PANC1 : pancréas humain). "2D" : cellules cultivées en mono-couches, "3D" : sphéroïdes, "PS" : photo-agent et concentration incubée (en μM), " σ " : section efficace du photo-agent dans de l'eau ($\times 10^{-15}$ cm^2). " Φ_Δ " : rendement quantique du photo-agent. "I" (mW/cm^2) : intensité laser. Δt (min) : durée d'irradiation. * : Estimation de la quantité d' $^1\text{O}_2$ (la concentration cumulée n'est pas évaluée dans la publication) ** : Concentration cumulée $[^1\text{O}_2]_C$ pour des petits sphéroïdes (diamètre $D=95\mu\text{m}$) et des sphéroïdes plus gros $D=150\mu\text{m}$. [29] : diamètre $D=700-1000\mu\text{m}$, [32-34] : $D=500\mu\text{m}$. Abréviations pour les photo-agents : mTHPC : meta-tetra-(hydroxyphenyl)chlorin, MB=methylene blue. BPD= benzoporphyrin derivative monoacid ring A. Les photo-agents sont irradiées à des longueurs d'ondes comprises entre 620 et 690nm.

sont donc ici négligés. La concentration de dioxygène est de plus considérée suffisante pour que $[^1\text{O}_2]_C$ ne soit uniquement déterminé par [PS]. Ces nombreuses hypothèses permettent d'avoir une estimation de l'ordre de grandeur de la concentration cumulée seuil.

Ainsi, les valeurs obtenues [tableau 2.1](#) permettent de constater que le type cellulaire et la nature du photo-agent ont un impact fort sur la dose d' $^1\text{O}_2$ létale. Aucune conclusion ne peut être tirée en comparant sphéroïdes et mono-couches de lignées cellulaires différentes. Lorsque le même protocole de PDT est appliqué sur des cellules de même lignée cultivées en mono-couches ou sphéroïdes, les doses létales estimées à partir des fluences létales données est plus élevée dans les sphéroïdes. Toutefois, cette dose létale estimée ne prend pas en compte, notamment, le gradient en dioxygène dans les sphéroïdes, à l'origine d'une production d' $^1\text{O}_2$ plus faible comparé à la production en mono-couches. Ainsi la dose d' $^1\text{O}_2$ en sphéroïdes est surestimée. Remarquons que lorsque nous comparons pour le même protocole PDT^[32;33] la dose estimée en évaluant les gradients de concentration en dioxygène et de PS dans des sphéroïdes de $500\mu\text{m}$ de diamètre ($[^1\text{O}_2]=0.3\text{mM}$) et la dose estimée à partir de la fluence létale au moyen de l'équation (2.1) ($[^1\text{O}_2]=40\text{mM}$), la différence obtenue est de deux ordres de grandeur. L'équation (2.1) n'est donc pas adaptée à une évaluation quantitative de la dose.

Enfin, *in vivo* sur des modèles murins, les concentrations cumulées létales estimées^[20;36] sont de l'ordre de 0.1-1mmol. Le nombre de paramètres qui diffèrent entre les études comparées ici est trop élevé pour conclure sur une éventuelle différence entre la réponse de cellules à une même concentration cumulée d'oxygène singulet entre les cultures *in vitro* et les tumeurs *in vivo*. Nous allons dans la suite de cette thèse utiliser les valeurs de la littérature comme point de comparaison.

2.1.4 Dose d'oxygène singulet et physico-chimie en PDT

Nous venons d'établir une première estimation des concentrations cumulées létales d' $^1\text{O}_2$ à partir d'études de la littérature, et d'illustrer les limites de l'estimation quantitative de la

dose d' $^1\text{O}_2$ à partir de la fluence et concentration en photo-agents seul dans des sphéroïdes. Résumons ici les paramètres associés à l'estimation quantitative de la dose de $^1\text{O}_2$ générée dans des sphéroïdes irradiés en PDT.

Nous avons décrit dans le chapitre précédent les interactions entre PS, dioxygène, oxygène singulet et substrat biologique qui déterminent le taux de production d' $^1\text{O}_2$. Retenons que la concentration cumulée $[^1\text{O}_2]_C$ dépend de l'intensité laser I , de la concentration de photo-agents [PS] et de la concentration de dioxygène dissous $[^3\text{O}_2]$. Dans les sphéroïdes, ces trois paramètres ont une dépendance spatiale. Les propriétés d'absorption et de diffusion de la lumière affectent la distribution de l'intensité laser I , et un gradient de $[^3\text{O}_2]$ et de [PS] s'établit entre la surface et le cœur des sphéroïdes. A ces considérations s'ajoute la dégradation des PS suite aux processus de photo-blanchiment. Ainsi, l'information sur la concentration moyenne de PS avec laquelle sont incubés les sphéroïdes et la fluence $F=I_0 \times \Delta t$, avec I_0 l'intensité en sortie du laser et Δt la durée de l'irradiation, ne suffisent pas à estimer le taux de production d'oxygène singulet.

Le gradient de concentration de dioxygène dans le sphéroïde est couplé avec des questions associées à la déplétion en dioxygène pendant la génération de $^1\text{O}_2$ par photo-production. De nombreuses études sur des tumeurs *in vivo*^[144–146] et des sphéroïdes *in vitro*^[33;147;148] montrent que pour une fluence donnée, réduire l'intensité laser et augmenter le temps d'irradiation permet d'augmenter la fraction de cellules mortes et donc l'efficacité du traitement. Cette différence est attribuée principalement à la déplétion en dioxygène à proximité des PS. Cette information nous montre la limite de l'utilisation de la concentration cumulée $[^1\text{O}_2]_C$ comme seul critère de définition de la dose : la réponse des cellules est également fonction du taux de production d' $^1\text{O}_2$.

Au vu de ces résultats, il semble conseillé de travailler avec des intensités d'irradiation faibles et de prolonger la durée des expériences. Toutefois, une expérience de M.S. Mathews *et al.*^[147] montre les limites de ce raisonnement. En effet, sur des sphéroïde de cellules humaines tumorales du cerveau, un seuil minimal d'intensité létal $I_{min}=0.3 \mu\text{W}/\text{cm}^2$ est établi. Pour $I=I_{min}$ de la mort cellulaire est constatée pour une irradiation de 12h. Pour $I < I_{min}$, quelque soit la durée d'irradiation, aucune mort cellulaire due à la génération d'oxygène singulet ne sera observée. Le taux de production d'oxygène singulet pour $I=I_{min}$ est de l'ordre de 0.1 nM/s, soit une production proche de la production basale d'autres ERO ($\text{NO}\cdot$, O_2^- , H_2O_2 ...) par les cellules^[149–151], comprise entre 0.1 et 100 nM/s en fonction du type cellulaire et de l'ERO considérée. Il est donc possible que le métabolisme redox des cellules soit, pour de tels taux de production, en mesure d'empêcher l'accumulation d' $^1\text{O}_2$ jusqu'à des concentrations toxiques.

En résumé, afin d'interpréter la mort cellulaire observée dans des sphéroïdes, il est nécessaire de différencier les effets liés aux propriétés physiques de la lumière (diffusion et absorption), à la diffusion des espèces chimiques (dioxygène et photo-agents), et les effets biologiques liés au métabolisme et aux capacités antioxydantes des cellules.

2.1.5 Photo-excitation directe du dioxygène et dose d' $^1\text{O}_2$ dans un sphéroïde

L'excitation directe de l'oxygène autours de 1270nm permet de générer de l'oxygène singulet sans l'intermédiaire de photo-agents. L'absence de photo-agents permet de s'affranchir des incertitudes dues à l'assimilation de PS par les cellules, aux concentrations locales de PS à échelle d'une cellule, à la diffusion des PS dans des sphéroïdes, et au photo-blanchiment des PS. Il est ainsi plus simple d'estimer le taux de production d'oxygène singulet.

Rappelons l'équation associée à la concentration cumulée d'oxygène singulet générée $[^1\text{O}_2]_C$

(équation (1.12) dans le chapitre d'introduction).

$$[{}^1O_2]_C = \frac{\sigma_{1270nm}}{h\nu} \int_{t=0}^{t_f} I[{}^3O_2] dt$$

La concentration de dioxygène dissous dans les cellules $[{}^3O_2]$, et l'intensité laser I ont une dépendance spatiale, comme décrit dans la section précédente. Nous devons estimer les gradients de dioxygène et d'intensité laser, afin comparer la réponse de cellules en sphéroïdes et en mono-couches à une dose équivalente de 1O_2 .

Les profils spatiaux attendus associés aux paramètres I et $[{}^3O_2]$ sont schématisés [figure 2.2](#). Une première approximation du gradient en dioxygène dans les sphéroïdes est estimée avec le modèle mathématique développé par D.R. Grimes *et al.*^[126]. Ce modèle propose une solution analytique à l'équation de réaction-diffusion dans un sphéroïde sphérique de diamètre D . La concentration est mesurée à distance z à la surface du sphéroïde. Lorsque $z=D$, la totalité du sphéroïde a été traversée.

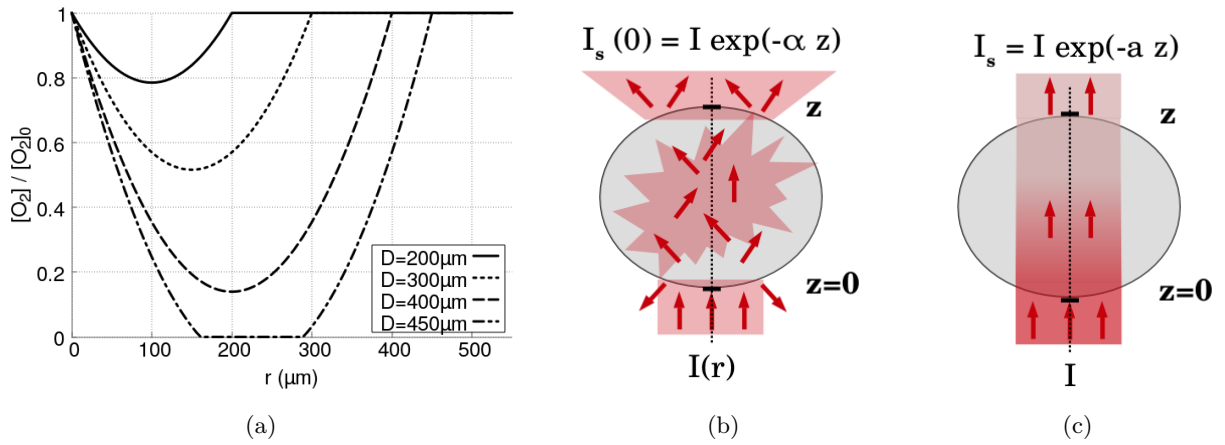


FIGURE 2.2 – Schémas illustrant la distribution spatiale de la concentration de dioxygène dissous $[{}^3O_2]$ et de l'intensité laser I dans un sphéroïde. Ces paramètres déterminent la concentration d' 1O_2 généré par irradiation laser. **Figure (a)** Simulation de la concentration de dioxygène $[{}^3O_2]$ en fonction de la distance z à la surface du sphéroïde, et du diamètre D du sphéroïde (modèle développé par D.R. Grimes *et al.*^[126], avec un taux de consommation en dioxygène des cellules de $25 \mu m/s$). $[{}^3O_2]_0$: concentration de dioxygène en surface du sphéroïde. **Figure (b)** Schéma illustrant la diffusion de la lumière par un sphéroïde. Les photons sont déviés au contact des cellules. En sortie du sphéroïde, le faisceau n'est plus nécessairement Gaussien. L'intensité I_s au niveau de l'axe du laser dépend de l'épaisseur z du sphéroïde et du coefficient de diffusion de la lumière α (en mm^{-1}) associé au type cellulaire. **Figure (c)** Schéma illustrant l'absorption de la lumière par un sphéroïde. L'intensité initiale laser I est réduite lors de la traversée d'un sphéroïde d'épaisseur z . La proportion d'intensité absorbée dépend du coefficient d'absorption a (en mm^{-1}).

Résumons les objectifs de ce chapitre. Nous souhaitons comparer la réponse de mono-couches et sphéroïdes à une même dose de 1O_2 , et comparer les doses seuil mesurées avec les valeurs de la littérature. Pour ce faire, nous devons estimer le taux de production d'oxygène singulet dans des sphéroïdes. Nous allons dans un premier temps mesurer expérimentalement un coefficient de diffusion de la lumière à 1270nm et simuler mathématiquement la propagation de la lumière dans un sphéroïde. Dans un second temps, nous simulons la consommation en dioxygène des cellules MCF-7, la diffusion du dioxygène dans les sphéroïdes et la déplétion associée à l'irradiation

laser. Ainsi, nous pourrions associer un taux de production $\Gamma(r,z)$ d'oxygène singulet à chaque point des sphéroïdes et mesurer la mort cellulaire associée.

2.2 Protocoles et méthodes

Cette section décrit les protocoles et dispositifs utilisés dans le cadre de notre étude, et les méthodes associées à la simulation de la propagation de la lumière et à l'estimation des gradients en dioxygène dans les sphéroïdes.

2.2.1 Dispositif expérimental

Le dispositif d'irradiation doit assurer plusieurs fonctions : l'irradiation laser des cellules, le maintien des cellules à température et dans une atmosphère adaptée, et l'imagerie des cellules pendant l'irradiation et jusqu'à 48h après irradiation. Le montage expérimental est schématisé [figure 2.3](#).

L'irradiation à 1273nm est assurée par un laser Raman^[5] à fibre accordable autour de 1270nm, permettant de délivrer des puissances de l'ordre d'une centaine de mW au niveau des cellules. Le faisceau laser gaussien traverse un objectif de microscope 20X (Nikon, ON=0.4) avec un rayon à $1/e^2$ (waist) $\omega=40\ \mu\text{m}$. L'objectif 20X sert également pour l'imagerie des cellules. Les images des cellules sont prises par une caméra (Hamamatsu C11440-22CU) pendant et après l'irradiation laser, de manière automatisée. Les images par transmission en lumière blanche permettent d'obtenir l'aspect général du tapis de cellules ou des sphéroïdes. Les images par fluorescence permettent de mesurer le signal fluorescent renvoyé par le marqueur de mort cellulaire CellTox GreenTM (Promega), dont le fonctionnement est présenté plus en détail par la suite.

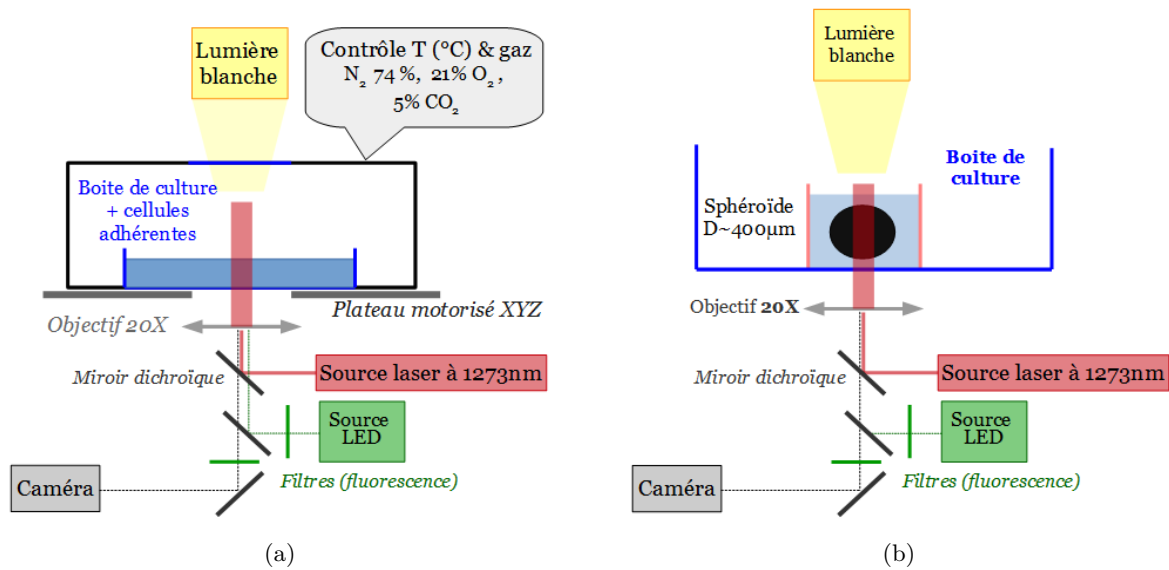


FIGURE 2.3 – Montage expérimental pour l’irradiation et le suivi de la réponse cellulaire à $^1\text{O}_2$. Des cellules MCF-7 (cellules humaines cancéreuses du sein) sont cultivées en mono-couches (2D) et en sphéroïdes (3D), et irradiées avec un laser 1270nm. La mort cellulaire est caractérisée par le marqueur CellTox Green (Ex/Em : 480nm/530nm). **Figure (a)** La boîte de culture est intégrée à un incubateur qui maintient les cellules à 37°C dans une atmosphère contrôlée (21% O_2 , 5% de CO_2 et 74% de N_2) afin de suivre les cellules irradiées par imagerie (en lumière directe et par fluorescence) sur plusieurs jours. L’incubateur est lui-même placé sur un plateau de microscope XYZ automatisé, qui permet d’irradier et d’imager de multiples champs de cellules sur une même boîte de culture. **Figure (b)** Les sphéroïdes sont irradiés dans une boîte de culture divisée en compartiments avec des inserts en silicone. Chaque compartiment de ($1 \times L \times h$) $7\text{mm} \times 4\text{mm} \times 5\text{mm}$, et $100\ \mu\text{L}$, contient un sphéroïde.

2.2.1.1 Irradiation de mono-couches

La culture des cellules en mono-couches est dans du milieu DMEM (‘Dulbecco’s Modified Eagle Medium’ avec 4.5g/L de glucose) supplémenté de 10% de sérum fœtal de veau, 1% de glutamine et 0.5% d’antibiotiques (pénicilline/streptomycine). Tous les composants sont achetés chez Lonza. Le milieu de culture est remplacé tous les 2-3 jours et les cellules passées avec une solution de Trypsine-EDTA (0.25%) lorsqu’elles atteignent une confluence de 70-80% (détails en [annexe A](#)).

2-4 jours avant l’irradiation laser, les cellules MCF-7 sontensemencées dans des boîtes de culture (format P35), afin d’avoir une confluence moyenne de 40 à 60% au moment de l’irradiation. Les zones irradiées sont des tapis continus de cellules. Le milieu de culture est remplacé environ 1h avant l’irradiation par du milieu neuf auquel est ajouté 1X de fluorophore CellToxTM Green. Les molécules CellToxTM Green ne peuvent pas traverser la membrane cellulaire et ne fluorescent donc pas au contact de cellules vivantes. Lorsque l’intégrité de la membrane cellulaire est compromise, phénomène caractéristique de la mort cellulaire, CellToxTM Green pénètre dans la cellule, se fixe sur les molécules d’ADN, et émet un signal fluorescent (maximum d’excitation/émission : 480nm/530nm).

Les cellules cultivées en mono-couches sont irradiées dans un incubateur portable placé sur le microscope, et suivies par imagerie pendant plusieurs jours. Cet incubateur permet de contrôler la température et l’atmosphère dans la boîte de culture afin de maintenir les cellules

dans des conditions physiologiques. Les cellules sont irradiées à température ambiante afin de limiter l'élévation de la température due à l'absorption à 1270nm. La température de la boîte de culture est augmentée à 37 °C après la fin de l'irradiation. Les cellules sont imagées pendant l'irradiation, et toutes les 20 minutes pendant 24 à 60h. Nous mesurons ainsi la cinétique des processus de mort.

Un plateau motorisé permet d'irradier et d'imager plusieurs champs de cellules de manière automatisée. Le plateau permet également de maintenir les cellules dans le plan focal de l'objectif du microscope et d'éviter une dérive de l'image. L'interfaçage entre le plateau, le laser et la caméra est fait au moyen du logiciel LabView.

2.2.1.2 Irradiation de sphéroïdes

Afin d'obtenir des sphéroïdes, 1000 à 8000 cellules (+/- 10%) sont ensemencées dans des plaques 384 puits à très faible adhésion (Corning, "ULA plates"). Ces cellules s'agrègent en sphéroïdes individuels (1 puits = 1 sphéroïde). Les sphéroïdes sont cultivés 6 à 12 jours avant irradiation. Les sphéroïdes irradiés font 150 à 450 μm de diamètre, afin d'être suffisamment gros pour être manipulés et suffisamment petits pour ne pas avoir de cœur nécrotique. Des informations supplémentaires sur le protocole de culture, la croissance des sphéroïdes et leur caractérisation, sont données [annexe A](#). Le milieu de culture des sphéroïdes (identique à celui des cellules cultivées en mono-couches) est remplacé environ 1h avant l'irradiation par du milieu neuf contenant 1X du fluorophore CellTox Green.

Les sphéroïdes sont transférés avant l'irradiation dans des boîtes de culture de format P35 à fond non-adhérent (Sarstedt 94.6077.333). Le fond non-adhérent est une membrane "Lumox" de 50 μm d'épaisseur, perméable aux gaz. La boîte de culture est divisée en compartiments individuels (jusqu'à 12) à l'aide d'inserts en silicone (Ibidi). Chaque compartiment de 7mm \times 4mm \times 5mm (l \times L \times h) et 100 μL de volume accueille un unique sphéroïde. Trois compartiments sont dédiés à des sphéroïdes non-irradiés qui servent de contrôles. Les sphéroïdes sont irradiés, comme les mono-couches, à température ambiante. Les sphéroïdes ne sont pas (hormis pour quelques expériences longues de cinétique de mort) irradiés dans l'incubateur placé sur le microscope. Le faible volume de milieu de culture dans les inserts et l'évolution de la position des sphéroïdes (les sphéroïdes sortent du champ de la caméra) ne se prêtent pas à un suivi sous microscope de longue durée. Après l'irradiation, les sphéroïdes sont par conséquent placés dans un incubateur et ressortis toutes les 24h pendant 72h pour prendre des images en contraste de phase et de fluorescence afin de mesurer la mort cellulaire.

2.2.1.3 Laser et paramètres d'irradiation

Contrairement aux études citées jusqu'à présent, le faisceau laser utilisé pour exciter le dioxygène est à profil gaussien. Dans la littérature, il est plus courant d'exposer les cellules à une source laser à profil d'intensité spatialement homogène^[28;29] et donc de multiplier les irradiations pour exposer les cellules à des concentrations différentes de $^1\text{O}_2$, et déterminer le lien entre dose et réponse cellulaire. Un faisceau laser gaussien permet d'exposer une même population de cellules à différentes concentrations d' $^1\text{O}_2$. Plus les cellules sont éloignées de l'axe du faisceau, plus le taux de production d' $^1\text{O}_2$ est faible ([figure 2.4](#)). Dans la mesure où l'intensité maximale du faisceau est suffisante pour générer une dose létale de $^1\text{O}_2$ au niveau de l'axe du laser, une unique expérience suffit pour estimer le taux de production d' $^1\text{O}_2$ minimal pour provoquer de la mort cellulaire.

Nous irradiions des sphéroïdes de diamètre $D=150$ à $450 \mu\text{m}$. Un faisceau de waist $\omega = 40 \mu\text{m}$ est choisi pour l'irradiation, afin d'avoir $\omega < D/2$ et de ne tuer que les cellules proches de l'axe du laser (et non pas toutes les cellules en surface des sphéroïdes). Plus ω est petit, plus, à

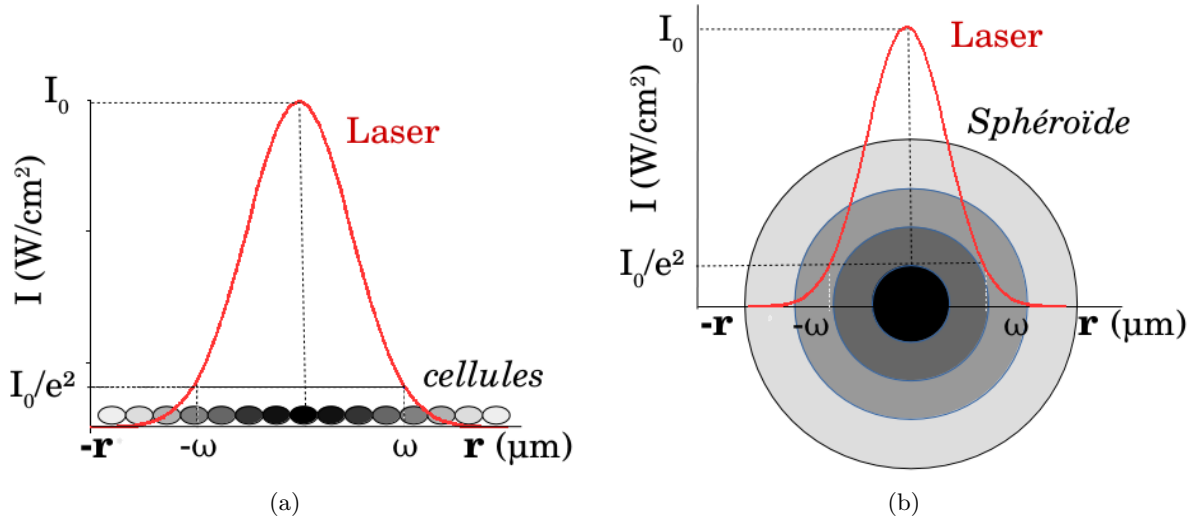


FIGURE 2.4 – **Schéma de l'irradiation avec un faisceau gaussien.** Schéma de l'intensité laser (en niveaux de gris, noir = intensité maximale), et donc du taux de production d' $^1\text{O}_2$ dans des cellules cultivées en **figure (a)** monocouches (2D) et **figure (b)** sphéroïdes, en fonction de leur distance à l'axe du faisceau laser.

puissance laser P égale, l'intensité I au niveau de l'axe du laser sera importante (équation (2.2)). Le waist $\omega(z)$ traduit la divergence du faisceau à distance z du plan de focalisation du laser.

$$I(r, z) = 2 \frac{P}{\pi \omega(z)^2} e^{-2 \frac{r^2}{\omega(z)^2}} \quad (2.2)$$

Le faisceau laser peut être considéré parallèle sur l'épaisseur du sphéroïde : pour $\omega = 40 \mu\text{m}$, la longueur de Rayleigh est de $z_R = 4 \text{mm}$, soit environ 10x le diamètre des sphéroïdes. L'intensité $I(r, z)$ laser (en W/cm^2) ne dépend donc que de la distance r des cellules à l'axe du faisceau (équation (2.3)).

$$I(r) = 2 \frac{P}{\pi \omega^2} e^{-2 \frac{r^2}{\omega^2}} \quad (2.3)$$

Les cellules sont irradiées avec une puissance de l'ordre de $P = 100 \text{mW}$ soit $I(0) = 4 \text{kW}/\text{cm}^2$. Ceci correspond à un taux de production d'oxygène singulet de l'ordre de $\Gamma = 100 \text{mM}/\text{s}$ au niveau de l'axe du laser. Γ est multipliée par $1/e^2 (= 0.135)$ à une distance de $r = \omega$ de l'axe. La durée d'irradiation des cellules varie de 5 à 60 minutes en fonction des expériences.

Nous avons vu précédemment que la propagation de la lumière et la diffusion des espèces dans les sphéroïdes affectent le taux de production d'oxygène singulet. Nous allons donc chercher à caractériser ces effets dans un sphéroïde.

2.2.2 Interaction de la lumière à 1270nm avec des sphéroïdes

Nous souhaitons simuler la propagation de la lumière dans les sphéroïdes afin d'estimer l'intensité laser en chaque point du sphéroïde. Pour ce faire, il est nécessaire de déterminer les paramètres caractéristiques associés à l'absorption et la diffusion de la lumière pour des cellules MCF-7 à 1270nm.

L'absorption de la lumière crée de plus une augmentation locale de la température. Des expériences contrôlées permettent de confirmer que la mort cellulaire observée n'est pas la conséquence d'un stress thermique.

2.2.2.1 Absorption

Quatre^[125;137] composants conditionnent les propriétés d'absorption de la lumière des cellules : l'eau ($\sim 70\%$ du volume total), la mélanine, les lipides et l'hémoglobine (oxygénée et non-oxygénée). Pour une longueur d'onde $\lambda=1270\text{nm}$, l'eau a un coefficient d'absorption de $\alpha_A = 1 \text{ cm}^{-1}$ ^[125;137;152], légèrement plus élevé que celui des graisses, et plus élevé d'un facteur >10 que les autres composants. L'absorption d'un sphéroïde est donc assimilé à celle d'un volume d'eau équivalent. Soient $P(z)$ (en W) et $I(z)$ (en W/cm^2) respectivement la puissance et l'intensité laser mesurée après la traversée d'un sphéroïde d'épaisseur z . Leur évolution est décrite par l'équation (2.4).

$$\frac{P(z)}{P(0)} = \frac{I(z)}{I(0)} = e^{-\alpha_A z} \quad (2.4)$$

Pour $\alpha_A = 1.0 \text{ cm}^{-1}$, à travers un sphéroïde de $z=500 \mu\text{m}$, $\frac{I(z)}{I(0)}=0.95$. L'absorption crée ainsi un gradient d'intensité laser de moins de 5% . L'effet sur l'intensité est minime. L'absorption à 1270nm crée toutefois une augmentation locale de la température. Intéressons nous aux effets de cette augmentation avant de mesurer la diffusion de la lumière.

2.2.2.2 Effets thermiques

A 1270nm , l'eau des cellules est le composant le plus absorbant. Cette absorption se traduit par une augmentation locale de la température, proportionnelle à la puissance et au diamètre du faisceau laser. Au delà de 40°C ^[153], la température provoque un stress thermique pour les cellules qui peut être létal. Afin de limiter le stress produit, les cellules sont irradiées à température ambiante ($20\text{-}25^\circ\text{C}$). Nous n'avons pas mesuré directement l'élévation locale de la température liée à l'irradiation, nous nous sommes contentés d'évaluer la mort cellulaire associée à un stress thermique équivalent.

La cytotoxicité d'un éventuel stress thermique est évaluée en irradiant les cellules à 1241nm . Le coefficient d'absorption de l'eau (et des autres composants de la cellule^[137]) est très proche de celui à 1270nm (figure 2.5a). Le stress thermique engendré est donc comparable. Des résultats obtenus par notre groupe avant le début de cette thèse ont permis d'établir que le taux de production d' $^1\text{O}_2$ à 1241nm est divisé par 10 à 20 : A. Sivery *et al.*^[1], ont mesuré l'efficacité de la transition $^3\text{O}_2 \rightarrow ^1\text{O}_2$ à différentes longueurs d'ondes autour de 1270nm , dans différents solvants. La figure 2.5b reproduit le spectre d'absorption mesuré (normalisé) de la transition dans de l'éthanol, et superpose à ce spectre la fraction de cellules mortes mesurée pour des paramètres d'irradiation donnés (faisceau gaussien de diamètre 0.5mm et d'intensité maximale $I_0= 100 \text{ W}/\text{cm}^2$, durée d'exposition de 3h), dans une zone de $200 \mu\text{m}$ de rayon autour de l'axe du laser. Ainsi, on voit que la fraction de cellules mortes est cohérente avec l'efficacité de la transition $^3\text{O}_2 \rightarrow ^1\text{O}_2$.

Lors d'études antérieures à cette thèse, avec la même source laser et la même lignée de cellules^[3;4], la température a été expérimentalement mesurée et les résultats comparés avec des simulations mathématiques des profils thermiques. Le maintien des cellules à température ambiante (21°C) pendant l'irradiation laser permet de garantir que l'élévation locale de la température ne provoque pas de mort ou d'altération de la morphologie des cellules.

Dans cette thèse, des expériences d'irradiation contrôlée à 1241nm permettent de confirmer que la mort cellulaire mesurée à 1270nm dans les conditions d'irradiation testées est due à l'oxygène singulet. De la mort liée au stress thermique est observée dans les sphéroïdes pour une irradiation de durée $\Delta t > 30\text{min}$ avec une puissance laser $P=300\text{mW}$ et des faisceaux laser

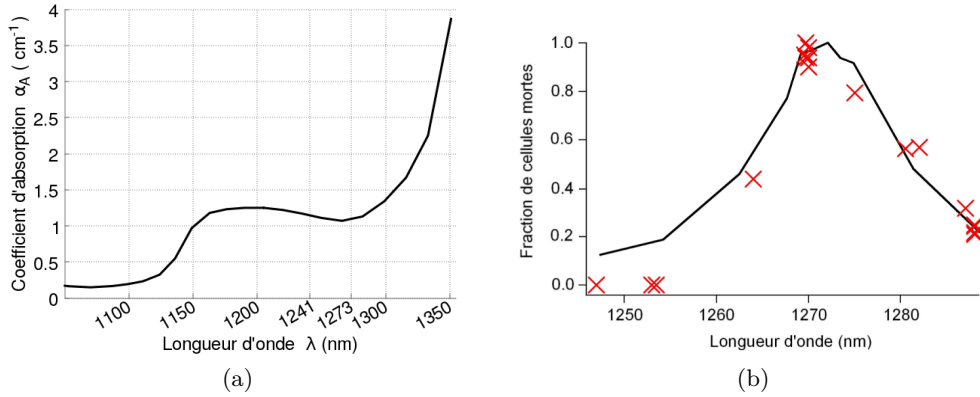


FIGURE 2.5 – **Spectre d’absorption de l’eau et transition ${}^3\text{O}_2 \rightarrow {}^1\text{O}_2$ à 1270nm.** **Figure (a)** Spectre d’absorption de l’eau dans le proche infrarouge. Les coefficients d’absorption α_A à 1241 et 1270nm sont très proches (1.15 et 1.1 cm^{-1} respectivement). Graphé tracé avec les données expérimentales obtenues par K.F. Palmer et D. Williams^[152]. **Figure (b)** En rouge la fraction expérimentale de cellules mortes dans une zone $r \sim 200 \mu\text{m}$ centrée sur l’axe du faisceau laser, pour une irradiation de 3h à intensité $I_{\text{moy}} \sim 25 \text{ W/cm}^2$, 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 de l’éthanol. Plus la valeur est élevée, plus la production d’oxygène singulet est importante. Ces courbes ont été obtenues dans des travaux antérieurs publiés par notre groupe^[3].

de 0.5mm et 0.08mm de diamètre (intensités maximales $I_0=300 \text{ W/cm}^2$ et 11 kW/cm^2 respectivement). Pour $P=150\text{mW}$ (Δt jusqu’à 1h30), nous ne mesurons pas de mort inhabituelle. Les sphéroïdes seront irradiés dans ce chapitre à $P=100\text{mW}$ et $\Delta t \leq 1\text{h}$.

En mono-couches, nous ne mettons jamais en évidence de stress thermique létal dans les conditions testées (paramètres maximaux : $P=300\text{mW}$ et $\Delta t=3\text{h}$). Cette disparité est potentiellement due au volume de milieu réduit dans lequel sont irradiés les sphéroïdes (inserts individuels de $100 \mu\text{L}$, à comparer à 3mL de milieu dans une boîte de culture), et donc à l’augmentation plus importante de la température lors de l’irradiation. Nous ne sommes toutefois pas en mesure d’exclure l’existence d’une synergie^[154–157] entre un stress thermique non létal et le stress oxydant, qui amplifierait potentiellement l’effet du stress oxydant.

2.2.2.3 Mesure expérimentale du coefficient de diffusion

Nous venons de voir que l’absorption a un effet faible sur la distribution de l’intensité laser dans les sphéroïde, et qu’elle n’est pas à l’origine d’effets thermiques cytotoxiques pour les paramètres d’irradiation testés. Afin de simuler la propagation de la lumière à 1270nm dans un sphéroïde, nous mesurons dans un premier temps un coefficient de diffusion.

Les cellules sont irradiées avec un faisceau gaussien qui peut être considéré collimaté (longueur de Rayleigh $z_R = 4\text{mm}$, 10 fois supérieure au diamètre des sphéroïdes). Le faisceau en sortie d’un sphéroïde est un faisceau laser divergent. Le degré de cette divergence est déterminé par le coefficient de diffusion α_D (en mm^{-1}). Soit $P(z)$ la puissance laser en sortie d’un sphéroïde d’épaisseur z . L’équation (2.5) décrit la relation entre $P(z)$, z et α_D .

$$P(z) = P(0) \exp(-\alpha_D z) \quad (2.5)$$

Pour obtenir une valeur de α_D , nous mesurons la puissance $P(z)$ du faisceau laser en sortie d’un sphéroïde d’épaisseur z et calculons le ratio $P(z)/P(0)$. Les sphéroïdes sont placés dans les mêmes conditions que pour une expérience d’irradiation. P_0 est mesurée en absence de

sphéroïde (traversée de la boîte de culture et des 100 μL de milieu). $\frac{P(z)}{P(0)}$ est minimale lorsque le faisceau laser est centré sur le sphéroïde et traverse ainsi la partie la plus épaisse du sphéroïde. La position du sphéroïde est ajustée en temps réel pour localiser ce minima. Cette étape, qui dure environ 20s, est également utilisée dans le cadre des expériences d'irradiation pour centrer précisément le sphéroïde sur le faisceau laser.

L'équation (2.5) est exacte dans la mesure où le détecteur de puissance ne détecte que la puissance émise à un angle 0 avec le faisceau laser incident. Nous détectons avec un angle de collecte de $2\theta=17^\circ$ (figure 2.6), contraint par la taille du détecteur et la distance entre le détecteur et le sphéroïde. Expérimentalement, nous mesurons $\alpha_D(2\theta) \sim 24 \text{ cm}^{-1}$ (figure 2.6c).

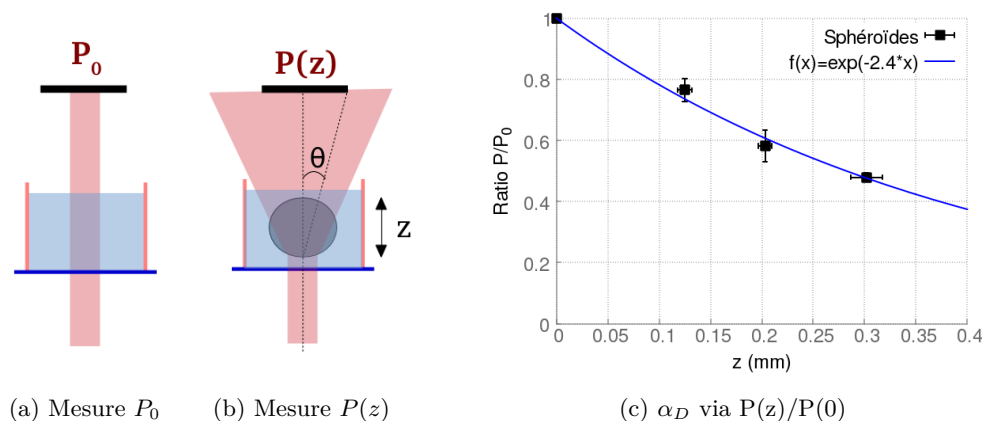


FIGURE 2.6 – Mesure expérimentale du coefficient de diffusion α_D (cm^{-1}) par des sphéroïdes. Figures (a,b) Schémas expérimentaux de la mesure de $\frac{P(z)}{P(0)}$, afin de calculer le coefficient de diffusion α_D des sphéroïdes. Figure (c) α_D déduit des mesures obtenues ($n=5$ sphéroïdes par point de mesure). Au vu de l'angle de collecte de notre détecteur de puissance ($2\theta=17^\circ$), α_D est sous-estimé d'un facteur 2.

Les fonctions de phase de Henyey-Greenstein^[158;159] permettent d'obtenir une distribution de probabilités des nouvelles directions que peut adopter un photon après avoir interagi avec une particule diffusante. Ces fonctions permettent d'évaluer à quel point nous sous-estimons α_D avec un angle de collecte de $2\theta=17^\circ$ (figure 2.6b). Pour ce faire, nous avons besoin de connaître le coefficient d'anisotropie g de la diffusion dans nos sphéroïdes. Pour $g=0$, la diffusion est isotrope. Plus g est proche de 1, moins la déviation des photons par rapport à leur direction d'origine est importante. Nous n'avons pas mesuré g , et l'estimons à 0.9 au vu des valeurs obtenues dans la littérature^[125;160;161] pour différents tissus mammaires humains. Pour $g=0.9$, avec un angle de collecte de 17° nous sous-estimons α_D d'environ un facteur 2.

En conclusion, nous mesurons un coefficient de diffusion $\alpha_D \sim 48 \text{ cm}^{-1}$. Ce coefficient est très supérieur au coefficient d'absorption $\alpha_A = 1 \text{ cm}^{-1}$: l'absorption a un effet négligeable sur la distribution de l'intensité laser, comparé à la diffusion.

Comparons la valeur obtenue de α_D aux valeurs de la littérature. Les tissus biologiques sont caractérisés dans la littérature (valeurs rassemblées par Jacques *et al.*^[160]) par leur coefficient de diffusion réduit μ_D' (équation (2.6)). Nous obtenons donc expérimentalement $\mu_D' = 4.8 \text{ cm}^{-1}$ à $\lambda=1270\text{nm}$ pour $g=0.9$.

$$\mu_D' = (1 - g)\alpha_D \quad (2.6)$$

Le coefficient de diffusion réduit est fonction de la longueur d'onde, et décroît entre le

visible et le proche infra-rouge. Pour des tissus mammaires cancéreux^[137;160], $\mu_D' \sim 4-14 \text{ cm}^{-1}$ à $\lambda=900 \text{ nm}$ et $2-10 \text{ cm}^{-1}$ à $\lambda=1000 \text{ nm}$. La valeur obtenue de 4.8 cm^{-1} à 1270 nm est en bon accord avec les valeurs de la littérature.

2.2.2.4 Simulation de la propagation de la lumière

La propagation de la lumière à 1270 nm dans des sphéroïdes est caractérisée par les coefficients d'absorption $\alpha_A \sim 1 \text{ cm}^{-1}$, de diffusion $\alpha_D \sim 48 \text{ cm}^{-1}$, et l'anisotropie $g=0.9$. A partir de ces paramètres, nous pouvons simuler la propagation de la lumière par une méthode Monte-Carlo^[125;162]. Les résultats de simulation restent robuste à de faibles variations de g (0.85-0.95).

Simulation numérique par méthode Monte-Carlo. Il s'agit de transformer un problème de diffusion de la lumière en problème balistique. Une distribution gaussienne de photons (en nombre suffisant pour garantir la convergence du modèle) est tirée vers le sphéroïde avec une direction parallèle à l'axe du laser. A chaque itération, les photons parcourent une distance de 100 nm (soit $1/10$ de la longueur d'onde). Une fraction de photons, déterminé par le coefficient d'absorption α_A , est absorbée. Une autre fraction, déterminé par le coefficient de diffusion α_D est diffusée. La nouvelle direction de propagation est calculée à partir de la fonction de phase de Henyey-Greenstein^[158;163]. Cette fonction, dans laquelle est injectée un angle θ aléatoire, détermine la nouvelle direction de chaque photon dévié. L'anisotropie g conditionne la distribution de probabilités de l'angle de déviation par rapport à la trajectoire initiale. Au bout d'un nombre suffisant d'itérations pour que la simulation converge, nous obtenons une distribution spatiale de l'intensité laser dans le sphéroïde.

Modèle géométrique des sphéroïdes. La simulation requiert de définir un modèle géométrique de sphéroïdes. Nous mesurons sur les images de phase des sphéroïdes les dimensions (grand axe, petit axe, hauteur) des sphéroïdes. La géométrie mesurée s'accorde avec un modèle d'ellipsoïde symétrique (équation (2.7)), pour un ratio $z \sim 0.6 \times D$ avec z l'épaisseur du sphéroïde et D son diamètre. Le détail de ces mesures est présenté dans l'annexe A.3.6.

$$\frac{x^2 + y^2}{R^2} + \frac{z^2}{z_s^2} = 1 \quad (2.7)$$

Simulation de la distribution de l'intensité laser. Nous obtenons par simulation un profil $I(r,z)$ d'intensité laser dans les sphéroïdes. $I(r,z)$ est estimé pour différentes valeurs de α_D ($0, 35, 48, 70$ et 100 cm^{-1}) afin d'évaluer l'impact d'une erreur éventuelle sur la mesure de α_D . La figure 2.7 illustre l'impact de la diffusion et l'absorption de la lumière sur la distribution spatiale de l'intensité laser, sur deux surfaces du sphéroïde. La surface dite "d'entrée" du faisceau est la première en contact avec le laser, et la surface où le faisceau est le moins déformé. La surface dite "de sortie" est diamétralement opposée à la première : le laser a traversé la totalité du sphéroïde. Les sections que nous qualifierons de "surface" du sphéroïde sont les deux sections transversales à $20 \mu\text{m}$ des sommets du sphéroïde, afin d'inclure une couche pleine de cellules.

Les valeurs (normalisées) de l'intensité I présentées ont été obtenues pour $\alpha_D=70 \text{ cm}^{-1}$, soit une surestimation par rapport au α_D expérimental. Les courbes en pointillés sur la figure 2.7 représentent le seuil de toxicité (intensité I_S) pour une irradiation de durée $\Delta t=30 \text{ min}$ en mono-couches (2D) (expériences présentées dans la partie résultat). Si l'on compare l'intensité sur la surface d'entrée du sphéroïde pour un coefficient de diffusion $\alpha_D=0$ et $\alpha_D=70 \text{ cm}^{-1}$ les intensités sont très similaires (différence de moins de 5%). Sur la surface de sortie, on a une réduction significative de l'intensité laser. Pour un sphéroïde d'épaisseur $400 \mu\text{m}$, l'intensité est ainsi divisée par 3 avec un faisceau qui conserve un profil globalement gaussien.

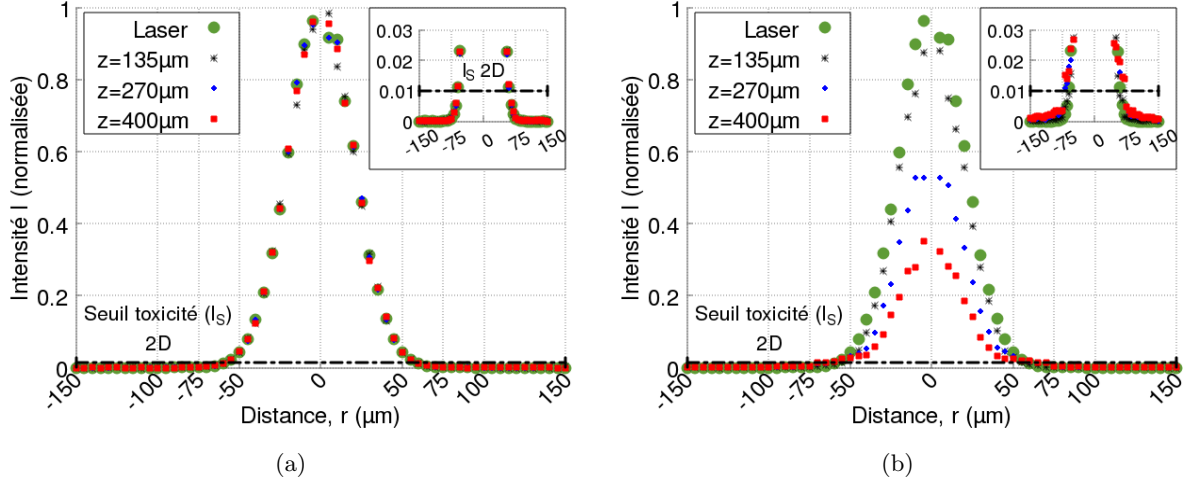


FIGURE 2.7 – Profils d'intensité $I(r,z)$ obtenus par simulation de la propagation du faisceau laser à 1270nm lors de la traversée d'un sphéroïde. Profil au niveau **figure (a)** de la surface d'impact et **figure (b)** de la surface de sortie de sphéroïdes d'épaisseur z variable. Coefficient de diffusion $\alpha = 70 \text{ cm}^{-1}$ (surestimation). La ligne en pointillés délimite l'intensité seuil (I_S) de toxicité associée à une irradiation de mono-couches de durée $\Delta t = 30 \text{ min}$. Dans les coins supérieurs droit, le profil d'intensité pour les intensités proches du seuil est présentée. Pour $r > 60 \mu\text{m}$, $I < I_S$.

2.2.3 Dépendance spatiale du taux de production de $^1\text{O}_2$

A chaque cellule des sphéroïdes, nous pouvons désormais associer une intensité laser $I(r,z)$. Afin d'évaluer le taux de production d'oxygène singulet, nous devons également estimer le profil de concentration de dioxygène dissous $[^3\text{O}_2](r,z)$.

En l'absence de cellules, la concentration en dioxygène vaut $[^3\text{O}_2]_0 = 0.25 \text{ mM}$ dans de l'eau à 25°C pour une atmosphère constituée à 21% d'oxygène [62]. Les cellules vivantes cultivées en mono-couches consomment du dioxygène, à hauteur de 5 à $50 \times 10^{-6} \text{ pmol.cellules}^{-1}\text{s}^{-1}$ [63;64], en fonction du type cellulaire. Les cellules MCF-7 ont un taux de consommation q_c de $30 \times 10^{-6} \text{ pmol.cellules}^{-1}\text{s}^{-1}$, soit $q_c = 20 \mu\text{M s}^{-1}$. En sphéroïdes, le taux de consommation en dioxygène de cellules MCF-7 est deux fois plus élevé [139] qu'en mono-couches, soit $q_c = 40 \mu\text{M s}^{-1}$. La densité cellulaire des sphéroïdes (évaluée dans l'annexe A.3.6) est d'environ 0.6. Nous estimons ainsi q_c à $25 \mu\text{M s}^{-1}$ dans les sphéroïdes.

La photo-production d'oxygène singulet consomme également du dioxygène. L'évolution des concentrations de dioxygène $^3\text{O}_2$ et de l'oxygène singulet $^1\text{O}_2$ sont décrite par les équations (2.8) et (2.9), avec D_{O_2} (en cm^2/s) le coefficient de diffusion du dioxygène (et de l'oxygène singulet) dans les sphéroïdes, q_c (en M/s) la consommation en dioxygène dans les sphéroïdes, et $\gamma[^3\text{O}_2]$ (en M/s^{-1}) le taux de production d'oxygène singulet.

$$\frac{d[^3\text{O}_2]}{dt} = D_{\text{O}_2} \nabla^2 [^3\text{O}_2] - q_c + K[^1\text{O}_2] - \gamma[^3\text{O}_2] \quad (2.8)$$

$$\frac{d[^1\text{O}_2]}{dt} = D_{\text{O}_2} \nabla^2 [^1\text{O}_2] - K[^1\text{O}_2] - K_{ox}[^1\text{O}_2] + \gamma[^3\text{O}_2] \quad (2.9)$$

Le coefficient K (en s^{-1}) traduit la désexcitation de l'oxygène singulet par réaction avec le solvant (eau). $K = \ln(2)/\tau_{^1\text{O}_2}$ avec $\tau_{^1\text{O}_2} = 3.5 \mu\text{s}$ la demi-vie de l'oxygène singulet dans de l'eau pure. L'oxygène singulet retrouve suite à cette réaction son état fondamental $^3\text{O}_2$. Le coefficient K_{ox} caractérise les réactions de $^1\text{O}_2$ dans le milieu de culture ou dans la cellule qui ne sont pas

source de $^3\text{O}_2$. Lorsque $K_{ox}=0$, tout l'oxygène singlet généré se désexcite. La concentration en dioxygène dans le sphéroïde est donc identique à celle d'un sphéroïde non irradié. Lorsque $K_{ox} \gg K=1.98 \times 10^5 \text{ s}^{-1}$, tout l'oxygène singlet produit réagit avec les substrats biologiques. La déplétion en dioxygène est alors maximale.

Nous simulons donc numériquement la concentration en dioxygène en faisant varier deux paramètres : le coefficient de réaction K_{ox} et le coefficient de diffusion D_{O_2} dans les cellules (figure 2.8). Le modèle géométrique des sphéroïdes et des informations supplémentaires sur les simulations sont données annexe C.2. Plus D_{O_2} est faible et K_{ox} grand, plus la déplétion en dioxygène est importante et la différence de concentration entre la surface et le centre du sphéroïde marquée.

Dans de l'eau pure ou le milieu de culture, le coefficient de diffusion du dioxygène vaut $D_{O_2}=2 \times 10^{-5} \text{ cm}^2\text{s}^{-1}$. Dans les cellules, le coefficient est réduit et est compris entre 2 et $4 \times 10^{-6} \text{ cm}^2/\text{s}$ [24]. La densité cellulaire des sphéroïdes (évaluée dans l'annexe A.3.6) est d'environ 0.6. Le coefficient de diffusion du dioxygène moyen dans les sphéroïdes est donc a priori compris entre 2×10^{-6} et $2 \times 10^{-5} \text{ cm}^2\text{s}^{-1}$. Différentes valeurs de D_{O_2} sont mesurées ou estimées dans la littérature. G.E. Kapellos *et al.*[37] ont fait un état de l'art (2007) des coefficients obtenus dans des tissus de mammifères, compris majoritairement entre 0.6 et $1.0 \times 10^{-5} \text{ cm}^2\text{s}^{-1}$. Dans des sphéroïdes de 0.5mm de cellules murines (EMT6/Ro), T.H. Foster *et al.*[32] ont mesuré $D_{O_2}=1.46 \times 10^{-5} \text{ cm}^2\text{s}^{-1}$.

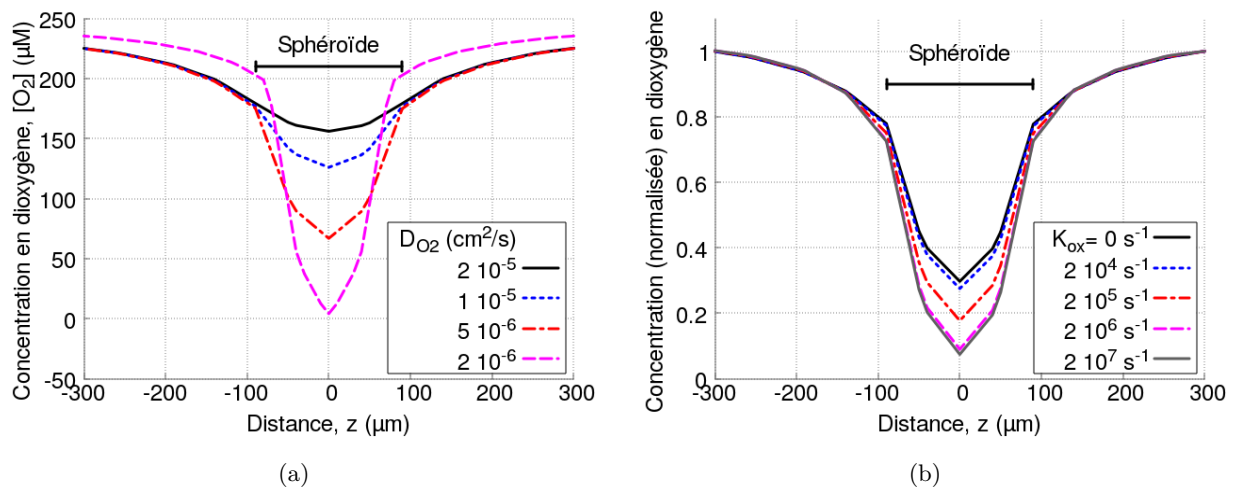


FIGURE 2.8 – **Simulation numérique de la concentration en dioxygène dans des sphéroïdes** en fonction des paramètres D_{O_2} (coefficient de diffusion du dioxygène, en cm^2/s) et K_{ox} (coefficient de réaction de $^1\text{O}_2$, en s^{-1}). Les profils sont tracés dans un repère cylindrique en fonction de l'épaisseur z du sphéroïde (centre du sphéroïde en $z=0$) pour $r=0$ (axe du laser). **Figure (a)** Impact de D_{O_2} pour un sphéroïde de diamètre $D=300 \mu\text{m}$ et un coefficient de réaction $K_{ox}=0$. **Figure (b)** Impact de K_{ox} pour un sphéroïde de diamètre $D=300 \mu\text{m}$ et $D_{O_2}=5 \times 10^{-6} \text{ cm}^2\text{s}^{-1}$. K_{ox} est ici considéré nul à l'extérieur du sphéroïde. Concentration normalisée, 1 correspond à 0.25mM .

A partir de la concentration en dioxygène $[^3\text{O}_2](r,z)$, et de l'intensité laser $I(r,z)$, nous estimons le taux de production d' $^1\text{O}_2$, et la concentration cumulée d'oxygène singlet générée suite à l'irradiation laser en tout point des sphéroïdes.

2.2.4 Mesure de la mort cellulaire

Nous souhaitons déterminer des seuils de toxicité de $^1\text{O}_2$ en mono-couches et en sphéroïdes. Nous pouvons estimer le taux de production d'oxygène singulet dans les cellules. Nous devons désormais définir une mesure de la mort cellulaire.

Le marqueur fluorescent CellTox GreenTM (maximum d'excitation/émission : 480nm/530nm), agent intercalant de l'ADN, permet d'identifier les cellules mortes. Il ne pénètre pas la membrane des cellule, et ne peut donc se fixer sur l'ADN des cellules que si leur membrane est compromise, symptôme de mort cellulaire. Nous observons expérimentalement un signal fluorescent sur les images de cellules prises après irradiation.

2.2.4.1 Mort cellulaire en mono-couches

En mono-couches (images [figure 2.9](#)), les cellules dans l'axe du faisceau laser meurent les premières, et la mort s'étend de manière symétrique dans les quelques heures qui suivent l'irradiation. Les cellules mortes forment ainsi une "zone de mort" centrée sur l'axe du faisceau laser. La zone de mort est ainsi le disque centré sur l'axe du laser contenant le maximum de cellules mortes sans inclure de cellules vivantes. En absence d'irradiation, 2.3% des cellules meurent en 30h. Cette fraction de mort est dite fraction de mort "basale". En dehors de la zone de mort, la fraction de cellules mortes est similaire à la fraction de mort basale.

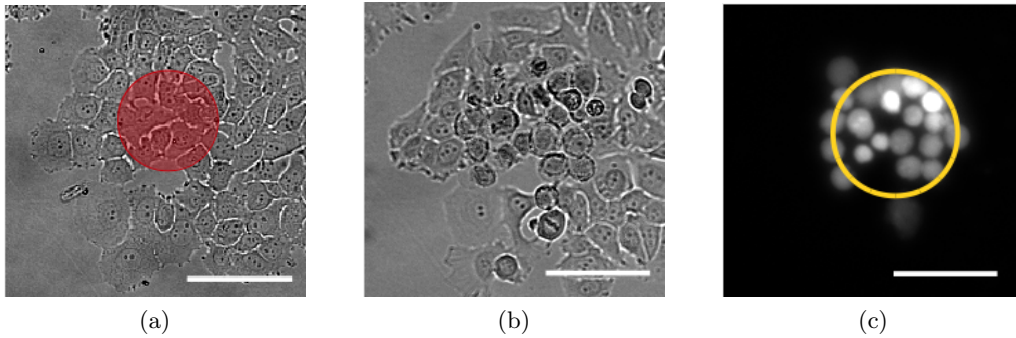


FIGURE 2.9 – **Images de cellules MCF-7 en mono-couches.** **Figure (a)** Mono-couche avant irradiation. Cercle rouge : faisceau laser de waist $\omega=40\ \mu\text{m}$. **Figures (b,c)** Mono-couche 24h après irradiation. **Figures (a,b)** Images par transmission en lumière blanche. **Figure (c)** Image de fluorescence, fluorescence des cellules mortes (marqueur CellTox Green). Cercle jaune : zone de cellules mortes de diamètre D_m . Barre d'échelle = $100\ \mu\text{m}$.

Le diamètre de la zone de mort diamètre D_m est mesuré à partir de la position des cellules au début de l'irradiation laser. L'intensité I laser à la coordonnée $r_m=D_m/2$ est qualifiée d'intensité seuil I_S ([équation \(2.10\)](#)). Il s'agit de l'intensité minimale nécessaire pour tuer des cellules lors d'une irradiation de durée Δt . F_S ([équation \(2.11\)](#)), est la fluence 2D requise pour générer un stress oxydant létal.

$$I_S \text{ (W/cm}^2\text{)} = 2 \frac{P}{\pi\omega^2} e^{-2(\frac{D_m/2}{\omega})^2} \quad (2.10)$$

$$F_S \text{ (J/cm}^2\text{)} = I_S \Delta t \quad (2.11)$$

Avec P (=100mW) la puissance laser et ω (=40 μm) le rayon à $1/e^2$ du faisceau laser.

Le taux seuil de production d' $^1\text{O}_2$, Γ_S est déduit de I_S et de la concentration locale en

dioxygène (équation (2.12)).

$$\Gamma_S(\text{mol/L/s}) = \frac{\sigma_{1270nm}}{h\nu} [^3O_2] I_S \quad (2.12)$$

avec $\frac{\sigma_{1270nm}}{h\nu} = 10^{-8} \text{ m}^2/\text{J}$. En mono-couches, la concentration en dioxygène dans les cellules est comprise entre 0.2 et 0.24mM en fonction de la distance au laser (simulé numériquement, annexe C.2).

2.2.4.2 Mort cellulaire en sphéroïdes

Des images par contraste de phase et de fluorescence sont prises avant et après l'irradiation laser (figure 2.10). Les images de fluorescence obtenues ne permettent pas de distinguer les cellules individuelles. Dans l'optique d'associer aux cellules mortes une quantité d' 1O_2 , nous mesurons donc un profil d'intensité de fluorescence en fonction de la distance à l'axe du laser. L'axe du laser coïncide avec le centre du sphéroïde.

Profils d'intensité de fluorescence. Nous obtenons à partir des images de fluorescence des sphéroïdes des profils d'intensité de fluorescence $I_f(r)$, définis sur une demi-droite r d'extrémité l'axe du faisceau laser ($r=0$). En moyennant plusieurs profils d'intensité $I_f(r)$ pour un même sphéroïde, nous obtenons un profil d'intensité moyen du sphéroïde. Les profils d'intensité moyens de plusieurs sphéroïdes irradiés dans des conditions identiques sont moyennés à leur tour afin d'obtenir un profil d'intensité moyen global (figure 2.11). Les mêmes mesures sont effectuées sur des sphéroïdes non irradiés afin de mesurer le niveau de fluorescence associé à la mort basale.

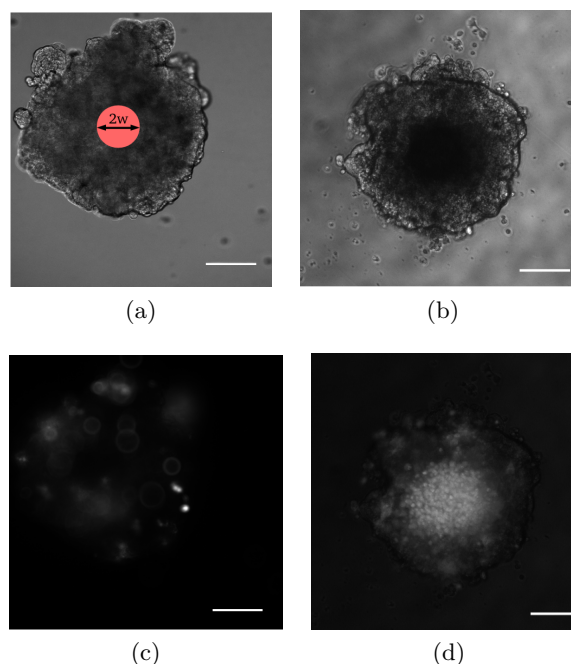


FIGURE 2.10 – **Images de sphéroïdes avant et après irradiation.** (a,c) Sphéroïde avant irradiation. **Figure (a)** En rouge : faisceau laser de waist ω . **Figures (b,d)** Sphéroïdes 48h après irradiation. **Figures (a,b)** Images en contraste de phase. **Figures (c,d)** Images de fluorescence, fluorescence des cellules mortes (marqueur CellTox Green). Barre d'échelle = 100 μm .

Définition d'une zone de mort. La totalité du sphéroïde renvoie un signal de fluorescence. Ce signal est maximal au niveau de l'axe du laser. Nous définissons arbitrairement la zone de

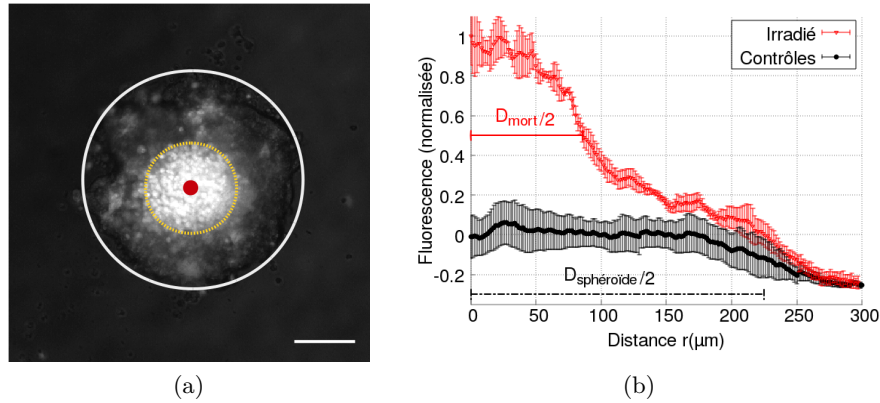


FIGURE 2.11 – **Sphéroïde irradié et profil d’intensité de fluorescence.** **Figure (a)** Images superposées de fluorescence et de lumière blanche d’un sphéroïde 48h après irradiation. Vue de face. Cercle blanc : cercle de diamètre $D=450\ \mu\text{m}$ qui délimite le sphéroïde. Disque rouge : position de l’axe du laser. Le cercle en pointillés délimite la zone où où l’intensité de fluorescence mesurée est supérieure à 50% de l’intensité maximale. Barre d’échelle = $100\ \mu\text{m}$. **Figure (b)** Profil de fluorescence du sphéroïde irradié (en rouge, intensité maximale fixée à 1) et profil moyen de $n=5$ sphéroïdes contrôles (en noir) non irradiés. Barres d’erreur : écarts-types.

cellules mortes comme la zone pour laquelle l’intensité de fluorescence (normalisée au maximum et ajustée pour que l’intensité des sphéroïdes contrôles vaille 0) vaut au moins 50% de l’intensité maximale mesurée.

Le profil d’intensité en fluorescence ne permet pas d’estimer la fraction de cellules mortes en fonction de la distance à l’axe du laser. Dans le but d’y parvenir, nous avons augmenté la résolution d’imagerie en sphéroïdes en prenant des images de sections de sphéroïdes au microscope confocal (TCS STED Leica). L’objectif de microscope utilisé (Leica x20 HCPLAn APO NA=0.7, WD=0.64mm) permet d’avoir une résolution en z (épaisseur du plan de section) de l’ordre de $2\ \mu\text{m}$. Des images de section sont prises tous les $5\ \mu\text{m}$. Les images obtenues permettront de différencier la mort des cellules en surface et en profondeur des sphéroïdes.

Protocole pour l’imagerie confocale. Les sphéroïdes irradiés sont incubés 2h avant imagerie avec le marqueur fluorescent Hoechst 33258, qui se fixe sur toutes les cellules, vivantes et mortes. Les images de fluorescence Hoechst donnent ainsi une image globale du sphéroïde. Les images de fluorescence CellTox Green permettent de ne visualiser que les cellules mortes. Les fluorophores sont excités avec un laser continu (Coherent, Chameleon tunable) à respectivement 800nm (Hoechst) et 920nm (Green). L’excitation est en mode biphoton^[164]. L’émission est mesurée à $420\text{-}500\text{nm}$ (Hoechst) et $530\text{-}630\text{nm}$ (Green). L’excitation biphoton permet une meilleure résolution spatiale et une plus grande pénétration dans le sphéroïde (les tissus absorbent moins le rouge et le proche infra-rouge que le reste du visible). Néanmoins, nous ne parvenons pas à obtenir une intensité de signal suffisante au delà de $60\ \mu\text{m}$ de la surface du sphéroïde. Cette profondeur reste suffisante pour différencier les cellules mortes en surface et à l’intérieur du sphéroïde. Des images sont présentées dans la section Résultats.

2.2.4.3 Cinétique de la mort cellulaire

Nous avons pas justifié jusqu’à présent la date de mesure de la mort (en heures après le début de l’irradiation laser). Le diamètre de la zone de mort est suivi sur plusieurs jours afin d’évaluer la cinétique de la mort cellulaire (figure 2.12). En mono-couches, le diamètre de la zone de mort évolue peu ($<5\%$) après 24h, la mort est définie 24h après irradiation. En sphéroïdes, la

cinétique est plus lente. Le diamètre de mort (qui caractérise la zone où l'intensité du signal de fluorescence supérieure à 50% de l'intensité maximale) évolue de manière significative jusqu'à 48h après irradiation, quelque-soit la durée d'irradiation. La fluorescence sur la totalité du sphéroïde suit une cinétique similaire à celle du diamètre du mort.

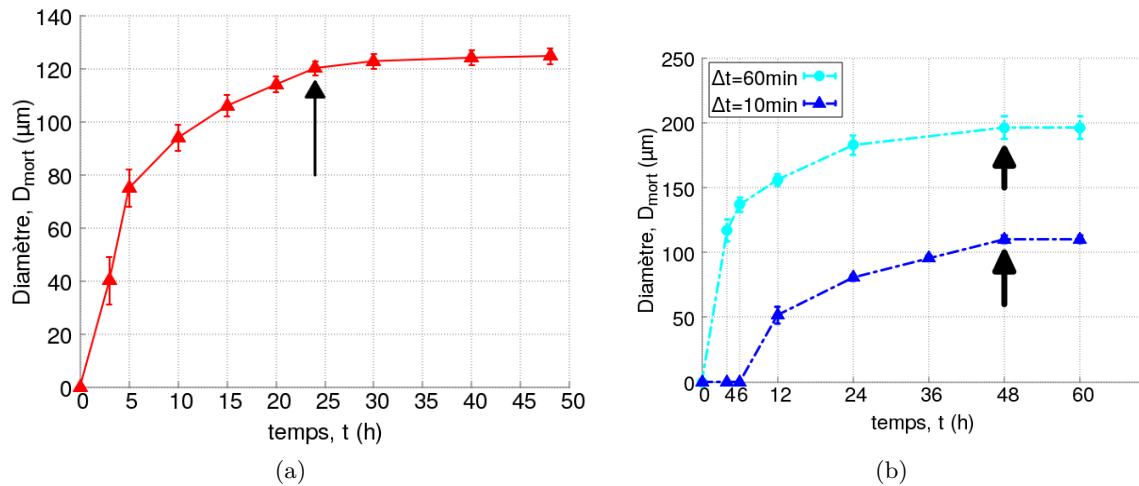


FIGURE 2.12 – **Cinétique de mort des cellules irradiées.** **Figure (a)** Suivi temporel en mono-couches du diamètre D_{mort} de la zone de cellules mortes de 0 à 48h après irradiation. Nous considérons que la zone maximale est atteinte 24h après irradiation (flèche). Nous définissons donc $D_{mort} = D_{mort}(24h)$. **Figure (b)** Suivi du diamètre D_{mort} de la zone de mort de sphéroïdes irradiés. La zone de cellules mort n'évolue presque plus 48h après irradiation. La mort des sphéroïdes est donc mesurée 48h après irradiation.

2.2.5 Mesure de la viabilité

Les images de sphéroïdes obtenues mettent en évidence de la mort cellulaire sur la totalité du sphéroïde. Elles ne permettent toutefois pas de déduire la fraction de cellules mortes à partir du profil de fluorescence mesuré. Nous souhaitons notamment différencier la fraction de cellules mortes à proximité de l'axe du laser, et la fraction de cellules mortes en périphérie du sphéroïde. Pour ce faire, nous utilisons un test de viabilité qui dissocie le sphéroïde et mesure la fraction de cellules vivantes. Nous en déduisons ainsi la fraction de cellules mortes.

2.2.5.1 Mesure de la viabilité cellulaire

CellTiter Glo 3D (Promega), dit "Glo" est un test de viabilité. Ce test est composé d'un agent lytique, qui détruit les membranes cellulaires. Au contact de Glo, un sphéroïde est entièrement désagrégé. L'enzyme luciférase contenue dans Glo se fixe aux molécules d'ATP (Adénosine Tri-Phosphate) contenues dans les cellules, et émet un signal luminescent. Ce signal est mesuré dans un lecteur de plaque (Omega). L'ATP n'est présent que dans les cellules au métabolisme actif. Le signal luminescent est proportionnel au nombre de molécules d'ATP et donc de cellules vivantes. En comparant le nombre de cellules vivantes dans une population de sphéroïdes irradiés et une population de sphéroïdes contrôles de même diamètre, on peut déduire la fraction de cellules mortes suite au stress oxydant dans l'échantillon irradié.

Contrairement au marqueur de mort CellTox Green, Glo détruit toutes les cellules de l'échantillon. Toute information spatiale est donc perdue. Toutefois, le fait de désagréger un sphéroïde, et donc de ne pas être soumis aux contraintes de diffusion et d'imagerie associée aux structures

tri-dimensionnelles, est ici un avantage. Glo est également utilisé pour caractériser la prolifération des cellules cultivées en mono-couches et en sphéroïdes (détails en [annexe A.3](#)).

2.2.5.2 Fractions de cellules vivantes dans un sphéroïde irradié

La fraction de cellules vivantes dans les sphéroïdes est obtenue en calculant le ratio de luminescence entre des sphéroïdes irradiés et non-irradiés de même volume V . V est mesuré juste avant le début de l'irradiation laser.

A partir des images de fluorescence, et notamment les images de profil des sphéroïdes irradiés ([figure 2.13a](#)), nous pouvons graphiquement estimer le volume V_C de la zone centrale de mort, définie comme la zone où l'intensité de fluorescence est supérieure à 50% de son maximum. Un sphéroïde irradié est schématisé [figure 2.13b](#). Soit $z \in [-h/2, h/2]$ le segment de l'axe du faisceau laser inclus dans le sphéroïde, et $D_1(z)$ le diamètre de la zone centrale de mort mesuré à la coordonnée z . V_C est calculé à partir de $D_1(z)$ ([équation \(2.13\)](#)).

$$V_C = \int_{-h/2}^{h/2} \pi(D_1(z)/2)^2 dz \quad (2.13)$$

$$V = V_C + V_P \quad (2.14)$$

Le volume V total du sphéroïde est la somme de la zone centrale de mort V_C et du volume "périphérique" V_P restant ([équation \(2.14\)](#)). Glo permet de mesurer la fraction de cellules vivantes totale f . Nous souhaitons estimer la fraction f_C de cellules vivantes dans le volume V_C (a priori proche de 0) et la fraction f_P dans le volume V_P (inconnue). L'[équation \(2.15\)](#) relie ces cinq paramètres.

$$f = V_C f_C + V_P f_P \quad (2.15)$$

Dans l'hypothèse où $f_C=0$ (hypothèse vérifiée expérimentalement dans la section Résultats), c'est-à-dire où la totalité des cellules sont mortes dans la zone centrale de mort, l'[équation \(2.15\)](#) peut donc s'écrire sous la forme [équation \(2.16\)](#). On peut ainsi déduire la fraction f_P de cellules vivantes dans la zone périphérique du sphéroïde ([équation \(2.17\)](#)) à partir de la fraction f de cellules vivantes totale.

$$f = V_P f_P \quad (2.16)$$

$$f_P = \frac{f}{V - V_C} \quad (2.17)$$

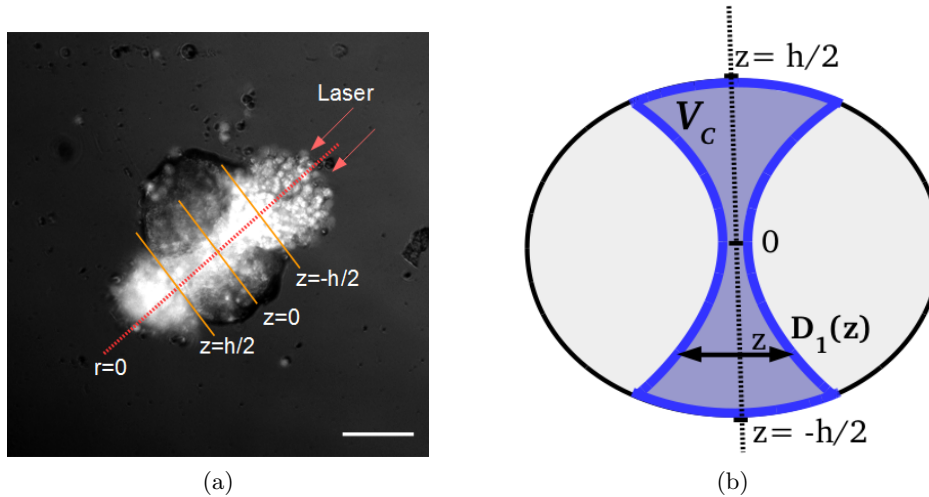


FIGURE 2.13 – **Zones de cellules mortes dans un sphéroïde.** **Figure (a)** Image (de phase et de fluorescence superposées) d'un sphéroïde irradié vu de côté. Le faisceau laser d'axe $r=0$ est centré sur le sphéroïde d'épaisseur h . **Figure (b)** Schéma d'un sphéroïde irradié et de la zone "centrale" de mort, de volume V_C . V_C est obtenu en intégrant sur z la surface associée au diamètre $D_1(z)$ sur $[-h/2; h/2]$. Le reste du sphéroïde est appelé zone périphérique.

2.3 Résultats

Dans cette section nous définissons et mesurons les zones de mort cellulaire qui apparaissent suite à la génération d' 1O_2 par excitation directe de l'oxygène singulet à 1270nm, pour des cellules cultivées en mono-couches et en sphéroïdes. Nous mettons en évidence dans les sphéroïdes de la mort de cellules exposées à des quantités d' 1O_2 beaucoup plus faibles (plus de trois ordres de grandeur) que dans les mono-couches, et cherchons à expliquer cette différence. Nous remarquons une disparition de cette différence entre mono-couches et sphéroïdes lorsque nous réduisons la contribution à la mort de l'oxygène singulet généré à l'extérieur des cellules, en ajoutant un désactivateur extra-cellulaire d'oxygène singulet au milieu de culture avant l'irradiation.

2.3.1 Existence de deux zones de mort dans sphéroïdes irradiés

Les cellules mortes dans les sphéroïdes sont marquées par fluorescence. Des profils d'intensité en fluorescence caractérisent la mort dans les sphéroïdes. Deux zones de mort sont définies : la zone de mort centrale, dans laquelle l'intensité de fluorescence est supérieure ou égale à 50% de l'intensité de fluorescence maximale, mesurée au niveau de l'axe du laser, et la zone de mort périphérique, qui correspond au reste du sphéroïde.

Nous souhaitons déterminer la fraction de cellules mortes dans chacune de ces zones et la concentration cumulée d'oxygène singulet associée à la mort.

2.3.1.1 Profils de fluorescence

L'imagerie par fluorescence associée au microscope ne permet pas de distinguer les cellules individuelles et de mesurer directement une fraction de cellules mortes. Nous mesurons sur les images de sphéroïdes (figures 2.14a et 2.14b) de rayon $R_{sphéroïde}$ un profil d'intensité de fluorescence en fonction de la distance r à l'axe du laser. L'axe du laser coïncide avec le centre du sphéroïde.

Le profil de fluorescence dépend des conditions d'irradiation (figure 2.14c). Nous irradiions à puissance constante ($P=100\text{mW}$) et faisons varier la durée d'irradiation Δt . Lorsque Δt augmente, l'intensité de fluorescence augmente. Dans des sphéroïdes d'environ $400\ \mu\text{m}$ de diamètre, pour $\Delta t=60\text{min}$, l'intensité de fluorescence est supérieure à l'intensité associée à la mort basale ($I=0$) sur la totalité des sphéroïdes.

L'intensité de fluorescence est maximale au niveau de l'axe du laser ($r=0$). Nous définissons un rayon de mort, R_{mort} , associé à une intensité de fluorescence $I(R_{mort})=0.5\times I(0)$. La zone des sphéroïdes telle que $r\leq R_{mort}$ est qualifiée de zone "centrale" de cellules mortes. La zone restante, telle que $R_{mort} < r \leq R_{spheroïde}$ est qualifiée de zone "périphérique".

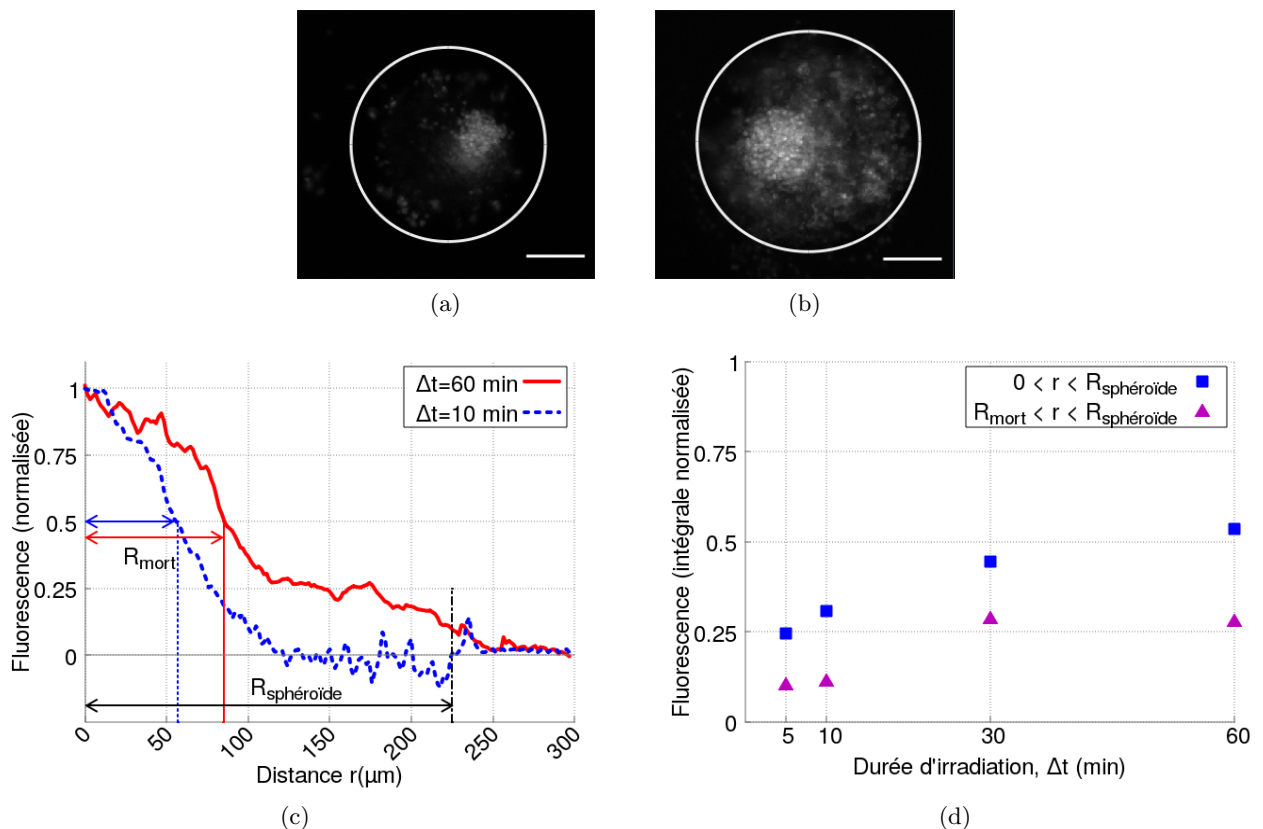


FIGURE 2.14 – **Sphéroïdes : deux zones de mort.** **Figures (a),(b)** Images de fluorescence de deux sphéroïdes (délimités par les cercles blancs) irradiées respectivement 10 et 60 minutes. Barre d'échelle : $100\ \mu\text{m}$. **Figure (c)** Intensité de fluorescence normalisée au maximum, en fonction de la distance à l'axe du laser (centré sur le sphéroïde). Profil d'intensités moyens à partir des images de $n=4$ sphéroïdes de rayon $R_{spheroïde}=200-225\ \mu\text{m}$. Le rayon R_{mort} définit la zone de mort "centrale" dans laquelle $I(r)>0.5\times I(0)$. $R_{mort} < r < R_{spheroïde}$, délimite une zone de mort "périphérique". **Figure (d)** Intégrale normalisée de l'intensité de fluorescence sur $0 < r < R_{spheroïde}$ (totalité du sphéroïde) et $R_{mort} < r < R_{spheroïde}$ (zone de mort périphérique), en fonction de la durée d'irradiation Δt . Pour $\Delta t \geq 30\text{min}$, la fluorescence est importante dans la zone de mort périphérique.

Le calcul de l'intégrale de l'intensité de fluorescence, sur la totalité du sphéroïde ($0 < r < R_{spheroïde}$) et dans la zone de mort périphérique ($R_{mort} < r < R_{spheroïde}$), permet d'évaluer l'évolution de la mort cellulaire en fonction de la durée d'irradiation (figure 2.14d). Les deux intégrales augmentent de manière importante avec la durée d'irradiation. L'intégrale dans la zone de mort périphérique atteint 25% pour les durées longues. Nous nous attendons donc à ce que la fraction

de cellules mortes dans la zone périphérique pour les sphéroïdes irradiés soit bien supérieure à la mort basale.

Nous souhaitons dans un premier temps obtenir une vision en volume de la mort cellulaire, afin de vérifier que la mort n'a pas uniquement lieu en surface, et ensuite mesurer la fraction de cellules mortes associées aux deux zones de mort des sphéroïdes.

2.3.1.2 Mort en volume

L'imagerie confocale avec une excitation biphoton permet d'avoir une meilleure résolution spatiale et en volume. Les cellules des sphéroïdes sont marquées avec le fluorophore Hoechst, qui se fixe sur toutes les cellules (vivantes et mortes) afin de visualiser le sphéroïde dans son ensemble. La pénétration de la lumière reste toutefois limitée dans le sphéroïde. Nous obtenons une qualité d'image satisfaisante jusqu'à 60 μm sous la surface des sphéroïdes.

Des images de sections superposées de sphéroïdes ([figure 2.15](#)) permettent de confirmer l'existence d'une zone "centrale" de cellules mortes, qui semble constituée d'un tapis continu de cellules mortes, et d'une zone périphérique, dans laquelle seule une fraction de cellules fluorescent. L'absence de zone centrale de mort est évidente dans les sphéroïdes contrôles non-irradiés. La mort n'est pas uniquement en surface : dans les images de différentes sections ([figure 2.16](#)) espacées de 15 μm , on constate la présence de cellules mortes à plusieurs dizaines de micromètres de la surface des sphéroïdes.

Nous souhaitons quantifier la fraction de cellules mortes dans le sphéroïde, et différencier la fraction de cellules mortes dans la zone centrale de cellules mortes (dans laquelle la totalité des cellules semblent mortes au vu du signal de fluorescence), et la zone périphérique.

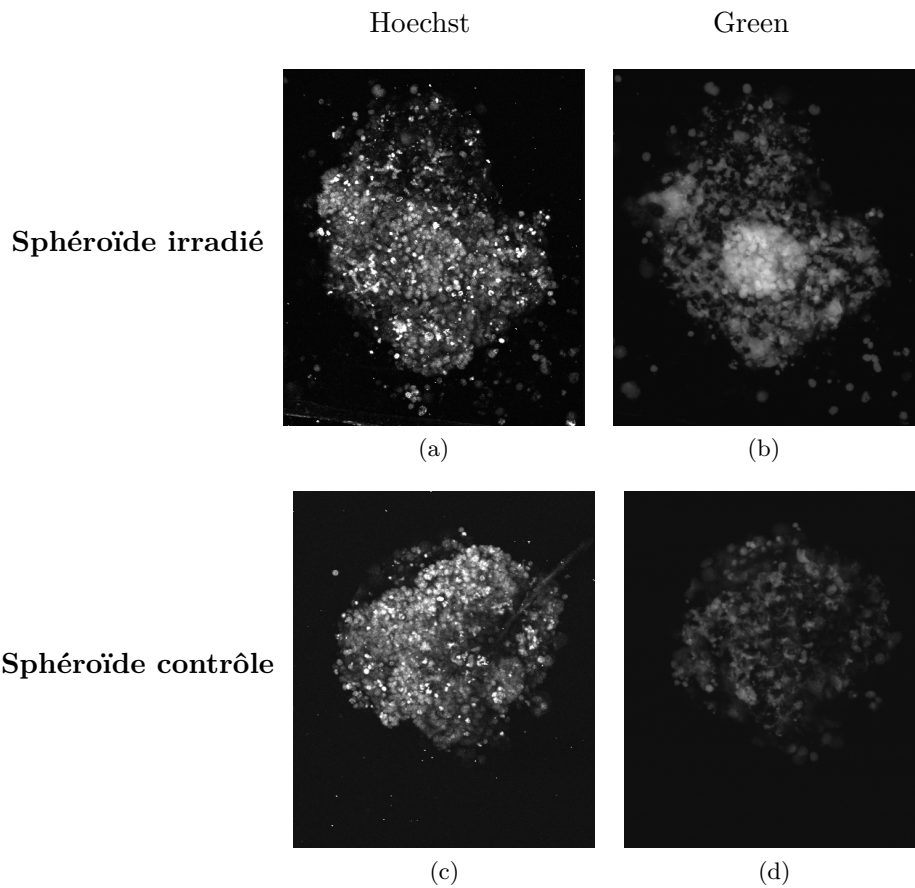


FIGURE 2.15 – **Projection 3D d'images confocales de sphéroïdes irradiés** ($\Delta t=30\text{min}$). Les images sont prises 48h après irradiation. **Images (a,c)** : marquage fluorescent Hoechst : toutes les cellules (vivantes et mortes) sont marquées. **Images (b,d)** : marquage fluorescent CellTox Green ("Green"), seules les cellules mortes sont marquées. **Images (a,b)** Sphéroïde irradié, vue de face. On distingue une zone centrale de cellules mortes, caractérisée par la fluorescence Green de toutes les cellules, du reste du sphéroïde, où la fluorescence ne concerne qu'une fraction de cellules. **Images (c,d)** : Sphéroïde contrôle, non irradié. La fluorescence Green est moins intense que dans un sphéroïde irradié.

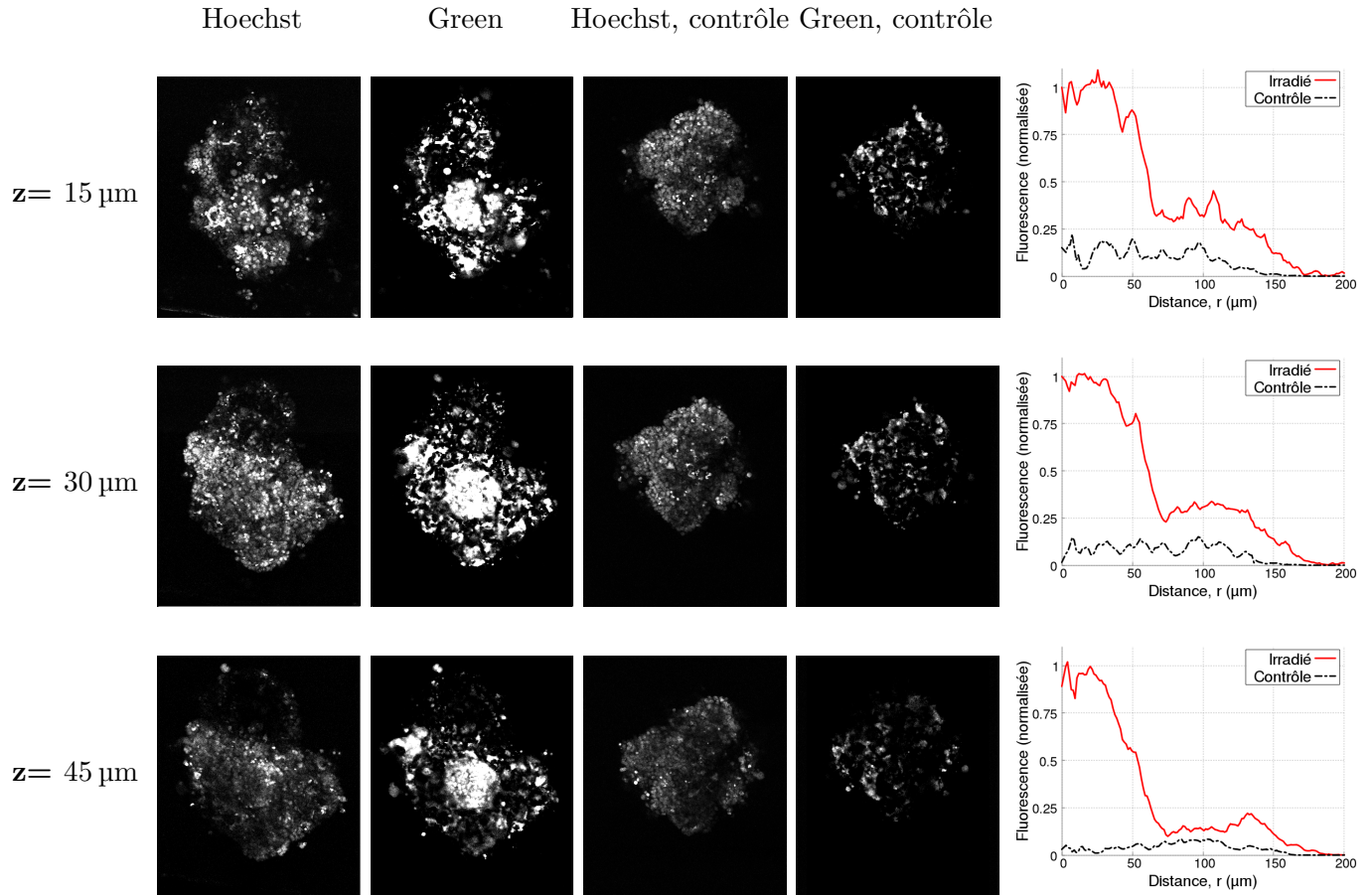


FIGURE 2.16 – **Images de sections de sphéroïdes.** Images ($800 \mu\text{m} \times 955 \mu\text{m}$) de sections de sphéroïdes (excitation biphoton, microscope confocal) prises 48h après irradiation. Les sections sont caractérisées par leur distance z (en μm) de la surface du sphéroïde. Les conditions d'imagerie sont identiques pour les deux sphéroïdes. **Colonne 1** : sphéroïde irradié ($\Delta t = 30 \text{min}$), marquage fluorescent Hoechst, toutes cellules (vivantes et mortes) marquées. **Colonne 2** : marquage fluorescent CellTox Green, seules les cellules mortes sont marquées. Le signal de fluorescence sature au centre du sphéroïde. **Colonnes 3 et 4** : sphéroïde contrôle (non-irradié), marquage Hoechst et CellTox Green respectivement. **Colonne 5** : Profil de fluorescence du signal CellTox Green, normalisé par rapport au maximum d'intensité (le maximum est mesuré sur les images de la colonne 2). L'axe du faisceau laser coïncide avec $r=0$. Remarque : les deux sphéroïdes n'ont pas le même rayon (irradié : $R=160 \mu\text{m}$, contrôle $R=125 \mu\text{m}$).

2.3.1.3 Fraction de cellules vivantes

Nous utilisons le test de viabilité CellTiter Glo (présenté [section 2.2.5](#)), afin de mesurer une fraction de cellules vivantes dans les sphéroïdes. Cell Titer Glo désagrège les sphéroïdes et permet de mesurer un signal luminescent proportionnel au nombre de cellules vivantes. Il est ajouté aux sphéroïdes 48h après le début de l'irradiation. Le signal luminescent moyen mesuré pour une population de sphéroïdes irradiés est comparé au signal mesuré pour une population contrôle non irradiée. Tous les sphéroïdes ont été ensemencés simultanément avec le même nombre de cellules. La fraction de cellules vivantes suite à l'irradiation est le ratio entre les signaux associés aux sphéroïdes irradiés et les sphéroïdes contrôles.

La fraction de cellules vivantes est mesurée en fonction de deux paramètres : le temps d'irradiation Δt , et le diamètre D des sphéroïdes. $n=3$ sphéroïdes sont irradiés pour chaque couple de paramètres (Δt , D) et comparés à une population de $n=3$ sphéroïdes contrôles de diamètre D . Lorsque les sphéroïdes sont suffisamment petits, la zone centrale de mort couvre tout le sphéroïde (l'intensité de fluorescence associée aux cellules mortes ne descend jamais en dessous de 50% de la valeur maximale mesurée. L'irradiation de sphéroïdes dont le volume est inférieur ou égal à celui de la zone centrale de mort permet d'évaluer la fractions de cellules vivantes à proximité de l'axe du laser, et de déduire dans les sphéroïdes plus gros la fraction de cellules mortes en périphérie du sphéroïde.

Les fractions de cellules vivantes obtenues sont représentées [figure 2.17a](#). Pour une durée d'irradiation $\Delta t=30$ min, le diamètre en surface des sphéroïdes de la zone centrale de mort est de $160\mu\text{m}$. Pour les sphéroïdes irradiés de diamètre $D=160\mu\text{m}$, la fraction de cellules vivantes mesurée est inférieure à 5%. Nous concluons donc que la totalité des cellules sont mortes dans la zone centrale. Nous estimons à partir de la fraction totale de cellules vivantes (détails dans la partie Protocoles et Méthodes) la fraction de cellules vivantes dans la zone de mort périphérique des sphéroïdes ([figure 2.17b](#)). Plus la durée d'exposition Δt est grande, plus la fraction de cellules vivantes est faible. Pour $\Delta t=30\text{min}$, la fraction de cellules vivantes en zone périphérique est inférieure à 85% pour des sphéroïdes de diamètre $D\leq 425\mu\text{m}$. c'est-à-dire qu'au moins 15% des cellules irradiées meurent à une distance à l'axe du laser de $r>80\mu\text{m}$.

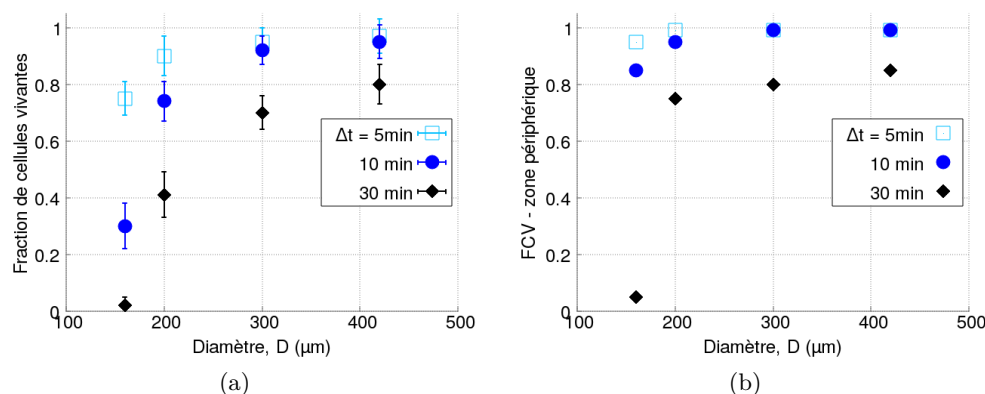


FIGURE 2.17 – **Viabilité des sphéroïdes irradiés.** **Figure (a)** Fraction de cellules vivantes dans des sphéroïdes de diamètre D irradiés Δt minutes. Barres d'erreur : écarts-types à la moyenne. $n=3$ sphéroïdes par point de mesure. **Figure (b)** Fraction de cellules vivantes hors zone centrale de mort en fonction du temps d'irradiation Δt et du diamètre D du sphéroïde irradié.

2.3.2 Zone de mort centrale et physico-chimie

La déformation du faisceau laser et la concentration en dioxygène dans les sphéroïdes ont été estimés dans la section Protocoles et Méthodes. A partir de ces informations, nous pouvons estimer de manière quantitative la production d'oxygène singulet en tout point d'un sphéroïde. Nous souhaitons confirmer que les résultats expérimentaux sont cohérents avec ces estimations.

2.3.2.1 Zone de mort centrale et absorption/diffusion de la lumière

Un coefficient de diffusion de la lumière à 1270nm $\alpha_D \sim 48 \text{ cm}^{-1}$ a été obtenu suite à la mesure des ratios de puissance laser, et de l'estimation au vu de la littérature d'un coefficient d'anisotropie $g=0.9$. α_D a servi à estimer la propagation de la lumière dans les sphéroïdes. Nous souhaitons vérifier la cohérence entre la simulation de la diffusion de la lumière et la mort cellulaire.

La mort cellulaire est mesurée sur deux surfaces diamétralement opposées du sphéroïde. La surface dite d'impact est la première surface à entrer en contact avec le faisceau laser. Le laser se propage dans le sphéroïde jusqu'à la surface dite de sortie. Avec la diffusion de la lumière, les cellules des deux surfaces ne sont pas exposées à la même intensité laser.

Nous mesurons un rayon de la zone centrale de mort R_{mort} sur chaque surface : R_I sur la surface d'impact, et R_S sur la surface de sortie. La concentration en dioxygène est considérée homogène sur la surface du sphéroïde. Le taux de production d'oxygène singulet, à durée d'irradiation égale, ne dépend donc que de l'intensité laser. Nous allons estimer le coefficient de diffusion α_D à partir des rayons de mort, et le comparer à la valeur 48 cm^{-1} obtenue précédemment. Soit z l'épaisseur du sphéroïde irradié. Dans l'hypothèse où le faisceau laser reste Gaussien malgré la diffusion, les équations (2.18) à (2.20) permettent d'écrire α_D en fonction des rayons de mort mesurés sur les deux surfaces opposées.

$$I_0 e^{-2\frac{R_I^2}{\omega^2}} = I_0(z) e^{-2\frac{R_S^2}{\omega^2}} \quad (2.18)$$

$$I_0(z) = I_0 e^{-\alpha_D z} \quad (2.19)$$

$$e^{-\alpha_D z} = e^{-2\frac{R_I^2 - R_S^2}{\omega^2}} \quad (2.20)$$

Les valeurs de $\exp\left(-2\frac{R_I^2 - R_S^2}{\omega^2}\right)$ obtenues expérimentalement sont cohérentes avec un coefficient $\alpha_D \sim 42 \text{ cm}^{-1}$ (figure 2.18b).

Nous obtenons ainsi un coefficient de diffusion de 42 cm^{-1} , proche du coefficient $\alpha_D \sim 48 \text{ cm}^{-1}$ obtenu précédemment. Les résultats expérimentaux sont cohérents avec le modèle de diffusion utilisé.

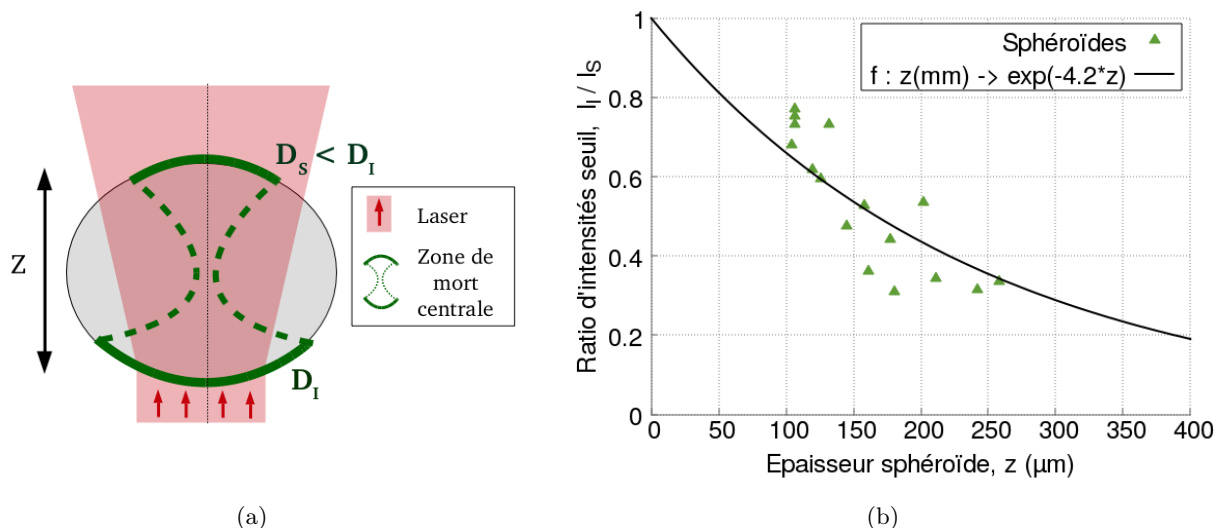


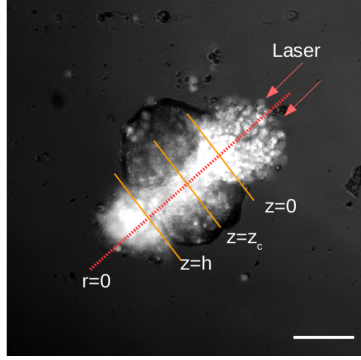
FIGURE 2.18 – Mesure expérimentale du coefficient de diffusion α_D de la lumière 1270nm à partir de la zone de cellules mortes suite à la génération d'oxygène singulet. **Figure (a)** Schéma expérimental : nous mesurons les diamètres des zones centrales de mort en surface du sphéroïde. D_I : diamètre sur la surface "d'impact" du faisceau laser. D_S : diamètre sur la surface "de sortie" du faisceau laser. Du fait de la diffusion de la lumière $D_I > D_S$ **Figure (b)** Estimation du coefficient de diffusion α_D à partir de la mesure expérimentale des diamètres des zones centrales de mort. ($n=19$ sphéroïdes).

2.3.2.2 Zone de mort centrale et concentration en dioxygène

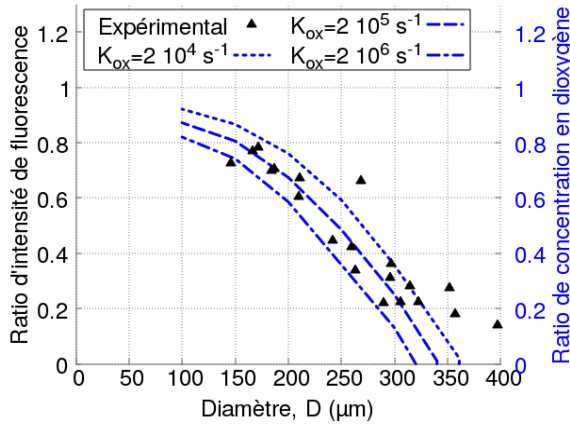
Rappelons que deux coefficients de réaction décrivent le comportement de l'oxygène singulet généré à l'intérieur des cellules et dans le milieu de culture : $K = \frac{\ln 2}{\tau_{1/2}} = 1.98 \times 10^5 \text{s}^{-1}$ caractérise les interactions avec le solvant (eau, demi-vie $\tau_{1/2} = 3.5 \mu\text{s}$), et K_{ox} les interactions avec les cellules et/ou le milieu de culture qui produisent des espèces autres que $^3\text{O}_2$. Pour $K_{ox} \geq 2 \times 10^7 \text{s}^{-1}$, tout l'oxygène singulet produit réagit dans les cellules pour former des espèces autres que $^3\text{O}_2$, et la déplétion en dioxygène liée à l'irradiation laser est maximale.

Nous avons simulé numériquement la concentration en dioxygène dans des sphéroïdes en fonction des conditions d'irradiation et de deux paramètres : le coefficient de diffusion du dioxygène D_{O_2} dans les sphéroïdes et le coefficient de réaction K_{ox} . Les images de fluorescence de sphéroïdes en vue de profil ([figure 2.19a](#)) permettent d'associer à chaque plan z du sphéroïde un profil d'intensité de fluorescence, et donc un rayon r_{mort} associé à la zone centrale de mort cellulaire. Nous mesurons le rayon de la zone de mort au centre du sphéroïde, et souhaitons déterminer si la concentration en dioxygène au centre du sphéroïde permet d'expliquer le rétrécissement du rayon de mort lorsque l'on s'éloigne de la surface du sphéroïde.

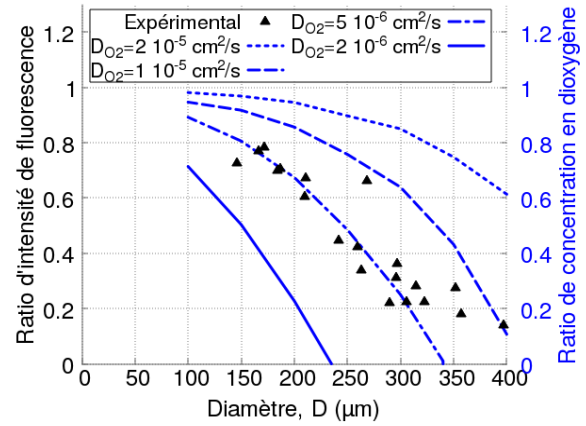
Soit $z=z_0$ le plan en surface du sphéroïde (surface d'impact) et $z=z_c$ le plan du centre du sphéroïde. Soient r_0 et r_c les rayons respectifs de la zone centrale de mort mesurés dans ces plans. Dans l'hypothèse où la concentration cumulée seuil d' $^1\text{O}_2$ est constante dans le sphéroïde, c'est-à-dire que les capacités antioxydantes des cellules ne dépendent pas de leur position dans le sphéroïde, l'équation $I(r_0, z_0)[^3\text{O}_2](r_0, z_0) = I(r_c, z_c)[^3\text{O}_2](r_c, z_c)$ doit être vérifiée. Le ratio $I(r_0, z_0)/I(r_c, z_c)$ devrait donc être égal au ratio des concentrations en dioxygène entre la surface et le centre du sphéroïde. Les valeurs de $I(r, z)$ sont estimées grâce aux simulations de propagation de la lumière dans le sphéroïde présentées précédemment.



(a)



(b)



(c)

FIGURE 2.19 – **Gradient en dioxygène dans un sphéroïde et mort cellulaire.** Comparaison entre le ratio d'intensité seuil expérimental mesuré en surface et au centre de sphéroïdes irradiés, et le ratio de concentration en dioxygène en fonction du diamètre D des sphéroïdes obtenu par simulation numérique. **Figure(a)** Image d'un sphéroïde en vue de côté : on constate l'existence d'un gradient d'intensité de fluorescence, avec une réduction de l'intensité au centre du sphéroïde. **Figure(b)** Effet du paramètre K_{ox} sur le ratio de concentration en dioxygène, pour un coefficient de diffusion du dioxygène dans les sphéroïdes $D_{O_2}=5 \times 10^{-6} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$. **Figure(c)** Effet du paramètre D_{O_2} sur le ratio de concentration en dioxygène, pour $K_{ox}=2 \times 10^5 \text{ s}^{-1}$.

La figure 2.19b compare les ratios d'intensité $I(r_0, z_0)/I(r_c, z_c)$ expérimentaux avec le ratio en dioxygène théorique attendu, en fonction du diamètre D des sphéroïdes, pour différentes valeurs de K_{ox} et D_{O_2} . Dans l'hypothèse d'une réponse homogène au stress oxydant des cellules dans le sphéroïde, le ratio en dioxygène est cohérent avec le ratio d'intensité laser pour $K_{ox} = 2 \times 10^5 \text{ s}^{-1}$ et $D_{O_2} = 5 \times 10^{-6} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$. Pour des valeurs plus élevées de K_{ox} , le coefficient D_{O_2} doit être diminué (par exemple $7 \times 10^{-6} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$ pour $K_{ox} = 2 \times 10^7 \text{ s}^{-1}$) pour retrouver les valeurs expérimentales.

Ces résultats nous mènent à considérer deux cas de figure : soit l'hypothèse que la réponse des cellules à une dose d' $^1\text{O}_2$ ne dépend pas de leur position dans le sphéroïde est vraie, dans ce cas nous déduisons la valeur des paramètres K_{ox} et D_{O_2} à partir des simulations et de nos résultats expérimentaux. Soit les valeurs réelles de K_{ox} et D_{O_2} ne permettent pas de faire correspondre les ratios d'intensité seuil avec les ratios de dioxygène. Dans ce cas, cela signifierait que la réponse des cellules des sphéroïdes à une quantité donnée d' $^1\text{O}_2$ dépend de la position des cellules dans

le sphéroïde et par conséquent de la concentration en dioxygène et/ou en nutriments à laquelle elles ont accès.

Les expériences du chapitre 3 permettent d'affirmer que $2 \times 10^5 \text{s}^{-1} < K_{ox} < 2 \times 10^6 \text{s}^{-1}$ dans le milieu extra-cellulaire. Elles n'apportent toutefois pas d'éléments sur le coefficient de diffusion moyen du dioxygène dans les sphéroïdes. Les valeurs mesurées de D_{O_2} dans la littérature, dans des tissus de mammifères^[37], et des sphéroïdes de cellules murines^[32], sont généralement comprises entre 0.6 et $1.1 \times 10^{-5} \text{cm s}^{-1}$, soit des valeurs du même ordre de grandeur mais supérieures à $0.5 \times 10^{-5} \text{cm s}^{-1}$. Si l'hypothèse d'une réponse homogène des cellules mène à une sous-estimation de D_{O_2} , alors la concentration en 3O_2 et la production d' 1O_2 au cœur des sphéroïdes sont plus élevées que celles prédites par le diamètre de mort des cellules. Les cellules en hypoxie, au cœur des sphéroïdes, seraient par conséquent plus résistantes que les cellules en surface.

Ne pouvant pas conclure sur la mort des cellules au cœur des sphéroïdes, nous allons comparer la mort cellulaire en surface des sphéroïdes avec la mort des cellules en mono-couches. Nous devons donc comparer premièrement les concentrations en dioxygène. En surface des sphéroïdes, la concentration en dioxygène ne dépend pas du coefficient de diffusion D_{O_2} (simulations en [annexe C.2](#)). Elle est principalement déterminée par la valeur de K_{ox} dans le milieu de culture. Si $K_{ox}=0$, la concentration des cellules en mono-couches et en surface des sphéroïdes pendant l'irradiation laser est très proche (0.233 et 0.225mM respectivement au niveau de l'axe du laser). Plus K_{ox} est élevé, plus la concentration en dioxygène est faible, et plus l'écart entre la concentration en surface des sphéroïdes et en mono-couches est importante. Par exemple, pour $K_{ox} = 2 \times 10^5 \text{s}^{-1}$ et $K_{ox} = 2 \times 10^7 \text{s}^{-1}$ (déplétion en dioxygène maximale) respectivement, la concentration en dioxygène est de 0.2 et 0.175mM au niveau de l'axe du laser en mono-couches, et 0.15 et 0.115 en surface de sphéroïdes. Ainsi, respectivement 133% et 150% de l'oxygène singulet généré en sphéroïdes est généré en mono-couches.

2.3.3 1O_2 et mort cellulaire en mono-couches et sphéroïdes

Nous souhaitons comparer la concentration cumulée seuil d'oxygène singulet $[^1O_2]_C$ de cellules cultivées en sphéroïdes et en mono-couches. Comparons dans un premier temps la mort cellulaire dans la zone centrale des sphéroïdes avec la mort en mono-couches. La concentration en dioxygène en surface des sphéroïdes est égale ou inférieure à la concentration en surface des mono-couches (en fonction de la constante de réaction K_{ox}). Le taux de production d'oxygène singulet à intensité laser égale est donc potentiellement inférieur dans les cellules en surface des sphéroïdes (jusqu'à 50% de moins).

Soit $I_S(3D)$ l'intensité seuil associée à la zone centrale de cellules mortes en surface des sphéroïdes et $I_S(2D)$ l'intensité seuil associée à zone de cellules mortes en mono-couches. Nous obtenons ([figure 2.20](#)) $I_S(2D) \gg I_S(3D)$ pour différentes durées d'exposition. L'écart entre les intensités seuils augmente avec la durée d'exposition Δt , et atteint deux ordres de grandeur pour $\Delta t \geq 30 \text{min}$. Comme la concentration en dioxygène en surface des sphéroïdes est potentiellement inférieure à celle en mono-couches, l'écart entre les taux de production d' 1O_2 seuil est ainsi d'au moins deux ordres de grandeur. Remarquons que nous ne considérons en sphéroïdes que la mort cellulaire dans la zone centrale. Ainsi, les cellules mortes dans la zone périphérique sont exposées à des quantités d' 1O_2 encore plus faibles.

En conclusion, deux éléments différencient la mort en mono-couches et en sphéroïdes : premièrement la concentration cumulée d' 1O_2 seuil qui caractérise la zone de mort contenant 100% de cellules mortes est beaucoup plus faible en sphéroïdes (jusqu'à deux ordres de grandeur). Deuxièmement, pour les irradiations longues ($\geq 30\text{min}$), une fraction significative des cellules

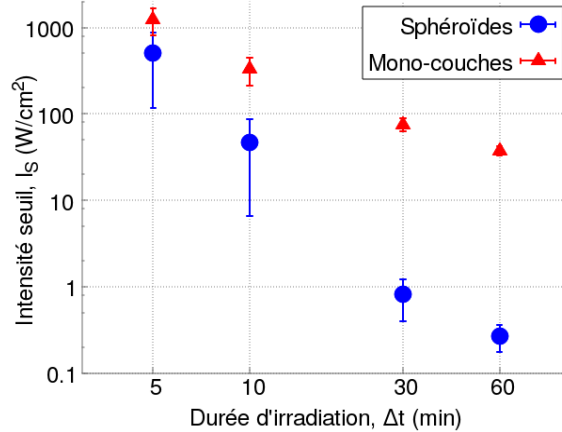


FIGURE 2.20 – **Comparaison des intensités létales de mort en mono-couches et sphéroïdes.** Intensité de lumière seuil I_S en fonction de la durée d'irradiation Δt . Barres d'erreur : écarts-types, $n > 10$ champs de cellules ou sphéroïdes irradiés par point ($n = 6$ pour $\Delta t = 60$ min). I_S est beaucoup plus faible pour les sphéroïdes. L'écart entre mono-couches et sphéroïdes augmente avec Δt .

meurent dans la totalité du sphéroïdes, c'est-à-dire jusqu'à plusieurs centaines de microns de l'axe du laser. Ces cellules ont été exposées à des quantités d'oxygène singulet infimes (jusqu'à plus de dix ordres de grandeur en dessous des concentrations toxiques en mono-couches).

Au vu de la littérature de la PDT, qui annonce que les sphéroïdes sont plus résistants que des mono-couches de cellules lorsqu'ils sont exposés à une même fluence laser (résultat partiellement expliqué par les gradients en dioxygène), nous nous attendions à $I_S(3D) \geq I_S(2D)$. Nos résultats suggèrent au contraire que les cellules cultivées en sphéroïdes sont beaucoup moins résistantes au stress oxydant que les cellules en mono-couches. Dans la partie suivante, nous cherchons à identifier la raison de cette différence de mort entre sphéroïdes et mono-couches, et expliquer la différence entre nos résultats et les résultats de la littérature.

2.3.4 Mort cellulaire et jonctions communicantes inter-cellules

La mort dans la zone périphérique des sphéroïdes est associée à des quantités d'oxygène singulet si faibles qu'il est improbable que la mort soit la conséquence de la concentration d'oxygène singulet produite dans ces cellules. Des effets de mort à longue portée, initiés par différents types de stress (radiatif, oxydant etc.) ont été mis en évidence dans la littérature [90;165–167]. Les cellules irradiées avec des doses toxiques propageraient le stress à des cellules voisines et plus éloignées au moyen de communications inter-cellules, la génération de facteurs de mort extra-cellulaires, et/ou d'autres mécanismes de propagation de la mort.

Nous allons donc dans un premier lieu explorer la piste d'une différence de métabolisme entre les sphéroïdes et les mono-couches qui expliquerait la différence de mort mesurée. Les cellules des sphéroïdes ont plus de cellules voisines, et le nombre de connections membranaires cellule-à-cellule (jonctions d'ancrage, jonctions serrées, et jonctions communicantes) est fortement augmenté. Les jonctions communicantes ("jonctions gap") notamment, sont impliquées dans les processus de résistance au stress et d'effets à longue portée [90;165–168]. Nous souhaitons nous pencher sur le rôle de ces jonctions, et moduler leur activité afin de mesurer l'évolution de la réponse des cellules.

Structure des jonctions communicantes. Les jonctions communicantes, ou "gap", sont des canaux de transport au niveau des membranes cellulaires, constituées de protéines, les connexines, organisées en connexons. Chaque connexon est un hexamère de six connexines. La liaison de deux connexons, un appartenant à chacune des deux cellules connectées, forme un canal de quelques nanomètres de diamètre^[169]. Des connexons seuls (qui ne sont pas liés à un connexon d'une autre cellule), dits hemicanaux, permettent aux cellules de communiquer avec le milieu extra-cellulaire. L'espace interstitiel entre deux cellules dans un tissu peut atteindre quelques micromètres^[170] d'épaisseur.

Rôle des jonctions communicantes. Le rôle des jonctions gap dans la propagation du stress est complexe. Ces jonctions ont été identifiées en radiothérapie^[171], en PDT^[172-174], et lors d'ajout d'ERO extra-cellulaire^[175-177], comme des vecteurs de propagation du stress et de la mort cellulaire. A l'inverse, il est proposé que les jonctions gap, et notamment les connexines 43, sont essentielles pour protéger les cellules des dommages provoqués par H₂O₂ sur des astrocytes (cerveau humain)^[175], et des dommages provoqués par des ERO au niveau du cristallin^[177]. W. Shi *et al.*^[176] suggèrent, dans une étude sur des cellules humaines du cristallin exposées à une dose toxique de H₂O₂, que les jonctions gap ne sont pas impliquées dans la protection des cellules, mais que les hemicanaux oui, en favorisant le transfert d'antioxydants présents dans le milieu extra-cellulaire jusqu'aux cellules. Enfin dans une série d'études^[178;179] en PDT sur des cellules de rein canin, les jonctions gap n'ont pas été retenues comme acteurs majeurs dans les effets de mort à longue portée. Les jonctions gap facilitent la diffusion de petites (<1kDa) molécules à travers les membranes, il est donc probable qu'en fonction des molécules présentes, elles amplifient ou diminuent l'effet du stress.

Modulateurs du nombre de jonctions gap. Des agents chimiques permettent d'augmenter (acide trans-retinoïque, ATRA^[180-182]) ou de réduire (1,1-bis(p-chlorophenyl)-2,2,2-trichloroethane, DDT^[183-185]) le nombre de connexons à base de connexines 43, la connexine majoritaire. ATRA agit sur la phosphorylation des connexines (les connexines phosphorylées ne sont pas en mesure de former des connexons) et augmente le nombre de connexons formés. DDT provoque une fragmentation des jonctions gap et des hemicanaux. Les sphéroïdes seront exposés à ces agents avant d'être irradiés. Si la diffusion d'espèces à travers les jonctions gap/hemicanaux contribue à la différence de réponse cellulaire entre mono-couches et sphéroïdes, nous nous attendons à voir, sur des sphéroïdes, une réduction de la zone de mort en présence de DDT. A l'inverse, une augmentation de la zone de mort en présence de DDT suggérerait que les jonctions gap/hemicanaux ont une action protectrice sur les cellules. L'effet de ATRA devrait s'opposer à l'effet du DDT.

Protocole d'irradiation avec modulateurs. Les cellules cultivées en mono-couches, et une population de sphéroïdes, sont incubées avec du DDT (50μM, incubé 1h30. Le milieu de culture est ensuite remplacé par du milieu neuf 20min avant le début de l'irradiation). Il faut ~ 24h^[183] pour que les jonctions gap des cellules exposées retrouvent une activité proche de celle qu'elles avaient avant exposition au DDT, la densité cellulaire de jonctions reste donc réduite pendant et plusieurs heures après l'irradiation.

Une autre population de mono-couches et de sphéroïdes est incubée avec de l'ATRA (100nM et 10μM incubé 24h, sans différence d'effet sur la mort cellulaire. Milieu de culture remplacé 20min avant l'irradiation laser). Des expériences contrôles sur des cellules non-irradiées vérifient l'absence de toxicité due à DDT et ATRA aux concentrations testées (le DDT est toxique à partir de 100μM pour une incubation de 1h30, et l'ATRA à partir de 35μM, incubé 24h). Les cellules (sphéroïdes et mono-couches) sont irradiées 30 minutes.

Pour les sphéroïdes, la fluence seuil (F_S en Wh/cm²) est la fluence reçue par les cellules limitrophes de la zone de mort centrale. Cette fluence seuil est comparée à la fluence seuil associée à la zone de mort de mono-couches (figure 2.21). Les barres d'erreur associées aux mesures de fluence incluent toutes (100%) les mesures expérimentales. Un effet peut donc être considéré statistiquement significatif si ces barres d'erreur ne se chevauchent pas.

Effet du DDT sur la mort cellulaire. En présence de DDT, F_S est réduit d'environ un facteur 10. L'absence de chevauchement des barres d'erreur associées aux mesures (qui contiennent 100% des valeurs de mesure) rend l'effet du DDT sur la mort cellulaire statistiquement convainquant. La mort dans la zone périphérique ne semble toutefois pas fortement affectée : les profils d'intensité de fluorescence avec et sans ajout de DDT se rejoignent à distance $r > 100 \mu\text{m}$ du laser (figure 2.21c).

Malgré l'absence de mort inhabituelle sur les sphéroïdes non-irradiés incubés avec du DDT, nous ne pouvons pas affirmer avec certitude que cette mort accrue n'est pas due, en totalité ou en partie, à une fragilisation des cellules par le DDT. En supposant néanmoins que la présence de DDT ne rend pas les cellules plus sensibles au stress, les expériences avec DDT en mono-couches et en sphéroïdes suggèrent que les jonctions à base de connexines 43 ont un effet protecteur sur les cellules : lorsque le nombre de jonctions est réduit, la fluence seuil F_S nécessaire pour tuer les cellules diminue. Si seule la densité de jonctions gap/hemi-canaux décidait de la mort cellulaire suite à un stress oxydant, les sphéroïdes devraient donc être plus résistants que les cellules en mono-couches. La fluence seuil en mono-couches en présence de DDT reste en outre bien supérieure à la fluence seuil en sphéroïdes.

Effet de l'ATRA sur la mort. Nous ne voyons pas d'effet statistiquement convainquant d'ATRA sur la fluence seuil en mono-couches ou en sphéroïdes : les barres d'erreur (qui contiennent 100% des mesures expérimentales) se chevauchent fortement. La légère augmentation de la valeur moyenne de la fluence seuil en présence d'ATRA s'oppose à la diminution de la fluence seuil provoquée par le DDT, ce qui est cohérent au vu de l'action opposée des deux composés chimiques sur les connexines 43. La mort dans la zone périphérique semble réduite en présence d'ATRA, ce qui encourage à penser que ces jonctions et/ou hemi-canaux ont un effet cyto-protecteur. L'intensité de fluorescence reste néanmoins supérieure à au niveau basal.

Conclusion sur les jonctions communicantes. Nous avons émis l'hypothèse que la mort cellulaire en périphérie des sphéroïdes est liée à des interactions inter-cellules, plus présentes dans les sphéroïdes qu'entre des cellules cultivées en mono-couches. Au vu des résultats expérimentaux, les jonctions gap ne semblent pas avoir une action pro-oxydante. Au contraire, la diminution de la fluence seuil en présence de DDT suggère que les connexines 43 ont un effet cyto-protecteur. L'effet de l'ATRA sur la mort et le profil de fluorescence des sphéroïdes est également cohérent avec cette hypothèse. La densité accrue de jonctions communicantes en sphéroïdes comparé aux mono-couches ne semble donc pas un bon candidat pour expliquer la différence de mort entre les deux modèles.

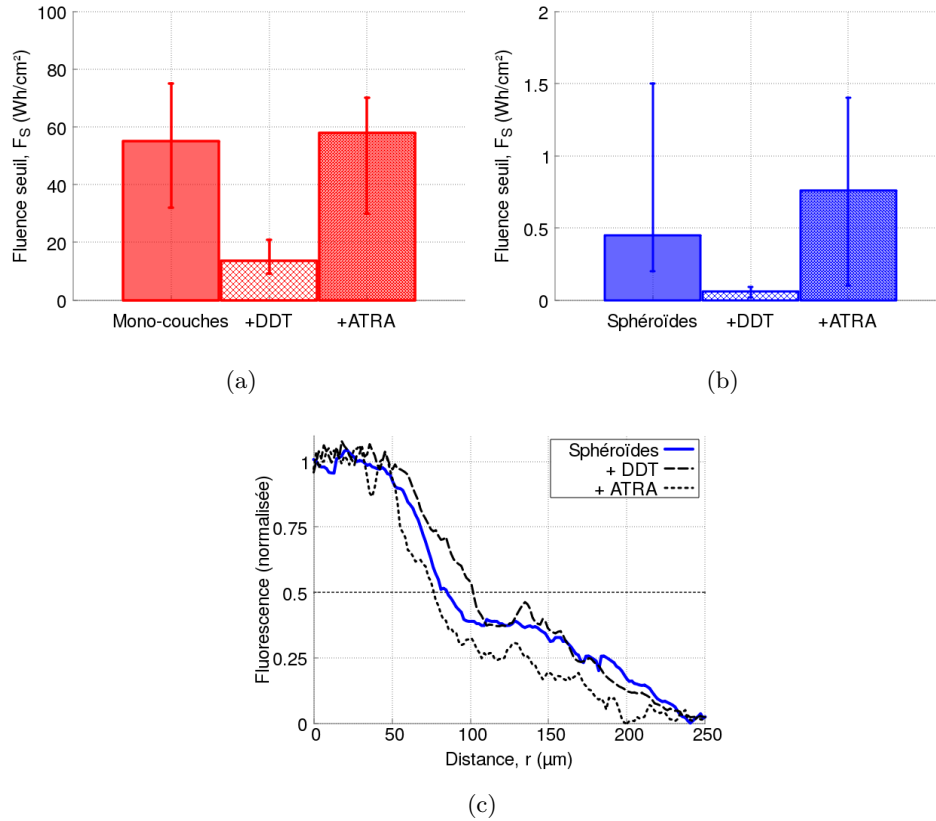


FIGURE 2.21 – **Effet d’agents chimiques qui perturbent les jonctions gap.** Le DDT fragmente les connexions inter-cellules. L’ATRA augmente la densité de jonctions gap. Barres : intervalle contenant 100% des données expérimentales. **Figure (a)** Fluence seuil F_S (en Wh/cm²) en mono-couches, sans ajout d’agents chimiques, avec DDT et avec ATRA. $10 < n < 15$ champs de cellules irradiées. **Figure (b)** F_S en sphéroïdes sans ajout d’agents chimiques, avec DDT et avec ATRA. $10 < n < 15$ sphéroïdes par points de mesure. **Figure (c)** Profils d’intensité moyenne de fluorescence de sphéroïdes de diamètre $\sim 425 \mu\text{m}$ en fonction de la distance r à l’axe du laser.

2.3.5 Influence de $^1\text{O}_2$ extra-cellulaire

Nous avons considéré jusqu’à présent que, dans la mesure où $^1\text{O}_2$ est l’agent cytotoxique majeur en PDT, l’excitation directe du dioxygène provoquerait une mort cellulaire comparable. Or, en PDT, les photo-agents (PS) intra-cellulaires se fixent exclusivement à l’intérieur des cellules. L’oxygène singulet généré par excitation des PS n’est généré donc que de manière intra-cellulaire. En excitation directe de l’oxygène à 1270nm, le dioxygène dissous dans le milieu de culture est également excité. La désactivation spontanée de l’oxygène singulet et le coefficient de réaction avec le solvant (eau) limitent la demi-vie de l’oxygène singulet dans le milieu de culture à $3.5 \mu\text{s}$. Dans l’hypothèse de réactions avec d’éléments autres que le solvant dans le milieu de culture, la demi-vie devrait être encore réduite.

Ainsi, les molécules d’oxygène singulet générées ne peuvent diffuser que sur $\sim 0.1\text{nm}$. Nous n’avons donc pas considéré la génération extra-cellulaire comme source de dommages. Cela suppose toutefois que l’oxygène singulet ne réagit pas dans le milieu de culture pour produire une ou plusieurs espèces toxiques, capables de diffuser sur des distances plus longues. Afin de déterminer si l’oxygène singulet généré en dehors des cellules contribue à la mort des cellules, nous ajoutons un désactivateur de $^1\text{O}_2$ dans le milieu cellulaire avant l’irradiation.

2.3.5.1 Albumine de sérum de boeuf : un désactivateur de 1O_2

L'albumine de Sérum de Bœuf^[24;186] (BSA) est une protéine non-toxique qui réagit avec l'oxygène singulet avec une constante de réaction $K_{BSA} = 8 \cdot 10^8 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ (équation (2.21)). Du fait de sa taille (masse molaire : 66kDa), la BSA ne peut pas traverser la membrane cellulaire. Elle ne réagit donc qu'avec l'oxygène singulet extra-cellulaire. 3mM de BSA sont ajoutés au milieu cellulaire environ une heure avant le début de l'irradiation. Une absence de réduction de la mort en présence de BSA indiquerait une absence de contribution significative de d^1O_2 extra-cellulaire.

$$\frac{d[{}^1O_2]}{dt} = D\nabla^2[{}^1O_2] + \gamma[{}^3O_2] - K[{}^1O_2] - K_{ox}[{}^1O_2] - K_{BSA}[BSA][{}^1O_2] \quad (2.21)$$

Nous rappelons que $D\nabla^2[{}^1O_2]$ traduit la diffusion des espèces, $\gamma[{}^3O_2]$ la production d'oxygène singulet par le laser, et $K = \frac{\ln(2)}{\tau_{1/2}} = 1.98 \times 10^5 \text{ s}^{-1}$, avec $\tau_{1/2}$ la demi-vie de l'oxygène singulet dans de l'eau pure. La réduction de la concentration de 1O_2 en présence de BSA dépend de la constante de réaction K_{ox} de l'oxygène singulet dans le milieu extra-cellulaire (détails complémentaires dans l'annexe C.4.1). La concentration en présence de 3mM de BSA est réduite d'au moins un facteur 2 tant que $K_{ox} \leq 2 \times 10^6 \text{ s}^{-1}$. Pour $K_{ox} = 0$, elle est divisée par un facteur 13.1.

2.3.5.2 Effet de la BSA sur la mort cellulaire

Comparons figure 2.22 la mort de mono-couches et de sphéroïdes à une irradiation avec et sans BSA. Les intensités seuil I_S associées à la mort cellulaire sont mesurées pour 10 à 15 sphéroïdes et champs de cellules cultivées en mono-couches. Pour des irradiations de durée $\Delta t = 30 \text{ min}$ (résultats similaires pour $\Delta t = 10 \text{ min}$), la présence de BSA affecte peu l'intensité seuil I_S en mono-couches. L'augmentation de l'intensité seuil est faible (d'un facteur < 1.25) et les écarts-types sont superposés.

En sphéroïdes, l'intensité seuil associée à la zone centrale de mort augmente de 2 ordres de grandeur (de 0.9 ± 0.8 à $128 \pm 78 \text{ W/cm}^2$) et atteint l'intensité seuil mesurée en mono-couches ($81 \pm 25 \text{ W/cm}^2$). La fluorescence dans la zone de mort périphérique des sphéroïdes est également fortement réduite (figure 2.22b). Nous retrouvons un profil d'intensité de fluorescence, et donc de mort cellulaire, plus cohérent avec la forme gaussienne du faisceau laser.

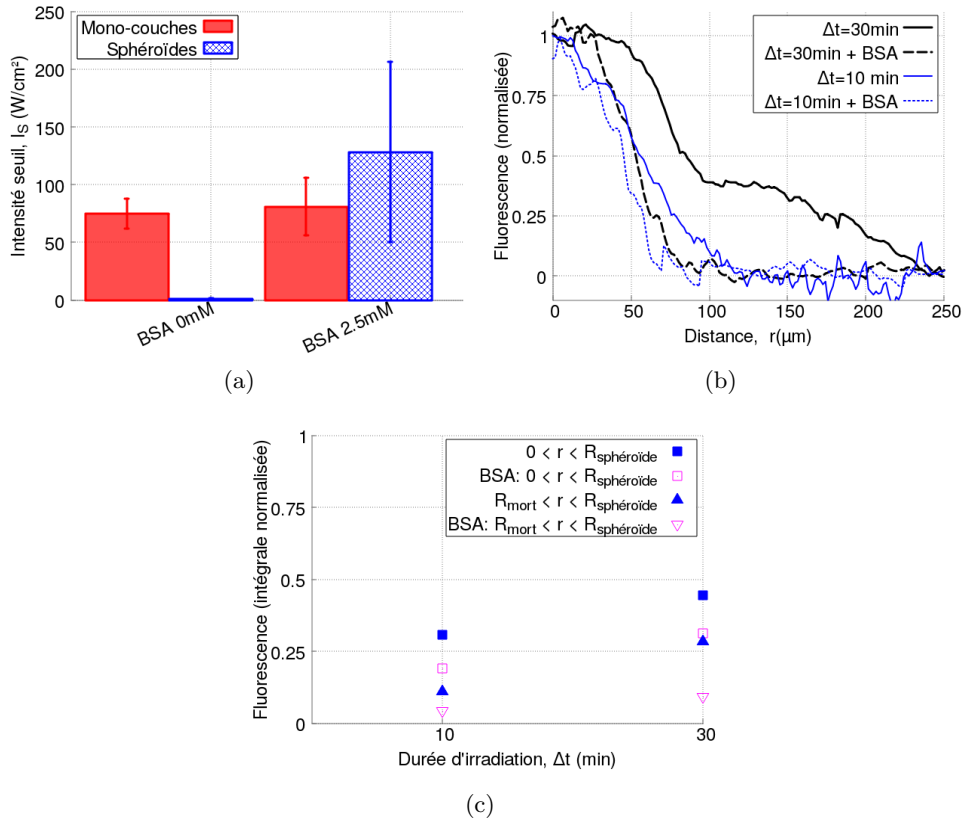


FIGURE 2.22 – **Mort cellulaire avec et sans 3mM de BSA.** La BSA est un désactivateur extra-cellulaire d' $^1\text{O}_2$. **Figure (a)** Intensité seuil I_S en mono-couches (2D) et sphéroïdes (3D), irradiés 30 minutes. Sans BSA, les sphéroïdes sont moins résistants que les mono-couches ($I_S(2D) \gg I_S(3D)$). En présence de BSA, $I_S(2D) \sim I_S(3D)$. Barres d'erreur : écart-types ($10 < n < 15$ par point de mesure). **Figure (b)** Profil d'intensité de fluorescence de sphéroïdes irradiés avec et sans BSA. La présence de BSA réduit fortement la mort dans la zone périphérique. Pour $r > 100 \mu\text{m}$, la mort cellulaire atteint le niveau basal. **Figure (c)** Intégrale normalisée du profil d'intensité de fluorescence, sur le sphéroïde entier et dans la zone périphérique, avec et sans BSA, pour des durées d'irradiation Δt de 10 et 30min.

2.3.5.3 $^1\text{O}_2$ extra-cellulaire initiateur de mort cellulaire

Au vu de ces résultats, nous concluons qu'une grande partie de la différence de mort entre mono-couches et sphéroïdes est due à des dommages initiés par de l' $^1\text{O}_2$ produit à l'extérieur des cellules. La durée de demi-vie de $^1\text{O}_2$ est trop faible pour expliquer de la mort cellulaire à plus d'une centaine de microns de l'axe du laser, nous émettons donc l'hypothèse que $^1\text{O}_2$ réagit dans le milieu cellulaire pour former des espèces toxiques, à durée de vie plus longue. Enfin, la BSA n'a pas un effet important en mono-couches. Cela suggère que l'oxygène singulet extra-cellulaire à l'origine de dommages est généré dans l'espace inter-cellules et non à l'extérieur du sphéroïde.

L'espace inter-cellules a été imagé par T.T Goodman *et al.*^[170], révélant des pores de quelques microns entre les cellules. Nous avons estimé la densité de nos sphéroïdes à environ 0.6, donc 40% du volume des sphéroïdes est de l'espace inter-cellules.

2.3.5.4 Concentration cumulée seuil en mono-couches et en sphéroïdes.

En supprimant à l'aide de BSA la contribution de l'oxygène singulet extra-cellulaire à la mort, nous mesurons une intensité seuil en mono-couches légèrement inférieure à l'intensité

seuil en sphéroïdes (facteur 1.8 pour une durée d'irradiation de $\Delta t=30\text{min}$ et 1.3 à $\Delta t=10\text{min}$). Le taux de production d'oxygène singulet dépend de l'intensité et de la concentration en dioxygène. La concentration en dioxygène en surface des sphéroïdes et des mono-couches dépend du coefficient de réaction K_{ox} de l'oxygène singulet avec le milieu extra-cellulaire.

Nous retrouvons un facteur 1.3-1.5 sur la concentration en dioxygène pour $2 \times 10^5 \text{s}^{-1} < K_{ox} < 2 \times 10^7 \text{s}^{-1}$ (simulations numériques dans l'annexe C.2). La différence de concentration en dioxygène pourrait donc expliquer entièrement la différence d'intensité seuil. La concentration cumulée seuil associée à la mort mesurée en présence de BSA pour des mono-couches vaut 2-3.5mM (en fonction de la concentration en dioxygène et donc du coefficient de réaction K_{ox} de l'oxygène singulet dans l'espace extra-cellulaire). Toutefois, au vu des écarts types de mesure, l'écart entre les intensités seuil n'est pas statistiquement significatif et nous ne pouvons pas conclure sans expériences complémentaires sur la valeur de K_{ox} .

2.4 Conclusion et perspectives

2.4.1 Conclusion

Dans ce chapitre, nous avons irradié des cellules MCF-7 cultivées en mono-couches et des sphéroïdes de 150-450 μm de diamètre avec un laser à 1270nm, afin de générer de l'oxygène singulet par photo-activation directe du dioxygène. Nous avons mesuré la mort cellulaire, et identifié la présence de deux zones de mort dans les sphéroïdes : une zone à proximité de l'axe laser, dite "zone centrale" dans laquelle la totalité des cellules irradiées sont mortes, et une zone périphérique, dans laquelle seule une fraction des cellules meurent. Nous avons estimé la concentration en dioxygène et simulé la propagation de la lumière dans des sphéroïdes afin d'estimer de manière quantitative le taux de production d'oxygène singulet. Au vu des quantités d'oxygène singulet produites dans la zone périphérique (inférieures de plus de six ordres de grandeurs aux seuils d'oxygène singulet toxiques en mono-couches) la mort cellulaire ne peut être attribuée à l'oxygène singulet seul.

L'ajout d'un désactivateur extra-cellulaire de $^1\text{O}_2$ permet de mesurer en surface de sphéroïdes de la mort comparable à la mort en mono-couches. Nous avons ainsi identifié une contribution de l'oxygène singulet extra-cellulaire à la mort cellulaire incompatible avec les propriétés de diffusion de l'oxygène singulet. Nous attribuons par conséquent cette contribution à une ou plusieurs espèces produites par $^1\text{O}_2$ dans les espaces inter-cellules. Dans le chapitre 3, nous confirmons l'existence cet effet "extra-cellulaire" et cherchons à identifier la ou les espèces chimiques impliquées. Nous allons mettre en place un protocole d'irradiation qui limite au maximum la génération intra-cellulaire d'oxygène singulet afin de n'étudier que la mort initiée par une source extra-cellulaire d' $^1\text{O}_2$.

En supprimant la mort cellulaire initiée par $^1\text{O}_2$ généré en dehors des cellules, nous nous plaçons dans des conditions de traitement plus proches de la PDT. Rappelons les trois conclusions principales d'études de la littérature de la PDT^[27-31] comparant la réponse de sphéroïdes et mono-couches à une même irradiation (même intensité laser et durée d'irradiation), que nous avons présenté en début de chapitre :

- 1) *La mort des cellules à un stress oxydant est fortement conditionnée (plus d'un ordre de grandeur d'écart sur les doses létales) par le type cellulaire et la nature du photo-agent utilisé.* Nous n'avons étudié que la réponse de cellules MCF-7 à un stress oxydant et ne pouvons donc pas apporter de nouveaux éléments sur le sujet. Il serait pertinent d'étendre notre étude à plusieurs lignées cellulaires afin de comparer la variabilité observée en PDT

et par photo-production directe. L'absence de variabilité liée à la nature des photo-agents nous encourage à penser que la variabilité serait plus faible.

- 2) *Les sphéroïdes sont globalement plus résistants que les cellules cultivées en mono-couches. c'est-à-dire qu'à traitement équivalent (même photo-agent, même concentration de photo-agent incubée avec les cellules, même intensité laser et durée d'irradiation), la fraction de cellules mortes obtenues dans des sphéroïdes est plus faible que la fraction de cellules mortes en mono-couches.* A traitement équivalent, la concentration cumulée d'oxygène singulet générée dans les cellules n'est pas la même qu'en mono-couches. Nous trouvons une concentration cumulée seuil létale en mono-couches et en surface des sphéroïdes similaire, de l'ordre de 2 à 3.5mM. Ainsi, nous proposons que l'organisation des cellules en sphéroïdes ne modifie pas de manière significative les propriétés anti-oxydantes des cellules de surface par rapport aux cultures en mono-couches.
- 3) *La résistance augmente avec le diamètre du sphéroïde.* Cette conclusion est une conséquence directe des gradients en dioxygène et des propriétés optiques des sphéroïdes. Plus le diamètre est grand, plus à traitement équivalent, la concentration cumulée d'oxygène singulet moyenne générée dans le sphéroïde est faible. La concentration en dioxygène dans les sphéroïdes est fonction de deux paramètres à la valeur exacte inconnue : le coefficient de diffusion D_{O_2} du dioxygène dans les sphéroïdes et la constante de réaction K_{ox} dans les cellules qui caractérise toutes les réactions impliquant 1O_2 dont 3O_2 n'est pas le produit (ces réactions participent ainsi à la déplétion en dioxygène). D_{O_2} notamment a un impact fort sur la concentration en dioxygène. Nous ne pouvons pas conclure à ce jour sur une éventuelle hétérogénéité de réponse à une même quantité d' 1O_2 entre les cellules en surface et les cellules au centre du sphéroïde. Il serait pertinent de mesurer la concentration en dioxygène^[128] pendant l'irradiation des sphéroïdes afin de déterminer si la différence de mort entre sphéroïdes et mono-couches lors d'un traitement est exclusivement due aux propriétés physico-chimiques des sphéroïdes (diffusion du dioxygène et propriétés de propagation de la lumière dans les tissus), ou si les capacités anti-oxydantes des cellules diffèrent en fonction de leur position dans un sphéroïde, et ainsi de la concentration en dioxygène et/ou en nutriments à laquelle elles ont accès.

2.4.2 Intérêt de la photo-excitation directe du dioxygène

La génération d'oxygène singulet par photo-excitation directe du dioxygène présente des avantages et des inconvénients (synthétisés dans la [tableau 2.2](#)) par rapport à l'excitation de photo-agents. La mise en évidence de mort initiée par de l'oxygène singulet généré dans l'espace inter-cellules, espace inexploité en PDT, ajoute un intérêt à la photo-excitation directe.

Photo-excitation directe et dosimétrie. Une des difficultés majeures liées à la dosimétrie en PDT est la variabilité biologique. Les interactions des photo-agents avec les cellules sont complexes et difficiles à quantifier. La comparaison de la mort initiée par l'oxygène singulet généré à l'intérieur des cellules par photo-excitation directe et en présence de PS pourrait servir d'outil pour caractériser les interactions entre photo-agents, dioxygène et cellules vivantes.

Photo-excitation directe et thérapies. Au vu des résultats obtenus, nous pouvons estimer les conditions d'irradiation nécessaires pour détruire une tumeur superficielle de 0.5mm de diamètre par photo-excitation directe. Prenons un faisceau laser gaussien à 1270nm également de 0.5mm de diamètre. *In vivo*, sur des modèles murins^[20;36], la concentrations cumulées seuil $[^3O_2]_C$ mesurée vaut 0.1 à 1mM, soit jusqu'à dix fois moins que pour des sphéroïdes *in vitro*. La concentration en dioxygène dans les tumeurs *in vivo* est de plus 2 à 20 fois^[187] inférieure que

	Photo-excitation directe (1270nm)	PDT
Espèces produites*	$^1\text{O}_2$	$^1\text{O}_2$, O_2^- et radicaux.
Estimation de la production d' $^1\text{O}_2$	plus facile	difficile
Rendement	faible, $\sigma \sim 10^{-23} \text{ cm}^2$	plus élevé, $\sigma \sim 10^{-17}-10^{-15} \text{ cm}^2$
Sources de variabilité biologique	cellules	cellules + interactions PS/cellules
Toxicité des photo-agents (PS)	Non	Oui
Taux de production $\Gamma_{^1\text{O}_2}$	tissus sains > tumeurs ($[^3\text{O}_2]$)	tumeurs > tissus sains ([PS])
Effet thermique	Oui**	Non
Génération d' $^1\text{O}_2$	intra- et extra-cellulaire	intra-cellulaire, contraint par PS

TABLE 2.2 – **Table récapitulative des caractéristiques de la photo-excitation directe du dioxygène et de la PDT.** *Production d'espèces directement liée à l'apport de lumière ou au photo-agent. Les espèces produites peuvent ensuite réagir pour former d'autres espèces. **La photo-excitation directe à 765nm permet de contourner cet effet.

dans des sphéroïdes irradiés dans une atmosphère à 21% d'oxygène. Prenons donc une valeur $[^3\text{O}_2]_C = 1\text{mM}$ et $[^3\text{O}_2] = 52\mu\text{M}$ (5%). Afin de limiter les effets thermiques, la puissance laser est limitée à 300mW.

En l'absence de dommages initiés par de l'oxygène singulet extra-cellulaire, la concentration cumulée nécessaire pour tuer 100% des cellules de la tumeur est de l'ordre de 1h. En présence des dommages extra-cellulaires, l'intensité seuil est réduite à environ 20 min. De plus, une fraction des cellules à plus longue portée (plusieurs centaines de micromètres) meurent également. 20 minutes est un temps relativement long par rapport aux durées d'exposition classiques utilisées en PDT *in vivo* (0.5-10min), qui ne peut être réduit qu'en augmentant la puissance et donc les effets thermiques (et la déplétion en dioxygène). Néanmoins, la génération d'oxygène singulet extra-cellulaire pourrait avoir des avantages *in vivo* qui compensent les temps d'irradiation longs.

Remarquons que la transition du dioxygène à 765nm ($^3\text{O}_2 + h\nu_{765\text{nm}} \rightarrow \text{O}_2[{}^1\Sigma_g^+]$) produit également de l'oxygène singulet mais ne provoque pas une augmentation de la température aussi importante qu'une irradiation à 1270nm. En effet le coefficient d'absorption à 765nm des cellules, assimilées à de l'eau, est de 0.02 cm^{-1} , à comparer à 1.1 cm^{-1} pour 1270nm^[152], soit plus de 50 fois plus faible. Dans l'eau, l'efficacité de la transition du dioxygène à son état singulet à 765nm est réduite d'un facteur 1.5^[8] par rapport à 1273nm, soit une différence suffisamment faible pour, à taux de production d' $^1\text{O}_2$ égale, ne pas provoquer d'effets thermiques. La comparaison de la réponse des cellules à une même quantité d' $^1\text{O}_2$ générée par photo-excitation directe du dioxygène à 1270nm (stress oxydant + stress thermique) et 765nm (stress oxydant uniquement) pourrait en outre permettre d'étudier la synergie entre stress oxydant et stress thermique^[154-157]. A.S. Yusupov *et al.*^[9] ont détruit une tumeur de la peau chez une patiente par excitation directe du dioxygène à 1262nm. La contribution des effets thermiques à la mort des cellules n'a pas été évaluée dans l'étude mais l'hypothèse d'une synergie avec le stress oxydant ne peut être exclue. Il est ainsi également possible que la production d'effets thermiques se révèlent un atout pour le traitement des tumeurs^[154].

Enfin, les photo-agents s'accumulent principalement dans les tumeurs, favorisant la destruction sélective des tumeurs en PDT, tandis que la génération optique directe favorise la production d' $^1\text{O}_2$ dans les cellules à concentration plus élevée de dioxygène^[187], c'est-à-dire les tissus sains. Ainsi, la génération optique directe permet de s'affranchir des éventuels effets secondaires liés à l'introduction de photo-agents dans l'organisme, mais elle provoque également la mort des tissus sains irradiés.

Chapitre 3

A la recherche d'espèces toxiques secondaires générées par $^1\text{O}_2$

Nous avons mesuré dans le chapitre précédent de la mort cellulaire à longue portée initiée par $^1\text{O}_2$ dans des sphéroïdes irradiés avec un laser à 1270nm. A de telles distances de l'axe du faisceau laser, la concentration d'oxygène singulet générée dans les cellules est plus de six ordres de grandeur en dessous du seuil de toxicité mesuré pour des cellules cultivées en mono-couches. Cette mort à longue portée disparaît en présence de sérum d'albumine de bœuf (BSA), un désactivateur de l'oxygène singulet qui a une action exclusivement extra-cellulaire (contrairement à d'autres désactivateurs de $^1\text{O}_2$ communément utilisés comme l'azide de sodium NaN_3). Ainsi, nous proposons que l'oxygène singulet généré dans l'espace extra-cellulaire réagit pour produire une ou plusieurs espèces toxiques, que nous appellerons "espèces secondaires", responsables de la mort à longue portée. Nous distinguons dommages directs, c'est-à-dire les effets cyto-toxiques provoqués par une réaction directe de $^1\text{O}_2$ avec les cellules, des dommages indirects initiés par $^1\text{O}_2$ à attribuer à une ou plusieurs espèces secondaires.

Dans un premier temps, nous allons générer de l'oxygène singulet en focalisant un laser 1270nm à l'extérieur de cellules vivantes cultivées en mono-couches et mesurer la fraction de cellules mortes en fonction de la distance des cellules à l'axe du faisceau laser. Une fraction de cellules mortes supérieure à la mort cellulaire observée sans génération de $^1\text{O}_2$ est mesurée jusqu'à $35\mu\text{m}$ du laser. Nous montrons que le taux de production d'oxygène singulet est trop faible pour provoquer directement la mort des cellules à plus de $10\mu\text{m}$ de l'axe du faisceau, et que la mort mesurée est donc à attribuer à des espèces secondaires.

Dans un second temps, nous souhaitons identifier les produits de l'oxygène singulet. En irradiant les cellules en présence d'un flux, nous mettons en évidence que la formation des ERO secondaires ne requiert pas de composés organiques, et que leur durée de demi-vie est inférieure à la seconde. Des désactivateurs d'ERO sont enfin utilisés dans le but d'identifier quelles ERO extra-cellulaires sont à l'origine de la mort cellulaire mesurée.

3.1 Introduction

Nous ne sommes pas les premiers à nous intéresser aux effets sur les cellules d'une dose extra-cellulaire d' $^1\text{O}_2$ générée par photo-excitation directe du dioxygène. Le groupe de P.R. Ogilby^[23;53;188] notamment, a montré la présence de dommages (et, à dose suffisante, de mort cellulaire) suite à une irradiation avec un laser à 765nm focalisé à quelques microns des membranes des cellules. Rappelons que 765nm permet d'exciter directement le dioxygène à un son second état singulet ($^3\text{O}_2 + h\nu_{765\text{nm}} \rightarrow \text{O}_2[^1\Sigma_g^+]$) et que la conversion au premier état singulet, responsable des effets cytotoxiques ($\text{O}_2[^1\Sigma_g^+] \rightarrow \text{O}_2[^1\Delta_g]$) est quasiment instantanée (\sim ps).

Ainsi, les effets d'une excitation à 765nm sont a priori similaires à ceux d'une excitation de l'oxygène à 1270nm. Dans les travaux de P.R. Ogilby *et al.*, les dommages sont toutefois attribués à l'oxygène singulet seul. Les résultats obtenus suite à l'irradiation de sphéroïdes nous encourageant à revoir cette affirmation.

Afin de mettre en évidence la présence d'espèces chimiques secondaires, responsables de dommages indirects initiés par l'oxygène singulet extra-cellulaire, nous devons mettre en place une expérience d'irradiation et établir une liste d'espèces secondaires potentielles au vu des mécanismes de réaction existants identifiés dans la littérature.

3.1.1 Génération extra-cellulaire de $^1\text{O}_2$ par photo-excitation directe du dioxygène à 1270nm.

Afin d'éprouver l'hypothèse de la production d'espèces toxiques par l'oxygène singulet dans le milieu extra-cellulaire, nous devons mettre en place une expérience qui minimise la production intra-cellulaire d' $^1\text{O}_2$ et maximise la production extra-cellulaire. Le faisceau laser est focalisé à la limite de la diffraction (waist $\omega=0.64\ \mu\text{m}$, mesuré en [annexe B](#)) et localisé à l'extérieur de cellules cultivées en mono-couches ([figure 3.1](#)). La majorité de l'oxygène singulet est produit dans un volume de quelques micromètres cube. Ainsi, les éventuelles ERO secondaires sont également générées dans ce volume restreint et leur concentration est proportionnelle à la distance à l'axe du faisceau laser. La mesure de la fraction de cellules mortes en fonction de la distance au laser permettra par conséquent d'estimer les concentrations toxiques d'ERO secondaires.

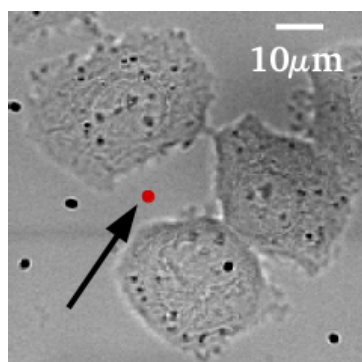


FIGURE 3.1 – **Image d'une mono-couche de cellules MCF-7.** Point rouge : faisceau laser gaussien de waist $\omega_0=0.64\ \mu\text{m}$. Le laser est focalisé à l'extérieur des cellules.

Jusqu'à présent, les cellules ont été irradiées dans un milieu de culture DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) supplémenté de sérum foetal de veau, L-glutamine et antibiotiques (pénicilline et streptomycine), qui assure la survie et la prolifération de cellules MCF-7. Le DMEM est un milieu chimiquement complexe^[189] contenant, entre autres, du glucose, des sels, des acides aminés, du pyruvate et des vitamines. Le sérum foetal de veau contient de plus des facteurs de croissance (ions, protéines, hormones) propices à la prolifération des cellulaires. Certains de ces composés, par exemple le pyruvate^[190], ont des propriétés anti-oxydantes. Nous souhaitons limiter le nombre de composés chimiques présents dans le milieu extra-cellulaire pendant l'irradiation, afin de limiter les possibilités de réaction de $^1\text{O}_2$. Pendant l'irradiation, les cellules sont donc cultivées dans une solution tampon phosphate saline (PBS), ce qui restreint le nombre de réactions potentielles auxquelles peut prendre part l'oxygène singulet.

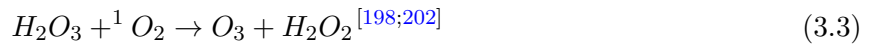
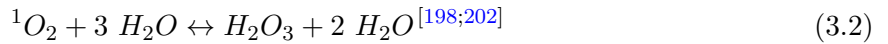
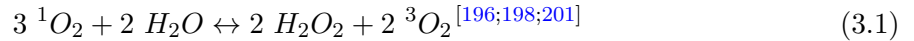
3.1.2 ERO potentiels produits de l'oxygène singulet

Les cellules sont irradiées dans une solution tampon phosphate saline (PBS), à pH=7.4. Nous avons établi une liste de produits de réaction possibles de l'oxygène singulet dans le PBS à partir de la littérature.

Composition du PBS. Le PBS^[191] est composé de sels et d'ions à base de phosphate (concentrations d'ions phosphate $[H_2PO_4^-]=1.5\text{mM}$, et $[HPO_4^{2-}]=8\text{mM}$), de sodium, potassium, chlore ($[Cl^-]=130\text{mM}$), calcium, et magnésium, dilués dans de l'eau. Les cellules sont irradiées dans une atmosphère constituée à 75% de N_2 , 21% de O_2 , et 5% de CO_2 , et à une température de 25 °C. A saturation, les concentrations de gaz atmosphériques dilués dans le PBS sont de $[O_2] = 0.25\text{mM}$ et $[N_2]=0.5\text{mM}$ ^[62]. Le CO_2 gazeux dissous forme diverses espèces aqueuses, notamment H_2CO_3 , HCO_3^- et CO_3^{2-} . La concentration totale en carbone inorganique dissous est de l'ordre de 10 μM .

En plus des éléments du PBS et des gaz atmosphériques dissous, des protéines^[192] et des ERO^[193;194] sont sécrétées dans le milieu extra-cellulaire par les cellules, et peuvent atteindre des concentrations de l'ordre du micro-molaire à proximité des membranes des cellules. Des débris cellulaires, attirés dans l'axe du laser qui a un effet de pince optique, peuvent également être une source de composés organiques dans le milieu extra-cellulaire.

ERO potentiels et propriétés. Cinq espèces réactives de l'oxygène : H_2O_2 , $HO\cdot$, O_3 , H_2O_3 , O_2^- , ont été identifiées comme produits de réaction potentiels de 1O_2 . Le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) est plus fréquemment considéré comme source^[195–197] d'oxygène singulet, il a néanmoins été identifié comme produit de réaction de l'oxygène singulet en présence d'ascorbate^[78]. La production de H_2O_2 à partir de 1O_2 et H_2O est théoriquement possible^[198;201] (équation (3.1)), mais n'a pas été mesurée expérimentalement. Le radical hydroxyle $HO\cdot$ est un produit de la réaction entre 1O_2 et des phénols, ou entre 1O_2 et des biomolécules NADPH^[81;82]. Des mécanismes de formation dans l'eau de l'ozone, O_3 , et du trioxydane (aussi appelé sesquioxyde d'hydrogène), H_2O_3 , à partir de 1O_2 ^[198;202], au cours d'une réaction catalysée par des anticorps, ont également été validés théoriquement (équation (3.2), équation (3.3)). Néanmoins, à notre connaissance, aucune mesure expérimentale de H_2O_3 dans le but de montrer sa génération par 1O_2 n'a été effectuée à ce jour. Enfin, la génération d'anion superoxyde O_2^- à partir de 1O_2 requiert la présence de donneurs d'électrons (équation (3.4)). Parmi ceux identifiés expérimentalement^[79;80], on trouve des amines, azides, phénols et sulfides. Certains de ces composants sont présents dans les cellules et pourraient être libérés dans le milieu extra-cellulaire.



Certaines ERO déclenchent des réactions en chaîne, également source de ERO : la dégradation de l'ozone dans l'eau, par exemple, produit de nombreux radicaux^[203;204] dont $HO\cdot$ et O_2^- qui deviennent par la suite réactifs à leur tour. Le [tableau 3.1](#) rassemble les produits potentiels de 1O_2 . Leur propriétés sont décrites ci-dessous.

Espèce	$\tau_{1/2}$	Ordre	Désactivateur	Concentration létale
H ₂ O ₂ [78]	>24h	1	Catalase [205–207]	0.5mM pour $\Delta t=2h$
HO· [81;82]	0.1ms** pour 1 μM [213]	2	KI [208;209]	2nM [210] ($\Delta t=24h$), 1 μM [213] ($\Delta t=1min$)
O ₃ [202;214–216]	$\sim 5min$ *** [217;218]	1	KI [219]	0.2mM [220] ($\Delta t=5min$), 0.5mM ($\Delta t \sim min$) [215]
H ₂ O ₃ [198;199]	20ms* [200]	1	Pyridine [200]	?
O ₂ ⁻ [79;80]	25ms* pour 100 μM [221]	2	Superoxyde Dismutase [221]	1 μM ($\Delta t=24h$) [222], 2 μM ($\Delta t=6h$) [223]

TABLE 3.1 – **Table des ERO secondaires, produits potentiels de réaction de l’oxygène singulet dans du PBS.** La colonne "ordre" se réfère à l’ordre de la réaction de dégradation des espèces dans le PBS. $\tau_{1/2}$: durée de (première) demi-vie mesurée dans du PBS à 25 °C et pH=7.4, ou dans (*) de l’eau distillée, (**) de l’eau dé-ionisée, (***) eau & solutions tampon phosphatées à pH=7.4. Concentration toxique : ordre de grandeur de la concentration extra-cellulaire requise pour obtenir une fraction de cellules mortes de 50% (mort mesurée généralement 24h après l’exposition) lors d’une exposition de durée Δt (expériences *in vitro* sur des cellules humaines ou de mammifères).

3.1.2.1 Demi-vie et ordre de réaction

La durée de demi-vie, $\tau_{1/2}$, des espèces chimiques peut être indépendante (dégradation d’ordre 1) ou dépendante (dégradation d’ordre 2) de leur concentration. Toutes les espèces considérées sont des molécules de petite taille, de coefficient de diffusion $D \sim 2 \times 10^{-9} \text{ m}^2 \text{ s}^{-1}$ dans le PBS. Il leur faut donc environ 100ms pour parcourir une distance de 15 μm .

Certaines durées de demi-vie de la littérature citées ont été mesurées dans de l’eau et non du PBS et sont donc sur/sous-estimées. La décomposition de l’ozone, notamment, est ralentie par la présence d’ions phosphate [204] qui réagissent avec HO·, un de ses produits de réaction. La demi-vie de l’ozone est donc potentiellement plus longue dans le PBS.

HO·, en plus de réagir avec les ions phosphates, a une durée de demi-vie de 0.1ms dans l’eau lorsqu’il est présent à des concentrations toxiques (1 μM pour une irradiation de 1 min). Pour atteindre une demi-vie de l’ordre de 100ms, il faudrait une concentration de $\sim 1 \text{ nM}$, en supposant que sa durée de demi-vie ne soit pas réduite dans le PBS. Ces concentrations sont a priori inférieures aux concentrations létales.

3.1.2.2 Concentrations létales

Nous avons cherché dans la littérature des valeurs de concentrations dites "létales" d’ERO correspondent à la concentration à laquelle une lignée donnée de cellules humaines ou de mammifères doit être exposée *in vitro* pendant une durée Δt afin d’obtenir une fraction de cellules mortes de 50 %. Dans ce chapitre, nous irradiions les cellules dans du PBS pendant une durée $\Delta t=10 \text{ min}$. Afin d’estimer l’ordre de grandeur de la concentration létale dans nos conditions d’irradiation, nous devons estimer l’impact de la durée d’exposition sur la concentration létale.

Concentration létale, cas de H₂O₂

Ma collègue D. Simiuc (doctorante au PhLAM) a mesuré une durée de demi-vie $> 24h$ de H₂O₂ dans du PBS, pour des concentrations de 1 à 100 μM . Ma collègue A. Pruvost (Ingénieur d’études au PhLAM) a mesuré la fraction de cellules MCF-7 cultivées en mono-couches mortes

suite à l'exposition pendant 2h à différentes concentrations de H₂O₂ extra-cellulaire (ajouté à du milieu de culture DMEM sans pyruvate). La mort des cellules est mesurée 24h après irradiation. Pour [H₂O₂] = 10 et 100 µM respectivement, la fraction de cellules mortes atteint 0.05 et 0.5, 24h après exposition.

Des expériences similaires ont été faites sur des cellules MCF-7 dans la littérature [224;225] avec des résultats du même ordre de grandeur. Un modèle de toxicité de H₂O₂ en fonction de la durée d'exposition et de la concentration a été proposé par M. Gulden *et al.* [226] pour des cellules de la lignée C6 (cellule tumorale du cerveau -gliome- de rat). Ce modèle propose une loi de proportionnalité entre concentration létale C₅₀ et durée d'exposition t (en heures) (équation (3.5)). La concentration létale C₅₀ correspond à une Fraction de Cellules Mortes (FCM) de 0.5.

$$C_{50}(t) = C_{50,\infty} + kt^{-n}, \quad (3.5)$$

avec n=1.5, k=480 µM/h et C_{50,∞}=26 µM. Le coefficient k est lié aux capacités d'élimination de H₂O₂ par les cellules, par la mobilisation de mécanismes antioxydants. Pour une irradiation de 2h, la concentration létale de H₂O₂ est ainsi de 195 µM. Au vu de la différence entre les lignées cellulaires, un écart d'un facteur 2 avec les valeurs mesurées pour MCF-7 n'est pas surprenant. Pour une irradiation de 10min, on trouve une concentration létale de 7mM, 35 fois plus que pour une irradiation de 2h. Ainsi, on peut estimer que, dans nos conditions d'irradiation, une concentration de H₂O₂ >1mM est requise pour obtenir une fraction de cellules mortes de 0.5.

Concentration létale pour une durée d'exposition de 10 minutes

Au vu du modèle de toxicité de H₂O₂, nous estimons un ordre de grandeur de toxicité associé à une durée d'exposition des cellules de 10 minutes, en faisant l'hypothèse que la toxicité évolue selon une loi puissance en 1 < n < 1.5. Les résultats sont présentés tableau 3.2. En plus des incertitudes liées aux estimations, les différences expérimentales entre les études de la littérature (lignée cellulaire, milieu de culture, présence éventuelle d'un flux, etc.) et nos expériences nous imposent de considérer ces valeurs avec précaution.

Espèce	C ₅₀ (exposition de 10min)
¹ O ₂ (intra-cellulaire)	0.01nM
H ₂ O ₂	>1mM
HO·	0.1 µM
O ₃	100 µM
H ₂ O ₃	?
O ₂ ⁻	50-300 µM

TABLE 3.2 – **Estimation des concentration létales d'ERO extra-cellulaires.** La fraction de cellules mortes suite à une exposition de 10 minutes à une concentration de ERO extra-cellulaire C₅₀ est de 0.5.

Remarquons que la concentration toxique C₅₀ = 0.01nM de ¹O₂, liées aux dommages directs de ¹O₂ (génération intra-cellulaire), mesurée dans le chapitre précédent pour une exposition de 10min, est 10⁴ fois plus faible que la concentration toxique extra-cellulaire de la seconde ERO la plus toxique considérée (HO·).

Concentrations des ERO secondaires

Il s'agit enfin de déterminer si les concentrations létales estimées sont compatibles avec les concentrations produites lors des irradiations effectuées.

Faisons l'hypothèse que l'oxygène singulet est le réactif limitant dans la production de ERO secondaires et que les réactions peuvent être caractérisées par une constante de réaction du premier ordre K_{ox} (en s^{-1}). Le taux de production (en mol/L/s) d'une ERO secondaire dépend donc du taux de production Γ d'oxygène singulet et de K_{ox} (équation (3.6)). Γ est lui-même proportionnel à la concentration en dioxygène dans le milieu extra-cellulaire (équation (3.8)).

$$\frac{d[{}^1O_2]}{dt} = D\nabla^2[{}^1O_2] + \Gamma - K[{}^1O_2] - K_{ox}[{}^1O_2] \quad (3.6)$$

$$\Gamma = \frac{\sigma_{1270}}{h\nu_{1270}} [{}^3O_2] I \quad (3.7)$$

$$\frac{d[{}^3O_2]}{dt} = D\nabla^2[{}^3O_2] - \Gamma + K[{}^1O_2] \quad (3.8)$$

Dans de l'eau pure, l'oxygène singulet se désexcite avec un coefficient de réaction $K = \ln(2)/\tau_{1/2} = 1.98 \times 10^5 s^{-1}$, avec $\tau_{1/2} = 3.5 \mu s$ le temps de demi-vie de l'oxygène singulet. Le ratio entre K et K_{ox} détermine la fraction de molécules d'oxygène qui réagissent dans le PBS pour former des ERO secondaires. Pour $K_{ox} = 0$, l'oxygène a la même réactivité dans le PBS que dans l'eau pure. Dans le cas le plus favorable à la production de ERO, $K \ll K_{ox}$: quasiment tout l'oxygène singulet réagit pour produire des ERO secondaires.

Nous avons simulé numériquement les profils de concentrations d'ERO secondaires (annexe C) en fonction de K_{ox} . La concentration de ERO maximale est atteinte (à 1% près) lorsque $K_{ox} = 2 \times 10^7 s^{-1}$. Elle dépend de la demi-vie dans le PBS de l'ERO considérée et ne dépasse jamais $[ERO]_{max} = 50 \mu M$. Cette concentration maximale est a priori trop basse pour observer de la mort cellulaire provoquée par H_2O_2 . Des expériences complémentaires permettront de le confirmer.

3.1.2.3 Désactivateurs d'ERO

La colonne "désactivateurs" du tableau 3.1 répertorie des molécules qui réagissent avec l'ERO associée. Les constantes de réaction entre ERO et désactivateurs sont données dans la section dédiée aux désactivateurs. Des désactivateurs seront ajoutés au PBS dans le but d'identifier les ERO secondaires responsables de la mort des cellules : si, en présence d'un désactivateur, la fraction de cellules mortes (FCM) diminue, la toxicité peut être attribuée à l'ERO désactivée.

3.2 Protocoles et Méthodes

3.2.1 Dispositif expérimental et expérience d'irradiation

Les cellules sont cultivées en mono-couches et irradiées dans les mêmes conditions que dans le chapitre précédent (figure 3.2a), hormis le grossissement de l'objectif du microscope. La focalisation du laser à travers un objectif 60X à forte ouverture numérique (Nikon, ON=1.4, immersion à huile) permet d'obtenir un faisceau de waist $\omega = 0.64 \mu m$, dit "focalisé". Près de 50% de l'oxygène singulet produit est contenu dans un volume de $(2 \times 2 \times 2) \mu m^3$ centré sur le point de focalisation du laser, et plus de 75% dans un volume de $(4 \times 4 \times 4) \mu m^3$. Nous pouvons ainsi irradier à proximité des cellules en limitant fortement la concentration d'oxygène singulet générée à l'intérieur des cellules. Un schéma à l'échelle de l'expérience est présenté figure 3.2b.

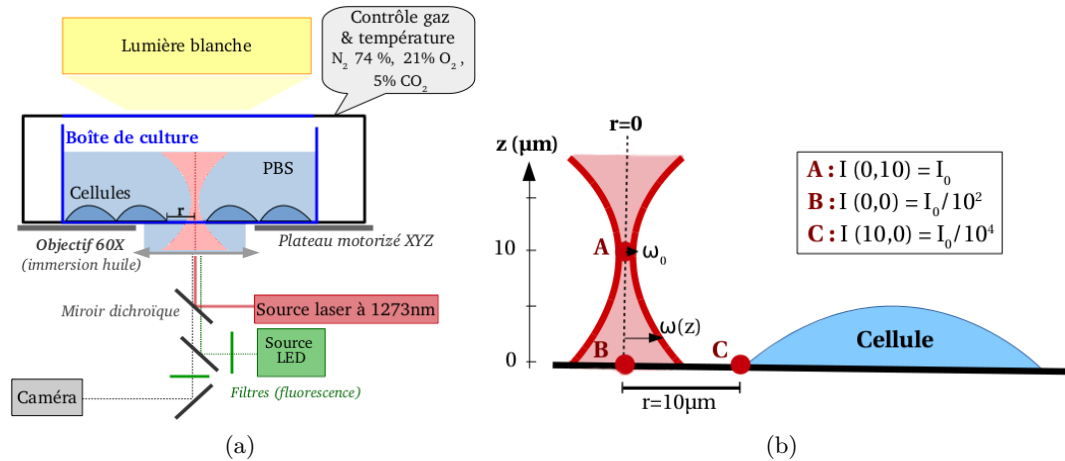


FIGURE 3.2 – **Schéma expérimental pour la réalisation d’une source de production extra-cellulaire d’ $^1\text{O}_2$.** Figure (a) Des cellules MCF-7 (cellules humaines cancéreuses du sein) sont cultivées en mono-couches, et irradiées avec un laser 1270nm à faisceau gaussien. La mort cellulaire est caractérisée par le marqueur CellTox Green (Ex/Em : 480nm/530nm). La boîte de culture est intégrée à un incubateur qui maintient les cellules à 37°C dans une atmosphère contrôlée (21% O_2 , 5% de CO_2 et 74% de N_2) afin de suivre les cellules irradiées par imagerie (en lumière directe et par fluorescence) sur plusieurs jours. L’incubateur est lui-même placé sur un plateau de microscope XYZ automatisé, qui permet d’irradier et d’imager de multiples champs de cellules sur une même boîte de culture. (b) Schéma à l’échelle de l’expérience d’irradiation. La distance r laser-cellule est définie comme la distance entre l’axe du faisceau laser et la membrane de la cellule. Les cellules sont irradiées dans du PBS. Le taux de production de $^1\text{O}_2$ est proportionnel à l’intensité $I(r,z)$ laser. $I_0=7.7\text{kW}/\text{cm}^2$ pour une puissance laser $P=50\text{mW}$.

Les cellules sont irradiées pendant $\Delta t=10\text{min}$ à une puissance laser $P=50\text{mW}$. Le laser est focalisé $z=10\mu\text{m}$ au dessus de l’interface verre/milieu de la boîte de culture. Une position $z=10\mu\text{m}$ garantit que le point de focalisation est bien dans le milieu extra-cellulaire. De plus, les cellules font $\sim 5\mu\text{m}$ de hauteur, et nous souhaitons focaliser le laser légèrement au dessus des cellules afin de limiter un éventuel effet d’écrantage entre cellules.

3.2.2 Dispositif d’irradiation sous flux

Une expérience d’irradiation des cellules sous flux est mise en place afin d’évaluer le temps de demi-vie des ERO secondaires et de préciser le mécanisme de leur production. En effet, la concentration des ERO secondaires potentielles à durée de demi-vie longue est réduite en présence d’un flux, contrairement à celle des ERO secondaires potentielles à durée de demi-vie faible. Le flux permet également d’évacuer les débris cellulaires et de réduire la concentration dans le PBS d’éventuelles espèces chimiques sécrétées par les cellules. Ainsi, nous pouvons déterminer si des composants organiques sont nécessaires à la génération d’ERO secondaires.

Les cellules sont cultivées dans un canal de $5\text{mm}\times 50\text{mm}$ de côté et 0.15mm de hauteur. L’entrée et la sortie du canal sont reliés à une seringue et un réservoir (50mL) afin de faire passer un flux de $0.5\text{mL}/\text{h}$ de PBS pendant l’irradiation, et un flux de milieu de culture (également $0.5\text{mL}/\text{h}$) une fois l’irradiation terminée. Le contrôle du flux est assuré par un pousse seringue (NE-1000 Single Syringe Pump, New Era Pump Systems). Le PBS est "tiré" depuis les réservoirs de PBS/milieu jusqu’à la seringue (figure 3.3a).

Deux réservoirs de 50mL, un de milieu de culture (DMEM), et un de PBS sont maintenus dans une atmosphère à 5% de CO₂. Le milieu et le PBS contiennent 1X de CellTox Green (marqueur fluorescent de la mort cellulaire). Un interrupteur manuel permet de choisir le réservoir relié au reste du circuit fluidique. L'interrupteur est basculé vers le réservoir de DMEM, maintenu à une température de 37°C, de telle sorte que le DMEM atteigne la puce environ 10 minutes après la fin de la dernière irradiation laser. Les tubes (ref 10841) et la connectique fluidique sont achetés chez Ibidi.

Le flux est démarré environ une heure avant le début de l'irradiation et maintenu après l'irradiation pendant le suivi des cellules. Le PBS atteint les cellules environ 30 minutes avant l'irradiation du premier champs de cellules, et 2h avant l'irradiation du dernier. Nous n'avons pas mesuré de corrélation entre la fraction de cellules mortes et l'ordre d'irradiation des champs de cellules. La vitesse moyenne de flux dans le canal est de $V_{moy} = 0.19\text{mm/s}$. Les cellules irradiées sont choisies à une distance d'environ 0.5mm (0.2-0.8mm) du bord du canal. La vitesse de flux au niveau des cellules (de hauteur $\sim 5\mu\text{m}$ est de $V_{cell} = 0.003\text{-}0.010\text{mm/s}$. Le profil (estimé analytiquement) de la vitesse de flux est représenté [figure 3.3c](#). Des précisions supplémentaires sur le protocole et les simulations numériques associées sont apportées dans l'[annexe D](#).

La puce est placée sous microscope ([figure 3.3b](#)), et insérée dans un plateau chauffant (Ibidi, Ref 10918), qui est activé après l'irradiation afin de maintenir les cellules à 37°C pendant le suivi des cellules (suivi sur environ 24 après l'irradiation). L'irradiation a lieu à température ambiante. Le reste du dispositif expérimental (microscope, laser, caméra etc.) est identique à celui utilisé pour les irradiations sans flux.

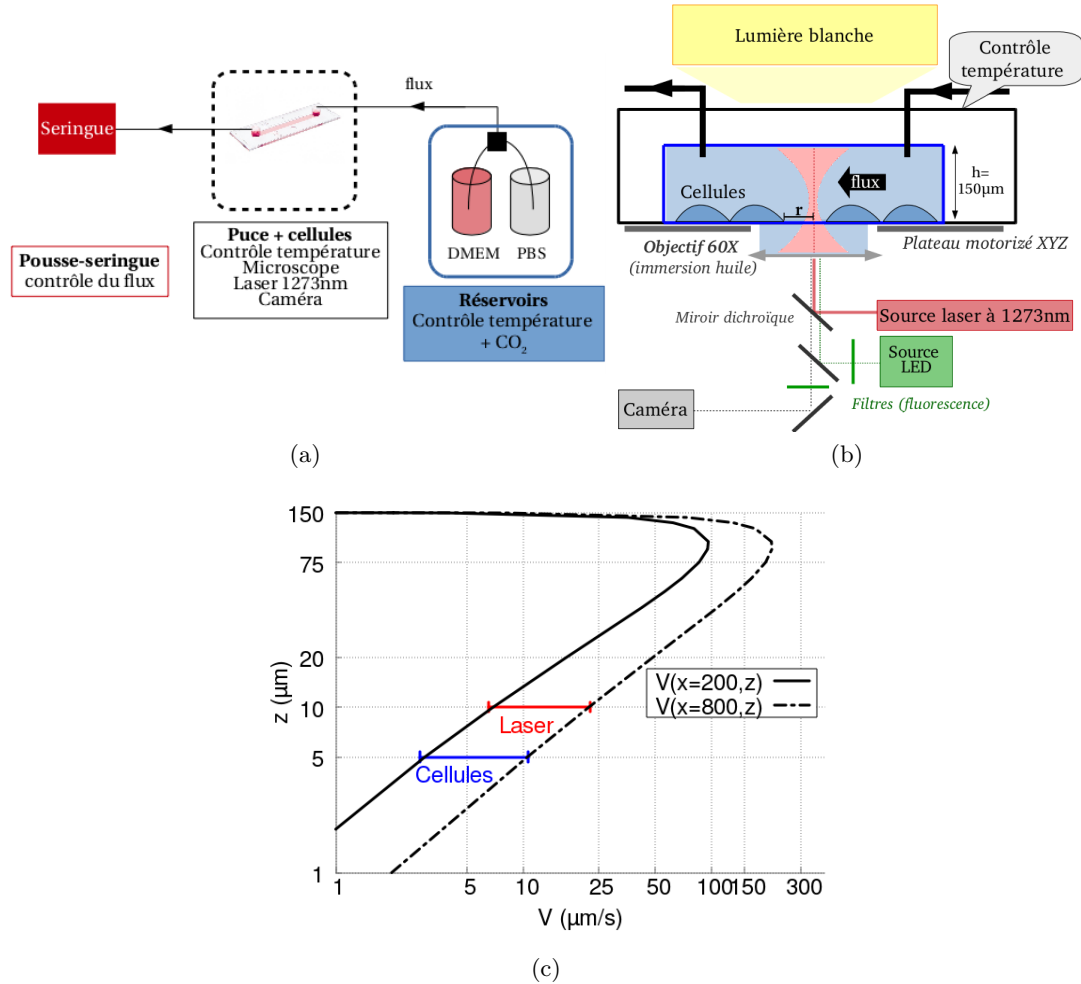


FIGURE 3.3 – **Expérience d’irradiation des cellules en flux.** **Figure (a)** Schéma du dispositif expérimental associé aux expériences d’irradiation de cellules en flux. La boîte de culture est remplacée par une puce fluïdique dans laquelle est gravé un canal de $5\text{mm} \times 50\text{mm} \times 0.15\text{mm}$. Les cellules cultivées dans ce canal sont soumises à un flux de vitesse moyenne $V_{\text{moy}} = 0.19\text{mm/s}$ avant, pendant et après l’irradiation. Après l’irradiation, le flux de PBS est remplacé par un flux de milieu de culture. La puce est reliée à une seringue motorisée qui contrôle la vitesse de flux, et à deux réservoirs (PBS et milieu de culture) thermalisés. Les réservoirs sont maintenus dans une atmosphère à 5% de CO₂. **Figure (b)** Schéma du dispositif d’imagerie et d’irradiation associés à la puce fluïdique. Le dispositif est très similaire au dispositif associé à une irradiation sans flux (figure 3.2). **Figure (c)** Profil de flux obtenu par simulation. Les cellules sont irradiées à proximité du bord du canal (0.2-0.8mm) de la puce. La vitesse du flux au niveau des cellules est ainsi de $V_{\text{cell}} = 0.003$ à 0.010mm/s .

3.2.3 Mesure de la fraction de cellules mortes

Comme dans le chapitre précédent, la mort cellulaire est caractérisée par le marqueur fluorescent CellTox Green. Les cellules sont suivies par imagerie pendant environ 24h après la fin de l'irradiation. Des images en lumière blanche par transmission, et de fluorescence sont prises toutes les 20 minutes.

$^1\text{O}_2$ et les ERO secondaires potentielles sont générées majoritairement dans un volume de quelques micromètres cube au niveau du point de focalisation du laser. Ces espèces vont par la suite diffuser. Leur concentration est ainsi une fonction de la distance au laser, de leur temps de demi-vie, et de leur coefficient de diffusion. Nous mesurons ainsi la fraction de cellules mortes en fonction de la distance au laser dans le but d'estimer la concentration des différentes espèces à une distance au laser donnée et d'associer à cette concentration la réponse des cellules.

3.2.3.1 Mort en fonction du milieu extra-cellulaire

De $^1\text{O}_2$ est généré à l'extérieur des cellules dans du PBS et initie de la mort cellulaire jusqu'à plusieurs dizaines de micro-mètres de l'axe du laser (figure 3.4). La Fraction de Cellules Mortes (FCM) mesurée est comparée à la fraction de cellules mortes (FCM) obtenue lorsque le PBS est remplacé par du milieu de culture (DMEM complété avec 10% de sérum fœtal de veau, 1% de L-glutamine et 0.4% de pénicilline/streptomycine). La FCM pour $15 \leq r \leq 35 \mu\text{m}$ est réduite dans le milieu de culture. Les composés présents dans le milieu de culture ne sont donc pas nécessaires à la génération de sous-espèces toxiques de $^1\text{O}_2$. Au contraire, ils semblent réduire leur rayon d'action, probablement en réagissant avec $^1\text{O}_2$ ou les ERO secondaires.

Les fractions de cellules mortes en fonction de la distance au laser r sont calculées en faisant le ratio entre le nombre de cellules mortes et le nombre total de cellules irradiées, dans l'intervalle $[r-k; r+k]$, avec $k=2.5 \mu\text{m}$. Le choix de $k=2.5 \mu\text{m}$ permet de calculer une FCM sur $n > 20$ cellules par point de mesure. Les intervalles de confiances associés aux fractions de cellules mortes expérimentales sont calculés au moyen d'une méthode bootstrap, décrite dans la section section 3.2.3.3.

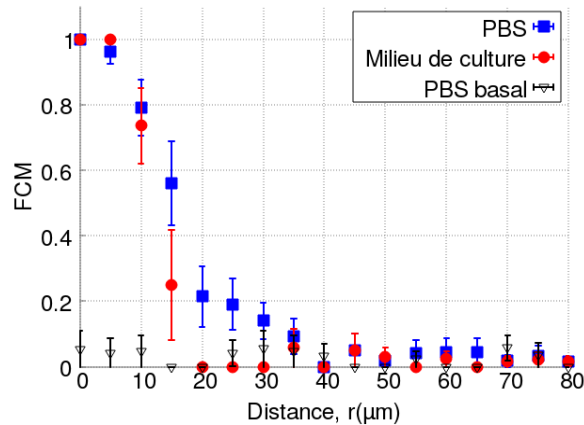


FIGURE 3.4 – Fraction de cellules mortes (FCM) en fonction de la distance des cellules à l'axe du laser et le milieu irradié, milieu de culture cellulaire (DMEM) ou un tampon phosphate salin (PBS). La FCM basale : fraction de cellules mortes en absence d'irradiation laser. Points de mesure : FCM sur intervalle $[r-2.5 \mu\text{m}, r+2.5 \mu\text{m}]$. Barres d'erreur : erreurs standard à la moyenne obtenues par méthode bootstrap. Nombre total de cellules par intervalle $20 < n_{cell} < 30$ pour $r < 40 \mu\text{m}$ et $30 < n_{cell} < 60$ pour $r < 80 \mu\text{m}$.

3.2.3.2 Mort basale

La mesure de la fraction de cellules mortes en absence d'irradiation permet de définir un seuil de mort basale, et des intervalles de confiance associés. Les cellules sont placées dans les mêmes conditions que pour une irradiation dans du PBS et sont suivies 30 heures. La FCM globale sur une population de 550 cellules est de 2.3%. Lorsque la FCM basale est calculée sur des intervalles de $5\mu\text{m}$ comme pour les cellules irradiées, chaque intervalle contient un nombre de cellules n_{cell} . $20 < n_{cell} < 30$ pour une distance au laser $r < 40\mu\text{m}$, et $30 < n_{cell} < 60$ pour $40 < r < 80\mu\text{m}$. Le nombre de cellules par intervalle dans les expériences contrôle est du même ordre que pour les expériences d'irradiation. Dans ces conditions, la FCM basale est de l'ordre de $5 \pm 5\%$ pour $r < 40\mu\text{m}$ (0-2 cellules mortes sur 20 à 30 cellules), et de $3 \pm 3\%$ pour $40 < r < 80\mu\text{m}$.

Lors de l'irradiation de cellules dans du PBS avec un laser 1270nm, la FCM obtenue est supérieure à 5% jusqu'à $r=35\mu\text{m}$. Au delà, elle est du même ordre que la mort basale. Pour cette raison, dans la suite de ce chapitre, la fraction de cellules mortes est étudiée sur des distances au laser comprises entre $r=0$ et $r=40\mu\text{m}$.

3.2.3.3 Méthode statistique

Cette section explique comment sont obtenus les p-valeurs et les intervalles de confiance associés aux mesures expérimentales dans les chapitres 3 et 4.

Dans ce chapitre, nous allons comparer la fraction de cellules mortes en fonction de la distance au laser pour différents protocoles d'irradiation. Nous devons effectuer un test statistique, afin de déterminer si nous pouvons attribuer les différences mesurées aux différences de protocole, ou s'il s'agit au contraire de variabilité statistique due au nombre réduit de cellules dans les échantillons.

Hypothèse nulle et p-valeur. L'hypothèse nulle H_0 est l'hypothèse que deux échantillons fassent partie d'une même population. Si l'on compare les effets de deux protocoles d'irradiation différents, l'hypothèse nulle permet de rendre compte que le paramètre expérimental modifié n'a aucun effet sur la fraction de cellules mortes (FCM). Comme les échantillons sont constitués d'un nombre réduit d'éléments, la FCM mesurée peut différer d'un échantillon à l'autre. En supposant H_0 vraie, et que la mort cellulaire est décrite par une loi normale, une probabilité d'occurrence 'p' peut être associée à la différence de FCM mesurée entre deux expériences. Plus la différence entre la FCM des deux échantillons est élevée et plus la taille des échantillons est grande, plus la p-valeur p est faible.

Si la p-valeur p est suffisamment faible, il est considéré suffisamment improbable d'obtenir les distributions observées pour réfuter H_0 . La différence de protocole expérimental a un effet dit "statistiquement significatif" sur la fraction de cellules mortes. Une p-valeur "suffisamment faible" correspond à p inférieur à un seuil d'importance α . Traditionnellement, α est fixé arbitrairement à 0.05^[227;228]. On considère ainsi que l'on se permet de réfuter l'hypothèse nulle lorsqu'il est possible d'affirmer que, si l'on considère H_0 vraie, la différence de FCM mesurée entre les deux échantillons a moins de 5% de chance d'être obtenue expérimentalement.

Test de comparaison de populations. La valeur de p est obtenue en effectuant un test de comparaison de proportions de populations indépendantes. Soient \hat{p}_1 et \hat{p}_2 les fractions de cellules mortes mesurées pour des échantillons contenant respectivement n_1 et n_2 cellules,

l'équation (3.10) décrit comment obtenir la valeur de Z , dont on déduit la p-valeur.

$$\hat{p} = n_{mortes}/n, \quad (3.9)$$

$$Z = \frac{\hat{p}_1 - \hat{p}_2}{\sqrt{\frac{\hat{p}_1(1-\hat{p}_1)}{n_1} + \frac{\hat{p}_2(1-\hat{p}_2)}{n_2}}} \quad (3.10)$$

Z traduit le nombre d'écart-types séparant les valeurs moyennes de deux échantillons comparés, plus Z est grand, plus les deux échantillons sont statistiquement différents, et plus la p-valeur est faible. La p-valeur est calculée à partir de Z par calcul de l'intégrale sous une distribution normale. Des tables de correspondances $Z \leftrightarrow p$ permettent d'associer Z à la probabilité p de retrouver les deux distributions expérimentales dans l'hypothèse H_0 vraie. Par exemple, $p < 0.05$ si $Z > 1.96$, et $p < 0.01$ si $Z > 2.57$.

Ce calcul de la p-valeur à partir de Z est pertinente lorsque la distribution des moyennes associées aux populations testées suit une loi normale, et pour des échantillons de "grande taille". Selon le théorème central de la limite, pour une taille d'échantillon suffisamment grande, la distribution normale des moyennes est garantie. Nous n'avons pas assez de données expérimentales pour valider cette hypothèse. Nous augmentons donc artificiellement la taille des échantillons pour chaque condition d'irradiation testée en appliquant une méthode "bootstrap" [229;230], qui a pour but d'associer un intervalle de confiance (écart-type à la moyenne) aux données expérimentales obtenues.

Méthode "bootstrap". La méthode dite "bootstrap" en anglais est une méthode itérative qui consiste à constituer à partir de l'échantillon de données expérimentales un nouvel échantillon de même taille par tirage au sort avec remise. Soit $i=1000$ le nombre d'itérations de tirage, on obtient ainsi i échantillons à partir de l'échantillon initial. A chacune de ces i itérations est associé une fraction de cellules mortes FCM_i . La FCM moyenne sur i itérations convergent vers une valeur limite. La convergence à $i=1000$ itérations a été confirmée (il n'y a pas de variation de FCM et des erreurs standard associées entre $i=1000$ et $i=2000$). Soulignons que la FCM moyenne calculée suite à 1000 itérations bootstrap est identique à la FCM calculée à partir de l'échantillon expérimental. La méthode bootstrap a uniquement pour but d'apporter un intervalle de confiance aux données expérimentales et donc d'évaluer leur robustesse statistique.

Dans les chapitres 3 et 4, les barres d'erreur (erreur standard à la moyenne) associées aux fractions de cellules mortes mesurées sont toutes déterminées par méthode bootstrap.

3.2.4 Simulations de la concentration de 1O_2 et des ERO

La représentation sous la forme de fractions de cellules mortes en fonction de la distance au laser a été choisie pour décrire la réponse des cellules à un stress oxydant initié par 1O_2 . La distance au laser ne présente un intérêt que dans la mesure où nous pouvons la convertir en concentration d'espèces (concentration d' 1O_2 , de ERO secondaires, de ERO en présence de désactivateurs etc.)

Nous avons décrit analytiquement dans le chapitre d'introduction le taux de production d'oxygène singulet en fonction des paramètres d'irradiation laser et de la concentration en dioxygène. Les concentrations d'espèces en fonction de la distance radiale à l'axe du laser r sont simulées à l'aide du logiciel Comsol Multiphysics v5.3. [323] Les équations différentielles traduisant la réaction et la diffusion des espèces, et des informations supplémentaires associées aux simulations sont présentées dans l'annexe C.

La figure figure 3.5a donne le profil de concentration en 1O_2 dans un environnement sans cellules, pour un faisceau laser 1270nm focalisé dans le milieu extra-cellulaire. Cette concentra-

tion est calculée (équation (3.11)) en faisant l'hypothèse que seule la désexcitation spontanée et les réactions avec le solvant (eau) ont lieu dans le PBS (pas de production d'ERO secondaires).

$$\frac{d[{}^1O_2]}{dt} = D\nabla^2[{}^1O_2] + \Gamma - K[{}^1O_2] \quad (3.11)$$

$$[{}^1O_2] = \frac{\Gamma}{K} \quad (3.12)$$

A l'état stationnaire (atteint en moins de 10ms), $[{}^1O_2]$ dépend de la production d' 1O_2 par le laser Γ (en mol/L/s) et du coefficient de réaction $K = \ln(2)/\tau_{1/2} = 1.98 \times 10^5 \text{s}^{-1}$ (équation (3.12)), avec $\tau_{1/2} = 3.5 \mu\text{s}$ la demi-vie de l'oxygène singlet dans de l'eau.

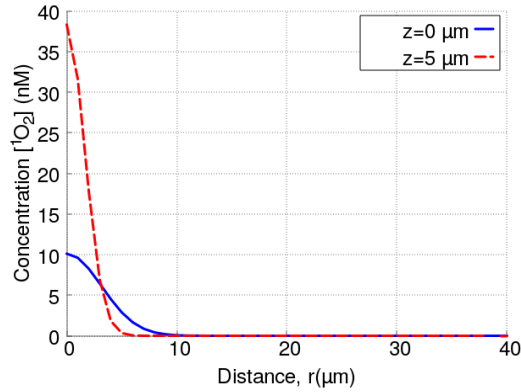


FIGURE 3.5 – **Simulation numérique de la concentration d'oxygène singlet à l'état stationnaire.** Concentration d'oxygène singlet, $[{}^1O_2]$, en fonction de la distance r à l'axe du laser et du plan z . Coordonnées du point de focalisation du faisceau : $(r,z)=(0,10\mu\text{m})$. Les cellules adhèrent au plan $z=0$ et ont une hauteur de $\sim 5 \mu\text{m}$.

A partir de cette concentration, nous estimons la concentration d' 1O_2 cumulée générée à l'intérieur des cellules, c'est-à-dire la quantité molaire (en mol/L) d' 1O_2 produite dans une cellule sur la totalité de l'irradiation. Notre objectif est de comparer la fraction de cellules mortes obtenue expérimentalement lors d'une irradiation extra-cellulaire avec la fraction de cellules mortes attendue dans l'hypothèse d'une absence de ERO secondaires. Cette dernière sera appelée "fraction de cellules mortes théorique". Nous souhaitons justifier l'existence de ERO secondaires en montrant que la fraction de cellules mortes expérimentales est plus élevée que la fraction de cellules mortes théorique.

3.2.5 Concentration cumulée de 1O_2 dans les cellules

Par simulation numérique, nous avons obtenu la concentration de 1O_2 à l'état stationnaire en fonction des coordonnées cylindriques (r,z) . A partir de cette concentration, du volume d'une cellule, et du coefficient de réaction K , nous pouvons calculer la concentration cumulée $[{}^1O_2]_C$ générée dans une cellule lors d'une irradiation de durée $\Delta t = t_f - t_0 = 10$ minutes (équation (3.13)).

$$[{}^1O_2]_C = \frac{K}{V_{cell}} \int_{t=t_0}^{t=t_f} \iiint [{}^1O_2](r,z) dr dz d\theta \quad (3.13)$$

$[{}^1O_2]_C$ dépend de la configuration géométrique des cellules considérées. Les cellules sont caractérisées par leur distance r à l'axe du laser. La géométrie des cellules MCF-7 cultivées en monocouches est paramétrée dans l'annexe A.2. Nous mesurons un volume de cellule $V_{cell} = 1500 \mu\text{m}^3$,

un diamètre médian $D=30\ \mu\text{m}$ avec un ratio d'aspect médian entre le petit et le grand axe des cellules de 1.5, et une hauteur de cellule $h\sim 5\ \mu\text{m}$.

La variabilité géométrique des cellules est à l'origine d'une variabilité de concentration cumulée d'oxygène singulet pour des cellules à une même distance r de l'axe du laser (figure 3.6a). Nous adoptons un modèle de cellule en forme de couronne qui surestime la quantité totale d' $^1\text{O}_2$ (N_C en mol) générée dans les cellules (équation (3.15)). En pratique, Le taux de production d' $^1\text{O}_2$ pour $r>30\ \mu\text{m}$ est négligeable (<1 molécule/s), on peut donc considérer que le diamètre externe de la couronne vaut $R'=30\ \mu\text{m}$ et que la concentration cumulée $[^1\text{O}_2]_C$ est nulle pour des cellules à une distance $r>R'$ du laser.

$$[^1\text{O}_2]_C V_{cell} = N_C \quad (3.14)$$

$$N_C = \Delta t K 2\pi R \int_{z=0}^{z=h} \int_{x=r}^{x=R} [^1\text{O}_2](r, z) dr dz \quad (3.15)$$

La quantité N_C (en mol) d'oxygène singulet générée dans les cellules est divisée par le volume moyen d'une cellule MCF-7, $V_{cell}=1500\ \mu\text{m}^3$. Nous obtenons ainsi un majorant de la concentration cumulée en mol/L en fonction de la distance r des cellules au laser (figure 3.6b). Nous détaillerons par la suite le calcul du seuil de toxicité de $^1\text{O}_2$ associé à la mort de 5% des cellules. Ce seuil (en pointillés rouges dans la figure) vaut 0.5mM et est atteint pour $r>10\ \mu\text{m}$.

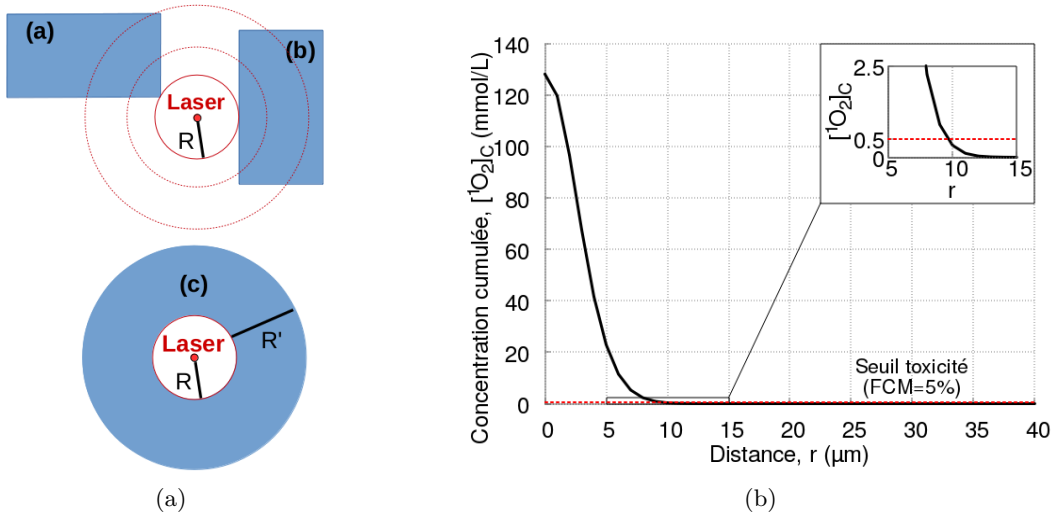


FIGURE 3.6 – **Concentration d' $^1\text{O}_2$ et variabilité cellulaire.** **Figure (a)** Deux cellules de même volume à une distance r de l'axe du faisceau laser. La cellule (a) est exposée à une concentration de $^1\text{O}_2$ inférieure à celle à laquelle est exposée la cellule (b). La quantité d' $^1\text{O}_2$ générée dans la "cellule" (c) avec $R'=\infty$ est un majorant de la quantité générée dans toute cellule réelle. Le taux de production d' $^1\text{O}_2$ pour $r>30\ \mu\text{m}$ est négligeable (<1 molécule/s), on peut donc considérer $R'=30\ \mu\text{m}$ et $[^1\text{O}_2]_C=0$ pour des cellules à une distance $r>R'$ du laser. **Figure (b)** : Concentration cumulée $[^1\text{O}_2]_C$ d' $^1\text{O}_2$ générées dans une cellule de géométrie (c) lors d'une irradiation de durée $\Delta t=10\text{min}$. En pointillés rouges, le seuil de toxicité correspondant à une fraction de cellules mortes de 5%, soit de l'ordre de la mort basale mesurée. Le cadre en haut à droite permet de visualiser l'intersection entre le seuil à 5% et la courbe concentration cumulée, à une distance $r=10\ \mu\text{m}$ du laser.

3.2.6 Fraction de cellules mortes en fonction de la concentration cumulée de $^1\text{O}_2$

Nous savons désormais évaluer la concentration cumulée d'oxygène singulet (maximale) générée à l'intérieur et à l'extérieur des cellules en fonction de leur distance à l'axe du laser. Nous souhaitons donc évaluer la fraction de cellules mortes (FCM) associée à la quantité de $^1\text{O}_2$ à laquelle les cellules sont exposées. Dans l'hypothèse d'une absence de ERO secondaires, les cellules ne subissent que des dommages directs.

La fraction de cellules mortes suite à des dommages exclusivement directs peut être estimée à partir des résultats expérimentaux du chapitre précédent. En effet, nous avons irradiés des populations de cellules cultivées en mono-couches (avec un faisceau laser de waist $\omega=40\ \mu\text{m}$) et l'ajout de BSA, un désactivateur extra-cellulaire de $^1\text{O}_2$, n'a pas d'effet statistiquement significatif sur la mort des cellules (résultats chapitre 2 : [section 2.3.5](#)). Nous faisons donc l'hypothèse que la mort cellulaire mesurée en mono-couches dans le chapitre précédent est exclusivement due à de l' $^1\text{O}_2$ intra-cellulaire et donc des dommages directs. En pratique, cette hypothèse nous amène à estimer un majorant de la fraction de cellules mortes due à des dommages directs.

Les expériences d'irradiation de mono-couches effectuées dans le chapitre 2 nous permettent ainsi de tracer une courbe FCM(r) de la fraction de cellules mortes en fonction de la distance r à l'axe du laser. Nous devons désormais évaluer la concentration cumulée d'oxygène singulet reçue par les cellules en fonction de leur distance r au laser. Pour cela nous devons premièrement estimer l'intensité laser moyenne à laquelle est exposé chaque cellule, en fonction de r. De cette intensité moyenne, nous déduisons la concentration cumulée en oxygène singulet, $[^1\text{O}_2]_C$ produite. Nous pourrions alors enfin tracer une FCM en fonction de $[^1\text{O}_2]_C$.

3.2.6.1 Calcul de l'intensité laser moyenne $\langle I \rangle$ dans les cellules

Nous souhaitons estimer l'intensité laser moyenne $\langle I \rangle$ à laquelle chaque cellule est exposée. Le faisceau gaussien peut être considéré collimaté (longueur de Rayleigh de 4mm, à comparer à la hauteur d'une cellule de $\sim 5\ \mu\text{m}$), l'intensité laser i locale en un point n'a donc qu'une composante radiale ([équation \(3.16\)](#)). Au vu de la variabilité géométrique des cellules en mono-couches ([section 3.2.6.1](#)), nous estimons l'intensité moyenne reçue à partir de la distance au laser des cellules et du diamètre moyen D d'une cellule MCF-7 ([équation \(3.17\)](#)).

$$i(r) = i_0 \exp\left(-2\frac{r^2}{\omega^2}\right) \quad (3.16)$$

$$\langle I(r) \rangle = \frac{\int_{x=r}^{r+D} (i(x)) dx}{D} \sim \frac{\Sigma_{x=r}^{r+D} (i(x))}{D} \quad (3.17)$$

Sources d'erreur sur $\langle I \rangle$. Nous avons plusieurs sources d'erreur : la première est le modèle géométrique de la cellule. Nous avons choisi une formule de I simple qui ne tient pas compte de la forme polygonale des cellules ni de la variabilité de leur dimensions. Évaluons uniquement l'impact de la variabilité du diamètre des cellules : $D=30 \pm 6.3\ \mu\text{m}$. En utilisant l'[équation \(3.17\)](#), l'intensité moyenne auxquelles sont exposées deux cellules de 23 et 37 μm de diamètre est multipliée par respectivement 115-130% et 80-88% par rapport à l'intensité moyenne reçue par une cellule de $D=30\ \mu\text{m}$. Plus r est important, plus l'écart est important (écart évalué jusqu'à $r=100\ \mu\text{m}$, la distance maximale à laquelle nous mesurons de la mort). En comparaison, l'erreur sur la mesure de la distance r cellule-laser ($\sim 1\ \mu\text{m}$) induit une erreur globale $<20\%$ pour $r<100\ \mu\text{m}$ et $<10\%$ pour $r<50\ \mu\text{m}$.

Nous choisissons de calculer des fractions de cellules mortes sur des intervalles d'intensité suffisamment grands pour limiter l'impact des erreurs sur $\langle I \rangle$ sur les résultats. Chaque inter-

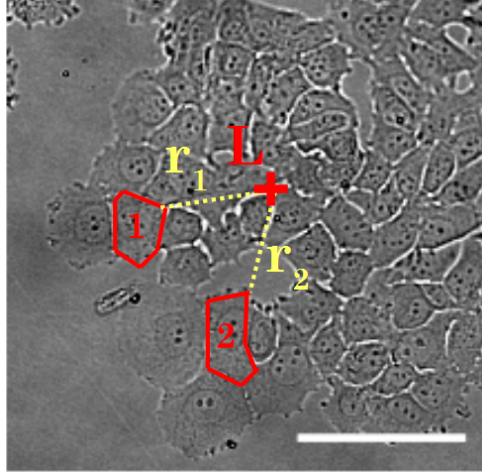


FIGURE 3.7 – **Variabilité géométrique de cellules en mono-couches.** Croix rouge : position de l'axe du faisceau laser. "1" et "2" : deux cellules au périmètre délimité en rouge. r_1, r_2 : distance laser-cellules. Barre d'échelle = 100 μm . La variabilité géométrique des cellules a un impact sur l'intensité laser et donc le taux d'oxygène singulet généré au sein des cellules.

valle d'intensité est de la forme $[I_n, I_{n+1}]$, avec $I_{n+1} \sim 2 \times I_n$. Chaque intervalle contient plus de 25 cellules pour une des conditions d'irradiation données.

3.2.6.2 Fractions de cellules mortes en fonction de $\langle I \rangle$

Nous avons associé à chaque cellule une intensité laser $\langle I \rangle$, que nous noterons désormais I , et défini des intervalles d'intensité $[I_n, I_{n+1}]$ dans lesquels nous pouvons calculer une fraction de cellules mortes $FCM(I)$, avec $I = \frac{I_n + I_{n+1}}{2}$. Expérimentalement, toutes expériences d'irradiation confondues, $0 < I < 7000 \text{ W/cm}^2$. Pour des irradiations de durée 5 à 60 minutes, les cellules exposées à une intensité $I < 0.1 \text{ W/cm}^2$ meurent à la même fréquence que les cellules non irradiées.

Afin d'estimer la robustesse statistique des fractions de cellules mortes mesurées, la fraction de cellules mortes $FCM(I)$ est calculée par la méthode "bootstrap". Un exemple de courbe expérimentale est montré figure 3.8. Les courbes sont extrapolées par des fonction de type sigmoïdale (équation (3.18)), afin de pouvoir associer une fraction de cellules mortes à chaque intensité laser (figure 3.8).

$$FCM(I) = \frac{1}{1 + \left(\frac{I_{50}}{I}\right)^A} \quad (3.18)$$

L'intensité I_{50} est telle que $FCM(I_{50})=0.5$. Pour une irradiation de durée $\Delta t=10\text{min}$, le meilleur accord avec les données expérimentales est obtenu pour $A=1.67 \pm 0.12$ et $I_{50}=184 \pm 9.5 \text{ W/cm}^2$.

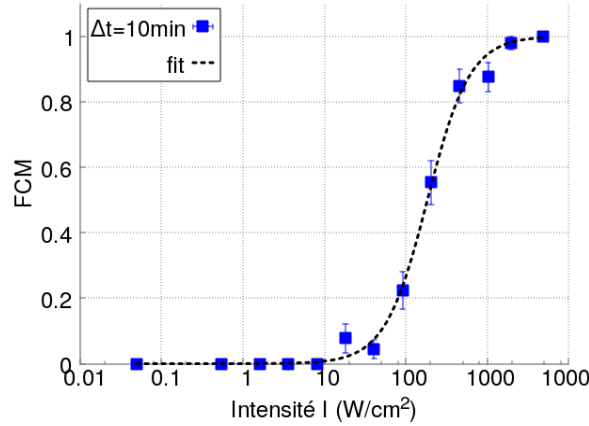


FIGURE 3.8 – Fraction de cellules mortes expérimentale en fonction de l'intensité laser I (en W/cm^2) à laquelle sont exposées les cellules, pour une irradiation de durée $\Delta t=10\text{min}$. Les résultats expérimentaux sont extrapolés par une fonction de type sigmoïdale.

3.2.6.3 Fraction de cellules mortes en fonction de la quantité d' $^1\text{O}_2$ généré

Nous avons désormais une courbe traduisant la fraction de cellules mortes (FCM) en fonction de l'intensité laser moyenne I à laquelle sont exposées les cellules. Nous souhaitons obtenir la fraction de cellules mortes en fonction de la concentration cumulée $[^1\text{O}_2]_C$ de molécules d'oxygène singulet générées par laser. La courbe associée est qualifiée de courbe "dose-effet". La concentration cumulée $[^1\text{O}_2]_C$ est estimée à partir de l'intensité I (équation (3.19)). Dans l'hypothèse d'une absence de génération de ERO secondaires, la concentration $[^3\text{O}_2]$ en dioxygène au niveau de la mono-couche de cellules est constante pendant l'irradiation, et vaut 0.23mM (simulations numériques dans l'annexe C.2).

$$[^1\text{O}_2]_C = \int_{t=t_0}^{t=t_f} \frac{\sigma}{h\nu} I [^3\text{O}_2] dt \quad (3.19)$$

$$FCM([^1\text{O}_2]_C) = \frac{1}{1 + \left(\frac{[^1\text{O}_2]_{C50}}{[^1\text{O}_2]_C}\right)^A} \quad (3.20)$$

Avec $\frac{\sigma}{h\nu} = 10^{-4} \text{ cm}^2/\text{W}$ le ratio entre la section efficace du dioxygène à 1270nm et l'énergie d'un photon à 1270nm et la durée d'exposition $\Delta t=t_f-t_0$.

La figure 3.9 présente différentes courbes dose-effet en fonction de la durée d'exposition Δt . L'évolution de la FCM en fonction de $[^1\text{O}_2]_C$ est à nouveau décrite par une fonction sigmoïde équation (3.20). Les paramètres A et $[^1\text{O}_2]_{C50}$ des courbes sigmoïdes qui décrivent les résultats expérimentaux dépendent du temps d'irradiation : $[^1\text{O}_2]_{C50}$ vaut respectivement 1.6 , 2.0 et 2.6mM et A 1 , 1.27 et 1.67 . Au vu des écarts-types sur les données expérimentales, nous ne pouvons pas exclure que les différences observées soient dues à la variabilité biologique des cellules et la variabilité statistique due au nombre de cellules irradiées (>20 cellules par point de mesure, le nombre de cellules augmente lorsque $[^1\text{O}_2]_{C50}$ diminue.) Cette différence, pourrait néanmoins être la conséquence d'une différence de contribution des dommages indirects (ERO secondaires) à la mort cellulaire en fonction de la durée d'irradiation. Nous ne pouvons enfin pas non plus exclure que la réponse biologique des cellules à une même quantité $[^1\text{O}_2]_C$ dépende du temps d'irradiation. Nous n'avons pas à ce jour les éléments pour favoriser une hypothèse plutôt que l'autre.

Dans le cadre des expériences de détection d'une sous-espèce de l'oxygène singulet, l'ex-

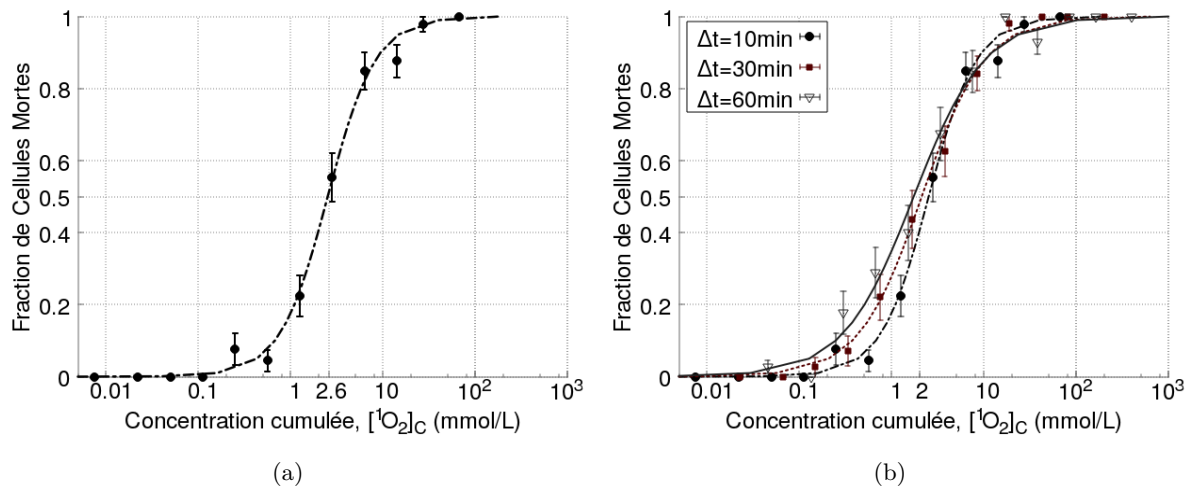


FIGURE 3.9 – **Fraction de Cellules Mortes (FCM) en fonction de la concentration cumulée d'oxygène singulet, $[^1\text{O}_2]_C$** , lors d'une irradiation de durée **figure (a) $\Delta t=10\text{min}$** et **figure (b) $\Delta t=10/30/60\text{min}$** . Nous observons une variation de la mort avec Δt , notamment pour les FCM faibles.

citation extra-cellulaire a une durée $\Delta t=10$ minutes. Les courbes dose-effet obtenues pour $\Delta t=10\text{min}$ sont ainsi utilisées afin d'estimer la fraction de cellules mortes attendue à proximité du faisceau laser (dans l'hypothèse d'une absence de ERO secondaires) et de la comparer à la FCM expérimentale. Toutefois, utiliser la courbe dose-réponse associées à $\Delta t=60\text{min}$ plutôt que $\Delta t=10\text{min}$ ne changerait pas les conclusions tirées dans ce chapitre. En effet, lors d'une irradiation extra-cellulaire avec un laser focalisé (figure 3.11, partie Résultats), utiliser la courbe dose réponse associée à $\Delta t=10\text{min}$ permet d'estimer la fraction de cellules mortes due aux dommages directs de $^1\text{O}_2$. Cette FCM vaut 3%, <0.1% et <0.1% à respectivement une distance $r=10, 11$ et $12\ \mu\text{m}$ de l'axe du laser. La courbe dose-effet à $\Delta t=60\text{min}$ permet quant à elle d'estimer une FCM de 10%, 5% et <0.1% à respectivement $r=10, 11$ et $12\ \mu\text{m}$ de l'axe du laser. Dans les deux cas la mort attendue est quasiment nulle passé $r=12\ \mu\text{m}$. La FCM expérimentale observée reste supérieure à 5% jusqu'à $r=35\ \mu\text{m}$, soit à des distances beaucoup plus grandes.

3.2.7 Désactivateurs de ERO

Afin d'identifier les ERO secondaires, c'est-à-dire les produits de réaction de $^1\text{O}_2$ dans le PBS, nous utilisons des désactivateurs d'espèces réactives de l'oxygène. Un désactivateur est une molécule avec une affinité chimique pour une espèce, qui réagit donc avec cette espèce suffisamment vite pour qu'elle n'ait pas l'occasion de participer à d'autres réactions chimiques. Ainsi, en présence d'un désactivateur extra-cellulaire adapté, la fraction de cellules mortes associée aux dommages indirects devrait être réduite.

Les désactivateurs d'ERO utilisés dans ce chapitre sont l'albumine de sérum de boeuf (BSA), des enzymes anti-oxydantes : la catalase et la superoxyde dismutase (SOD), l'iodure de potassium (KI), et la pyridine, une molécule organique.

3.2.7.1 Propriétés des désactivateurs

La spécificité d'un désactivateur est son aptitude à réagir fortement avec une espèce donnée et peu ou pas du tout avec d'autres espèces. Une constante de réaction K_D (en $\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$ dans les cas que nous étudierons) décrit la cinétique de réaction entre désactivateur et l'espèce considérée. Lorsque $K_D \sim 10^{10}\ \text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$, la réaction est dite limitée par la diffusion : les deux espèces

réagissent dès qu'elles entrent en contact. La désactivation peut être physique ou chimique. Une désactivation physique ne modifie pas la structure du désactivateur. La réaction avec l'espèce désactivée provoque par exemple une émission de chaleur. Une désactivation chimique a lieu par un transfert de charge ou une réorganisation des liaisons chimiques. Le désactivateur est ainsi modifié lorsqu'il réagit, avec potentiellement une modification de ses capacités de désactivation. Des informations de la littérature sur des désactivateurs des potentielles ERO secondaires sont regroupées [tableau 3.3](#).

	BSA	Catalase	KI	Pyridine	SOD
$^1\text{O}_2$	8×10^8 [186]	2.5×10^7 [231]	10^6 [232–234]	10^5 [235]	2.7×10^9 [236] ou 3×10^7 [231]
H_2O_2	modéré* [237]	10^5 [205;206]	10^{-2} [238]	?	0.5 [221;239]
O_3	$>10^5$ [240;241]	NA [242]	10^8 - 10^9 [219;243]	?	NA [244]
O_2^-	8×10^4 [245]	2×10^5 [221;246]	NA [247]	NA [248]	$\sim 10^9$ [221;249;250]
$\text{HO}\cdot$	modéré* [237]	NA [211;242]	10^{10} [208;209]	NA [248]	NA [211]
H_2O_3	?	?	?	?	?

TABLE 3.3 – Constantes de réaction K_D (en $\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$) entre désactivateurs et ERO. * : les coefficients exacts ne sont pas donnés ; à concentration égale de BSA, les concentrations $[\text{HO}\cdot]$ et $[\text{H}_2\text{O}_2]$ sont moins réduites que $[\text{O}_3]$ $[\text{O}_2^-]$ et $[\text{O}_2]$. "NA" : pas de réaction détectée entre désactivateur et ERO. "?" absence de données.

Afin d'estimer la spécificité des désactivateurs, il ne suffit pas de comparer les constantes de vitesses entre elles. Les propriétés de l'espèce à désactiver, notamment son temps de demi-vie, déterminent l'efficacité du désactivateur. Nous souhaitons estimer la spécificité de chaque désactivateur en décrivant analytiquement les cinétiques de réaction.

3.2.7.2 Estimation analytique de l'action des désactivateurs

A partir des équations de réaction/diffusion des espèces, nous allons estimer analytiquement l'action des désactivateurs. Pour cela, nous négligerons la diffusion, et considérons le taux de production d'oxygène singulet constant (nous négligeons ainsi la déplétion en dioxygène). Les simulations numériques de la concentration des ERO en présence de désactivateurs, qui tiennent compte de la diffusion et de la déplétion en dioxygène, sont regroupées dans l'[annexe C.4](#).

Équation de concentration de $^1\text{O}_2$. L'équation (3.21) décrit l'évolution de la concentration d'oxygène singulet extra-cellulaire, $[^1\text{O}_2]$. L'oxygène singulet est produit par irradiation laser avec un taux de production Γ et se désexcite avec une constante de réaction K . $K = \ln(2)/\tau_{1/2} = 1.98 \times 10^5 \text{ s}^{-1}$, avec $\tau_{1/2}$ la durée de demi-vie de $^1\text{O}_2$ dans de l'eau pure. L'oxygène singulet réagit également pour former des ERO secondaires, avec une constante de réaction K_{ox} (en s^{-1}).

$$\frac{\partial[^1\text{O}_2]}{\partial t} = D\nabla^2[^1\text{O}_2] + \Gamma - K[^1\text{O}_2] - K_{ox}[^1\text{O}_2] \quad (3.21)$$

L'oxygène singulet et les ERO de taille similaire diffusent dans le PBS avec une constante de diffusion $D=2 \times 10^{-9} \text{ m}^2 \text{ s}^{-1}$. Si $K_{ox} \gg K$, tout $^1\text{O}_2$ produit réagit pour former des ERO secondaires. Si $K_{ox} = K$, environ une molécule de $^1\text{O}_2$ sur deux réagit pour former des ERO secondaires. Dans les simulations numériques, nous calculons la concentration pour quatre valeurs de K_{ox} : 0, 2×10^4 , 2×10^5 , 2×10^6 et $2 \times 10^7 \text{ s}^{-1}$. Il n'y a pas ($<1\%$) d'évolution des concentrations pour $K_{ox} > 2 \times 10^7 \text{ s}^{-1}$.

L'équation (3.22) décrit l'évolution de la concentration de $^1\text{O}_2$ en présence d'une concentration $[\text{X}]$ de désactivateur. La constante de réaction K_X (en $\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$), traduit la vitesse de

réaction entre un désactivateur 'X' et l'oxygène singulet.

$$\frac{\partial [^1O_2]}{\partial t} - D\nabla^2[^1O_2] = \Gamma - K[^1O_2] - K_{ox}[^1O_2] - K_X[X][^1O_2] \quad (3.22)$$

Équation de concentration des ERO. Faisons l'hypothèse qu' 1O_2 ne produit qu'une seule ERO secondaire. La concentration de cette ERO dépend de son ordre de dégradation. L'équation (3.23) décrit l'évolution de la concentration d'une ERO d'ordre 1, C_1 . L'équation (3.25) décrit celle d'une ERO d'ordre 2, C_2 , en présence d'une concentration $[X]$ de désactivateur.

$$\frac{\partial C_1}{\partial t} = D\nabla^2(C_1) + K_{ox}[^1O_2] - K_1C_1 - K_X[X]C_1 \quad (3.23)$$

$$K_1 = \ln(2)/\tau_{1/2}^{(1)} \quad (3.24)$$

$$\frac{\partial C_2}{\partial t} = D\nabla^2(C_2) + K_{ox}[^1O_2] - K_2C_2^2 - K_X[X]C_2 \quad (3.25)$$

$$K_2 C_2 = 1/(2 \tau_{1/2}^{(2)}) \quad (3.26)$$

Les constantes de réaction K_1 (en s^{-1}) et K_2 (en $M^{-1}s^{-1}$) traduisent la dégradation des espèces dans le solvant et permettent de calculer les durées de demi-vie $\tau_{1/2}^{(1)}$ et $\tau_{1/2}^{(2)}$ des espèces considérées. Les valeurs des durées de demie-vie associées aux ERO secondaires sont listées en début de chapitre [tableau 3.1](#). Pour O_2^- et $HO\cdot$, $K_2 = 2 \times 10^5 M^{-1}s^{-1}$ [221] et $10^{10} M^{-1}s^{-1}$ [213] respectivement.

Action des désactivateurs sur la concentration d'ERO. Nous souhaitons estimer le ratio entre la concentration d'ERO sans ajout de désactivateurs et la concentration d'ERO en présence d'un désactivateur. La concentration de désactivateur $[X]$ est homogène et peut être considérée constante dans le temps. En effet, soit la désactivation ne consomme pas le désactivateur (catalase, SOD), soit $[X]$ est supérieure de plusieurs ordres de grandeur à la concentration maximale de ERO. Des précisions supplémentaires sont apportées dans l'[annexe C.4](#).

Résolvons dans un premier temps les équations différentielles à l'état stationnaire et sans tenir compte de la diffusion des espèces, et en considérant la concentration en dioxygène, et donc la concentration d'oxygène singulet à l'état stationnaire, constantes. Pour des espèces de dégradation d'ordre 1, nous résolvons l'équation (3.27) en absence (équation (3.29)) et en présence (équation (3.28)) de désactivateur. Le facteur de réduction de la concentration en présence de désactivateur est décrit par le ratio équation (3.30).

$$0 = K_1C_1 + K_X[X]C_1 - K_{ox}[^1O_2] \quad (3.27)$$

$$C_1(X=0) = \frac{K_{ox}[^1O_2]}{K_1} \quad (3.28)$$

$$C_1 = \frac{K_{ox}[^1O_2]}{K_1 + K_X[X]} \quad (3.29)$$

$$\frac{C_1(X=0)}{C_1} = 1 + \frac{K_X}{K_1}[X] \quad (3.30)$$

Pour une espèce de dégradation d'ordre 2, le ratio de concentrations en absence et en présence

de désactivateur est décrit par l'équation (3.34).

$$0 = K_2 C_2^2 + K_X [X] C_2 - K_{ox} [^1O_2] \quad (3.31)$$

$$C_2(X=0) = \sqrt{\frac{K_{ox} [^1O_2]}{K_2}} \quad (3.32)$$

$$C_2 = \frac{-K_X [X] + \sqrt{(K_X [X])^2 + 4K_2 K_{ox} [^1O_2]}}{2K_2} \quad (3.33)$$

$$\frac{C_2(X=0)}{C_2} = \frac{\sqrt{4K_2 K_{ox} [^1O_2]}}{-K_X [X] + \sqrt{(K_X [X])^2 + 4K_2 K_{ox} [^1O_2]}} \quad (3.34)$$

Plus le taux de production d'ERO $K_{ox} [^1O_2]$ est petit devant $K_X [X]$, plus le ratio est grand, donc plus le désactivateur est efficace. La concentration d'oxygène singulet $[^1O_2]$ a une dépendance spatiale forte. Choisir le taux de production $K_{ox} [^1O_2]$ au niveau du point de focalisation laser permet d'estimer un minorant de l'efficacité du désactivateur. Si tout l'oxygène singulet réagit pour former une ERO secondaire ($K_{ox} \geq 2 \times 10^7 s^{-1}$), $K_{ox} [^1O_2] = 0.12 M/s$ au point de focalisation laser (dans un volume de $1 \mu m^3$).

Bilan. Le [tableau 3.4](#) donne une estimation du ratio entre la quantité d'espèces totale présentes sans ajout de désactivateur au PBS et en présence de désactivateur. Plus le ratio est élevé, plus le désactivateur est efficace. Les concentrations de désactivateurs utilisées sont 3mM de BSA, 1mM de KI, 4 μ M (>1000u/mL) de catalase, 20 μ M de SOD (>1000u/mL), ou 30mM de pyridine. Les concentrations sont choisies en fonction de la solubilité des désactivateurs dans le PBS (BSA et catalase), de leur cytotoxicité (100mM de pyridine toxique), et de leur efficacité (1mM de KI et 20 μ M de SOD suffisent pour réduire très fortement l'activité des ERO associées). Les solutions de PBS contenant de la catalase et/ou de la SOD sont filtrées avec un filtre 0.22 μ m avant d'être ajoutées aux cellules.

	BSA	Catalase	KI	Pyridine	SOD
1O_2	$1 + \frac{24 \times 10^5}{1.98 \times 10^5 + K_{ox}}$	1.05	< 1.01	< 1.01	1.05 à 1.2
H_2O_2	*	> 2	< 1.01	?	< 1.1
O_3	> 1000	1	> 1000	?	1
O_2^-	> 2.05	< 1.1	1	1	> 130
$HO\cdot$	*	1	> 290	1	1
H_2O_3	?	?	?	?	?

TABLE 3.4 – Ratio entre la concentration d'espèces sans ajout de désactivateur et en présence de désactivateur. Plus le ratio est élevé, plus l'effet du désactivateur est important. Un ratio de 1 signifie qu'aucune action du désactivateur n'a été mise en évidence à notre connaissance dans la littérature. Concentrations de désactivateurs utilisées : [BSA]=3mM, [Catalase]=4 μ M, [KI]= 1mM, [Pyridine]=30mM, et [SOD]=20 μ M. Pour les espèces d'ordre 2 (O_2^- et $HO\cdot$), les ratios de concentration sont des minorants, obtenus pour $K_{ox} [^1O_2] = 0.12 M/s$ (majorant de concentration, obtenu au point de focalisation laser). * Les ratios ne sont pas connus ; à concentration égale de BSA, les concentrations [$HO\cdot$] et [H_2O_2] sont moins réduites que [O_3] [O_2^-] et [1O_2] (se référer au [tableau 3.3](#) pour les références de la littérature).

Les valeurs obtenues par simulation numérique en tenant compte de la diffusion des espèces (en [annexe C.4](#)) donnent des résultats proches des résultats estimés analytiquement, hormis pour la désactivation de H_2O_2 . Le calcul du ratio de concentrations (sans/avec désactivateur) de H_2O_2 à l'état stationnaire n'est pas pertinent car la durée d'irradiation (10 minutes) est

très courte devant le temps de demi-vie ($>24\text{h}$) de H_2O_2 dans le PBS. Le ratio calculé à l'état stationnaire surestime le ratio réel de plusieurs ordres de grandeur. Pour H_2O_2 , les valeurs données dans le [tableau 3.4](#) sont les valeurs obtenues par simulation numérique.

3.3 Résultats

Nous distinguons deux types de dommages aux cellules initiés par l'oxygène singulet. Les effets cytotoxiques provoqués par une réaction de $^1\text{O}_2$ avec les cellules, qualifiés de dommages directs, et les dommages létaux à attribuer à une ou plusieurs ERO secondaires, produits de $^1\text{O}_2$ dans le milieu extra-cellulaire, qualifiés d'indirects. Au vu de la durée de demi-vie de $^1\text{O}_2$ dans de l'eau pure ($\sim 3.5\ \mu\text{s}$), seul l'oxygène singulet généré à l'intérieur des cellules ou à proximité ($\sim 0.1\ \mu\text{m}$) de la membrane des cellules peut provoquer des dommages directs.

Dans le chapitre précédent, nous avons irradié des cellules cultivées en mono-couches avec un faisceau laser gaussien à 1270nm de waist $\omega=40\ \mu\text{m}$. Dans cette configuration, la désactivation de $^1\text{O}_2$ extra-cellulaire n'a que peu d'effet sur la mort des cellules (résultats [figure 2.22a](#)). Ainsi nous attribuons la mort des cellules à des dommages très majoritairement directs. Nous pouvons ainsi associer une Fraction de Cellules Mortes (FCM) à une concentration cumulée d'oxygène singulet donnée. Cette FCM, dite "théorique" est comparée à la FCM obtenue expérimentalement lors de la focalisation extra-cellulaire dans du PBS du laser 1270nm .

Nous montrons dans un premier temps que, pour une même concentration cumulée d'oxygène singulet, la FCM expérimentale est supérieure à la FCM théorique, et va donc dans le sens de la présence de dommages indirects. Dans un second temps nous cherchons à identifier les espèces et mécanismes de réaction à l'origine de ces dommages indirects.

3.3.1 Mise en évidence de dommages indirects

La concentration cumulée d'oxygène singulet produite par le laser est simulée numériquement. Elle dépend de la durée de demi-vie $\tau_{1\text{O}_2}$ de l'oxygène singulet dans le PBS. Le coefficient de diffusion du dioxygène est fixé à $D=2\times 10^{-5}\text{cm}^2\text{s}^{-1}$. Dans l'hypothèse de l'absence de production d'ERO secondaires, la $\tau_{1\text{O}_2}$ devrait être la même que dans de l'eau pure. Dans l'hypothèse d'une génération d'ERO secondaires, $\tau_{1\text{O}_2}$ devrait diminuer par rapport à sa valeur dans l'eau pure. Nous simulons néanmoins également la concentration cumulée d'oxygène singulet pour des demi-vies supérieures à $3.5\ \mu\text{s}$.

Les résultats de la [figure 3.10](#) montrent que, quelque-soit la valeur de $\tau_{1\text{O}_2}$, la FCM théorique ne correspond pas à la FCM expérimentale. La mort mesurée n'est donc pas compatible avec l'hypothèse de dommages exclusivement directs, et suggère donc que l'oxygène singulet réagit dans le PBS pour produire une ou plusieurs ERO secondaires. Pour $\tau_{1\text{O}_2}=3.5\ \mu\text{s}$, la fraction de cellules mortes devrait être nulle pour $r>10\ \mu\text{m}$. Au delà de $r=10\ \mu\text{m}$ toute la mort mesurée est par conséquent due à des dommages indirects.

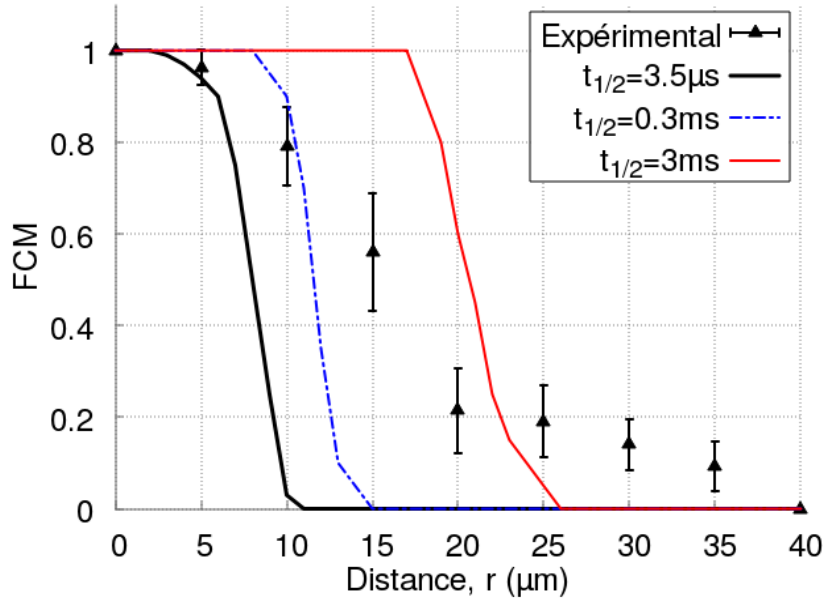


FIGURE 3.10 – **Comparaison des fractions de cellules mortes (FCM) théoriques avec la FCM expérimentale mesurée dans du PBS.** Demi-vie de l’oxygène singulet, $\tau_{1/2}$, variable. Le profil théorique, qui suppose que $^1\text{O}_2$ ne réagit pas dans le PBS pour produire des espèces toxiques, n’est jamais en adéquation avec le profil expérimental.

3.3.2 Effet du taux de production d’oxygène singulet sur les dommages directs.

Afin de provoquer de la mort cellulaire à plusieurs dizaines de micromètres du laser, $^1\text{O}_2$ doit non seulement réagir pour produire des espèces secondaires, mais également les produire en quantités toxiques. La toxicité d’une espèce est liée à sa concentration. Nous nous sommes donc intéressés à l’évolution des FCM théoriques et expérimentales pour différents taux de production de $^1\text{O}_2$ (figure 3.11).

Le taux de production de $^1\text{O}_2$ est contrôlé par les paramètres d’irradiation laser : la puissance P et le temps d’irradiation Δt . Nous reproduisons l’expérience d’irradiation dans du PBS, initialement faite à puissance $P=50\text{mW}$, pour $P=22\text{mW}$ et $P=7\text{mW}$. Les taux de production d’oxygène singulet sont maximaux au point de focalisation du laser, et valent respectivement 165, 73 et 23.2 mM/s lorsque la production d’ERO secondaires est nulle (coefficient de réaction $K_{ox}=0$) et 128, 65 et 22.4 mM/s lorsque la production d’ERO secondaire est maximale ($K_{ox} \geq 2 \times 10^7 \text{s}^{-1}$). Cette différence est liée à la déplétion en dioxygène (simulations numériques dans l’annexe C.2). Ainsi, irradier des cellules avec une puissance laser $P=7\text{mW}$ réduit la dose d’oxygène singulet par un facteur 7.14 ($K_{ox}=0$) à 5.71 ($K_{ox}=2 \times 10^7 \text{s}^{-1}$) par rapport à une irradiation à $P=50\text{mW}$.

Les FCM expérimentales sont très différentes des courbes théoriques pour $P=50\text{mW}$ et $P=22\text{mW}$. L’oxygène singulet n’est pas produit en quantités suffisantes pour provoquer de la mort cellulaire par dommages directs au delà de $r=10\mu\text{m}$, or nous observons expérimentalement une FCM supérieure à la mort basale (5%) jusqu’à $r=20$ et $r=35\mu\text{m}$ pour $P=22\text{mW}$ et $P=50\text{mW}$ respectivement. Pour une puissance laser $P=7\text{mW}$, les profils théoriques et expérimentaux se rejoignent : la part de dommages indirects est réduite par rapport aux irradiations aux puissances plus élevées.

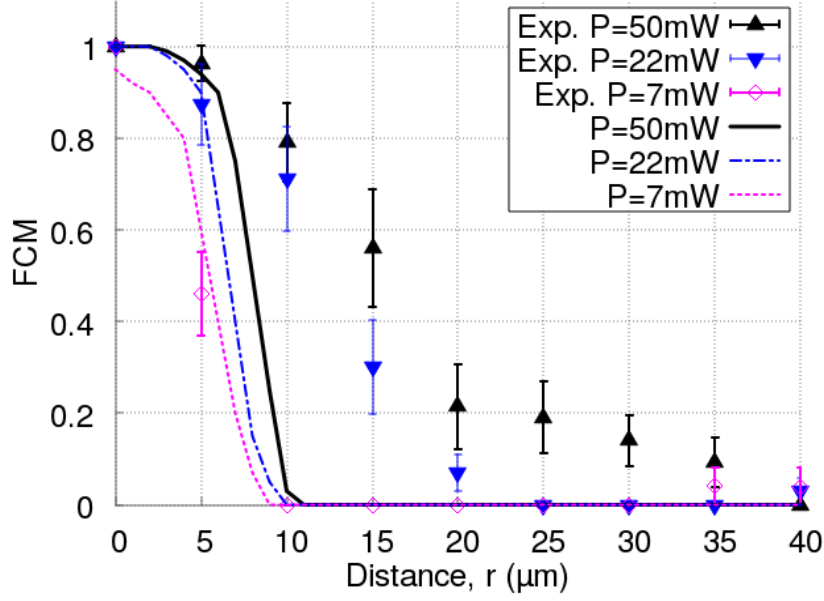


FIGURE 3.11 – Comparaison des fractions de cellules mortes (FCM) théoriques avec la FCM expérimentale mesurée dans du PBS. Puissance laser P variable. Les profils expérimentaux et théoriques ne sont proches que pour $P=7\text{mW}$. Barres d'erreur : erreur standard à la moyenne.

En conclusion, plus le taux de production d'oxygène singlet est faible, plus le profil de la fraction de cellules mortes est proche du profil associé aux dommages directs. Une réduction du taux de production d'un facteur 5.7-7.1 suffit à faire disparaître les dommages indirects.

3.3.3 Mort en présence d'un désactivateur extra-cellulaire d' $^1\text{O}_2$

Une deuxième façon de confirmer la présence de dommages indirects est de désactiver l'oxygène singlet extra-cellulaire en ajoutant 3mM de sérum d'albumine de veau (BSA) au PBS avant l'irradiation. Rappelons que la BSA a une constante de réaction avec $^1\text{O}_2$ de $K_{BSA} = 8 \times 10^8 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ [186], et que l'ajout d'une concentration $[BSA]$ équivaut donc à diviser la concentration d'oxygène singlet par un facteur $\alpha = 1 + \frac{K_{BSA}[BSA]}{K + K_{ox}}$, avec $K = 1.98 \times 10^5 \text{ s}^{-1}$ la constante de réaction associée à la désexcitation de $^1\text{O}_2$ dans l'eau et K_{ox} la constante de réaction associée à la production d'ERO secondaires dans le PBS. Si $K_{ox} = 0$ (absence d'ERO secondaires et donc de dommages indirects), $\alpha = 13.1$.

Nous allons estimer K_{ox} à partir de la réduction de la fraction de cellules mortes en présence de BSA.

3.3.3.1 Effet de la BSA sur la fraction de cellules mortes

En présence de BSA, la fraction de cellules mortes (FCM) en fonction de la distance r au laser est réduite par rapport à une irradiation dans du PBS seul (figure 3.12), sans ajout de BSA. Dans la figure 3.12b, la fraction de cellules mortes est calculée sur deux intervalles : pour $r < 10 \mu\text{m}$ et pour $10 < r < 35 \mu\text{m}$. Dans le premier intervalle, les dommages directs contribuent potentiellement à la fraction de cellules mortes mesurée. Dans le second intervalle, la mort cellulaire est due exclusivement aux dommages indirects attribués aux ERO secondaires.

Pour $20 \mu\text{m} \leq r \leq 35 \mu\text{m}$, la fraction de cellules mortes en présence de BSA est inférieure à la mort basale ($\sim 5\%$), et supérieure à la mort basale lors d'une irradiation sans ajout de BSA.

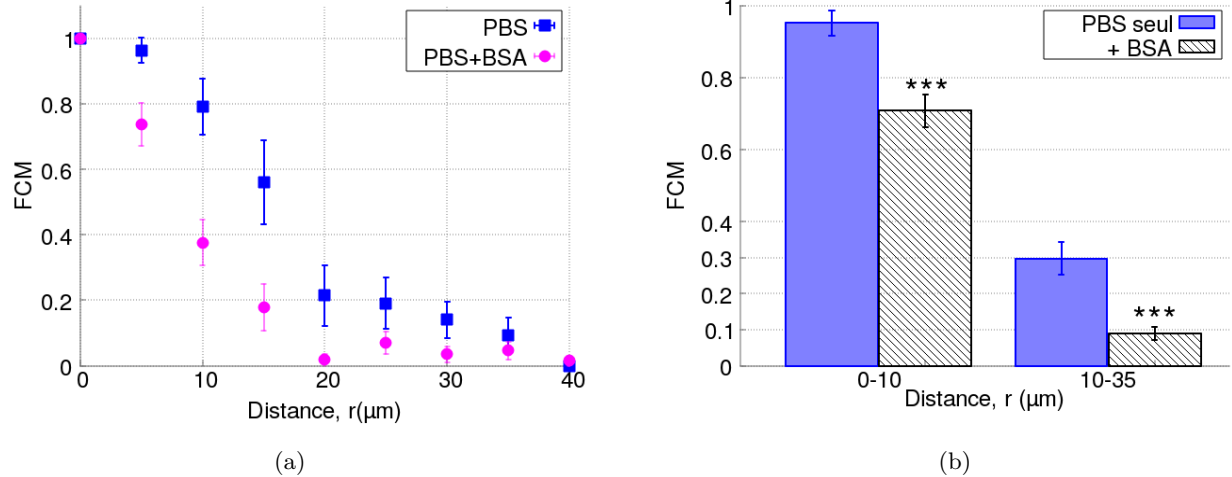


FIGURE 3.12 – **Effet de la BSA sur la Fraction de Cellules Mortes (FCM)**. FCM en fonction de la distance r des cellules à l'axe du laser. PBS : pas de BSA dans le milieu extra-cellulaire. PBS + BSA : 3mM de BSA ajouté au PBS. En présence de BSA la FCM est réduite. **Figure (a)** FCM calculée sur $[r-2.5 \mu\text{m}, r+2.5 \mu\text{m}]$ pour chaque point de mesure. $n > 20$ cellules par intervalle. **Figure (b)** FCM pour une distance au laser $0 < r < 10 \mu\text{m}$ (cellules irradiées $40 < n_{\text{cell}} < 50$) et $10 \leq r \leq 35 \mu\text{m}$ ($100 < n_{\text{cell}} < 150$). (***) $p < 0.001$. Barres d'erreur (toutes figures) : erreurs standard à la moyenne obtenues par méthode bootstrap.

En conclusion, seul l'oxygène généré à l'extérieur des cellules contribue à la mort cellulaire. De plus, la BSA réduit la fraction de cellules mortes de manière importante dès $r = 5 \mu\text{m}$, donc les ERO secondaires contribuent à la mort dès une distance de $5 \mu\text{m}$ de l'axe du laser.

3.3.3.2 Estimation de la constante de réaction K_{ox}

La constante de réaction K_{ox} est inconnue, nous ne connaissons donc pas le facteur α qui traduit la réduction de la concentration d' $^1\text{O}_2$ en présence de 3mM de BSA. Nous sommes en mesure d'estimer l'effet de la puissance laser sur le taux de production d' $^1\text{O}_2$. Afin d'évaluer α , nous comparons donc la FCM en présence de BSA, mesurée suite à une irradiation à puissance laser $P = 50 \text{mW}$, à la FCM obtenue lors d'irradiations à différentes puissances laser.

Contrairement à la réduction de la puissance laser, l'ajout de BSA affecte uniquement la fraction de cellules mortes liée à la production extra-cellulaire de $^1\text{O}_2$. Nous comparons donc l'effet de la BSA et d'une réduction de la puissance pour une distance au laser $r > 10 \mu\text{m}$.

La fraction de cellules mortes mesurée (figure 3.13) est supérieure à la fraction observée pour $P = 12 \text{mW}$ et supérieure à celle obtenue pour $P = 22 \text{mW}$. La concentration en oxygène singulet est donc divisée par un facteur compris α entre $50/22 = 2.3$ et $50/12 = 4.2$. Après simulation numérique, pour prendre en compte l'impact de la déplétion en dioxygène sur le taux de production de $^1\text{O}_2$ en fonction de la puissance laser (simulations dans l'annexe C.2), $2.1 < \alpha < 3.8$. Le coefficient de réaction K_{ox} est donc compris entre 6.5×10^5 et $2.0 \times 10^6 \text{ s}^{-1}$ (calculé à partir de la formule de α).

En conclusion, au vu de l'action de la BSA sur la fraction de cellules mortes, le coefficient de réaction K_{ox} , qui caractérise la réaction de $^1\text{O}_2$ dans le PBS pour former des ERO secondaires, est compris entre $K_{ox} = 6.5 \times 10^5$ à $2 \times 10^6 \text{ s}^{-1}$. Les concentrations d'ERO secondaires seront estimées par la suite pour $K_{ox} = 2 \times 10^5$ et $2 \times 10^6 \text{ s}^{-1}$ afin d'obtenir un encadrement de leur valeur exacte.

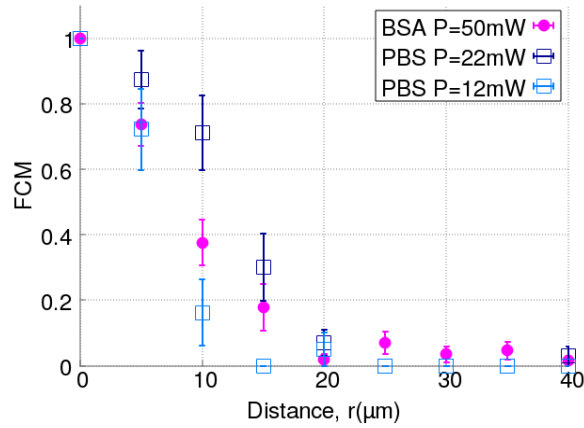


FIGURE 3.13 – Fraction de Cellules Mortes (FCM) en fonction de la distance r des cellules à l'axe du laser. La FCM dans du PBS seul pour différentes puissances laser P est comparée à la FCM obtenue dans du PBS à $P=50\text{mW}$ en présence de 3mM de BSA. Les FCM sont calculées sur des intervalles $[r-2.5\ \mu\text{m}, r+2.5\ \mu\text{m}]$ pour chaque point. $n > 20$ cellules par intervalle. Barres d'erreur (toutes figures) : erreurs standard à la moyenne obtenues par méthode bootstrap.

3.3.4 Estimation du temps de vie des ERO secondaires

Nous venons de confirmer l'existence d'ERO secondaires. Nous souhaitons désormais les caractériser. Au vu des composants présents dans le PBS, présentés en introduction, les possibilités de réaction de $^1\text{O}_2$ dans le PBS sont réduites, et nous avons identifié comme produits potentiels H_2O_2 , O_3 , H_2O_3 , O_2^- et $\text{HO}\cdot$.

Ces ERO ont des temps de demi-vie très différents dans le PBS (de la milliseconde pour $\text{HO}\cdot$ à plus de 24h pour H_2O_2). Les cellules sont irradiées en présence d'un flux de PBS afin d'estimer le temps de vie des ERO secondaires. De plus, le flux, en renouvelant le PBS, permettra d'identifier si des éléments organiques sont nécessaires à leur génération. En effet, les mécanismes associés à la production de $\text{HO}\cdot$ et O_2^- identifiés dans la littérature requièrent la présence d'éléments organiques qui ne font pas partie de la composition du PBS mais qui pourraient être synthétisés par les cellules.

3.3.4.1 Propriétés du flux

Les cellules sont irradiées dans une puce fluïdique en présence d'un flux de PBS. Le flux, de vitesse $\sim 10\ \mu\text{m}/\text{s}$ au niveau des cellules, permet d'éliminer les espèces secrétées par les cellules et autres débris organiques. Ainsi, si ces espèces sont nécessaires à la génération des produits de l'oxygène singulet, la mort en présence de flux devrait être réduite. De plus le flux réduit la concentration des espèces à plus longue durée de vie ($> 1\text{s}$: O_3 , H_2O_2 et O_2^- si sa concentration est $< 1\ \mu\text{M}$) et crée une asymétrie spatiale de concentration : la concentration est plus importante en aval du flux qu'en amont.

L'asymétrie est simulée numériquement [figure 3.14c](#). Des précisions supplémentaires sont apportées dans l'[annexe D](#). Nous ne retrouvons pas d'asymétrie marquée dans la fraction de cellules mortes expérimentale ([figure 3.14d](#)), ce qui encourage à penser que la ou les ERO secondaires présentes ont une durée de demi-vie maximale de l'ordre de 100ms.

3.3.4.2 Flux et stress cellulaire non-oxydant

Les cellules soumises à un flux sont potentiellement plus sensibles au stress oxydant. Une vitesse moyenne de flux de 0.19mm/s produit des contraintes de cisaillement $<0.2 \text{ dyn/cm}^2$ [251], en théorie trop faibles pour endommager des cellules MCF-7 [252-254]. Toutefois, malgré un aspect morphologique normal, les cellules se divisent peu en présence de flux : 10% de cellules se divisent en 24h comparé à $\sim 50\%$ dans une boîte de culture sans flux. La mort basale concerne de plus 10 +/- 2% des cellules en 24h, à comparer à 2.3 +/- 1% sans flux. Cette augmentation de la mort basale nous impose d'être prudents lorsque nous comparons la mort cellulaire avec et sans flux.

3.3.4.3 Flux et mort cellulaire

La génération d' $^1\text{O}_2$ extra-cellulaire en présence de flux provoque de la mort cellulaire comparable, voire plus élevée, que l'irradiation sans flux (figure 3.14a). Nous expliquons l'augmentation de la fraction de cellules mortes par l'augmentation de la mort basale en présence de flux (10% à comparer à 2%), qui traduit une fragilisation des cellules. La BSA, qui réduit la fraction de cellules mortes en l'absence de flux en désactivant l'oxygène singulet extra-cellulaire, réduit également la fraction de cellules mortes en présence de flux (figure 3.14b).

En conclusion, les cellules meurent à longue portée (distance $r > 10 \mu\text{m}$) lorsque les composés organiques dissous dans le PBS, et les divers débris cellulaires, sont évacués au moyen d'un flux. Nous proposons donc que l'oxygène singulet extra-cellulaire ne requiert pas la présence de composés organiques dans le PBS pour générer des produits toxiques. Enfin, l'absence d'asymétrie spatiale dans la distribution des cellules mortes en présence de flux suggère que la durée de vie des ERO secondaires est inférieure ou égale à $\sim 100\text{ms}$.

Parmi les ERO secondaires potentielles listées dans le tableau 3.1, H_2O_2 et O_3 ont une durée de demi-vie respectivement supérieure à 24h (dans le PBS) et d'environ 5min (dans de l'eau pure) : la fraction de cellules mortes observée en flux et l'absence d'asymétrie rendent leur présence improbable. H_2O_3 a une demi-vie de 20ms dans de l'eau distillée, et, pour $2 \times 10^5 \text{ s}^{-1} < K_{ox} < 2 \times 10^6 \text{ s}^{-1}$, $\text{HO}\cdot$ et O_2^- ont des durées de première demi-vies $< 1\text{ms}$ et $\sim 0.1\text{s}$ respectivement, compatibles avec le maintien de la fraction de cellules mortes. Toutefois, aucun des donneurs d'électron identifiés dans la littérature permettant de produire O_2^- à partir de $^1\text{O}_2$ ne fait partie de la composition du PBS. De même, la production de $\text{HO}\cdot$ par $^1\text{O}_2$ requiert a priori la présence de composés (phénols, NADPH) absents dans le PBS.

Afin de confirmer l'absence ou la présence de ces espèces, nous allons utiliser des désactivateurs de ERO et, pour l'anion superoxyde O_2^- , une méthode de détection par fluorescence. Toutes les expériences qui vont suivre sont effectuées sans flux.

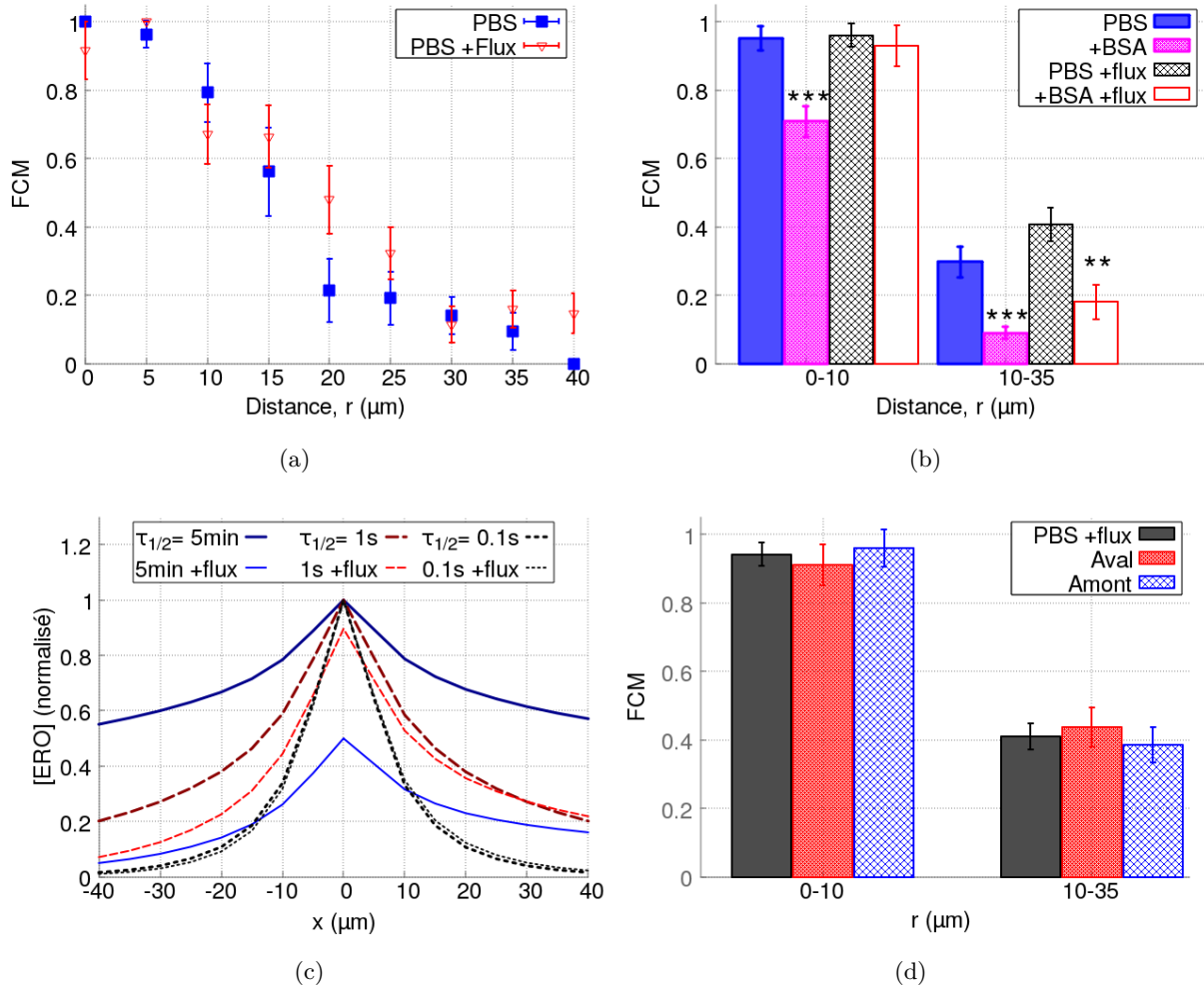


FIGURE 3.14 – **Irradiation extra-cellulaire en présence d'un flux de PBS.** **Figure (a)** Fraction de cellules mortes lors d'une irradiation sans flux dans une boîte de pétri, et avec flux dans un canal. **Figure (b)** Comparaison de la FCM pour $0 < r < 10$ et $10 < r < 35$ μm pour des irradiations avec et sans flux, et avec et sans BSA. L'effet de la BSA confirme la présence de dommages dus à $^1\text{O}_2$ extra-cellulaire. Indicateurs statistiques : ** : $p < 0.01$, *** : $p < 0.001$. Barres d'erreur : erreur standard à la moyenne.

Figure (c) Simulation du profil de concentration d'ERO [ERO], avec et sans flux, pour des espèces de demi-vie $\tau_{1/2}$ (dégradation du 1^{er} ordre. Le flux est dirigé de X- (amont) en X+ (aval). La concentration est normalisée par rapport à la concentration $X=0$ en absence de flux. La concentration est moyennée sur la hauteur d'une cellule ($0 < z < 5$ μm), et $Y=0$ (position laser). Une forte asymétrie apparaît en présence de flux pour $\tau_{1/2} \sim 1\text{s}$. [ERO] est fortement réduite pour $\tau_{1/2} \sim 5\text{min}$. **Figure (d)** Fraction de cellules mortes expérimentale en aval et en amont du flux : pas d'asymétrie dans la distribution spatiale des cellules mortes.

3.3.5 Influence des désactivateurs d'ERO sur la mort cellulaire

Dans la partie Protocoles et Méthodes, nous avons présenté une liste de désactivateurs d'ERO et estimé leur efficacité de désactivation ([tableau 3.4](#)). Nous allons générer de l'oxygène singulet dans du PBS contenant un ou plusieurs désactivateurs et comparer la fraction de cellules mortes mesurée avec la fraction de cellules mortes mesurée suite à une irradiation dans du PBS seul.

Nous avons établi précédemment que l'oxygène singulet ne peut contribuer seul à la mort des cellules au delà d'une distance $r=10\mu\text{m}$ de l'axe du laser. Pour chaque désactivateur, la fraction de cellules mortes (FCM) sera donc évaluée sur deux intervalles : $r<10\mu\text{m}$, dans lequel l'oxygène singulet est potentiellement présent en quantités toxiques, et $10\geq r\geq 35\mu\text{m}$ où seules des ERO produits de l'oxygène singulet peuvent être responsables de la mort des cellules.

Parmi les désactivateurs utilisés (catalase, iodure de potassium -KI-, superoxyde dismutase -SOD-, et pyridine), seul les ions I^- apportés par KI peuvent traverser la membrane cellulaire. La catalase, la SOD et la pyridine désactivent uniquement les ERO extra-cellulaires (respectivement H_2O_2 , O_2^- , et H_2O_3).

3.3.5.1 Catalase : désactivation du peroxyde d'hydrogène

La catalase est une protéine (masse molaire 240kDa) présente dans les cellules vivantes pour réguler le taux de peroxyde d'hydrogène. Elle est non-toxique pour les cellules et soluble dans l'eau (et le PBS) à hauteur de 1mg/mL, soit une concentration de $4\mu\text{M}$. La catalase (d'origine bovine, Sigma-Aldrich) catalyse la dismutation de H_2O_2 en O_2 et H_2O ([équation \(3.35\)](#)) avec une constante de réaction de $K_{cat}=10^5\text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ [[205;206](#)]. La catalase n'a pas d'effet sur la concentration des autres ERO secondaires potentiels.



Nous avons mesuré une durée de demi-vie de H_2O_2 dans le PBS supérieure à 24h. Au vu de l'absence de réduction de la FCM lors de la mise sous flux des cellules, nous ne nous attendons pas à ce que la mort cellulaire soit provoquée par H_2O_2 .

Nous n'observons pas d'effet statistiquement significatif ($p>0.5$) sur la fraction de cellules mortes en présence de catalase [figure 3.15](#). H_2O_2 ne semble donc pas impliqué dans la mort des cellules. Ceci est cohérent avec l'absence de mort cellulaire observé en flux et la concentration de H_2O_2 générée (au maximum $50\mu\text{M}$ à comparer à la toxicité de H_2O_2 pour une exposition des cellules de 10min, estimée à plus de 1mM.)

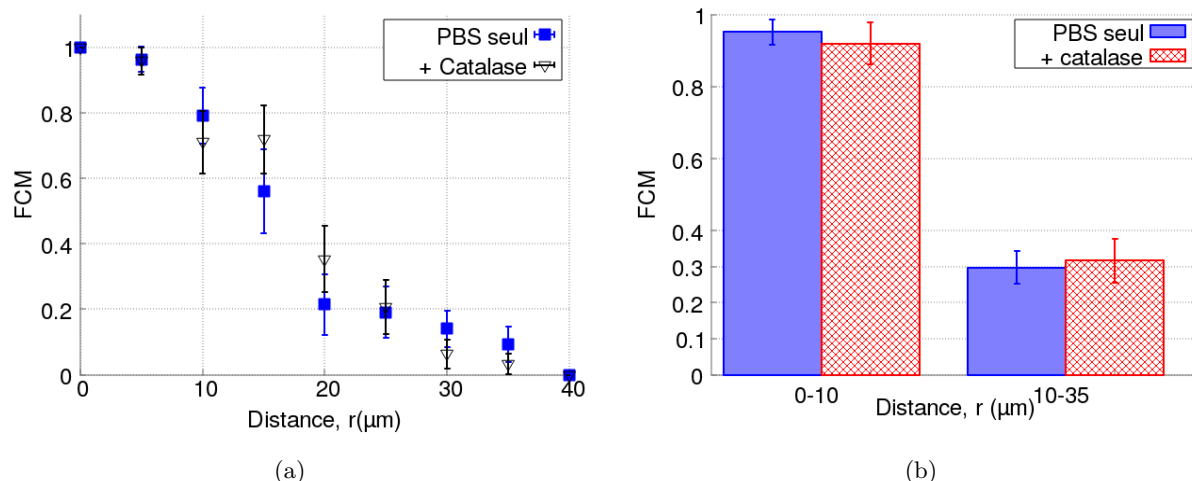


FIGURE 3.15 – **Effet de la catalase sur la fraction de cellules mortes.** Fraction de cellules mortes (FCM) avec/sans $4\ \mu\text{m}$ de catalase en fonction de la distance r à l’axe du laser. **Figure (a)** Chaque point est la FCM calculée sur un intervalle de $5\ \mu\text{m}$, $[r-2.5\ \mu\text{m} : r+2.5\ \mu\text{m}]$. **Figure (b)** FCM pour une distance au laser $0 < r < 10\ \mu\text{m}$ (nombre de cellules irradiées : $40 < n_{cell} < 50$) et $10 \geq r \geq 35\ \mu\text{m}$ ($100 < n_{cell} < 130$). Pas de différence significative : valeur $p > 0.5$. Barres d’erreurs (toutes figures) : erreur standard à la moyenne estimées par méthode bootstrap.

3.3.5.2 Pyridine : désactivation du trioxydane

Le trioxydane, ou sesquioxyde d’hydrogène, H_2O_3 est une des ERO les moins étudiées. B.H. Bielski *et al.* ont caractérisé en 1968^[255] le spectre d’absorption dans l’UV de H_2O_3 dans des solutions d’acide perchlorique (HClO_4). A. Engdahl *et al.*^[256] ont plus récemment caractérisé H_2O_3 , généré dans des matrices d’argon par photolyse d’un mélange d’ozone et peroxyde d’hydrogène, en spectrométrie infra-rouge. P.T. Nyffeler *et al.*^[257] ont identifié la présence de H_2O_3 par analyse en spectroscopie RMN du proton, suite à la réaction de O_3 et H_2O_2 à très faible température dans de solvants organiques.

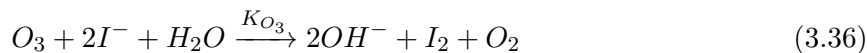
La génération de H_2O_3 à partir de $^1\text{O}_2$ et de molécules d’eau est énergétiquement possible^[198]. Elle n’a toutefois jamais été mesurée expérimentalement. H_2O_3 a une demi-vie d’environ 20ms dans de l’eau distillée^[200], soit une distance de parcours de l’ordre de la dizaine de microns.

La pyridine ($\text{C}_5\text{H}_5\text{N}$) est une base faible aromatique, qui a été présentée par J. Cerkovnik *et al.*^[200] comme un bon désactivateur potentiel de H_2O_3 . Le coefficient de réaction entre H_2O_3 et la pyridine est toutefois inconnu, tout comme les produits de réaction formés. Afin de maximiser les chances de voir un effet, les cellules sont irradiées en présence de 30mM de pyridine, soit la concentration maximale de pyridine qui n’est pas suivie d’une augmentation de la mort basale des cellules. La pyridine est un mauvais désactivateur de $^1\text{O}_2$ ($K=10^5\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$ ^[235], soit une concentration de $^1\text{O}_2$ en présence de 30mM de pyridine valant plus de 99% de la concentration sans ajout de pyridine).

Nous n’obtenons pas de réduction significative de la fraction de cellules mortes en présence de pyridine seule (données non présentées). Lors d’irradiations en présence de pyridine et d’autres désactivateurs, nous mettons en évidence que la pyridine réagit pour former des produits toxiques les cellules (résultats présentés dans l’annexe C.4.5) qui provoquent de la mort cellulaire. Nous n’avons donc pas pu conclure sur la présence ou l’absence de H_2O_3 .

3.3.5.3 KI : désactivation de l'ozone et du radical hydroxyle

L'iodure de potassium (KI) est un sel inorganique non-toxique (concentrations testées jusqu'à 100mM). Il se solubilise dans l'eau en ions I^- et K^+ . Les ions I^- réagissent avec O_3 [258] (équation (3.36)) et $HO\cdot$ [208;209] (équation (3.37)).



L'ajout de 1mM de KI au PBS diminue la concentration de O_3 et de $HO\cdot$ de plus d'un facteur 1000. Si O_3 et/ou $HO\cdot$ sont responsables de mort cellulaire, nous nous attendons à réduire la FCM au moins autant que l'ajout de BSA (désactivateur de 1O_2).

Effet de l'ajout de KI sur la fraction de cellules mortes. Nous observons une réduction significative de la mort cellulaire sur les longues distances au laser. Sur l'intervalle $10 < r < 35 \mu m$ la fraction de cellules mortes passe de 30% à 11.5%. Sur l'intervalle $0 < r < 10 \mu m$, la fraction de cellules mortes est similaire à la FCM lors d'une irradiation dans du PBS seul. L'ajout de KI ne permet donc que d'éliminer une partie des dommages extra-cellulaires. Il est donc plusieurs ERO extra-cellulaires soient responsables de la mort cellulaire mesurée, et que KI n'en désactive qu'une partie.

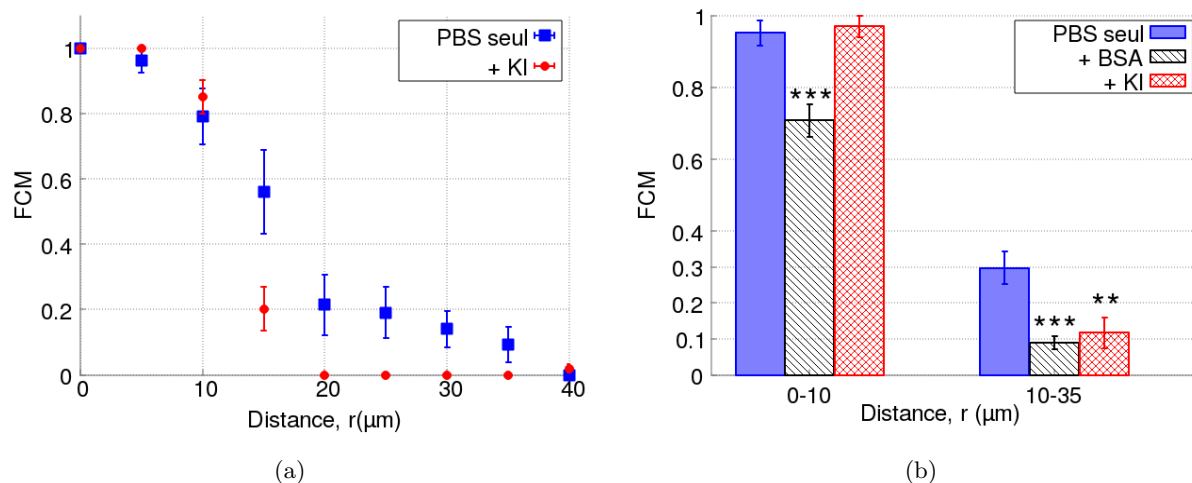


FIGURE 3.16 – **Effet de KI sur la fraction de cellules mortes.** **Figure (a)** Fraction de cellules mortes avec/sans KI en fonction de la distance r au laser. Chaque point est la FCM calculée sur un intervalle de $5 \mu m$ [$r-2.5 \mu m : r+2.5 \mu m$]. **Figure (b)** FCM pour une distance au laser $0 < r < 10 \mu m$ ($30 < n_{cell} < 50$) et $10 \geq r \geq 35 \mu m$ ($70 < n_{cell} < 150$). Barres d'erreurs : erreur standard à la moyenne estimées par méthode bootstrap. Indicateurs statistiques : ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

Il nous faut déterminer si KI désactive O_3 et/ou $HO\cdot$. Aucun des deux ERO n'est un bon candidat pour être produit par 1O_2 dans le PBS et expliquer la mort cellulaire.

Ozone et mort cellulaire dans le PBS. L'ozone, O_3 , a une durée de vie de l'ordre de plusieurs minutes dans de l'eau et des buffer phosphates. Lors des expériences en flux, nous aurions dû observer une réduction de la fraction de cellules mortes, ou une asymétrie dans la mort cellulaire, en présence d'une ERO secondaires à la durée de vie $> 1s$. Nous n'avons observé aucun de ces phénomènes. Ce résultat s'oppose à l'hypothèse de dommages létaux provoqués par l'ozone.

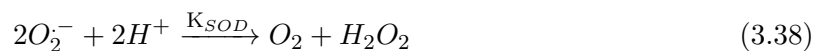
HO· et mort cellulaire dans le PBS. Au vu de la littérature, nous avons en début du chapitre estimé la toxicité de HO· à $\sim 0.1 \mu\text{M}$ (pour obtenir une fraction de cellules mortes de 50%). Pour $2 \times 10^5 \text{s}^{-1} < K_{ox} < 2 \times 10^6 \text{s}^{-1}$, la concentration de HO· est de l'ordre de $0.1 \mu\text{M}$ au niveau de l'axe du laser ($r=0$) et de respectivement 10 nM et 0.8 nM à $r=10$ et $r=30 \mu\text{m}$. La décroissance de la concentration en fonction de la distance au laser est trop abrupte pour être cohérente avec la fraction de cellules mortes, et de la fraction de cellules mortes en fonction de la puissance laser. Ces estimations de concentration (simulations numériques dans l'annexe C.3.3) négligent de plus toute réaction entre le PBS et les ions hydroxyle, or la présence d'ions phosphate réduit a priori la durée de demi-vie de HO· [204].

Enfin, les mécanismes de production de HO· à partir de $^1\text{O}_2$ identifiés dans la littérature requièrent la présence de molécules organiques. L'absence de réduction de la fraction de cellules mortes en présence de flux semble toutefois écarter l'hypothèse de réactifs organiques.

L'action de la SOD sur la fraction de cellules mortes (présenté ci-dessous) nous amène à proposer que KI désactive HO·, mais que HO· n'est pas produit directement par $^1\text{O}_2$.

3.3.5.4 SOD : désactivation de l'anion superoxyde

Le radical anion superoxyde est généré par le métabolisme lors de réactions routinières, notamment la phosphorylation oxydative [221;249;250]. Afin de limiter sa concentration à des niveaux physiologiques, les cellules produisent une enzyme, la superoxyde dismutase (SOD). La SOD catalyse, avec une constante de réaction $K_{SOD} \sim 10^9 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$, la réaction de O_2^- avec des protons pour former H_2O_2 (équation (3.38)).



Comme la dismutation de O_2^- produit H_2O_2 , lui-même toxique en concentrations élevées, $20 \mu\text{M}$ de SOD sont ajoutés au PBS pour une série d'irradiations, et supplémentés de $4 \mu\text{M}$ de catalase lors d'une seconde série.

Effet de l'ajout de SOD sur la fraction de cellules mortes. Nous observons un effet sur la fraction de cellules mortes, notamment à des distances $10 < r < 35 \mu\text{m}$ du laser (figure 3.17). Les irradiations en présence de SOD ($20 \mu\text{M}$) et de SOD ($20 \mu\text{M}$) avec de la catalase ($4 \mu\text{M}$) donnent des fractions de cellules mortes similaires, proches aux fractions de cellules mortes observées précédemment en présence de KI. Le coefficient de réaction de la SOD avec $^1\text{O}_2$ est trop faible pour que l'effet de la SOD sur $^1\text{O}_2$ soit responsable de cet effet (discussion sur les coefficients en ?? C.4.4.2). En outre, la SOD ne réagit ni avec O_3 [244], ni avec HO· [211], et les ions I^- ne réagissent pas avec O_2^- [247]. Nous faisons donc l'hypothèse que O_2^- et HO·, ou O_2^- et O_3 font partie de la même chaîne de réactions.

Possibilités de réaction entre O_3 et O_2^- . A notre connaissance, aucun mécanisme de génération O_3 à partir de O_2^- dans du PBS n'a été mis en évidence. L'anion superoxyde est un sous-produit de la décomposition de l'ozone [218], toutefois la concentration résultante d' O_2^- à l'état stationnaire est de l'ordre de 0.3 nM à $\text{pH}=7.4$ [260] pour une concentration initiale d'ozone de $60 \mu\text{M}$, soit supérieure à la concentration maximale d'ozone que nous pouvons produire ($50 \mu\text{M}$). Au vu de la littérature, la concentration toxique du superoxyde (associé à une fraction de cellules mortes de 0.5) est de l'ordre de $100 \mu\text{M}$, soit trois ordres de grandeur au dessus. Enfin, nos résultats en présence de flux qui s'opposent à l'hypothèse de la présence d'ERO toxiques à durée de vie de plus 1s, nous encouragent à écarter définitivement l'hypothèse de la présence de l'ozone, dont la demi-vie est de plusieurs minutes dans le PBS.

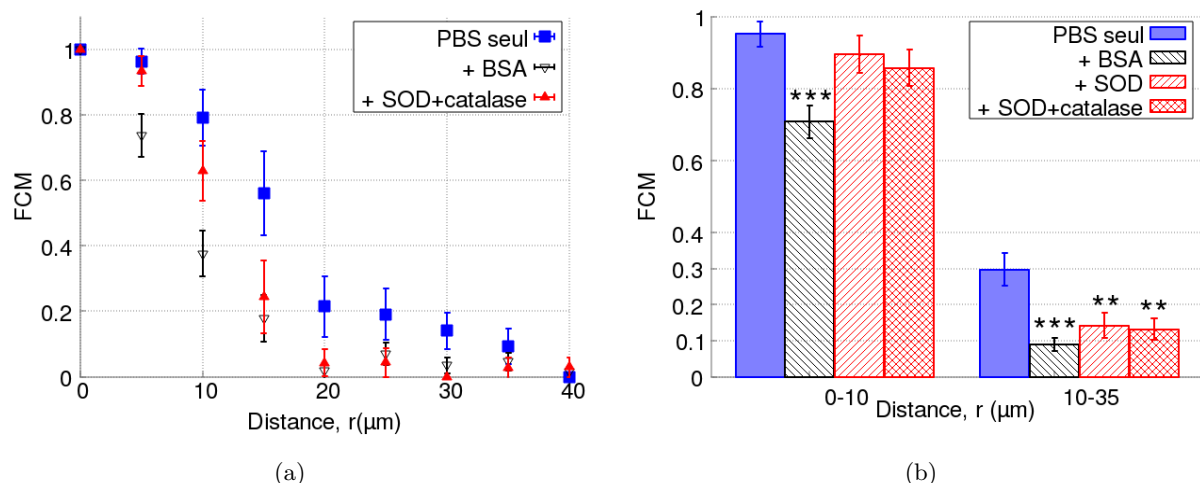
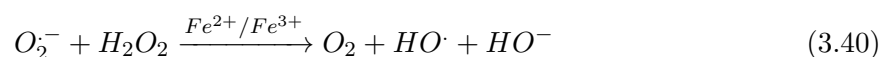
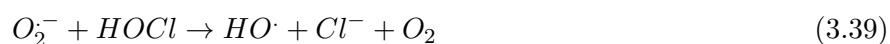


FIGURE 3.17 – **Effet de la SOD sur la fraction de cellules mortes.** (a) Fraction de cellules mortes avec/sans SOD ou BSA en fonction de la distance r au laser. Chaque point est la FCM calculée sur un intervalle de $5\ \mu\text{m}$, $[r-2.5\ \mu\text{m} : r+2.5\ \mu\text{m}]$. (b) FCM pour une distance au laser $0 < r < 10\ \mu\text{m}$ (cellules : $30 < n_{cell} < 50$) et $10 \leq r \leq 35\ \mu\text{m}$ ($100 < n_{cell} < 150$). Barres d'erreurs : erreur standard à la moyenne estimées par méthode bootstrap. Indicateurs statistiques : ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$. $p > 0.1$ lorsque les barres ne sont pas marquées. Les comparaisons de populations sont effectuées avec le PBS seul.

(c) Profil de concentration normalisé. La concentration maximale, atteinte pour

Possibilités de réaction entre $\text{HO}\cdot$ et O_2^- . A notre connaissance, aucun mécanisme de génération de $\text{HO}\cdot$ à partir de O_2^- dans du PBS n'a été mis en évidence. La génération de $\text{HO}\cdot$ à partir de O_2 a été constatée en présence d'acide hypochloreux HOCl [261] (équation (3.39)) ou, dans les cellules, en présence de H_2O_2 à travers la réaction de Haber-Weiss [262;263] et de ions fer (équation (3.40)).



Contrairement aux autres désactivateurs testés, les ions I^- peuvent pénétrer la membrane des cellules [247;264], il est donc possible que l'action de KI ait lieu dans les cellules. Les molécules O_2^- dans le PBS peuvent pénétrer dans la cellule à travers les canaux chlorure ClC_3 [265]. Les enzymes SOD intra-cellulaires synthétisées par les cellules accélèrent la dismutation des ions superoxyde dans les cellules, ils sont donc également source de H_2O_2 . Il est donc plausible que la formation de $\text{HO}\cdot$ ait lieu dans les cellules. Nous émettons donc l'hypothèse que $^1\text{O}_2$ produit O_2^- et que O_2^- réagit au niveau des cellules pour former des radicaux hydroxyle.

Toxicité de O_2^- et $\text{HO}\cdot$ et fraction de cellules mortes. Les toxicités respectives O_2^- et $\text{HO}\cdot$ sont compatibles avec la mort mesurée. La concentration $[\text{O}_2^-]$ de superoxyde, pour $2 \times 10^5 \text{s}^{-1} < K_{ox} < 2 \times 10^6 \text{s}^{-1}$, est comprise entre 21 et $3\ \mu\text{M}$ pour une distance $0 < r < 40\ \mu\text{m}$ au laser. La toxicité élevée de $\text{HO}\cdot$ ($\sim 0.1\ \mu\text{M}$) permet de ne pas exclure que $\text{HO}\cdot$ soit généré en quantités toxiques par une concentration extra-cellulaire de O_2^- de plusieurs micromoles.

Mécanisme de génération de O_2^- à partir de $^1\text{O}_2$ dans le PBS. La génération de O_2^- par $^1\text{O}_2$ requiert la présence de donneur d'électrons. Aucuns de ceux identifiés dans la littérature ne font partie de la composition du PBS. Nous n'avons donc pas de mécanisme de production de O_2^- à proposer. Le PBS [191] contient quatre anions : deux anions phosphates ($[\text{H}_2\text{PO}_4^-] = 1.5\text{mM}$,

[HPO_4^{2-}]=8mM), des ions chlorure ($[\text{Cl}^-]=130\text{mM}$), et HO^- ($\sim 2.5 \times 10^{-7}$ M à pH=7.4). Hors HO^- , ces anions sont en quantités suffisantes pour que $^1\text{O}_2$ soit le réactif limitant. A notre connaissance, aucun de ces ions n'a été identifié (expérimentalement ou théoriquement) comme donneur d'électron potentiel pour $^1\text{O}_2$. Des expériences supplémentaires seront nécessaires pour déterminer le mécanisme de production de O_2^- .

En conclusion, nous proposons que la mort des cellules pour $r=20\mu\text{m}$ est due à l'anion superoxyde, produit par $^1\text{O}_2$ dans le PBS, et à HO^\cdot , produit de réaction de O_2^- et H_2O_2 à l'intérieur des cellules.

3.3.6 Bilan : ERO secondaires générées par $^1\text{O}_2$

Résumons les effets observés. La réduction similaire de la fraction de cellules mortes (FCM) en présence de SOD et KI suggère la présence d'anion superoxyde, O_2^- , et de radical hydroxyle, HO^\cdot . Au vu des propriétés des deux espèces (durée de demi-vie et toxicité), et des mécanismes de réaction identifiés dans la littérature, nous proposons que $^1\text{O}_2$ réagisse dans le PBS avec O_2^- , et que O_2^- réagisse dans les cellules pour former HO^\cdot . Il nous manque toutefois un mécanisme de réaction dans le PBS, permettant d'expliquer la production de O_2^- à partir de $^1\text{O}_2$. Au vu de l'absence de réduction de la fraction de cellules mortes en présence d'un flux, aucun composé organique ou sécrété par les cellules ne prend a priori part à la réaction de production de O_2^- .

A défaut de mécanisme de réaction, nous souhaitons confirmer la présence d'anion superoxyde en irradiant à 1270nm du PBS (sans cellules, et donc en l'absence de composés organiques) en présence de dihydroéthidium (HE), un composé qui réagit essentiellement avec O_2^- pour former une espèce fluorescente. Dans un second temps, nous allons discuter l'hypothèse d'une seconde ERO secondaire produite par $^1\text{O}_2$.

3.3.6.1 Détection de O_2^- par fluorescence du dihydroéthidium oxydé

Nous souhaitons confirmer la génération de O_2^- dans du PBS. Le dihydroéthidium (HE)^[79;266-268], est une molécule ($M=315$ Da) fluorescente qui réagit avec des ERO, notamment O_2^- pour produire des sous-produits également fluorescents. Nous irradiions du PBS contenant $100\mu\text{M}$ de HE à température et atmosphère ambiante. Dans un second temps, de la SOD et de la catalase sont ajoutés au PBS avant l'irradiation pour confirmer que le signal de fluorescence mesuré est bien dû à la présence de O_2^- .

Réactions de HE avec les ERO. HE réagit avec O_2^- pour former 2OH-E^+ . La réaction a lieu en deux temps^[266]. La première réaction est limitante, avec, d'après J. Chen *et al.*^[269], une constante de réaction $K_{HE} = 2 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$. D'autres études^[266;267] proposent des constantes de réaction supérieures comprises entre 10^5 et $10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$, mais ces valeurs ne semblent pas prendre en compte la dismutation de O_2^- ^[266]. HE réagit en outre avec H_2O_2 (et peut-être d'autres ERO) pour former de l'éthidium (E^+). Nous souhaitons ainsi détecter 2OH-E^+ sans détecter E^+ .

Propriétés de fluorescence. Les longueurs d'onde d'excitation et émission maximales du HE sont respectivement 350 et 420nm^[267]. E-OH^+ et E^+ ont des spectres d'excitation et d'émission distincts de celui de HE, mais proches entre eux ($\text{Ex} : 400-500$, $\text{Em} : 520-620$)^[267;269]. Afin de maximiser le ratio de fluorescence en faveur de E-OH^+ (tout en obtenant une intensité de fluorescence acceptable), il est conseillé de travailler à $\text{Ex/Em} = 405/570\text{nm}$ ^[267;269]. La meilleure sélectivité serait obtenue pour $\text{Ex/Em} = 480/540\text{nm}$ ^[269], mais l'intensité de signal est réduite. Nous mesurons l'intensité du signal de fluorescence pour des longueurs d'onde d'excitation et d'émission de respectivement 405nm et 588nm.

Simulation numérique de la production de 2OH-E⁺. Les conditions d'irradiation dans le PBS (waist du laser, puissance, position par rapport au fond de la boîte de culture) sont identiques que lors des expériences en présence de cellules. Les équations de réaction diffusion de O₂⁻ (équation (3.41)), de 2OH-E⁺ (équation (3.42)) et des éléments nécessaires à leur production (³O₂, ¹O₂ et HE) permettent de simuler numériquement l'évolution de leur concentration (figure 3.18a, figure 3.18b), pour les constantes de réaction K_{HE}= 2 × 10³ M⁻¹ s⁻¹ et K_{ox}= 2 × 10⁵ s⁻¹. La constante de réaction K= $\frac{\ln(2)}{\tau_{1/2}}$ avec τ_{1/2} = 3.5 μs traduit la désactivation de ¹O₂ par les molécules d'eau.

$$\frac{d[O_2^-]}{dt} = D\nabla^2[O_2^-] + K_{ox}[^1O_2] - K_2[O_2^-]^2 - K_{HE}[HE][O_2^-] \quad (3.41)$$

$$\frac{d[2OH - E^+]}{dt} = D\nabla^2[2OH - E^+] + K_{HE}[HE][O_2^-] \quad (3.42)$$

$$\frac{d[^1O_2]}{dt} = D\nabla^2[^1O_2] + \gamma[^3O_2] - K[^1O_2] - K_{ox}[^1O_2] \quad (3.43)$$

$$\frac{d[^3O_2]}{dt} = D\nabla^2[^3O_2] - \gamma[^3O_2] + K[^1O_2] \quad (3.44)$$

$$\frac{d[HE]}{dt} = D\nabla^2[HE] - K_{HE}[HE][O_2^-] \quad (3.45)$$

$$(3.46)$$

Le coefficient de diffusion du HE et de 2OH-E⁺ est estimé à D=5×10⁻¹⁰m²s⁻¹ au vu de leur masse molaire (M=315 et 347 Da respectivement), et des coefficients de diffusion de molécules similaires (glucose, M=192 Da, D=6.6×10⁻¹⁰m²s⁻¹, et insuline, M=5734 Da, D=2×10⁻¹⁰m²s⁻¹).

La concentration à l'état stationnaire de O₂⁻ est atteinte en moins d'une seconde. La concentration décroît légèrement sur les temps longs à cause de la déplétion en dioxygène à proximité de l'axe du laser. La concentration en 2OH-E⁺ n'atteint pas d'état stationnaire en 1h d'irradiation. Dans l'hypothèse de la génération de O₂⁻ par ¹O₂ dans le PBS, on s'attend ainsi à une augmentation de l'intensité de fluorescence dans le temps, avec un signal maximal mesuré au niveau de l'axe du laser.

Mesure du signal de fluorescence. La mesure de l'intensité de fluorescence est effectuée à la longueur d'onde d'excitation λ=405nm, et d'émission λ 588nm. Le signal de fluorescence est enregistré pendant 60 min (figure 3.18c, fluorescence dans du PBS seul). Une image du champs est prise avant le début de l'irradiation laser afin de mesurer la fluorescence lorsque le laser est éteint. La valeur de la fluorescence mesurée est retirée à la valeur mesurée lors de l'irradiation. Pour un suivi de 65 min, l'intensité de fluorescence normalisée atteint 0.5 autour de 15 min après le début de l'irradiation. Dans le profil obtenu par simulation, cette valeur est atteinte plus tôt, avant 10 min. Nous expliquons cette différence par le fait que la simulation ne tient pas compte d'une éventuelle dégradation du HE et/ou de 2OH-E⁺ dans le PBS ou de processus de photo-blanchiment liés à l'exposition à la lumière (les mesures sont faites dans le noir et les images de fluorescence prises toutes les 5 minutes). Par conséquent, le temps auquel la fluorescence de 0.5 est atteint est probablement sous-estimé dans la simulation. Le profil spatial d'intensité expérimental est quant à lui plus étroit que le profil de concentration simulé (figure 3.18d, fluorescence dans du PBS seul). Ceci est également cohérent avec une dégradation de 2OH-E⁺ dans le temps.

Signal en présence de SOD et catalase. Afin de vérifier que le signal de fluorescence traduit effectivement la présence de O₂⁻, 20 μM de superoxyde dismutase sont ajoutés au PBS. On remarque une diminution de l'intensité du signal mais pas une disparition (figures 3.18c et 3.18d). La SOD catalyse la dismutation de O₂⁻ en H₂O₂ et O₂, avec un ratio stœchiométrique

de 2 :1 (équation (3.38)) entre O_2^- et H_2O_2 . Or H_2O_2 réagit avec le HE pour former E^+ , au spectre de fluorescence proche de $2OH-E^+$. La fluorescence détectée pourrait donc être celle de E^+ . La durée de demi-vie plus importante de H_2O_2 dans le PBS (plus de 24h à comparer à $\sim 0.1s$) expliquerait en outre le profil spatial plus large du signal de fluorescence. Afin d'empêcher la réaction de H_2O_2 avec le HE, $4\mu M$ de catalase sont ajoutés à la solution de PBS + SOD. Dans ces conditions, aucun signal de fluorescence n'est détecté figures 3.18c et 3.18d pendant l'irradiation. Le signal détecté en présence de la SOD seule est par conséquent attribué à H_2O_2 .

Ces résultats vont en conclusion dans le sens de la génération de O_2^- à partir de 1O_2 dans du PBS.

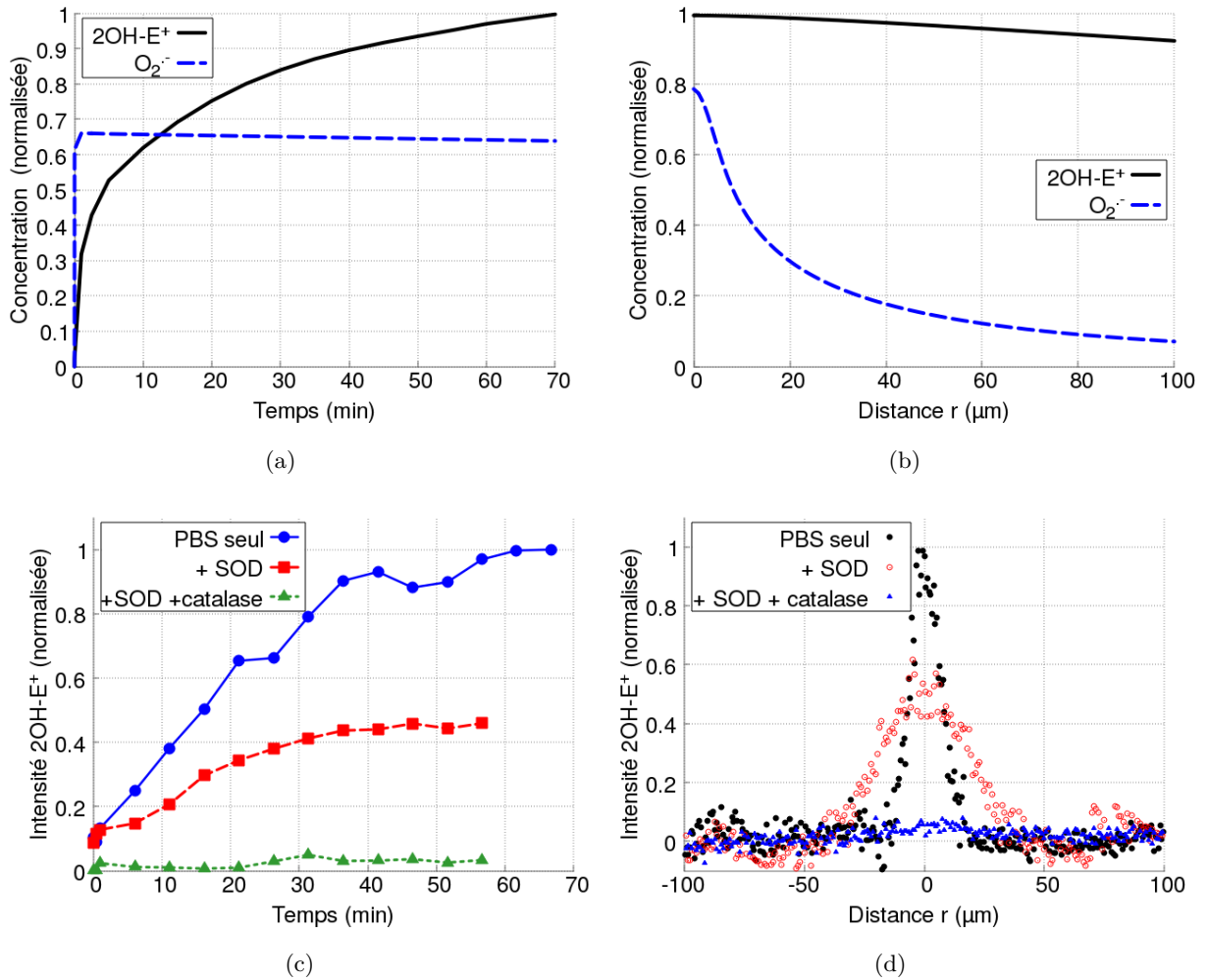


FIGURE 3.18 – **Détection de O_2^- en présence de HE.** Le laser est focalisé ($\omega=0.64\mu\text{m}$) aux coordonnées $(r,z)=(0,10\mu\text{mol})$ et produit 1O_2 en continu. **Figures (a),(b)** Simulations de la concentration de O_2^- et $2OH-E^+$. Coefficient de réaction entre 1O_2 et le PBS, $K_{ox} = 2 \times 10^5 \text{ s}^{-1}$. Coefficient de réaction entre HE et O_2^- , $K_{HE} = 2 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$. **Figure (a)** Évolution temporelle des concentrations de O_2^- et $2OH-E^+$, aux coordonnées $(r,z)=(0,0)$ (intersection entre l'axe du laser et le fond de la boîte de culture). La concentration est normalisée ($1=21\mu\text{m}$). **Figure (b)** profil spatial de la concentration de O_2^- et $2OH-E^+$ ($z=0$), 30 minutes après le début de l'irradiation. La concentration est normalisée ($1=17.8\mu\text{m}$). **Figure (c)** Intensités de fluorescence ($\lambda \text{ Em/Ex} = 405\text{nm}/588\text{nm}$) normalisées en fonction du temps, aux coordonnées $(r,z)=(0,0)$. PBS seul : solution de PBS contenant $100\mu\text{M}$ de HE. +SOD : solution de PBS contenant $100\mu\text{M}$ de HE et $20\mu\text{M}$ de SOD (la SOD réagit avec O_2^- pour former du peroxyde d'hydrogène H_2O_2). +SOD+catalase : $4\mu\text{M}$ de catalase (désactivateur de H_2O_2) sont ajoutés à la solution précédente. **Figure (d)** Intensités de fluorescence ($\lambda \text{ Em/Ex} = 405\text{nm}/588\text{nm}$) normalisées en fonction de la distance r à l'axe du laser ($z=0$). Mesures prise 30 minutes après le début de l'irradiation.

3.3.6.2 Discussion sur la possibilité de la présence d'une seconde ERO secondaire

Dans cette section, nous allons reprendre les résultats expérimentaux et montrer qu'ils ne sont pas cohérents avec l'hypothèse que O_2^- est la seule ERO secondaire. La génération d'une seconde espèce secondaire s'impose pour expliquer les fraction de cellules mortes observées.

Hypothèse d'une 2^e ERO secondaire et action des désactivateurs. Dans un premier temps, comparons l'effet sur la FCM de la BSA, désactivateur extra-cellulaire de 1O_2 , et l'effet de la SOD, désactivateur extra-cellulaire de O_2^- . Les résultats sont présentés [figure 3.19a](#). De la catalase est ajoutée à la solution de PBS contenant de la SOD afin de désactiver H_2O_2 , produit de réaction de la SOD avec O_2^- . La BSA réduit plus efficacement la FCM que la SOD (+ catalase). Rappelons ce que nous savons sur ces désactivateurs : 3mM de BSA divisent la concentration d' 1O_2 par un facteur 2 à 4 (en fonction de la constante K_{ox} qui caractérise la formation de ERO secondaires) et la concentration de O_2^- par un facteur 10 à 30 (simulations dans l'[annexe C.4.1](#)). 20 μ M de SOD divisent la concentration de O_2^- par un facteur supérieur à 150. Ainsi, la SOD est un désactivateur plus efficace de O_2^- que la BSA. Enfin, nous avons montré que la mort observée au delà d'une distance $r=10 \mu$ m du laser est à attribuer exclusivement aux ERO secondaires (dommages indirects).

Par conséquent, dans l'hypothèse où O_2^- est la seule ERO secondaire, sa désactivation totale devrait éliminer toute la mort cellulaire pour $r \geq 10 \mu$ m. Ainsi, pour $r \geq 10 \mu$ m, la FCM mesurée suite à une génération de 1O_2 extra-cellulaire en présence de SOD devrait être inférieure ou égale à la FCM mesurée suite à une génération de 1O_2 extra-cellulaire en présence de BSA. Les FCM mesurées [figure 3.19a](#) ne sont donc pas en accord avec l'hypothèse de O_2^- comme seule ERO secondaire. Remarquons enfin que la BSA a une action sur la concentration de cette ERO secondaire (puisqu'elle réduit la concentration de 1O_2) mais qu'il est probable que la SOD n'en ait pas. Nous attribuons donc la différence de FCM suite à une irradiation en présence de BSA et SOD (pour $5 \leq r \leq 15 \mu$ m) à l'existence d'une deuxième ERO secondaire.

Hypothèse d'une 2^e ERO secondaire et effet de la puissance laser. Reprenons dans un deuxième temps les FCM mesurées lors d'irradiations pour différentes puissances laser ([figure 3.19b](#)). Pour une puissance $P=7$ mW, nous ne mesurons plus de mort pour $r \geq 10 \mu$ m. Nous avons simulé l'effet de la puissance laser sur la concentration d'ERO secondaires potentiels en fonction de leur ordre de dégradation ([annexe C.2](#)). A $P=7$ mW, la concentration de O_2^- est divisée (par rapport à $P=50$ mW) par un facteur proche de 5, soit inférieure au facteur de division de la concentration de O_2^- par la BSA ou la SOD. Pourtant, l'ajout de SOD ou BSA au PBS ne permettent pas de réduire la FCM pour $r \geq 10 \mu$ m à 0. Par conséquent, la FCM non-nulle mesurée entre $r=10$ et $r=20 \mu$ m ([figure 3.19a](#)) ne peut être due à O_2^- . La FCM mesurée en présence de SOD pour $r > 10 \mu$ m est par conséquent attribuée à une seconde ERO secondaire.

Les profils simulés de concentration de O_2^- pour des puissances $P=50$, 22 et 7mW ([figure 3.19c](#)) permettent d'estimer les FCM attendues pour chaque puissance laser. A $P=50$ mW, la FCM est supérieure à la FCM observée sans irradiation ($FCM=0.05$) jusqu'à une distance $r=35 \mu$ m du laser. Le profil de concentration de O_2^- pour $P=50$ mW nous permet ainsi d'établir un seuil de toxicité de O_2^- (ligne rouge continue sur [figure 3.19c](#)). La réduction de la puissance décale spatialement ce seuil : il est atteint pour $r=20 \mu$ m à $P=22$ mW et autour de $r=0$ pour $r=7$ mW. Ce seuil est cohérent avec la FCM mesurée pour $P=22$ mW et pour $P=7$ mW (la mort mesurée à $r < 10 \mu$ m peut être attribuée à de la génération d' 1O_2 intra-cellulaire). Prenons désormais un second seuil (ligne bleue en pointillés sur [figure 3.19c](#)) défini par la concentration de O_2^- à $r=10 \mu$ m pour $P=22$ mW. La FCM vaut 0.7 et ne peut pas être attribuée à des dommages directs. On retrouve cette concentration à $r=22 \mu$ m pour $P=50$ mW. Dans l'hypothèse où O_2^- est la seule ERO secondaire, on devrait ainsi retrouver la même FCM. Or pour $P=50$ mW et

$r=22\ \mu\text{m}$, elle vaut près de 0.2. La génération d'une seconde ERO secondaire par $^1\text{O}_2$, qui contribue à la FCM à $r=10\ \mu\text{m}$ pour $P=22\text{mW}$ mais pas à $r=22\ \mu\text{m}$ à $P=50\text{mW}$ pourrait expliquer cette différence.

Propriétés de la 2^e l'ERO secondaire. Nous nous proposons désormais d'établir le profil de l'ERO secondaire, que nous appellerons "X", qui permettrait d'expliquer les FCM mesurées. La FCM est réduite à 0 par les désactivateurs SOD et BSA pour $r \geq 20\ \mu\text{m}$ (à $P=50\text{mW}$), X ne doit donc pas contribuer à la mort des cellules au delà de $20\ \mu\text{m}$. Le profil de concentration de X doit faire en sorte que son seuil de toxicité, établi pour $P=50\text{mW}$ et $r=20\ \mu\text{m}$ soit compatible avec les expériences faites à différentes puissances. Notamment, à $P=7\text{mW}$, la FCM est nulle pour $r=10\ \mu\text{m}$, et nous venons en outre d'établir que X doit contribuer à la mort des cellules pour $r=10\ \mu\text{m}$ pour $P=22\text{mW}$. Une espèce d'ordre 1 avec une demi-vie $\sim 20\text{ms}$ remplit ces conditions : la concentration seuil (ligne rouge en trait plein sur [figure 3.19d](#)) atteinte en $r=20\ \mu\text{m}$ pour $P=50\text{mW}$ est atteinte après $r=10\ \mu\text{m}$ pour $P=22\text{mW}$ et en $r=10\ \mu\text{m}$ pour $P=7\text{mW}$.

Vérifions enfin que l'action de la BSA sur X est compatible avec les FCM mesurées, dans l'hypothèse où il s'agit d'une espèce d'ordre 1 de demi-vie 20ms. Nous faisons l'hypothèse que la BSA ne désactive pas X. La réduction de la concentration de X en présence de BSA serait donc uniquement due à la réduction de la concentration de $^1\text{O}_2$ extra-cellulaire. Rappelons enfin que la BSA élimine également toute contribution de O_2^- à la FCM (simulation [figure 3.20a](#)). En présence de BSA ([figure 3.19a](#)) nous mesurons une FCM=0.2 à $r=15\ \mu\text{m}$, exclusivement attribuée à X. Vérifions donc que le seuil de toxicité de X et son profil de concentration en présence de BSA sont compatibles avec la FCM mesurée.

Les profils de concentration de X avec et sans BSA sont tracés [figure 3.20b](#). Pour être compatible avec les résultats, la concentration seuil de X doit être atteinte entre 15 et $20\ \mu\text{m}$ en présence de BSA (pour $P=50\text{mW}$). L'action de la BSA sur la concentration de $^1\text{O}_2$ dépend de la constante de réaction K_{ox} qui caractérise la génération de ERO secondaires (toutes) par $^1\text{O}_2$ dans le PBS. Nous avons montré précédemment que $6.5 \times 10^5 \text{s}^{-1} < K_{ox} < 2.0 \times 10^6 \text{s}^{-1}$. Les profils de concentration de X avec et sans BSA sont calculés pour $K_{ox}=2 \times 10^5 \text{s}^{-1}$ et $K_{ox}=2 \times 10^6 \text{s}^{-1}$ [figure 3.20b](#). Les seuils de concentration de X sont tracés sur la figure : la ligne bleue en pointillés représente le seuil pour $K_{ox}=2 \times 10^5 \text{s}^{-1}$ et la ligne rouge continue pour $K_{ox}=2 \times 10^6 \text{s}^{-1}$. Pour $K_{ox}=2 \times 10^6 \text{s}^{-1}$ les profils de concentration sont compatibles avec la mort observée. Pour $K_{ox}=2 \times 10^5 \text{s}^{-1}$ la FCM mesurée est trop élevée au vu de la toxicité attendue. Ainsi, X est un bon candidat pour expliquer les FCM mesurées dans l'hypothèse où K_{ox} serait plus proche de $2 \times 10^6 \text{s}^{-1}$ que $2 \times 10^5 \text{s}^{-1}$.

En conclusion, nous proposons que $^1\text{O}_2$ réagit dans le PBS pour former deux espèces, O_2^- et une seconde ERO "X" de demi-vie $\sim 20\text{ms}$. Les équations de réaction/diffusion des espèces se ré-écrivent selon les [équations \(3.47\) à \(3.50\)](#).

$$\frac{\partial [^1\text{O}_2]}{\partial t} = D\nabla^2 [^1\text{O}_2] + \gamma [^3\text{O}_2] - K [^1\text{O}_2] - K_{ox} [^1\text{O}_2] \quad (3.47)$$

$$\frac{\partial [^3\text{O}_2]}{\partial t} = D\nabla^2 [^3\text{O}_2] - \gamma [^3\text{O}_2] + K [^1\text{O}_2] \quad (3.48)$$

$$\Gamma_{\text{O}_2^-} = K_{ox} (\text{O}_2^-) [^1\text{O}_2] \quad (3.49)$$

$$\Gamma_X = K_{ox} (X) [^1\text{O}_2] \quad (3.50)$$

Avec $K_{ox}(\text{O}_2^-) + K_{ox}(X) = K_{ox} \sim 2 \times 10^6$ pour que l'action de la BSA sur "X" soit cohérente avec la fraction de cellules mortes mesurée, et $2 \times 10^5 \text{s}^{-1} < K_{ox}(\text{O}_2^-)$, $K_{ox}(X) < 2 \times 10^6 \text{s}^{-1}$ pour que les profils de concentration des deux espèces soient cohérent avec la fraction de cellules mortes observées à différentes puissances laser.

Remarquons enfin que 20ms correspond à la demi-vie de H_2O_3 dans de l'eau distillée^[200]. Nous n'avons pas pu conclure sur la présence ou l'absence de H_2O_3 à cause de la toxicité de la pyridine, il serait pertinent de chercher à détecter cette espèce par d'autres moyens.

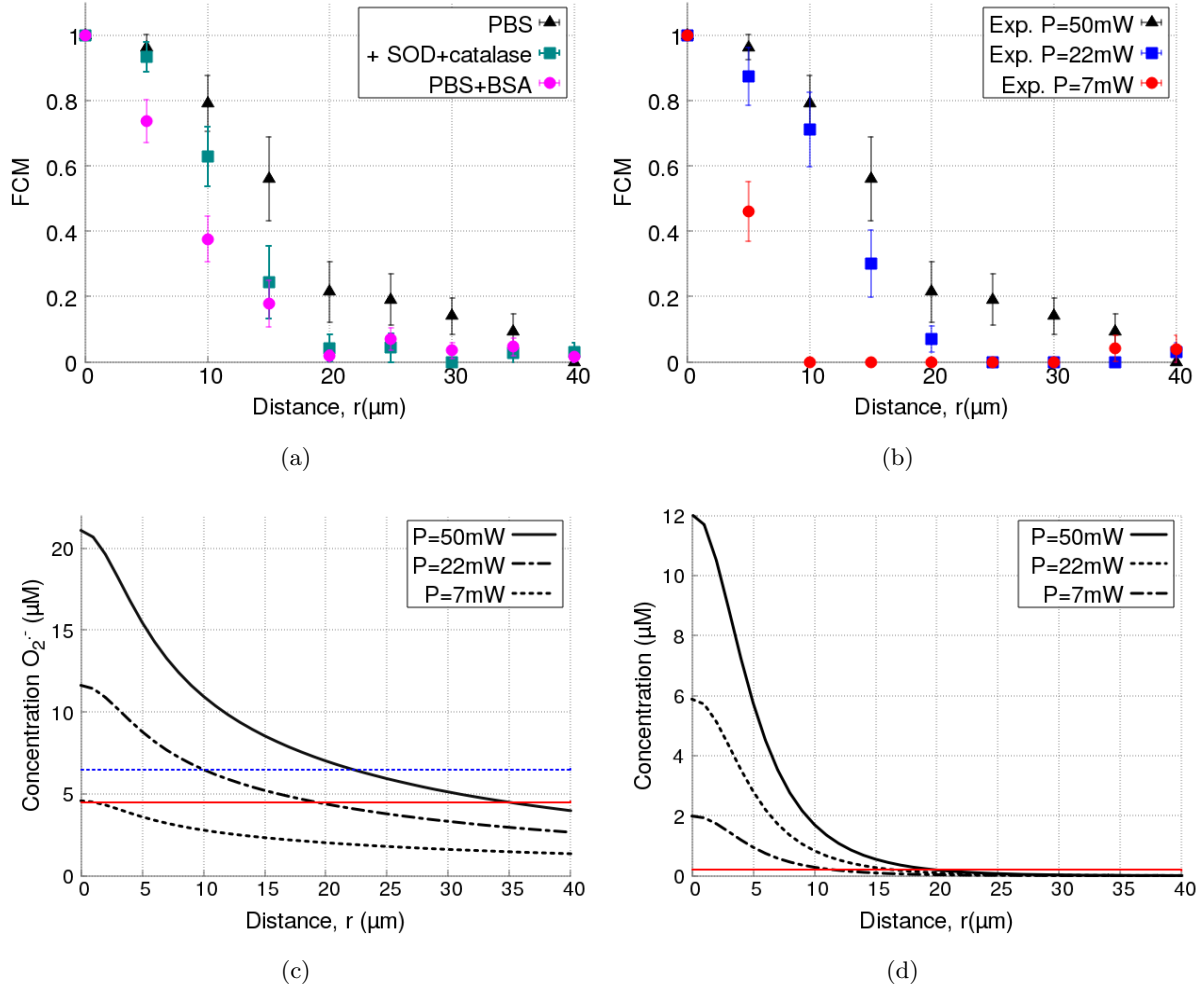


FIGURE 3.19 – Mise en évidence d’une seconde ERO secondaire. **Figure(a)** Fraction de cellules mortes (FCM) en fonction de la distance r au laser, lors d’irradiations dans du PBS, du PBS avec 3mM de BSA (désactivation de $^1\text{O}_2$ extra-cellulaire), et du PBS avec 20 μM de SOD + 4 μM de catalase (désactivation de O_2^- extra-cellulaire). **Figure(b)** Fraction de cellules mortes (FCM) en fonction de la distance r au laser, lors d’irradiations dans du PBS à différentes puissances laser : $P=50\text{mW}$, $P=22\text{mW}$ et $P=7\text{mW}$. **Figure(c)** Simulation numérique de la concentration de superoxyde en fonction de la puissance laser, pour $K_{ox} = 2 \times 10^6 \text{s}^{-1}$. Ligne rouge en trait plein : concentration seuil (FCM=0) pour $P=50\text{mW}$, atteinte en $r=35 \mu\text{m}$. Ligne bleue en pointillés : concentration telle que FCM~0.5 pour $P=50\text{mW}$, atteinte en $r=15 \mu\text{m}$. **Figure(d)** Simulation numérique de la concentration d’une ERO d’ordre 1 et de demi-vie 20ms en fonction de la puissance laser, pour $K_{ox} = 2 \times 10^6 \text{s}^{-1}$. Ligne rouge en trait plein : concentration seuil (FCM=0) pour $P=50\text{mW}$, $r=20 \mu\text{m}$.

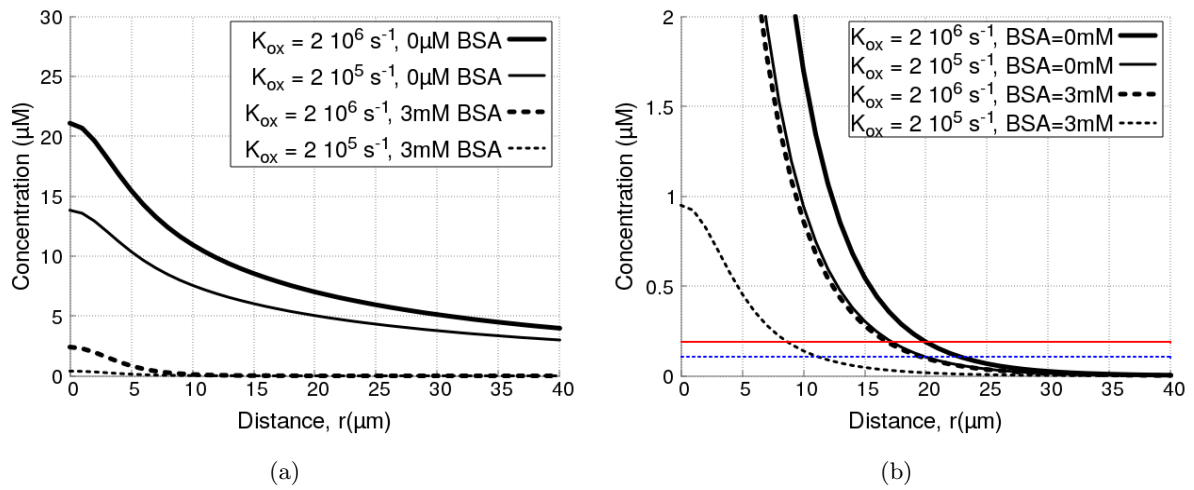


FIGURE 3.20 – **Simulation numérique de l'action de la BSA sur la concentration de ERO**, pour $K_{ox}=2 \times 10^5 \text{ s}^{-1}$ et $K_{ox}=2 \times 10^6 \text{ s}^{-1}$. Les concentrations sont moyennées sur la hauteur d'une cellule et dans le temps (durée d'irradiation 10 min). **Figure (a)** : effet de 3mM de BSA sur la concentration de O_2^- . **Figure (b)** Effet de 3mM de BSA sur la concentration d'une ERO d'ordre 1 et de demi-vie 20ms. Les droites rouges en trait plein et bleues en pointillés sont respectivement les concentrations seuils pour $K_{ox}=2 \times 10^6 \text{ s}^{-1}$ ($0.19 \mu\text{M}$) et $K_{ox}=2 \times 10^5 \text{ s}^{-1}$ ($0.10 \mu\text{M}$).

3.4 Conclusion et Perspectives

La génération d'oxygène singulet dans un tampon phosphate salin (PBS) à l'extérieur des cellules a permis de mettre en évidence la mort de cellules à des distances du laser trop élevées pour être dues à l'oxygène singulet seul. L'oxygène singulet génère des espèces réactives de l'oxygène (ERO) en quantités toxiques, capables de diffuser sur plusieurs dizaines de microns. L'existence de ces espèces rend inadaptée la mesure seule de la concentration cumulée d'oxygène singulet $[^1\text{O}_2]_C$ pour expliquer la mort cellulaire.

Nous avons mesuré l'effet sur la fraction de cellules mortes de différents désactivateurs de ERO, qui permettent de proposer l'anion superoxyde O_2^- comme sous-produit de $^1\text{O}_2$ dans le PBS. Nous avons confirmé la présence de O_2^- en mesurant dans du PBS sans cellules la fluorescence de 2OH-E^+ , produit de réaction de O_2^- avec du HE. Le radical hydroxyle, $\text{HO}\cdot$, contribue également à la mort cellulaire. Nous proposons que $\text{HO}\cdot$ est produit dans les cellules par O_2^- , à travers la réaction de Haber-Weiss. Enfin, les résultats expérimentaux sont compatibles avec l'hypothèse de la production par $^1\text{O}_2$ d'une seconde ERO secondaire, de demi-vie proche de 20ms. H_2O_3 , dont la demi-vie est de 20ms dans de l'eau distillée, reste donc un candidat potentiel pour expliquer la mort des cellules.

Des expériences complémentaires en vue d'identifier les ERO secondaires, d'estimer leur concentration, et d'identifier les mécanismes de réaction associés à leur production, seront nécessaires pour caractériser la réactivité de $^1\text{O}_2$ dans le PBS et la nature du stress oxydant subi par les cellules. Nous proposons une série d'expériences qui nous semblent pertinentes pour poursuivre cette étude. Nous terminons ce chapitre en reprenant les résultats d'irradiations de sphéroïdes afin de voir ce que les conclusions de ce chapitre peuvent apporter à l'interprétation de la mort des cellules à longue portée.

3.4.1 Détection des produits de $^1\text{O}_2$ et identification des mécanismes de génération

3.4.1.1 Mécanisme de génération de O_2^- dans du PBS

Des premières expériences ont confirmé la formation de produits du dihydroéthidium (HE) dans du PBS sans cellules, lors d'une irradiation à 1270nm. Ces expériences encouragent à penser que O_2^- est bien produit par $^1\text{O}_2$ et qu'aucune espèce organique n'est requise pour sa formation.

Il serait pertinent de comparer signal fluorescent obtenu dans du PBS et dans de l'eau déionisée afin de préciser les composants nécessaires à la génération de O_2^- . En l'absence de signal fluorescent dans de l'eau, un des composants du PBS serait alors donneur d'électron. Si un signal est mesuré dans de l'eau, O_2^- serait le produit d'une réaction avec l'eau ou avec un des gaz atmosphériques dilués.

Afin d'estimer quantitativement la concentration d' O_2^- , il serait intéressant de comparer l'intensité de fluorescence obtenue lors d'une irradiation avec un laser focalisé à 1270nm en présence de HE, et l'intensité mesurée en utilisant une méthode de génération de O_2^- qui permet d'estimer le taux de production du superoxyde. Par exemple la réaction de xanthine et xanthine oxydase.

3.4.1.2 Détection de H_2O_3

Nous avons émis l'hypothèse de l'existence d'une seconde ERO secondaire, de demi-vie $\sim 20\text{ms}$. Cette demi-vie est compatible avec la demi-vie de H_2O_3 dans de l'eau distillée. Nous

souhaiterions donc confirmer la présence ou l'absence de H_2O_3 lors d'une irradiation à 1270nm dans le PBS. Avec un laser focalisé et une puissance $P=50\text{mW}$, nous générons potentiellement H_2O_3 en concentration de l'ordre de $10\ \mu\text{M}$ au niveau du point de focalisation.

B.H. Bielski *et al.*^[255] ont caractérisé le spectre d'absorption dans l'UV de H_2O_3 dans des solutions d'acide perchlorique (HClO_4). Il serait intéressant de mettre en place une expérience permettant de reproduire cette mesure dans le PBS. Au vu de la courte durée de demi-vie de H_2O_3 ($\sim 20\text{ms}$), le laser devra irradier en continu le PBS pendant l'acquisition du signal par absorbance. De plus, H_2O_3 est généré dans un volume très petit proportionnellement au volume de PBS total dans la boîte de culture. Enfin le taux de production de H_2O_3 dépend de celui de $^1\text{O}_2$, lui-même proportionnel à la concentration en dioxygène. Pour cette raison, nous ne pouvons pas générer de $^1\text{O}_2$ dans une petite cuve ($100\ \mu\text{L}$ par exemple), hermétique aux échanges gazeux : la déplétion en dioxygène serait fortement augmentée par rapport aux expériences dans une boîte de culture. Un compromis entre ces différentes contraintes sera nécessaire.

L'électrochimie pourrait présenter une alternative intéressante. L'électrochimie consiste à mesurer l'évolution de la différence de potentiel entre deux électrodes, et donc de détecter indirectement les composants présents en solution. La génération locale d'espèces par irradiation laser se prête difficilement à des mesures d'absorption, mais pourrait être compatible avec la détection d'espèces générées à proximité de micro-électrodes. Un travail de chimie théorique permettrait d'estimer potentiels d'oxydoréduction associés à des réactions incluant H_2O_3 .

3.4.1.3 Détection de $\text{HO}\cdot$

La présence de l'anion hydroxyle est proposée suite à l'action de iodure de potassium (KI) sur la mort cellulaire, un désactivateur intra et extra-cellulaire de $\text{HO}\cdot$. Au vu des mécanismes identifiés dans la littérature, nous faisons l'hypothèse que $\text{HO}\cdot$ est généré dans les cellules par O_2^- .

La génération d'oxygène singulet en présence d'un désactivateur exclusivement extra-cellulaire de $\text{HO}\cdot$ permettrait de conclure sur le lieu de génération de $\text{HO}\cdot$. Plusieurs désactivateurs de $\text{HO}\cdot$ ^[211;212] ont été identifiés dans la littérature, une étude bibliographique plus approfondie est néanmoins nécessaire pour confirmer la spécificité des différents désactivateurs (notamment une faible réactivité avec O_2^- et $^1\text{O}_2$), et leur caractère exclusivement extra-cellulaire.

La détection de $\text{HO}\cdot$ par fluorescence en ajoutant dans le PBS (en présence de cellules et sans cellules) une sonde appropriée pourrait également permettre de conclure. Certaines sondes ont été caractérisées dans la littérature^[270-272] et pourraient servir de point de départ pour mettre en place une expérience.

3.4.2 Dommages indirects en sphéroïdes et mono-couches de cellules

La mort de cellules exposées à des dommages indirects suite à la génération d' $^1\text{O}_2$ extracellulaire est attribuée à l'anion superoxyde O_2^- et une ERO inconnue 'X' de demi-vie $\sim 20\text{ms}$. Des simulations numériques des profils de concentration ont permis d'établir des concentrations cumulées seuil de ces ERO secondaires. Nous souhaitons déterminer si ces seuils sont cohérents avec la mort cellulaire mesurée suite à l'irradiation de sphéroïdes et de cellules cultivées en mono-couches.

3.4.2.1 Interprétation de la mort observée en sphéroïdes

La recherche des sous-produits de l'oxygène singulet générée hors des cellules a été motivée par la différence de réponse de cellules cultivées en mono-couches et en sphéroïdes à une même

concentration cumulée d'oxygène singulet. Pour des irradiations de durée $\Delta t=30$ et 60min , environ 15% des cellules de sphéroïdes meurent à une distance $r=100\text{-}250\mu\text{m}$ de l'axe du laser. Ces effets disparaissent en présence d'albumine de sérum de bœuf (BSA), un désactivateur extra-cellulaire de $^1\text{O}_2$. Ainsi, la mort dans les sphéroïdes est due à la superposition des effets toxiques dus à $^1\text{O}_2$ et des ERO secondaires.

Nous allons simuler numériquement le profil de concentration de O_2^- pour les paramètres d'irradiation associés à la génération de $^1\text{O}_2$ dans les sphéroïdes (puissance $P=100\text{mW}$, faisceau de rayon $40\mu\text{m}$ - [figure 3.21a](#)). Nous souhaitons déterminer si la concentration cumulée de O_2^- qui réagit avec les cellules à longue portée dans des sphéroïdes est du même ordre de grandeur que la concentration cumulée de O_2^- qui réagit avec les cellules en mono-couches lors de la génération extra-cellulaire de $^1\text{O}_2$. Nous allons faire de même pour la seconde ERO secondaire potentielle ('X', espèce d'ordre 1 et de demi-vie 20ms).

Définition de la concentration cumulée seuil. Nous définissons une concentration cumulée seuil à dépasser pour obtenir une fraction de cellules mortes supérieure à la FCM obtenue en l'absence de génération de $^1\text{O}_2$, soit $\text{FCM}=0.05$. La concentration cumulée seuil correspond à la concentration de O_2^- reçue par les cellules intégrée sur la totalité de la durée d'irradiation. Le seuil de concentration cumulée est atteint dans les cellules à $r=35\mu\text{m}$ du laser. Remarquons que la concentration à $r=35\mu\text{m}$ n'est pas la même que la concentration moyenne sur une cellule entière dont la distance membrane-laser est de $r=35\mu\text{m}$. Les cellules font environ $30\mu\text{m}$ de diamètre. La concentration seuil $[\text{O}_2^-]_S$ est ainsi la concentration moyenne de O_2^- entre $r=35$ et $65\mu\text{m}$. $[\text{O}_2^-]_S= 2.5$ à $3.2\mu\text{M}$ (la valeur exacte dépend de la constante de réaction K_{ox} qui caractérise la réaction de production de O_2^- à partir de $^1\text{O}_2$), soit une concentration cumulée seuil $[\text{O}_2^-]_{CS}$ de 1.5 à 2mM ($[\text{O}_2^-]_S \times \Delta t$ avec $\Delta t=10\text{min}$).

Pour l'espèce 'X', la concentration cumulée seuil $[\text{X}]_{CS}$ est atteinte à une distance $r=20\mu\text{m}$ du laser, $[\text{X}]_{CS}=11\text{-}20\mu\text{M}$. Par voie de comparaison, la concentration cumulée seuil de $^1\text{O}_2$ (intra-cellulaire) est de $[\text{O}_2]_{CS} = 0.5\text{mM}$ pour obtenir une $\text{FCM}=0.05$. Rappelons enfin que la concentration cumulée seuil est une quantité générée et pas la quantité d'espèces qui réagit effectivement avec les cellules vivantes : parmi les 0.5mM de $^1\text{O}_2$ générée, une fraction se désexcite potentiellement sans causer de dommages.

Concentrations cumulées seuil et mort dans les sphéroïdes. La FCM dans les sphéroïdes en fonction de la distance à l'axe du laser n'a pas été mesurée directement. La fraction de cellules mortes est évaluée à partir des profils d'intensité de la fluorescence des cellules mortes. Premièrement, remarquons que les expériences de génération extra-cellulaire de $^1\text{O}_2$ ont été faites dans du PBS tandis que les sphéroïdes sont irradiés dans du milieu de culture. En début de chapitre, nous avons mis en évidence ([figure 3.4](#)) que la fraction de cellules mortes produite par une irradiation extra-cellulaire est réduite en présence de milieu de culture. Une expérience d'irradiation de culture de sphéroïdes ($n=8$) dans du PBS ne provoque pas de mort différant de la mort mesurée dans des sphéroïdes cultivés dans du milieu de culture. Il est possible que les composants du milieu de culture responsables de la réduction de la FCM soit présents en concentration plus réduite dans l'espace inter-cellules.

La FCM dans les sphéroïdes en fonction de la distance à l'axe du laser n'a pas été mesurée directement. La fraction de cellules mortes est évaluée à partir des profils d'intensité de la fluorescence des cellules mortes. Nous superposons [figure 3.21](#) les concentrations cumulées seuil obtenues pour $^1\text{O}_2$, O_2^- et l'ERO 'X' avec les profil de fluorescence de sphéroïdes irradiés 10 et 30 minutes. Les concentrations cumulées seuil et la distance r au laser à laquelle les seuils sont atteints sont simulés pour une constante de réaction $K_{ox} = K_{ox}(\text{O}_2^-) + K_{ox}(\text{X}) = 0.2 \times 10^6 \text{s}^{-1} +$

$1.8 \times 10^6 \text{s}^{-1}$. Nous retrouvons des résultats très similaires pour $2 \times 10^5 \text{s}^{-1} < K_{ox}(\text{O}_2^-)$, $K_{ox}(\text{X}) < 2 \times 10^6 \text{s}^{-1}$.

Dans les figures 3.21b à 3.21d nous pouvons définir les zones de contribution à la mort cellulaire de chaque ERO. Lors des expériences sans BSA (figures 3.21b et 3.21c), les seuils de concentration cumulée de O_2^- et 'X' sont plus éloignés de l'axe laser que le seuil de $^1\text{O}_2$. Ainsi les dommages indirects provoqués par les ERO secondaires étendent la zone de mort. L'augmentation du signal de fluorescence pour une irradiation de $\Delta t=30\text{min}$ (par rapport à $\Delta t=10\text{min}$) est cohérente avec le seuil associé à O_2^- . Dans les deux cas, le seuil de O_2^- coïncide avec une intensité de fluorescence normalisée de ~ 0.2 . Lorsque 3mM de BSA sont ajoutés au milieu extra-cellulaire (figure 3.21d), le seuil le plus éloigné du laser est celui de $^1\text{O}_2$. Rappelons que lors de la génération de $^1\text{O}_2$ en présence de BSA, on retrouve en surface des sphéroïdes une zone de mort de même diamètre qu'en mono-couches. Il est donc cohérent que le diamètre de la zone de mort soit, en présence de BSA, déterminé par les dommages directs. Nous retrouvons à nouveau une intensité de fluorescence normalisée de 0.2 au niveau du seuil de $^1\text{O}_2$.

Dans l'hypothèse où les simulations rendent compte des dommages dans les sphéroïdes, nous nous attendions à une intensité de fluorescence proche de zéro lorsque le seuil de ERO le plus éloigné de l'axe est atteint. Nous trouvons un seuil à 0.2 dans les trois cas étudiés. Cette différence pourrait être due à des différences de composition du milieu entre PBS et milieu inter-cellules. En mono-couches, le DMEM réduit la fraction de cellules mortes lors d'une irradiation extra-cellulaire, mais en sphéroïdes, la disposition géométrique des cellules pourrait altérer la composition du milieu dans l'espace inter-cellules. Des espèces secrétés par les cellules pourraient servir de réactifs pour augmenter la concentration d'ERO secondaires. Cette différence pourrait être également provoquée par des interactions inter-cellules qui augmenteraient la mort des cellules en périphérie. Nous avons dans le chapitre 2 traité les sphéroïdes avec des produits chimiques affectant la densité des jonctions inter-cellules (connexines 43) et nous avons montré que ces jonctions ont une action sur la réponse au stress. D'autres acteurs pourraient ainsi être responsable de la mort des cellules à longue portée. Néanmoins, les seuils établis à partir des expériences de génération extra-cellulaire en mono-couches sont cohérents avec l'évolution des profils de fluorescence des sphéroïdes en fonction des paramètres expérimentaux.

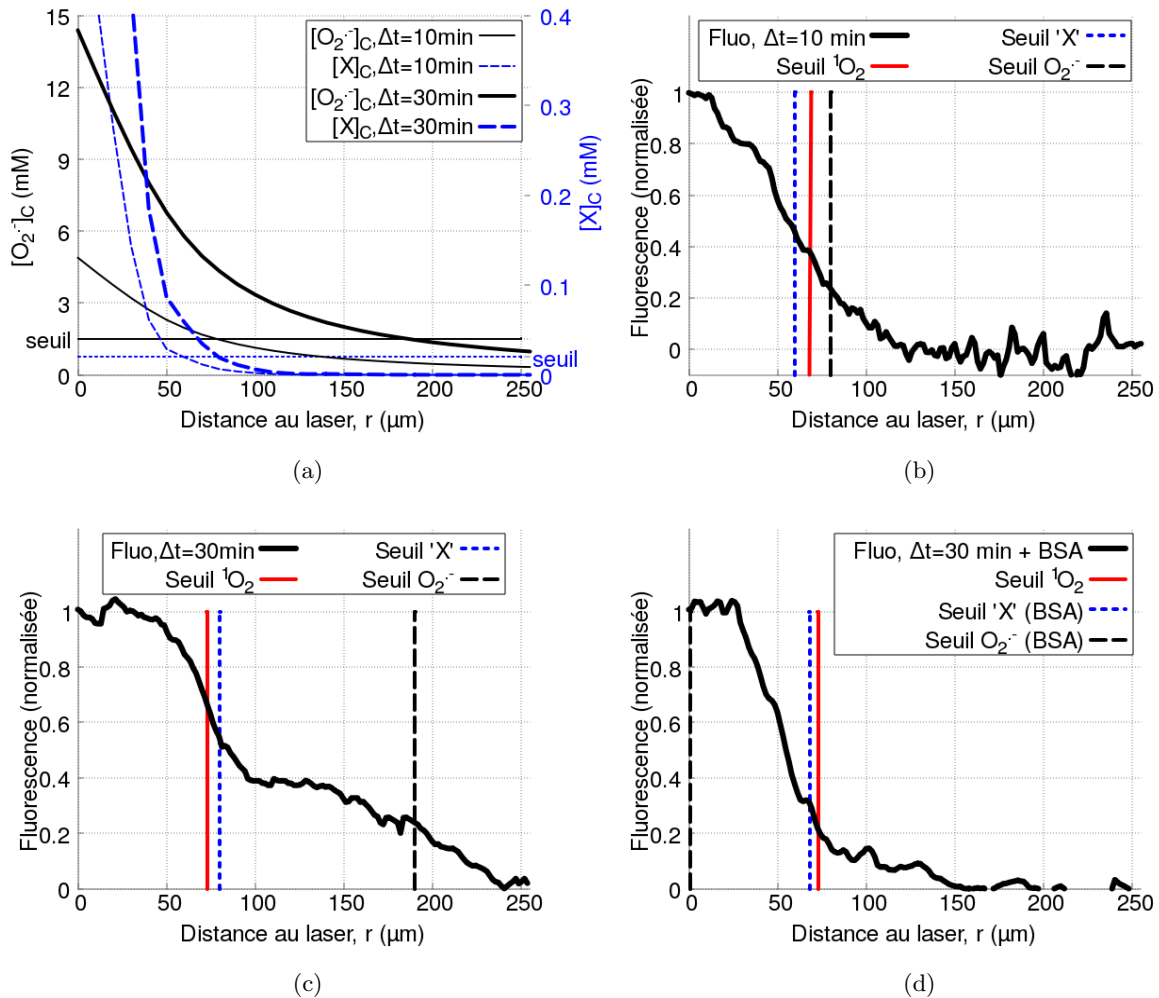


FIGURE 3.21 – Cohérence du profil de fluorescence de sphéroïdes irradiés avec les seuils de concentrations de ERO. **Figure (a)** : Simulation numérique des concentrations cumulées de O_2^- et de l'ERO X (demi-vie 20ms) en fonction de la distance r à l'axe du laser, dans les conditions expérimentales associées à l'irradiation de sphéroïdes. Les seuils représentés par des droites correspondent à une fraction de cellules mortes de 0.05 dans les expériences avec génération extra-cellulaire de 1O_2 . **Figure (b)** Profil de l'intensité de fluorescence des cellules mortes de sphéroïdes irradiés $\Delta t = 10\text{min}$ en fonction de la distance à l'axe du laser. La distance au laser à laquelle sont atteints les seuils de concentration de 1O_2 (intra-cellulaire), O_2^- et 'X' sont marqués par des droites. **Figure (c)** Profil et seuils associées à des sphéroïdes irradiés $\Delta t = 30\text{min}$. **Figure (d)** Profil et seuils associés à des sphéroïdes irradiés $\Delta t = 10\text{min}$ dans du milieu complété avec 3mM de BSA. Le seuil le plus éloigné de l'axe du laser est celui associé à la génération intra-cellulaire de 1O_2 : les ERO secondaires ne sont pas présentes en concentration suffisante pour étendre la zone de mort.

3.4.2.2 Interprétation de la mort observée en mono-couches

Nous distinguons dans cette section les expériences de génération d' $^1\text{O}_2$ extra-cellulaire, et les expériences d'irradiation de cellules cultivées en mono-couches. Ces dernières correspondent aux expériences présentées dans le chapitre 2 dans lesquelles des mono-couches de cellules étaient irradiées avec un laser de rayon $\omega=40\ \mu\text{m}$. Dans les expériences d'irradiation de mono-couches, nous n'avons pas retrouvé les effets à longue portée mesurés dans des sphéroïdes irradiés dans les mêmes conditions.

Nous avons affirmé précédemment que le manque d'effet statistiquement significatif de la BSA sur la mort de cellules cultivées en mono-couches nous permet d'émettre l'hypothèse de l'absence de dommages indirects en mono-couches : les ERO secondaires seraient produites en quantités trop faibles pour être toxiques. Nous avons ainsi à partir des expériences d'irradiation (pour un waist $\omega=40\ \mu\text{m}$, une puissance laser $P=100\text{mW}$, et une durée d'irradiation $\Delta t=10\text{min}$) établi une courbe dose réponse pour $^1\text{O}_2$ qui associe une Fraction de Cellules Mortes (FCM) à une concentration cumulée d' $^1\text{O}_2$ et fixe le seuil de toxicité de $^1\text{O}_2$, défini par $\text{FCM}=0.05$, à 0.5mM . Toutefois nous avons aussi remarqué que la courbe dose-réponse varie en fonction de la durée d'exposition Δt , notamment pour les FCM faibles (figure 3.22). Nous souhaitons vérifier si cette variation peut être provoquée par des dommages indirects.

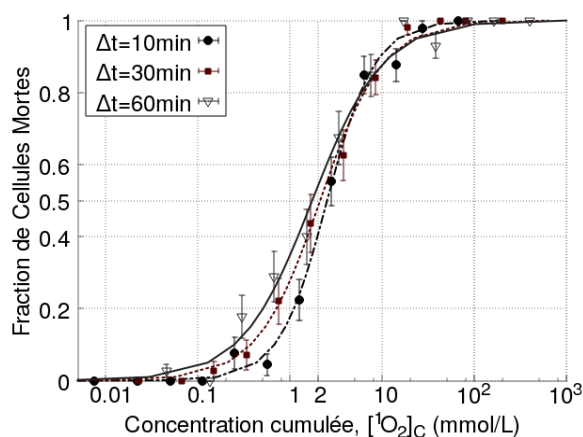


FIGURE 3.22 – **Fraction de Cellules Mortes (FCM) en fonction de la concentration cumulée d'oxygène singulet, $[^1\text{O}_2]_C$, lors d'une irradiation de durée $\Delta t=10, 30$ et 60min .** Nous observons une variation de la mort avec Δt , notamment pour les FCM faibles.

Contrairement aux expériences de génération de $^1\text{O}_2$ extra-cellulaire, les mono-couches étaient irradiées dans du milieu de culture (Dulbecco's Modified Eagle Medium -DMEM- supplémenté avec 10% de sérum fœtal de veau, 1% de L-glutamine, et des antibiotiques). Nous avons montré en début de chapitre que la génération extra-cellulaire de $^1\text{O}_2$ dans du milieu de culture réduit fortement la fraction de cellules mortes par rapport à la génération dans du PBS (figure 3.4). Nous avons alors émis l'hypothèse que certains composants du milieu de culture désactivent les ERO secondaires et limitent ainsi les dommages à longue portée. Lors d'expériences précédentes, dont les résultats ont été publiés en 2012^[4], F. Anquez *et al.* ont mis en évidence un effet fort de la BSA sur la fraction de cellules mortes en mono-couches. Ce résultats méritent d'être revisités afin de confirmer que les ERO secondaires ne contribuent pas de manière significative à la mort de cellules en mono-couches dans nos conditions d'irradiation.

F. Anquez *et al.* ont généré de l'oxygène singulet par excitation optique directe à 1270nm dans des cellules MCF-7 cultivées en mono-couches. Les cellules sont recouvertes de milieu de

Expérience	D_{mort} (μm)	$D_{seuil} \text{}^1\text{O}_2$	$D_{seuil} \text{O}_2^-$	$D_{seuil} \text{'X'}$	Espèce	Seuil (mM)
Sans BSA	500	300	500	450	O_2^-	7
1mM de BSA	420	300	0	420	ERO 'X'	1
5mM de BSA	300	300	0	280		

TABLE 3.5 – **Concentrations seuil d'ERO secondaires pour provoquer la mort de cellules en mono-couches et irradiées dans du milieu de culture.** Les seuils de concentration cumulée des ERO secondaires (O_2^- et l'ERO 'X' inconnue) sont estimés à partir des valeurs du diamètre de mort (D_{mort}) mesurés expérimentalement par F. Anquez *et al.*^[4]. Le diamètre D_{seuil} définit la zone autour de l'axe du laser dans laquelle la concentration de l'ERO est suffisante pour provoquer la mort des cellules. L'expérience sans BSA permet de définir le D_{seuil} de O_2^- et l'expérience avec 1mM de BSA le D_{seuil} de l'ERO 'X'. L'ajout de BSA avant irradiation réduit la concentration extra-cellulaire de $^1\text{O}_2$ et de O_2^- et réduit ainsi le D_{seuil} des ERO secondaires sans affecter le D_{seuil} de $^1\text{O}_2$ (dommages directs provoqués par $^1\text{O}_2$ intracellulaire). Les concentrations cumulées seuil ainsi estimées "Seuil (mM)" sont respectivement 4 et 50 fois plus élevées que celles estimées lors des expériences de génération extra-cellulaire de $^1\text{O}_2$ dans du PBS. Nous attribuons cette différence à la désactivation des ERO secondaires par des composants présents dans le milieu de culture.

culture lors de l'irradiation. L'ajout de 1mM et 5mM de BSA au milieu de culture réduit le diamètre de mort (zone contenant les cellules mortes) de $\sim 500 \mu\text{m}$ (sans BSA) à respectivement 430 et 300 μm . Nous concluons donc que des ERO secondaires sont générées en quantités toxiques et que 1mM de BSA ne suffit pas à éliminer entièrement la contribution à la mort cellulaire de ces ERO. Les cellules sont irradiées pendant $\Delta t=1\text{h}30$ avec un laser de waist $\omega=250 \mu\text{m}$ à une puissance de 200mW. Les conditions expérimentales, hormis les paramètres d'irradiation (ω , $P, \Delta t$) sont donc les mêmes que celles des irradiations de mono-couches de cette thèse ($\omega=40 \mu\text{m}$, $P=100\text{mW}$, $\Delta t=5$ à 60 minutes). Nous souhaitons déterminer si les diamètres des zones de mort mesurés dans les deux conditions d'irradiation sont cohérents entre eux au vu des concentrations de $^1\text{O}_2$ et de ERO secondaires générées.

Définition de seuils de concentrations cumulées en mono-couches. Nous ne connaissons pas l'effet du milieu sur les ERO secondaires. Nous avons donc simulé les profils de concentration de O_2^- et de l'ERO 'X' associés aux paramètres d'irradiation de F. Anquez *et al.* en négligeant la dégradation dans le milieu de culture. Les diamètres de mort mesurés par F. Anquez *et al.* nous permettent de calculer de nouveaux seuils de concentration cumulée de O_2^- et de ERO 'X'. Ces seuils sont indiqués dans le [tableau 3.5](#). Le seuil de concentration cumulée de $^1\text{O}_2$ que nous avons expérimentalement lors des expériences en mono-couche est cohérent avec le diamètre de mort de 300 μm , mesuré par F. Anquez *et al.* lors de la génération de $^1\text{O}_2$ en présence 5mM de BSA. L'ajout de BSA (1 ou 5mM) réduit suffisamment la concentration O_2^- pour éliminer entièrement sa contribution à la mort cellulaire. Ainsi, l'écart entre les diamètres de mort pour différentes concentrations de BSA (430 μm pour 1mM BSA et 300 μm pour 5mM BSA) ne peut être attribué à O_2^- et permet ainsi de définir le seuil de concentration cumulée de l'ERO X. Ce seuil correspond à la concentration cumulée de 'X' à $r=215 \mu\text{m}$ ($=430/2$) de l'axe du laser lors de la génération de $^1\text{O}_2$ en présence de 1mM de BSA. Ce seuil nous permet de déterminer la contribution à la mort de 'X' lors de la génération de $^1\text{O}_2$ en présence de 0mM et 5mM de BSA, au moyen du profil spatial de concentration de 'X', simulé numériquement pour chacun de ces cas de figure.

La concentration de 'X' est trop faible pour expliquer le diamètre de mort de 500 μm suite à la génération d' $^1\text{O}_2$ sans BSA. La mort est par conséquent attribuée à O_2^- . La concentration cumulée seuil de O_2^- , $[\text{O}_2^-]_{CS}$, est déduite de la concentration de O_2^- à $r=250 \mu\text{m}$ de l'axe du

Expérience	D_{mort} (μm)	$D_{seuil} \text{}^1\text{O}_2$	$D_{seuil} \text{O}_2^-$	$D_{seuil} \text{'X'}$
$\Delta t=10\text{min}$	110 +/- 7	110	0	0
$\Delta t=20\text{min}$	125 +/- 8	125	50*	0
$\Delta t=30\text{min}$	135 +/- 3	130	70*	30*
$\Delta t=60\text{min}$	155 +/- 4	140	155	90

TABLE 3.6 – **Comparaison mort mesurée et attendue en mono-couches.** Le diamètre de mort D_{mort} définit la zone de cellules mortes autour de l’axe du laser ($\text{FCM} < 0.05$ à l’extérieur de D_{mort}). Les diamètres D_{seuil} définissent la zone de cellules mortes attendue autour de l’axe du laser. Les concentrations cumulées seuil des ERO secondaires sont estimées à partir des données de F. Anquez *et al.* [4]. *A cette distance du laser la concentration cumulée d’ $\text{}^1\text{O}_2$ suffit à elle seule pour garantir $\text{FCM}=1$: toutes les cellules sont mortes (vérifié expérimentalement et avec 3mM de BSA pour $\Delta t=30\text{min}$). Les ERO secondaires n’augmentent pas la fraction de cellules mortes, déjà maximale.

laser. $[\text{O}_2^-]_{CS}=7\text{mM}$, soit environ 5 fois plus élevée que la concentration cumulée obtenue lors de la génération extra-cellulaire de $\text{}^1\text{O}_2$ dans du PBS. Nous attribuons cette augmentation du seuil à la désactivation de O_2^- par le milieu de culture. La concentration cumulée seuil de l’ERO X est quant-à-elle estimée à 1mM, soit environ 50 fois plus élevée que lors des expériences de génération extra-cellulaire de $\text{}^1\text{O}_2$ dans du PBS.

Seuils et dommages indirects en mono-couches. Enfin, nous utilisons les seuils estimés pour prédire la mort suite à des irradiations de mono-couches pour les paramètres de notre étude ($\Delta t=10,30$ ou 60min , $\omega=40\mu\text{m}$ et $P=100\text{mW}$). Le [tableau 3.6](#) compare le diamètre de mort mesuré expérimentalement avec le diamètre de mort (D_{seuil}) prédit par les profils de concentration simulés associés aux paramètres d’irradiation. Les ERO secondaires sont effectivement produites en quantités trop faibles pour étendre le diamètre de mort pour des irradiations de durée $\Delta t=10$ et 30min . Cela est par conséquent cohérent avec l’absence d’effet de la BSA sur le diamètre de mort mesuré dans le chapitre 2. Nous n’avons pas fait d’expériences d’irradiation de $\Delta t=60\text{min}$ en présence de BSA. Pour $\Delta t=60\text{min}$, les seuils de concentration suggèrent que le diamètre de la zone de mort est étendu de $\sim 10\mu\text{m}$ (soit environ 1/3 du diamètre d’une cellule) à cause de dommages indirects provoqués par O_2^- .

Nous avons défini la toxicité de $\text{}^1\text{O}_2$ intra-cellulaire à partir de l’expérience $\Delta t=10\text{min}$. L’absence de toxicité liée aux ERO secondaires permet de valider la courbe dose-réponse établie. Pour les durées d’irradiation $\Delta t=20$ et 30min , les ERO secondaires sont présentes en concentrations toxiques sur une zone restreinte de la zone de mort. La concentration cumulée de $\text{}^1\text{O}_2$ dans cette zone est suffisante pour que la fraction de cellules mortes soit de 1, la présence d’ERO secondaires n’augmente donc pas la fraction de cellules mortes, déjà maximale. En conclusion, les paramètres d’irradiation utilisés ($\omega=40\mu\text{m}, P=100\text{mW}, \Delta t=5-60\text{min}$) ne produisent des ERO secondaires en concentrations suffisantes pour augmenter la fraction de cellules mortes et étendre la zone de mort que pour $\Delta t=60\text{min}$. L’augmentation de la FCM expérimentale pour les concentrations cumulées d’ $\text{}^1\text{O}_2$ faibles ($< 1\text{mM}$) à $\Delta t=60\text{min}$ (par rapport à $\Delta t=10\text{min}$, [figure 3.22](#)) est ainsi attribuée aux ERO secondaires. Les écarts entre $\Delta t=10$ et 30min sont attribués à la taille des échantillons (nombre de cellules irradiées à une intensité laser donnée).

Chapitre 4

Contrôle par $^1\text{O}_2$ du mode de mort de cellules cultivées en mono-couches

Dans les chapitres précédents nous avons mesuré la mort cellulaire suite à la génération d'oxygène singulet, nous avons estimé le taux de production d'oxygène singulet et les quantités d' $^1\text{O}_2$ toxiques, et nous nous sommes intéressés aux dommages à longue portée. Dans ce chapitre, nous nous intéressons au mode de mort des cellules induit par un stress oxydant initié par $^1\text{O}_2$. En thérapie, il peut être intéressant de favoriser l'enclenchement de certains mécanismes de mort plutôt que d'autres, par exemple l'apoptose pour limiter une réponse inflammatoire de l'organisme.

En explorant des gammes de stress oxydant avec des fluences sur plusieurs ordres de grandeur, nous observons deux modes de mort, différenciés par des critères morphologiques et au moyen de marqueurs de fluorescence : une mort de type nécrotique, et une mort de type apoptotique. Les modes de mort ainsi définis ont des cinétiques propres, plus rapide pour la mort de type nécrotique, et plus lente pour la mort de type apoptotique. Nous observons enfin également chez certaines cellules des symptômes morphologiques (vacuoles) transitoires, généralement associées à une autophagie. Afin de préciser la question de la réponse des cellules suite à la génération de $^1\text{O}_2$, nous souhaitons mesurer la fraction de cellules mortes totale et le ratio de cellules mortes de chaque type en fonction du taux de production d' $^1\text{O}_2$ et de la durée d'exposition des cellules. Remarquons qu'à notre connaissance, il n'existe aucune autre étude à ce jour qui étudie la fraction de cellules mortes, le type de mort et la cinétique de mort en fonction d'une large gamme de doses d'oxygène singulet.

Nous observons que le mode de mort n'est pas déterminé par la concentration cumulée d' $^1\text{O}_2$ générée dans les cellules. Pour une même concentration cumulée, mais pour des taux de production d'oxygène singulet et des durées d'exposition différentes, la réponse des cellules peut différer. Nous discutons enfin de ce résultat au vu de la littérature sur les modes de mort cellulaire et notamment les possibles compétitions entre les voies de signalisation associés aux différents processus de mort cellulaire programmée.

4.1 Introduction : mort cellulaire et modalités de mort

La réponse de cellules à un stress dépend fortement de la nature des cellules et de leur environnement ^[113;114]. Nous souhaitons explorer la corrélation entre la nature du stress oxydant, caractérisée par un taux de production d'oxygène singulet et une durée d'exposition des cellules à $^1\text{O}_2$, et le destin des cellules.

Lorsque les mécanismes antioxydants d'une cellule échouent à rétablir l'homéostasie redox

et que les dommages subis sont trop importants, la cellule ne peut plus assurer ses fonctions vitales. Son métabolisme subit alors un arrêt définitif : on parle de mort cellulaire. Cette mort peut être régulée ou non par la cellule. La mort non-régulée, dite accidentelle ou passive, est subie, par exemple lors d'un stress trop violent pour permettre une réponse cellulaire organisée. La mort programmée est définie par la mobilisation de voies de signalisation métaboliques en réponse à divers stimulus (signaux extra-cellulaires, stress oxydant etc.) Des protéines initiateuses enclenchent alors une série de réactions intra-cellulaires qui aboutissent à l'arrêt du métabolisme. S. L. Fink *et al.* en 2005^[274] et Y. Xie *et al.* en 2016^[275] proposent une synthèse et une caractérisation des différents modes de mort identifiés dans la littérature. En dix ans, on constate l'émergence de nouveaux modes et sous-modes de mort, notamment parmi les morts programmées. Le classement de la mort cellulaire en catégories est complexe et il existe de nombreux couplages^[117-119] et sous-catégories.

Trois grands modes de mort se dégagent de la littérature : la nécrose, l'apoptose et l'autophagie. Nous allons brièvement présenter leurs caractéristiques, le lien entre mode de mort cellulaire et stress oxydant, et les couplages entre les différents modes de mort programmée.

4.1.1 Modes de mort

4.1.1.1 Apoptose

L'apoptose^[107;274] est un mode de mort régulée essentiel au développement des organes, et à de nombreux processus homéostatiques et de défense. Elle permet de renouveler les cellules, d'écartier les cellules dysfonctionnelles, et de sélectionner les cellules utiles en éliminant les superflues. Le processus d'apoptose s'enclenche lors de la réception d'un signal de mort. En fonction de la provenance de ce signal, intra- ou extracellulaire, différentes voies de signalisation sont activées.

Parmi les principaux acteurs moléculaires, on trouve les récepteurs membranaires des facteurs de mort et les caspases, famille d'enzymes responsables de la propagation intra-cellulaire des signaux de mort. En aval du processus d'apoptose, les caspases 3, 6 et 7, dites protéines "bourreau" clivent les différents substrats présents dans la cellule. Ces trois caspases sont donc les cibles moléculaires de choix pour caractériser une mort par apoptose : leur présence n'est a priori associée à aucun autre mécanisme de mort.

Morphologiquement, l'apoptose se traduit par un arrondissement et une condensation de la cellule, et par son décollement d'une éventuelle surface adhérente ou matrice extracellulaire *in vitro*^[115;296]. La cellule, dont la membrane reste intacte, se découpe ensuite en corps apoptotiques, digérés *in vivo* par des cellules phagocytes. Sur des modèles *in vitro*, l'absence de système immunitaire entraîne à terme le déclenchement d'un phénomène de nécrose secondaire^[276], c'est-à-dire que la membrane de la cellule arrondie et condensée se rompt et déverse son contenu dans le milieu extra-cellulaire.

4.1.1.2 Nécrose

La nécrose, également appelée oncose, est généralement caractérisée par un gonflement du cytoplasme (œdème) suivi d'une rupture de la membrane^[115;296]. Des agents fluorescents d'intercalation de l'ADN qui ne peuvent pénétrer dans le noyau cellulaire qu'en cas de rupture de la membrane, tel l'iodure de propidium, sont pour cette raison couramment utilisés comme marqueurs de la nécrose. *In vivo*, cette rupture relâche le contenu des cellules dans le milieu extra-cellulaire et peut provoquer une réponse inflammatoire^[277;278]. Afin de limiter les dommages aux tissus voisins, certaines thérapies visent ainsi à empêcher la nécrose^[279]. M.T. Lotze

et al.^[280] postulent même que la mort dérégulée par nécrose et non pas la croissance dérégulée des cellules serait le facteur principal du développement de tumeurs.

Dès les années 90^[281] une différence temporelle marquée entre les processus de nécrose et d'apoptose fut mise en évidence. La mort par apoptose est généralement un processus plus long (plusieurs heures à quelques jours entre le stimulus et l'arrêt du métabolisme). Toutefois, le processus au cœur de cette mort comme la libération de cytochrome c par les mitochondries et l'activation de caspases "bourreau", ne dure qu'une vingtaine de minutes^[282;283]. T.V. Berghe *et al.*^[284] ont mis en évidence que la cinétique n'était pas uniquement liée au phénotype de mort (nécrose ou apoptose) mais au caractère programmé ou non de la réponse de mort : les nécroses accidentelles sont plus rapides que les nécroses programmées. Nous discuterons des caractères accidentels ou programmés de la mort nécrotique par la suite. La nature du stimulus, l'intensité du stress et le type cellulaire ont tous un effet sur la cinétique de mort.

4.1.1.3 Autophagie

Un troisième mécanisme cellulaire, l'autophagie, fut longtemps placé au même niveau que la nécrose et l'apoptose. On parle de mort par autophagie lorsqu'il y a formation massive de vacuoles dans le cytoplasme. Le rôle des vacuoles est de séquestrer et de dégrader les toxines. La formation de vacuoles n'est toutefois pas toujours suivie de mort cellulaire. De nombreuses études^[110-114] contestent ainsi la classification de l'autophagie parmi les modes de mort, en démontrant que l'autophagie se déclenche en parallèle de certains mécanismes de mort, mais qu'il n'y a pas de relation causale claire entre autophagie et mort des cellules. Il se peut donc que l'autophagie soit uniquement un mécanisme de défense des cellules et que la mort soit un symptôme de son échec. Il est également possible que différentes voies de signalisation soient à l'origine des manifestations morphologiques associée à l'autophagie, et que les voies déclenchées déterminent les conséquences de l'autophagie sur la viabilité des cellules.

4.1.2 Stress oxydant et modes de mort cellulaire

Dans le cas spécifique d'un stress oxydant, la nécrose est associée à des doses élevées^[107;108] d'espèces réactives de l'oxygène et l'apoptose à des doses plus faibles, ou à des stress chroniques. La revue de G.C. Higgins *et al.*^[120] met en évidence un lien entre nature du stress oxydant et les modalités de mort de neurones. Un stress aigu provoque une mort par nécrose non-régulée, tandis qu'un stress ponctuel modéré favorise la nécrose programmée et des processus d'autophagie qui entraînent la mort cellulaire. Un stress ponctuel plus faible, ou une élévation chronique des niveaux d'ERO dans les cellules provoquent de la mort par apoptose, et des manifestations d'autophagie qui n'aboutissent pas forcément à la mort des cellules. Les voies de signalisation métaboliques mobilisées pour l'autophagie ne sont également pas les mêmes en fonction de l'intensité du stress.

En photothérapie dynamique, le type de tumeur, de PS utilisé, et la localisation intracellulaire des PS, influent sur les modalités de mort^[14;109]. La réponse au stress est également soumise à la variabilité biologique des cellules. Différentes sources de variabilité affectent la réponse de cellules au stress oxydant. Les variabilités génétiques inter et intra-lignées^[309] et la variabilité de taux de protéines entre cellules génétiquement identiques^[309;312]. Une concentration d'adénosine triphosphate (ATP) élevée, par exemple, favorise une mort par apoptose^[286]. J. Skommer *et al.*^[311] proposent enfin également l'existence d'une variabilité intrinsèque des voies de signalisation apoptotiques. Du fait de cette variabilité biologique, une population de cellules stressées peut présenter une variabilité de réponses.

Les modes de mort sont enfin corrélées avec la fraction totale de cellules mortes (FCM). S. Nagata *et al.*^[287] ont stressé *in vitro* par PDT des cellules de mélanome humain, et mesuré

une majorité de mort par apoptose lorsque la FCM atteint 70%. Pour une FCM de 99% la majorité des cellules sont mortes par nécrose. Ces résultats sont confirmés *in vitro* sur des cellules de carcinome de l'épiderme humain en PDT par K. Plaetzer *et al.*^[108] qui de plus montrent qu'une fraction importante de la mort nécrotique a lieu dans les 3h après traitement tandis que la mort apoptotique survient entre 3 et 24h après irradiation. Ainsi, les stress suffisamment importants pour limiter l'impact de la variabilité cellulaire (FCM proche de 1) sont également ceux qui favorisent une mort nécrotique. Dans l'optique, par exemple, de limiter une réponse inflammatoire, ces résultats soulignent donc le compromis à faire entre favoriser la mort par apoptose et maximiser la fraction totale de cellules mortes.

4.1.3 Mort programmée et plasticité des voies de signalisation

La nécrose a longtemps été considérée comme une mort non-régulée, subie par la cellule, à opposer à l'apoptose. Il a été mis en évidence au début des années 2000 que cette définition est réductrice. En effet, C.J. Zeiss *et al.*^[288] ont montré en 2003 que l'inhibition de caspases (et ainsi de l'apoptose) chez des souris entraîne une mort par nécrose des cellules stressées, suggérant d'une part la possibilité d'une nécrose programmée et d'autre part l'aptitude de la cellule à mobiliser d'autres voies de signalisation associées à la mort cellulaire si certaines voies sont inhibées. En 2005, A. Degterev *et al.*^[289] ont identifié que le facteur soluble TRAIL (en anglais "Tumor-necrosis-factor Related Apoptosis Inducing Ligand"), pouvait enclencher une mort programmée aux mêmes symptômes morphologiques que la nécrose (œdème et rupture de la membrane) à la place d'une mort par apoptose lors de l'inhibition de la caspase 8. Cette découverte a donné lieu à une première définition de la nécrose programmée, qualifiée de "nécroptose". G.C. Higgins *et al.*^[290] ont confirmé cet effet sur des neurones de souris mutantes présentant un déficit de caspases. Suite à un stress oxydant, provoqué par une concentration toxique de peroxyde d'hydrogène extracellulaire, qui donne lieu à de la mort par apoptose dans des souris de type sauvage, les neurones mutants subissent une mort programmée caractérisée par des symptômes morphologiques associés à l'autophagie ou la nécrose.

Les kinases (récepteurs protéiques) RIPK1 et RIPK3 ont été identifiés parmi les principaux acteurs de la nécroptose^[284]. Il a toutefois été montré par la suite que RIPK3 peut également être impliqué dans une mort par apoptose^[285]. Plus de dix ans après les travaux de A. Degterev *et al.*^[289], la découverte de nombreux mécanismes moléculaires complexes, avec des voies de signalisation variées et parfois redondantes, et de nombreux effecteurs impliqués à la fois dans la mort par apoptose et certaines nécroses programmées^[119], ont montré que la définition donnée de la nécroptose était trop réductrice. Ces études ont également révélé l'existence de nombreux autres mécanismes de mort programmés aboutissant à une rupture de la membrane plasmique, telles la pyroptose^[274] ou la ferroptose^[275].

De manière générale, l'inhibition ou la stimulation de gènes et/ou de protéines impliqués dans les mécanismes de mort régulée permettent de basculer entre mort nécrotique et apoptotique^[111;121]. Ceci révèle une plasticité du métabolisme : lorsqu'une voie de signalisation associée à la mort est engagée par une cellule, le blocage de cette voie ne permet pas d'éviter la mort des cellules. D'autres voies de signalisation s'enclenchent et prennent le relais. Cette plasticité rend complexe la définition et classification des modes de mort. L. Galluzzi *et al.*^[296] proposent une synthèse de ces phénomènes.

4.1.4 Un contrôle possible du type de mort ?

B. Loos *et al.*^[291] proposent que la mort est le résultat de plusieurs voies de signalisation en compétition, enclenchées de façon simultanée, et qu'il existe des passerelles ("checkpoints") d'une voie à une autre. La nature du stress et les conditions physiologiques de la cellule vont permettre

à une voie de l'emporter. Il est donc critique, lors de l'utilisation de marqueurs biochimiques pour caractériser la mort, d'identifier des marqueurs en aval des cascades étudiées. Cette revue introduit également le concept de Points de Non Retour (PNR). Les PNR seraient des étapes de signalisation (à identifier) qui, en fonction de la nature et l'intensité des stress subis, feraient basculer la cellule dans un type de mort plutôt qu'un autre. Tant que ces PNR ne sont pas atteints, le sort des cellules reste en suspens.

Cette hypothèse pourrait expliquer les symptômes d'autophagie observées chez des cellules qui vont dans un second temps mourir par apoptose ou par nécrose. Il a en outre été montré^[292;293] que la stimulation de l'autophagie permet de retarder la date de mort par apoptose, voire à entraîner la survie de la cellule. A l'inverse, inhiber l'autophagie permet de réduire la résistance des cellules à des stress radiatifs^[292;294]. De manière générale, en fonction des conditions (types de cellules, environnement, nature du stress), l'autophagie peut inhiber ou faciliter l'apoptose ou la nécrose^[295].

Un des enjeux actuels est l'identification de nœuds de convergence dans les voies de signalisation chimiques qui pourraient être ciblés pour inhiber spécifiquement une modalité de mort programmée, et servir à caractériser et distinguer les différents mécanismes.

Nous ne nous attacherons pas dans cette étude à caractériser les mécanismes biochimiques associés aux différents modes de mort. Nous nous limiterons à distinguer différents modes de mort au moyen de critères de morphologie et de marqueurs de fluorescence, et à étudier le lien entre les paramètres d'irradiation laser, c'est-à-dire l'intensité (qui détermine le taux de production d' $^1\text{O}_2$) et la durée d'irradiation Δt , et le mode de mort des cellules. Nous mettons ainsi en évidence que la dose, définie comme la concentration cumulée d' $^1\text{O}_2$ générée dans les cellules, ne détermine pas à elle seule la réponse des cellules à un stress.

4.2 Protocoles et Méthodes

Dans ce chapitre nous souhaitons caractériser pour une large gamme de doses d' $^1\text{O}_2$ la mort subie par les cellules. La quantité d' $^1\text{O}_2$ est contrôlée au moyen des paramètres d'irradiation laser (intensité et durée d'irradiation). La mort cellulaire est mesurée sur plusieurs ordres de grandeur de I (de 0.1 à 7kW/cm²), et pour une durée d'irradiation Δt de 5 à 60 minutes. De l'intensité laser I et de la concentration en dioxygène (simulée numériquement) nous estimerons dans un second temps le taux de production d'oxygène singulet, et donc la concentration cumulée générée dans les cellules.

La mort cellulaire est caractérisée en utilisant des critères morphologiques et des marqueurs fluorescents. Nous différencions ainsi deux modalités de mort. Le suivi par imagerie des cellules pendant au moins 24 heures après l'irradiation (1 image prise toutes les 20 minutes) permet de caractériser la cinétique de mort et de définir une date de mort t_M , mesurées en heures après le début de l'irradiation.

4.2.1 Expérience et dispositif d'irradiation

Le montage expérimental est identique à celui utilisé dans le chapitre 2. Il est schématisé à nouveau [figure 4.1](#). Dans ce chapitre nous ne nous intéressons pas uniquement au statut binaire mort/vivant des cellules. Nous allons extraire de nos données des informations supplémentaires sur la nature de la mort. Le paramètre " I " désigne dans tous ce chapitre l'intensité moyenne reçue par les cellules. La méthode pour obtenir des courbes dose-réponse, qui donnent la fraction de cellules mortes en fonction de la quantité d'oxygène singulet générée dans la cellule (ou l'intensité laser I), a été présentée [section 3.2.6](#).

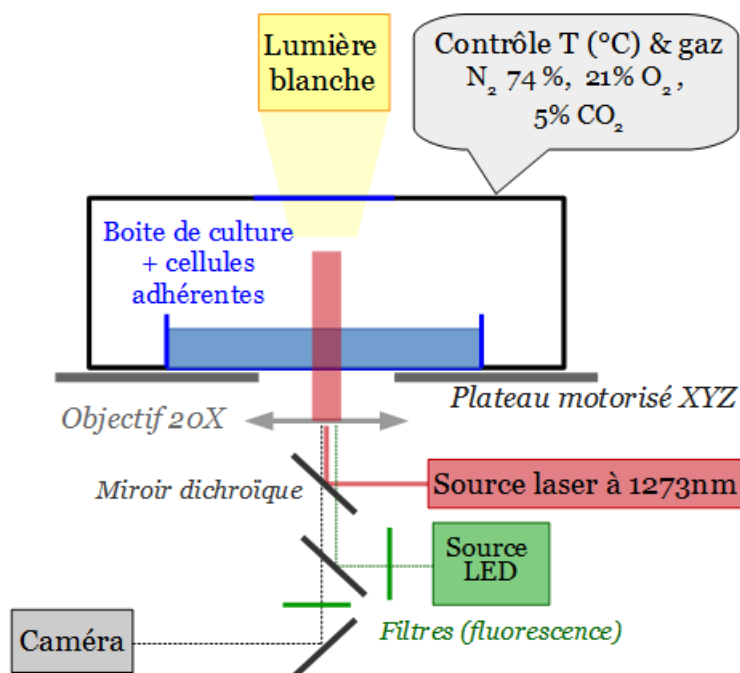


FIGURE 4.1 – Montage expérimental. Des cellules MCF7 cultivées en mono-couches (2D) dans une boîte de culture sont irradiées avec un laser gaussien à 1270nm (waist $\omega=40\mu\text{m}$) afin de générer une distribution d' $^1\text{O}_2$ proportionnelle à l'intensité laser I . La boîte de culture est intégrée à un incubateur portable qui maintient les cellules dans des conditions standard de culture cellulaire (37°C, 21% O₂ et 5% de CO₂) afin de suivre sur au moins 30h les cellules irradiées par imagerie. L'imagerie en lumière directe permet de suivre l'évolution de la morphologie des cellules. Des marqueurs fluorescents permettent d'identifier les cellules mortes. L'incubateur est lui-même placé sur un plateau de microscope XYZ automatisé, qui permet d'irradier et d'imager de multiples positions sur une même boîte de culture, et de maintenir les cellules dans le plan focal de l'objectif de microscope.

4.2.1.1 Paramètres d'irradiation

Les cellules sont irradiées entre 5 et 60 minutes. Nous commençons à mesurer une fraction de cellules mortes supérieure à la FCM obtenue sans irradiation pour des intensités laser de l'ordre de 1-10 W/cm², soit un taux de production d' $^1\text{O}_2$ d'environ 20-200 nM s⁻¹. Un faisceau laser gaussien de rayon à 1/e² (waist) $\omega=40\mu\text{m}$ permet ainsi de balayer près de quatre ordres de grandeur d'intensité (jusqu'à 2000-8000W/cm² en fonction de la puissance laser) dans chaque champs de cellules irradiées.

Les irradiations sont effectuées à plusieurs puissances laser : P=50mW, 100mW ou 200mW. A P=50mW et $\Delta t=5\text{min}$, la mort cellulaire ne concerne que 1-4 cellules par champs irradié, nous ne travaillons donc pas à puissance inférieure. A partir de P=300mW, les cellules risquent de subir un stress thermique. Un stress thermique léthal pour P=300mW, mesuré en irradiant les cellules à 1241nm (détails section 2.2.2.2), est observé dans des sphéroïdes. La mort en mono-couches n'est pas augmentée lors d'une irradiation à 1241nm et P=300mW, mais il est possible que les mono-couches subissent des effets sub-létaux néfastes qui risqueraient d'altérer la réponse des cellules au stress oxydant. Nous limitons donc la puissance laser dans ces études à P=200mW.

4.2.1.2 Mesure et caractérisation de la mort cellulaire

Les modes de mort sont étudiés pour des cellules cultivées en mono-couches. Les cellules sont recouvertes de leur milieu de culture pendant l'irradiation. La contribution de ERO secondaires à la mort des cellules pour les paramètres d'irradiation ci-dessus est négligeable pour $\Delta t < 60\text{min}$. En effet, au moyen d'un désactivateur extra-cellulaire de $^1\text{O}_2$ (sérum d'albumine de boeuf) d'une part, en estimant les seuils de toxicité des ERO secondaires pour des mono-couches de cellules irradiées dans leur milieu de culture d'autre part, et enfin en estimant par simulation numérique la concentration de ERO secondaires générées au niveau des cellules en mono-couches, nous avons mis en évidence dans les perspectives du chapitre précédent que les ERO secondaires ne sont générées en quantités suffisantes pour être toxiques que pour des irradiations de $\Delta t = 60\text{min}$. Pour un temps d'exposition de $\Delta t = 60\text{min}$, les ERO secondaires font augmenter la fraction de cellules mortes en périphérie de la zone de mort. Nous en tiendrons compte lors de l'interprétation des résultats.

Afin d'estimer le taux de production d'oxygène singulet, la déplétion en dioxygène doit être prise en compte. Nous l'estimerons par simulation numérique en fixant $K_{ox} \sim 2 \times 10^6 \text{s}^{-1}$. K_{ox} caractérise la réaction de $^1\text{O}_2$ avec le milieu extracellulaire pour former des ERO secondaires, sa valeur a été estimée dans le chapitre précédent.

Les cellules sont suivies par imagerie pendant et après l'irradiation. Après l'irradiation des images par transmission de lumière blanche et de fluorescence sont prises toutes les 20 minutes pendant plus de 24 heures (jusqu'à 65h en fonction des expériences). Les images par transmission en lumière blanche (objectif 20X) permettent de caractériser la morphologie des cellules. Les images de fluorescence, combinées à des marqueurs fluorescents, permettent de caractériser le type de mort, et de définir la date de mort des cellules.

Les cellules mortes sont dans les chapitres précédents caractérisées par le marqueur fluorescent CellTox Green, un agent intercalant de l'ADN qui ne pénètre dans les cellules que lorsque la membrane cellulaire est compromise. L'iodure de propidium (PI), aux propriétés biologiques similaires est substitué au CellTox Green dans certaines expériences de ce chapitre, car ses propriétés physiques (longueurs d'onde maximales d'excitation et d'émission : 530 et 620 μm) sont adaptées pour faire un double marquage des cellules avec le marqueur annexine V-FITC (Ex :490/Em :520 μm). L'annexine V est une molécule avec une forte affinité pour la phosphatidylsérine, normalement présente uniquement sur la face intérieure de la membrane cellulaire. La phosphatidylsérine migre sur la face extérieure de la cellule lors de l'enclenchement de certains mécanismes de mort, notamment l'apoptose^[297], mais pas exclusivement^[296], et sert ainsi à caractériser le mode de mort.

4.2.2 Caractérisation des modalités de mort cellulaire

Nous souhaitons distinguer les différents modes de mort subis par les cellules irradiées. Des définitions morphologiques et biologiques^[115;116;296] associées à chaque mode de mort ont été suggérées par un comité spécialisé, le "Nomenclature Committee on Cell Death" (NCCD). La pertinence et les limites de l'utilisation de critères morphologiques et des marqueurs fluorescents Annexine V et PI y sont également discutées.

Deux modes de mort sont ici mis en évidence, et nous nous baserons sur les recommandations du NCCD pour interpréter les résultats obtenus.

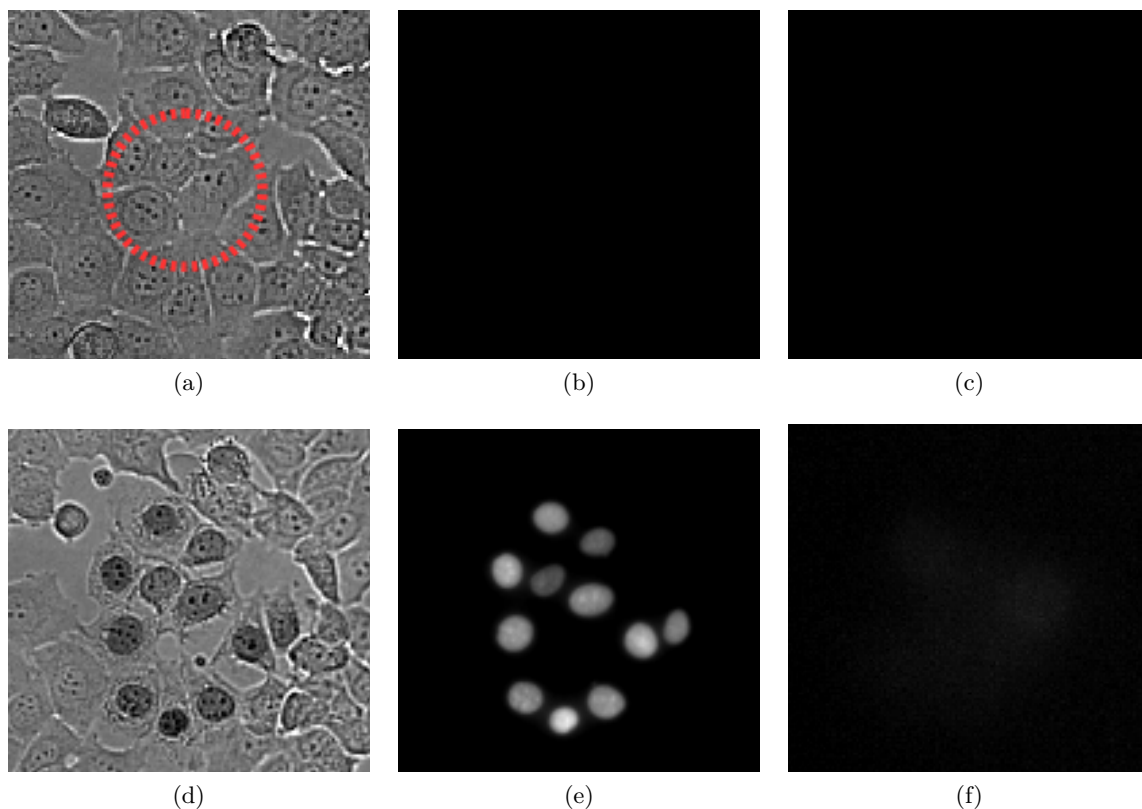


FIGURE 4.2 – **Caractérisation du premier mode de mort cellulaire.** Images de champs de cellules de $150\ \mu\text{m}$ de côté. **Figures (a,d)** : images en lumière blanche. **Figure (a)** Cercle rouge : faisceau laser de waist $40\ \mu\text{m}$. Images en microscopie de fluorescence : **figures (b,e)** marquage iodure de propidium (PI) et **figures (c,f)** marquage Annexine V-FITC (AV). Les images sont prises avant (**figure (a,b,c)**) et 4h après (**figures (d,e,f)**) le début de l'irradiation.

4.2.2.1 Mort de type "nécrotique"

Un exemple de mort cellulaire est illustré [figure 4.2](#). La surface occupée par une cellule avant et après sa mort ne varie pas ou peu. Le noyau de la cellule (chromatine) ne se condense pas. La cellule se dilate (gonflement) jusqu'à rupture de la membrane cellulaire. Le noyau devient alors opaque. La rupture de la membrane permet au marqueur fluorescent PI de se fixer sur le noyau des cellules mortes. La fluorescence Annexin V-FITC est très faible sur les cellules mortes (notamment en comparaison au second mode de mort présenté ci-après). La date de mort, t_M , mesurée en heures après le début de l'irradiation laser, est définie par rapport à l'intensité de fluorescence du marqueur PI ([figure 4.3](#)). Elle est fixée arbitrairement à la date où l'intensité de fluorescence atteint 75% de son intensité maximale.

Ces critères, morphologiques et fluorescents, sont généralement associés à une mort par nécrose^[115;275;298]. Les critères établis ne permettent toutefois pas de distinguer une nécrose "accidentelle" d'une mort programmée (par exemple une nécroptose). Nous allons utiliser le terme général de mort de "type nécrotique", pour le distinguer du second type de mort, tout en gardant à l'esprit que nous ne pouvons pas nous prononcer sur les mécanismes moléculaires impliqués. Nous verrons par la suite que cette mort est généralement rapide (mort des cellules quelques heures après début d'irradiation) et associée aux intensités laser fortes.

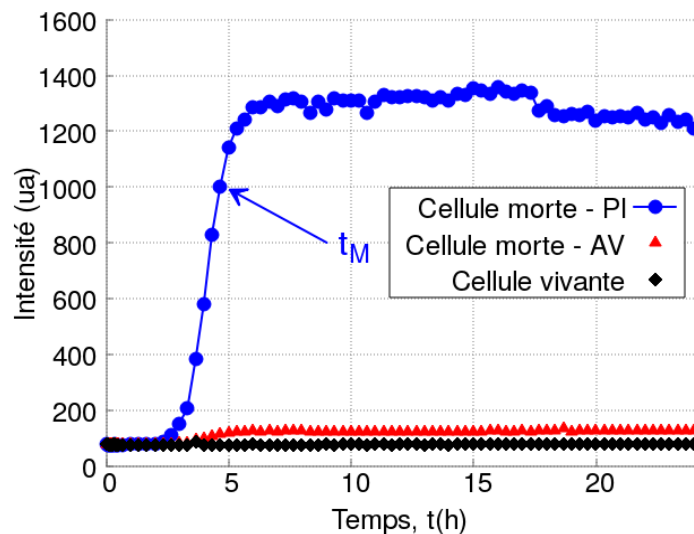


FIGURE 4.3 – Profil de l'évolution temporelle de l'intensité de fluorescence moyenne dans une cellule, pour les marqueurs PI et Annexine-V, associé au premier mode de mort. La date de mort t_M , mesurée en heures après le début de l'irradiation laser, est définie lorsque l'intensité de fluorescence associée au marqueur PI atteint 75% de la valeur maximale (seuil arbitraire). L'intensité de fluorescence est mesurée et moyennée sur une cellule. La fluorescence des aux cellules vivantes (niveau basal) est la même pour le PI et l'annexine V.

4.2.2.2 Mort de type "apoptotique"

Le second mode de mort est illustré figure 4.4. La surface des cellules adhérentes rétrécit et le noyau se condense entre le début de l'irradiation et la rupture de la membrane. Certaines cellules se détachent partiellement du fond de la boîte de culture et restent recroquevillées plusieurs heures avant l'éclatement de la membrane. Les cellules qui se "recroquevillent" sont celles qui sont exposées à des intensités laser plus faibles et meurent le plus tardivement. Les cellules sont marquées Annexine-V et PI. Ce marquage est détecté (figure 4.5) de manière simultanée (à 20 minutes près, intervalle de prise d'image). La fluorescence Annexine V est la plus intense sur les membranes des cellules. La fluorescence PI est globalement spécifique du noyau. Le niveau de fluorescence des cellules recroquevillées est légèrement supérieur à celui des cellules vivantes. Les fluctuations d'intensité autour des valeurs basales et maximales sont dues au déplacement des cellules au cours du suivi.

Une étude de Y.H.C. Yang *et al.* [299] explore en détail la cinétique d'apparition des marqueurs fluorescents Annexine V et PI. Une apparition simultanée des signaux associés aux deux marqueurs, couplée à une absence de condensation de chromatine est associée à une mort par nécrose. Le terme "apoptose partielle" est proposé par Yang *et al.* [299] pour définir une modalité de mort qui présente des critères morphologiques caractéristiques de l'apoptose (condensation de chromatine, cellule qui se recroqueville) mais pas le marquage séquentiel Annexine V/PI attendu. Le marquage PI et l'explosion de la membrane traduit une nécrose secondaire qui mets fin *in vitro* au processus d'apoptose.

Pour qualifier la mort d'apoptose, un marquage Annexine V antérieur (jusqu'à plusieurs heures) au marquage PI est traditionnellement requis [299]. H. Sawai *et al.* [300] ont néanmoins montré que certains processus nécrotiques peuvent également être caractérisés par un marquage séquentiel et que l'utilisation de marqueurs biochimiques supplémentaires est nécessaire pour discriminer entre les différents modes de mort.

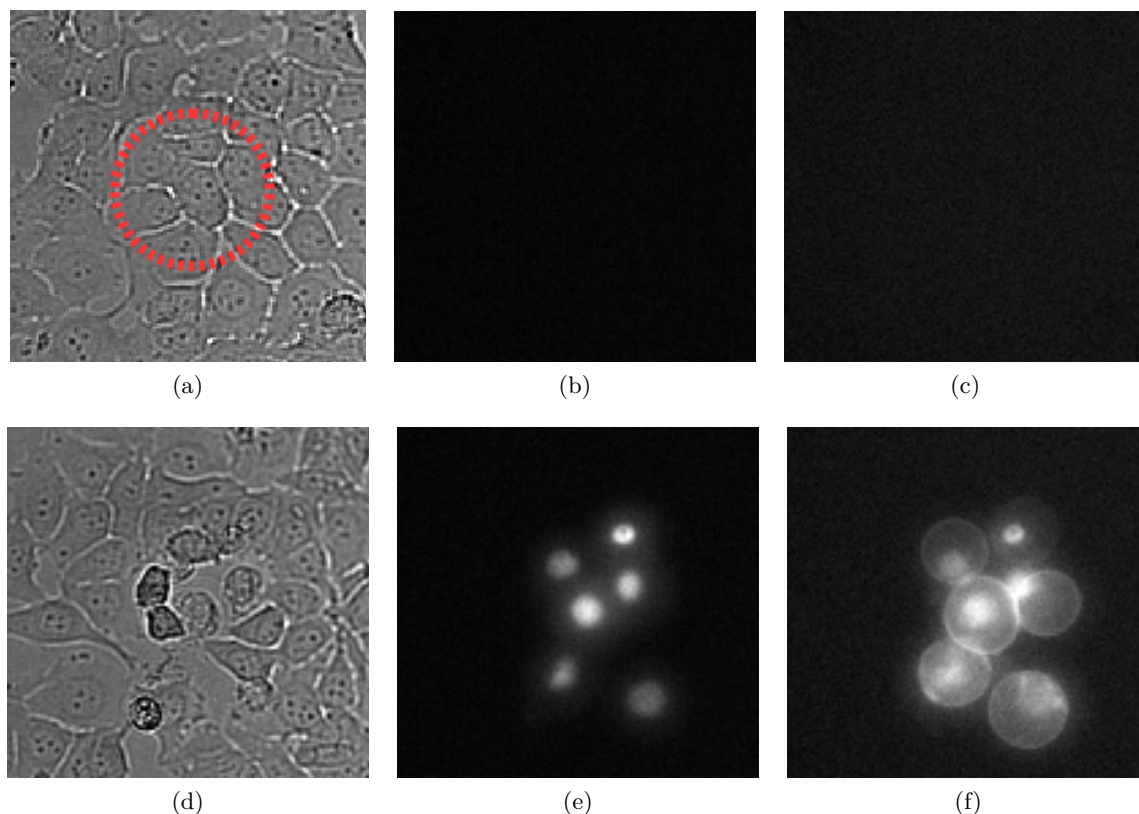


FIGURE 4.4 – **Caractérisation du second type de mort cellulaire.** Images de champs de cellules de $150\ \mu\text{m}$ de côté, prises avant (**figure (a,b,c)**) et 10h après (**figures (d,e,f)**) le début de l'irradiation. **Figures (a,d)** : images par transmission en lumière blanche. Cercle en pointillés : faisceau laser gaussien de waist $40\ \mu\text{m}$. **Figures (b,e)** : Images de fluorescence PI. **Figures (c,f)** : Images de fluorescence Annexine V-FITC..

Comme pour la mort dite de type nécrotique, nous n'avons pas fait d'expériences pour identifier les processus moléculaires impliqués dans cette mort. Il y a néanmoins suffisamment de différences entre les deux modes pour les étudier séparément. Ce second mode de mort sera qualifié de mort de type apoptotique. Remarquons que la majorité des expériences ont été faites avec des cellules marquées uniquement avec du CellTox Green (propriétés très similaires à celles de l'iodure de propidium, PI). Les expériences avec la présence de fluorophores Annexine V et PI ont servi à confirmer que les différences morphologiques observées dans les cellules sont corrélées aux marquages fluorescents (PI seul pour les morphologies de type nécrotique et Annexine V + PI pour les morphologies de types apoptotiques).

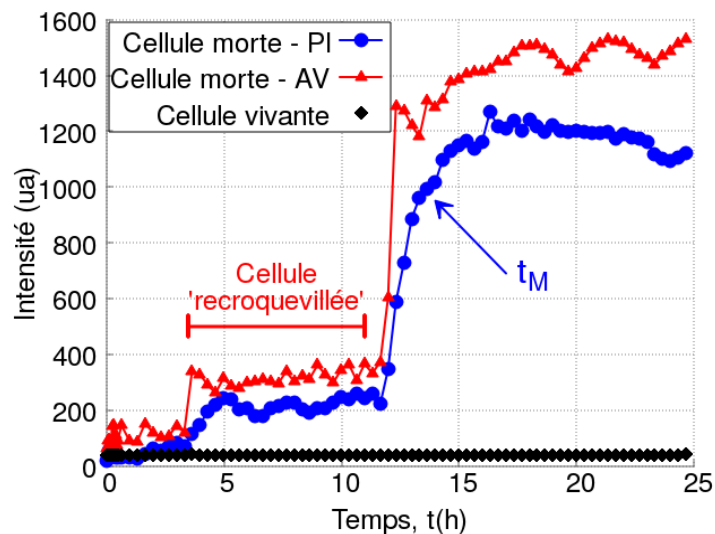


FIGURE 4.5 – Profil de l'évolution temporelle de l'intensité de fluorescence moyenne dans une cellule, pour les marqueurs PI et Annexine-V, associé au second mode de mort. La date de mort t_M , mesurée en heures après le début de l'irradiation laser, est défini lorsque l'intensité de fluorescence associée au marqueur PI atteint 75% de la valeur maximale (seuil arbitraire).

Le [tableau 4.1](#) récapitule les caractéristiques des deux modes de mort observés.

	Critère	Type nécrotique	Type apoptotique
Morphologie	Rupture membrane	+	+
	Gonflement	+	-
	Condensation noyau	-	+
	Réduction surface ⁽¹⁾	-	+
Fluorescence	PI	+	+
	Annexine V	-	+
Date de mort	t_M	$\sim 5h$	$\sim 15h$

TABLE 4.1 – Table récapitulative des propriétés associées aux deux types de mort identifiés.

⁽¹⁾ La réduction de la surface peut aboutir à un recroquevillement de la cellule, qui se détache partiellement du fond de la boîte de culture plusieurs heures avant la rupture de la membrane. Les dates de mort des cellules sont présentées dans la partie Résultats.

4.2.3 Stress oxydant et modalités de morts cellulaires

En pratique, au vu des gammes d'intensité générées par la distribution spatiale gaussienne du laser d'irradiation, on peut observer une population de cellules mortes mixte ([figure 4.6](#)) avec des cellules de type nécrotique dans une zone proche de l'axe du laser et des cellules de type apoptotique formant une couronne en périphérie. Si le taux de production d'oxygène singulet, contrôlé au moyen de l'intensité laser, et/ou le temps d'irradiation sont trop faibles, les cellules mortes sont exclusivement de type apoptotique.

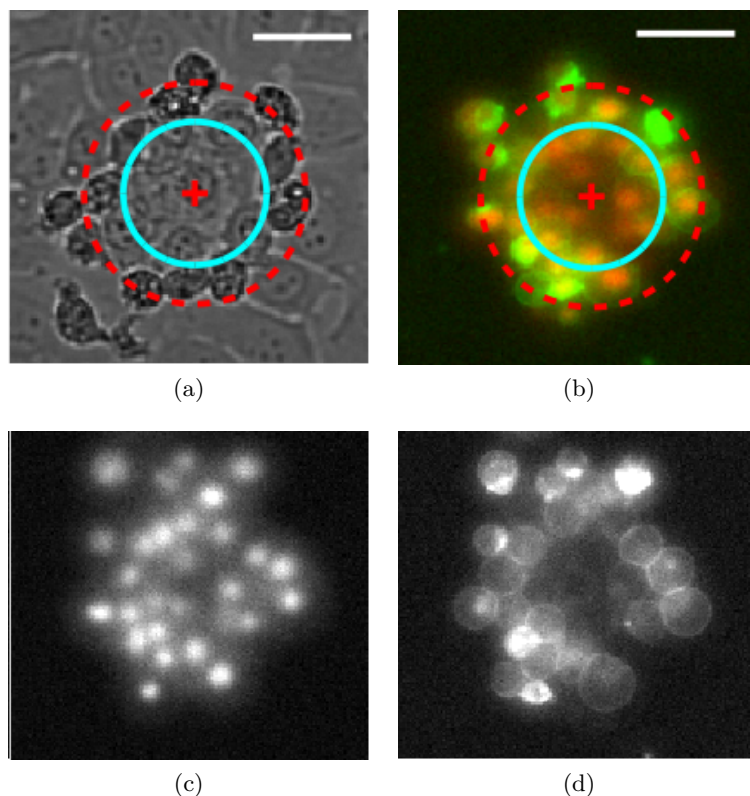


FIGURE 4.6 – **Distribution spatiale des modes de mort suite à une irradiation.** Images microscope d'un champs de cellules irradiées. Croix rouge : centre du faisceau laser. Cercle plein bleu : zone de mort de type nécrotique. Cercle rouge en pointillés : zone de mort de type apoptotique. Barres d'échelle : 30 μm . **Figure (a)** Images par transmission en lumière directe (au contraste augmenté) prises 12h après irradiation. Les cellules centrales sont mortes (type nécrotique). Les cellules périphériques sont vivantes mais recroquevillées (mort de type apoptotique en cours). **Figures (b,c,d)** Images de fluorescence 24h après irradiation. **Figure (b)** Superposition des deux canaux de fluorescence : PI (fluorescence rouge) + Annexine V (fluorescence verte). **Figure (c)** Image PI : fluorescence des noyaux des cellules mortes, tous modes de mort confondus. **Figure (d)** Annexine V-FITC : fluorescence des cellules mortes de type apoptotique exclusivement, marquage des membranes.

4.2.4 Mort cellulaire : données expérimentales

Le [tableau 4.2](#) liste les expériences faites avec les principaux critères expérimentaux. Les cellules mortes sont divisées en trois catégories : nécrotiques (N), apoptotiques (A) et apoptotiques non aboutis (A^*). Les cellules A^* correspondent aux cellules dont la mort n'a pas abouti (défini par le marquage fluorescent du noyau par le fluorophore PI ou CellTox Green) avant la fin du suivi par imagerie mais qui présentent toutefois des symptômes morphologiques d'apoptose. Nous discuterons de cette sous-population dans la partie Résultats.

Intensité I_{max} (W/cm ²)	Exposition Δt (min)	Marquage fluorescent	Durée du suivi (h)	Nb cellules $I > 1 \text{W/cm}^2$	Nb cellules mortes		
					N	A	A*
1721	5	CTG	43	82	0	15	0
3443	5	AV + PI	46	103	0	44	0
6886	5	CTG	26	177	7	37	26
1721	10	CTG	63	74	0	29	0
3443	10	CTG	26	233	18	36	42
3443	10	AV + PI	38	161	10	49	15
1721	15	CTG	38	281	5	74	18
6886	15	CTG	23	193	51	27	22
1721	20	CTG	65	133	4	50	0
3443	20	CTG	44	205	53	56	9
1721	30	CTG	23	122	11	28	14
3443	30	AV + PI	44	168	43	53	2
6886	30	CTG	26	210	75	31	20
1721	60	CTG	65	142	41	42	0
3443	60	CTG	40	199	74	43	3
6886	60	CTG	24	124	54	21	5

TABLE 4.2 – Table des expériences d’irradiation. Les expériences sont caractérisées par l’intensité laser au niveau de l’axe du laser (I_{max}), la durée d’exposition des cellules (durée d’irradiation laser), la nature du marquage fluorescent (Annexine V + Iodure de Propidium, noté AV+PI, ou le CellTox Green, un équivalent PI, noté CTG), et la durée du suivi par imagerie après la fin de l’exposition. Sont également listés, pour chaque expérience, le nombre total de cellules irradiées (telles que l’intensité soit supérieure à 1W/cm^2 , seuil en dessous duquel nous ne mesurons pas de mort liée à la génération d’oxygène singulet) et le nombre de cellules mortes par catégorie (nécrose N, apoptose A, et apoptose non aboutie A*).

Nous souhaitons analyser le lien entre paramètres d’irradiation laser fixés : intensité I , temps d’irradiation Δt , et la réponse des cellules, caractérisée par les modalités de mort et la date de mort t_M (en heures après le début de l’irradiation). Nous avons constaté [chapitre 2](#) que le diamètre de la zone contenant les cellules mortes n’évoluait plus de manière importante (<5%) après 24h, et quasiment plus après 30h. Les cellules irradiées ont donc été suivies par imagerie entre 23h et 65h. Dans ce chapitre ne cherchons pas à mesurer une "zone" globale mais à identifier le destin de chaque cellule individuelle irradiée.

La méthode pour obtenir une fraction de cellules mortes en fonction de l’intensité laser est décrite dans le chapitre 3 ([section 3.2.6](#)). Une représentation en trois dimensions de la fraction de cellules mortes (FCM) en fonction des paramètres d’irradiation est donnée [figure 4.7a](#). Plus Δt et I sont élevés, plus la FCM est proche de 1. La [figure 4.7b](#) différencie les cellules de type apoptotique et nécrotique en fonction des paramètres d’irradiation et de leur date de mort. Le mode de mort est, comme la fraction de cellules mortes, corrélé à $(I, \Delta t)$. Pour $(I, \Delta t)$ élevés, les cellules meurent d’une mort de type nécrotique. Lorsque $(I, \Delta t)$ décroît, la part de mort de type nécrotique décroît également jusqu’à ce que la mort ne soit que de type apoptotique.

Dans un premier temps, nous nous intéressons à la mort cellulaire en fonction des paramètres d’irradiation I (dont nous déduisons le taux de production en oxygène singulet) et Δt . Dans un second temps, nous nous intéresserons à la cinétique de mort et les corrélations entre le temps de mort t_M , le mode de mort et les paramètres d’irradiation.

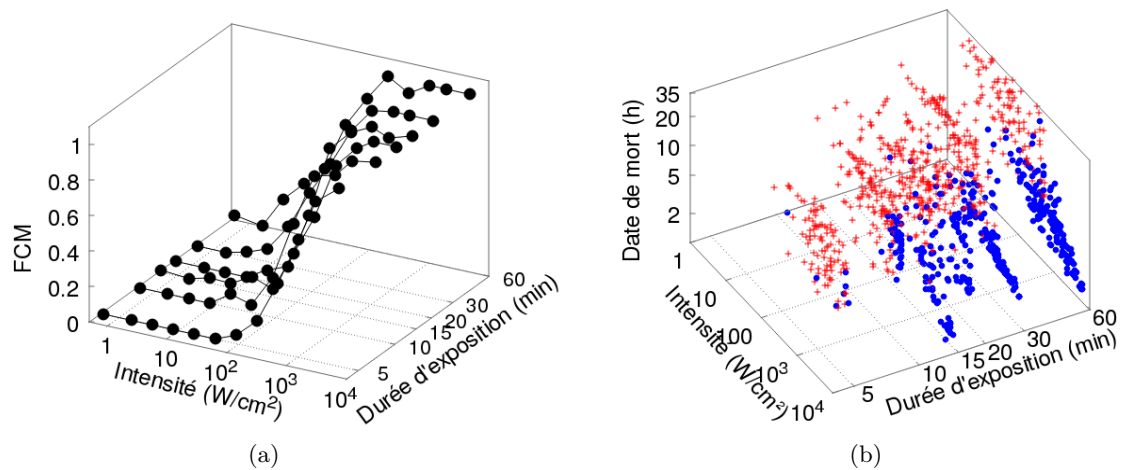


FIGURE 4.7 – **Figure (a)** Fraction de cellules mortes (FCM) en fonction des paramètres d’irradiation I (intensité laser) et Δt (durée d’irradiation). **Figure (b)** Répartitions des cellules mortes en fonction de I , Δt et leur temps de mort t_D . Les cellules peuvent subir deux modalités de mort : une mort de type nécrotique (ronds bleus), ou apoptotique (losanges rouges). Chaque type de mort est associé à une gamme de paramètres : $(I, \Delta t)$ élevés et t_D court pour nécrose, et $(I, \Delta t)$ plus faible et t_D long pour apoptose.

4.3 Résultats

4.3.1 Paramètres d’irradiation et mode de mort des cellules

L’intensité laser varie sur quatre ordres de grandeur ($I_{max}=8\text{kW}/\text{cm}^2$) et la durée d’exposition sur un ordre de grandeur ($\Delta t=5$ à 60 min) lors de l’irradiation des cellules. Dans cette gamme de paramètres, nous nous intéressons à la fraction de cellules mortes et au mode de mort, de type apoptotique ou nécrotique, des cellules.

Étudions la fraction de cellules mortes (FCM) en fonction de l’intensité I pour un temps d’irradiation donné. Nous traçons [figure 4.8a](#) la fraction totale de cellules mortes (en noir, valeurs expérimentales représentées par des carrés) à $\Delta t=60\text{min}$.

Les sigmoïdes bleues, associée aux valeurs expérimentales représentées par des cercles, et rouges (triangles) sont respectivement le ratio de cellules de type nécrotique parmi les cellules mortes et le ratio des cellules de type apoptotique parmi les cellules mortes. Lorsque la FCM totale est proche de zéro, les cellules mortes sont toutes de type apoptotique. Tant que la FCM totale est inférieure à 0.8, les cellules sont très majoritairement ($>80\%$) de type apoptotique. Il faut que la FCM atteigne 0.9 pour que les cellules mortes soient à parts égales de type apoptotique et nécrotique. Enfin, lorsque la FCM se rapproche de 1, les cellules meurent majoritairement de mort de type nécrotique.

La fraction de cellules mortes (FCM) et les ratios de cellules mortes associés à chaque mode de mort sont représentés en fonction de la durée d’irradiation Δt dans la [figure 4.8b](#). Par exemple, pour $\Delta t=15\text{min}$, pour une intensité $I<50\text{ W}/\text{cm}^2$ la FCM est <0.2 : la majorité des cellules survivent suite à l’irradiation. Pour $50<I<1500\text{ W}/\text{cm}^2$, les cellules meurent très majoritairement (ratio >0.8) par apoptose, et la fraction totale de cellules mortes atteint 50% pour $I\sim 400\text{ W}/\text{cm}^2$. La zone délimitée par $50<I<1500\text{ W}/\text{cm}^2$ est une zone dite "mixte" dans laquelle aucun mode de mort n’est très majoritaire. Enfin, pour $I>1500\text{ W}/\text{cm}^2$ les cellules meurent très majoritairement (ratio >0.8) d’une mort de type nécrotique. Ces résultats complètent ceux de

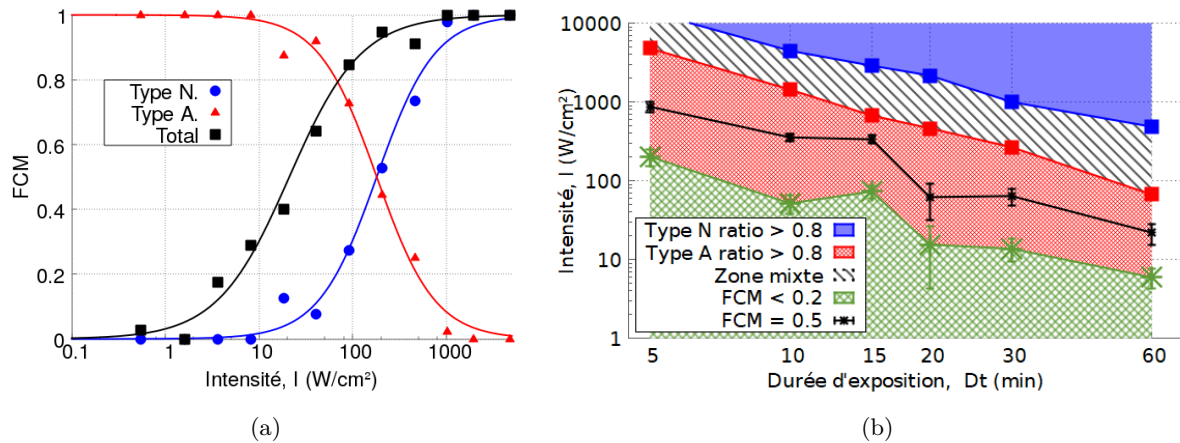


FIGURE 4.8 – Modes de mort en fonction des paramètres d'irradiation laser. **Figure (a)** Fraction de cellules mortes totale et ratio de cellules mortes de type nécrotique/apoptotique en fonction de l'intensité I (en W/cm^2). Valeurs expérimentales (points) et extrapolations (courbes sigmoïdes) pour une durée d'irradiation $\Delta t=60\text{min}$. **Figure (b)** Destin cellulaire (mort ou survie) et mode de mort, en fonction de l'intensité laser I et de la durée d'exposition Δt . A chaque choix de paramètres ($I, \Delta t$) on peut associer une fraction de cellules mortes et un ratio de cellules mortes de type apoptotique ou nécrotique.

S. Nagata *et al.* [287] et K. Plaetzer *et al.* [108], qui ont montré que le ratio de mort par apoptose est élevé lorsque la FCM totale est faible et le ratio de nécrose élevé lorsque la FCM totale augmente.

Regardons désormais si nous pouvons nous affranchir du temps d'irradiation et ne définir la réponse des cellules au stress uniquement à partir du paramètre de fluence $F=I \times \Delta t$ (en Wh/cm^2), qui définit la dose de lumière laser à laquelle sont exposées les cellules sur la totalité de l'irradiation. Dans la figure 4.9, l'intensité est remplacée par la fluence. Dans l'hypothèse où la fluence seule détermine la réponse des cellules à un stress, les différentes régions du graphique devraient être associées aux mêmes fluences, indépendamment de la durée d'exposition. Nous observons le phénomène inverse. Par exemple, la fluence nécessaire pour tuer 50% des cellules (ligne en pointillés noirs sur la figure) lors d'une irradiation de 15 minutes est de $F=83 \pm 10 \text{Wh}/\text{cm}^2$, et de $22 \pm 6.5 \text{Wh}/\text{cm}^2$ pour une irradiation de 60 minutes. De manière générale les fluences seuils associées aux temps d'exposition faibles sont plus élevées que celles associées aux temps d'exposition élevés.

L'intensité et la fluence ne sont pas directement proportionnelles aux taux de production et à la concentration cumulée de $^1\text{O}_2$. Ces dernières sont proportionnelles au produit de I et F avec la concentration en dioxygène $^3\text{O}_2$. Lors des irradiations longues, la concentration en dioxygène moyenne au niveau des cellules irradiées diminue à cause du phénomène de déplétion. Ainsi, à fluence égale, nous nous attendons à générer une concentration cumulée de $^1\text{O}_2$ plus faible lors des irradiations longues. Si la déplétion en dioxygène était seule responsable de la dépendance en Δt de la réponse des cellules (figure 4.9), les fluences associées aux temps d'exposition longs devraient être plus élevées que celles aux temps courts, et non plus faibles.

Nous avons cessé de mesurer la mort cellulaire environ 35h après le début de l'irradiation. Nous décidons de suivre les cellules irradiées sur 60h afin de contrôler que la différence de réponse n'est pas due à une cinétique de mort plus longue des cellules irradiées pendant des temps courts, qui nous ferait sous-estimer la fraction de cellules mortes totale. Nous allons également étudier le lien entre mode de mort et cinétique de mort.

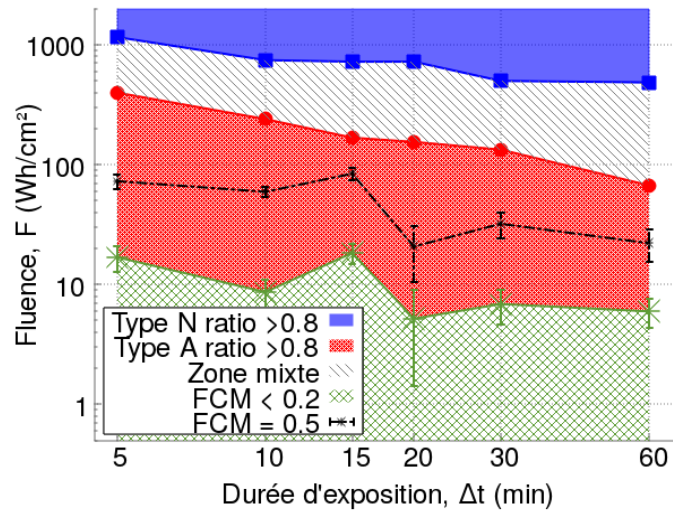


FIGURE 4.9 – Modes de mort en fonction de la fluence laser. Destin cellulaire (mort ou survie) et mode de mort, en fonction de la fluence laser F et de la durée d'exposition Δt . Les valeurs de F caractérisant les différentes zones dépend de Δt , la fluence seule ne suffit donc pas à expliquer la mort cellulaire et le mode de mort.

4.3.2 Cinétique de mort et corrélation fluence/date de mort

Dans cette section, nous étudions les cinétiques de mort des cellules irradiées et montrons une corrélation entre fluence laser et date de mort pour les cellules de type nécrotique. Cette corrélation est plus prononcée dans la gamme de fluence pour laquelle les cellules mortes sont très majoritairement (ratio >0.8) de type nécrotique. Il n'y a pas de corrélation entre fluence et date de mort pour les cellules mortes de type apoptotique lorsque la mort des cellules est suivie 30-35h après irradiation.

4.3.2.1 Cinétique de mort lors d'un suivi des cellules sur 35h post irradiation

Dans un premier temps les cellules sont suivies pendant 35h après le début de l'irradiation laser. L'histogramme [figure 4.10a](#) classe, selon la modalité de mort subie, le ratio de cellules en fonction de leur date de mort t_M (en heures après le début de l'irradiation laser). Tous temps d'irradiation confondus, nous avons mesuré $n_N=450$ cellules de type nécrotique et $n_A=600$ de type apoptotique. La mort de type nécrotique est plus rapide : t_M médian=3.4h et 75% des cellules meurent entre 2.5h et 5.6h après le début de l'irradiation. La mort de type apoptotique est plus lente et étalée : t_M médian=16h avec 75% de la mort entre 10h et 22h après le début de l'irradiation.

Corrélation entre la fluence et la date de mort. Nous représentons [figure 4.10b](#) la date de mort t_M des cellules en fonction de la fluence laser F . Pour chaque type de mort (nécrotique ou apoptotique), les données expérimentales sont extrapolées par une fonction $\log(t_M(F)) = A \log(F) + B$. Le coefficient de corrélation R^2 est inférieur à 0.01 pour les morts de type apoptotique. $R^2=0.32$ pour les morts de type nécrotique. Si l'on choisit de séparer les cellules en fonction de la durée de l'irradiation laser Δt , la corrélation augmente lorsque Δt augmente. $R^2=0.42$ et 0.49 pour $\Delta t=30$ et 60min, et 0.05 pour $\Delta t=5$ et 10min.

Nous expliquons cette différence de corrélation par le fait que seules les irradiations à $\Delta t > 30$ min permettent de générer des quantités d' 1O_2 suffisamment élevées pour observer une

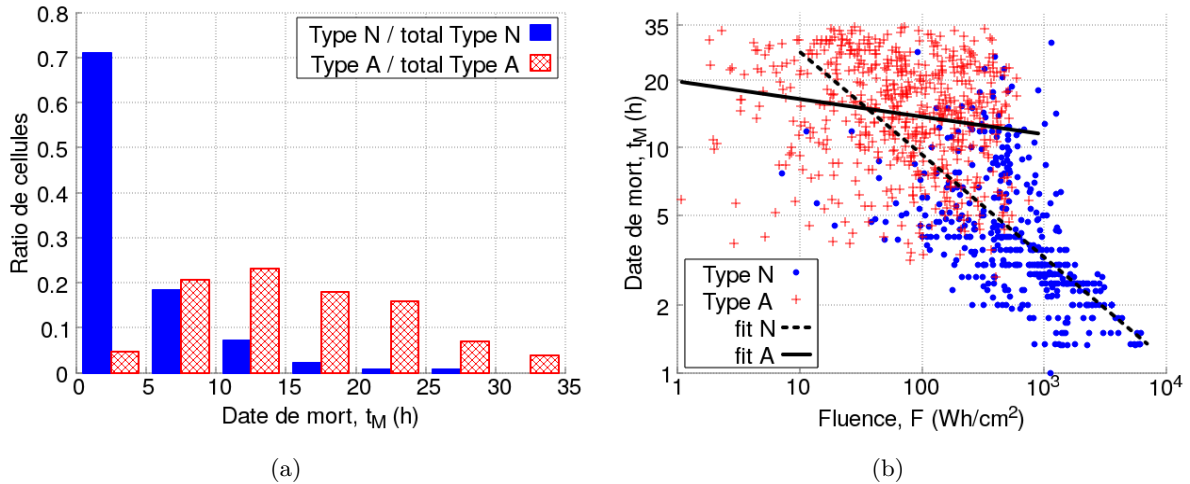


FIGURE 4.10 – **Cinétique de la mort cellulaire.** **Figure (a)** Ratio de cellules mortes de type apoptotique ou nécrotique en fonction de la date de mort t_M (en heures après le début de l’irradiation des cellules). Mort de type nécrotique : t_M médian 3.4h. Mort de type apoptotique : t_M médian 16h. **Figure (b)** Date de mort t_M en fonction de la fluence laser F (en Wh/cm^2). Les données sont extrapolées par une courbe $A \cdot \log(F) + B$ afin d’évaluer la corrélation entre fluence et date de mort. Pas de corrélation entre F et t_M pour les morts de type apoptotiques ($R^2 < 0.01$). La corrélation est plus forte ($R^2 \sim 0.4$) pour les morts de type nécrotiques.

zone dans laquelle les cellules mortes sont exclusivement de type nécrotique. Dans la gamme de fluence où les deux modes de mort se côtoient, il y a une perte de corrélation entre fluence et date de mort, indépendamment du mode de mort.

Enfin, remarquons que les valeurs mesurées pour t_M dépendent de la fluence, mais également du type cellulaire. Les cellules MCF-7 ne produisent pas la protéine caspase 3^[301;302], essentielle au clivage des protéines et organites en fin du processus d’apoptose. Ceci n’empêche pas aux cellules MCF-7 de mourir par apoptose : l’engagement dans un processus non-réversible d’apoptose se fait en amont de l’activation de la caspase 3^[303]. L.Y. Xue *et al.*^[303] comparent *in vitro*, la réponse à un traitement PDT de cellules MCF7-wt et de cellules MCF7-c3, modifiées pour exprimer la caspase 3. De l’apoptose, définie dans l’étude par la présence de critères morphologiques (condensation du noyau, rétrécissement et fragmentation), est mesurée dans les deux lignées, mais les cellules MCF7-wt meurent plus tardivement (en moyenne en 24h au lieu de 6h aux fluences testées dans l’étude) et en fraction réduite. Il est donc possible que la différence de cinétique observée entre les deux modes de mort ne soit pas aussi prononcée pour une autre lignée cellulaire.

4.3.2.2 Mort des cellules sur des temps longs : précision de la définition de la mort

Jusqu’à présent, nous avons divisé la population des cellules irradiées en deux catégories : les cellules dont la mort est aboutie (caractérisé par une explosion de la membrane cellulaire et un marquage fluorescent du noyau à l’iodure du propidium) lors de la fin du suivi par imagerie, et les autres cellules, considérées vivantes. Nous allons revoir cette division binaire dans cette section.

Nous avons présenté ci-dessus la distribution de la mort cellulaire jusqu’à 35h après le début de l’irradiation des cellules. Autours de 35h après l’irradiation des cellules, la mort est rare et uniquement de type apoptotique. Moins de 3% des cellules mortes meurent entre 30 et 35h après irradiation, soit moins de 5% du nombre total des cellules mortes de type apoptotique. De

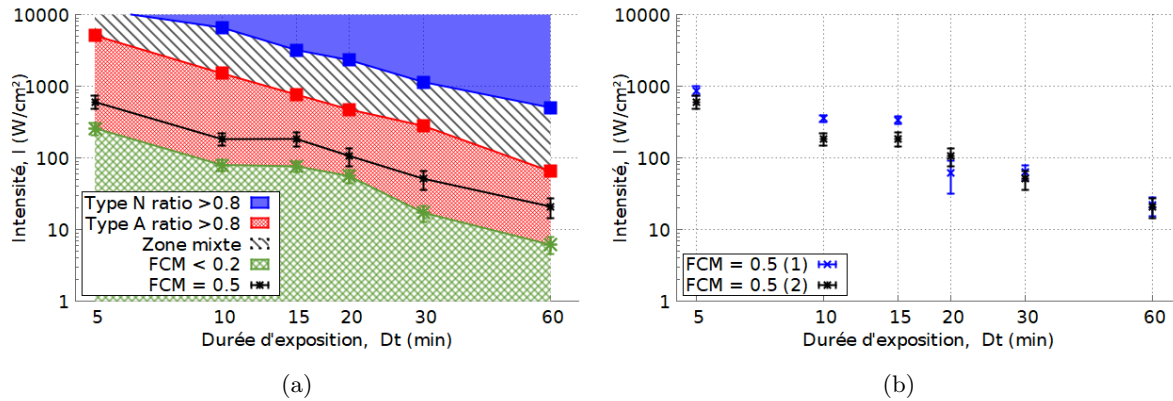


FIGURE 4.11 – Modes de mort en tenant compte des morts non-abouties pendant le suivi par imagerie. **Figure (a)** : Distribution des modes de mort en fonction de l'intensité laser I et de la durée d'exposition Δt . **Figure (b)** : Intensités correspondant à une fraction de cellules mortes (FCM) égale à 0.5 avant (1) et après (2) prise en compte des cellules apoptotiques dont la mort n'a pas abouti avant la fin des suivis 'courts' (24-48h de suivi post-irradiation).

plus, l'absence de corrélation entre mort apoptotique et fluence semble suggérer que prolonger le suivi des cellules n'aurait permis que d'ajuster éventuellement les fractions de cellules mortes de quelques pourcents, et ceci de manière homogène en fonction de l'intensité laser. Nous avons par conséquent jusqu'à présent classé comme "vivantes" des cellules montrant des symptômes d'amorce de mort de type apoptotique (réduction de la surface et recroquevillement, tel que défini plus haut, en [section 4.2.2.2](#)) <30h après le début de l'irradiation, mais dont la mort n'a pas abouti (pas de marquage fluorescent à l'iodure de propidium) avant la fin du suivi des cellules.

Dans le but de déterminer dans quelle mesure les premiers symptômes annonçant une mort apoptotique aboutissent à la mort de la cellule, nous avons suivi 60 heures des cellules irradiées durant 60, 10 et 5 min. Ces quelques expériences ont permis de conclure que toutes les cellules irradiées qui présentent dans les 30h suivant l'irradiation les premiers symptômes morphologiques d'une mort par apoptose meurent par apoptose dans les 60h. Nous allons donc par la suite comptabiliser ces cellules comme des cellules mortes, même si la durée du suivi par imagerie a été trop courte (24-48h) pour observer l'aboutissement du processus de mort.

La corrélation entre paramètres d'irradiation et fraction/type de mort, représentée [figure 4.11](#), est similaire à celle [figure 4.8](#). Les paramètres d'irradiation associés à une fraction de cellules mortes donnés sont toutefois ajustés. Par exemple, afin d'obtenir une fraction de cellules mortes de 50% (FCM=0.5), l'intensité laser nécessaire varie jusqu'à un facteur 2 (significatif au vu des écarts types). Ainsi, dans l'optique d'avoir une mesure précise de la réponse cellulaire à une dose quantitative d'¹O₂, il est nécessaire d'observer les cellules sur des temps longs (de l'ordre de 60h pour des cellules MCF-7 wt).

4.3.3 Mort cellulaire et dose de ¹O₂

Nous avons jusqu'à présent représenté la réponse cellulaire, et notamment le mode de mort, en fonction des paramètres d'irradiation (intensité ou fluence). Nous souhaitons désormais exprimer la réponse cellulaire directement en fonction des quantités de ¹O₂ produites dans les cellules. Les [figures 4.12a](#) et [4.12b](#) illustrent la réponse des cellules en fonction respectivement du taux de production d'oxygène singulet et de la concentration cumulée en oxygène singulet générée dans les cellules.

Le taux de production d'oxygène singlet, produit de l'intensité laser et de la concentration en dioxygène, est estimé à partir de l'intensité laser par simulation numérique la concentration de dioxygène $^3\text{O}_2$ (intégrée sur la durée de l'irradiation). Plus la puissance laser et plus le temps d'irradiation sont importants, plus la déplétion en dioxygène est importante. Les équations et figures associées sont répertoriées dans l'annexe C.2.

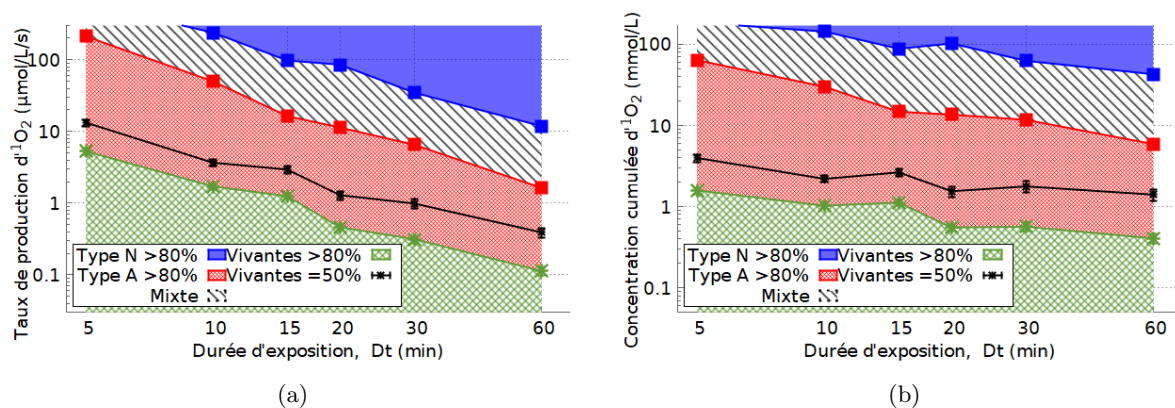


FIGURE 4.12 – Modes de mort - Bilan. **Figure (a)** Modes de mort en fonction du taux de production en oxygène singlet Γ (en $\mu\text{mol/L/s}$) et de Δt . **Figure (b)** Modes de mort en fonction de la concentration cumulée d' $^1\text{O}_2$ [$^1\text{O}_2$] $_C$ (en mmol/L) et de Δt . Si la mort était uniquement fonction de [$^1\text{O}_2$] $_C$, les différentes zones du graphe seraient toutes parallèles à l'axe des abscisses.

Au vu des résultats du chapitre précédent, la concentration en dioxygène est simulée en considérant que $^1\text{O}_2$ réagit dans le milieu extra-cellulaire pour former des ERO secondaires avec un coefficient de réaction $K_{ox}=2\times 10^6 \text{ s}^{-1}$. Dans le milieu de culture, la concentration d'ERO est toutefois réduite par rapport au PBS. Nous avons mis en évidence précédemment que les ERO secondaires ne sont générées en quantités toxiques dans le milieu de culture que pour des irradiation de $\Delta t=60\text{min}$. Pour $\Delta t=60\text{min}$, des expériences supplémentaires en présence de BSA permettraient de discriminer entre les effets directs $^1\text{O}_2$ et une éventuelle contribution des ERO secondaires. Au final (figure 4.12), nous obtenons un fraction de cellules mortes de 50% pour une concentration cumulée d' $^1\text{O}_2$ comprise entre $3.9 \pm 0.4\text{mM}$ (pour $\Delta t=5\text{min}$) et $1.5 \pm 0.2\text{mM}$ (pour $\Delta t=60\text{min}$).

C'est autour d'une concentration cumulée de 3mM que la réponse des cellules dépend le moins de la durée d'exposition Δt : la fraction de cellules mortes est autour de 50% et elles meurent très majoritairement (ratio >0.8) de mort de type apoptotique. Remarquons que de nombreuses études [28;29;33;34] caractérisent la toxicité d'une espèce en évaluant uniquement la dose D_{50} , qui provoque une fraction de cellules mortes de 50% (on trouve également $\text{FCM}=1/e=36\%$ [19]). Certaines de ces études [19;28;29] ont mesuré de manière quantitative la production d' $^1\text{O}_2$ et se sont intéressées à la dépendance de D_{50} avec la durée d'irradiation Δt . Elles ont conclu que la quantité cumulée d' $^1\text{O}_2$ définissant la dose D_{50} ne dépend pas de la durée d'exposition.

Au vu de nos résultats, il est probable que cette conclusion soit liée au choix du seuil D_{50} pour caractériser la toxicité de $^1\text{O}_2$. En étudiant la réponse des cellules à une gamme plus large de doses de $^1\text{O}_2$ nous mettons en évidence des différences marquées dans la réponse des cellules à une même dose en fonction de la durée d'exposition. Par exemple, la concentration cumulée qui permet d'obtenir 80% de mort par apoptose est 5 à 10 fois plus élevé pour des expositions de 10 et 5min par rapport à une exposition de 60 min.

4.3.4 Symptômes d'autophagie : une sous-population de cellules particulière

En plus des caractéristiques associées à des morts par apoptose ou nécrose définies précédemment, certaines cellules présentent temporairement des vacuoles, symptômes associé généralement à un phénomène d'autophagie. Il ne s'agit pas ici de définir un nouveau mode de mort, car les cellules concernées subissent dans la grande majorité des cas une mort par apoptose ou par nécrose (au vu des critères morphologiques et liés aux marquages fluorescents décrits précédemment). Les cellules restantes, minoritaires, survivent et ont un aspect morphologique sain (similaire à celui d'une cellule non-irradiée) en fin de suivi.

Nous souhaitons quantifier la population de cellules concernées en fonction des conditions d'irradiation (et donc de la dose de $^1\text{O}_2$ générée). Nous avons ainsi mis en évidence, à fluence laser égale, un nombre plus important de cellules présentant des vacuoles suite à des irradiations de durée faible, comparé aux irradiations longues (30 et 60 min).

4.3.4.1 Définition des symptômes autophagiques

L'apparition de vacuoles ont été observées chez certaines cellules lors du suivi post-irradiation (figure 4.13). Les cellules concernées, suite à l'apparition de ces vacuoles, meurent en majorité (en présentant les symptômes soit d'une mort par apoptose, soit par nécrose).

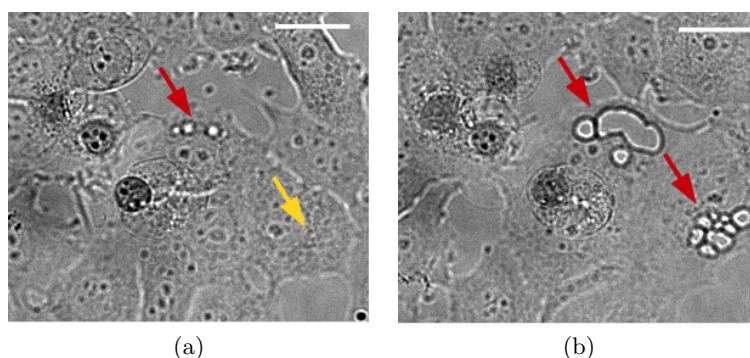


FIGURE 4.13 – **Caractérisation des vacuoles. Figures (a) et (b) :** Vacuoles autophagiques dans deux cellules irradiées. Images avec un microscope par transmission en lumière blanche, prises au grossissement 60X, respectivement 6 et 16h après irradiation. Barre d'échelle : 20 μm . Ces deux cellules survivront à l'irradiation.

Remarquons que ces vacuoles ne sont caractérisées que de manière morphologique. Ainsi, les résultats présentés ci-dessous mériteront d'être approfondis afin de se prononcer sur le potentiel enclenchement d'un processus d'autophagie chez certaines cellules irradiées. L'occurrence de vacuoles chez les cellules qui meurent de mort apoptotique n'est visible que si elle survient avant que la cellule ne se recroqueville. L'éventuelle présence de vacuoles dans une cellule recroquevillée ne peut être distingué sur les images prises, et nécessiterai l'utilisation, par exemple, de marqueurs fluorescents spécifiques.

4.3.4.2 Symptômes d'autophagie : doses et fractions de cellules concernées

Nous avons identifié les cellules présentant des symptômes d'autophagie. Ces cellules sont représentées figure 4.14 pour trois conditions d'exposition laser différentes. Afin d'exposer les cellules à une même gamme de fluences laser, la puissance maximale du faisceau gaussien doit être plus élevée lors des irradiations courtes. Nous constatons que, pour un nombre de cellules mortes comparables, le nombre de cellules autophagiques est plus important pour des

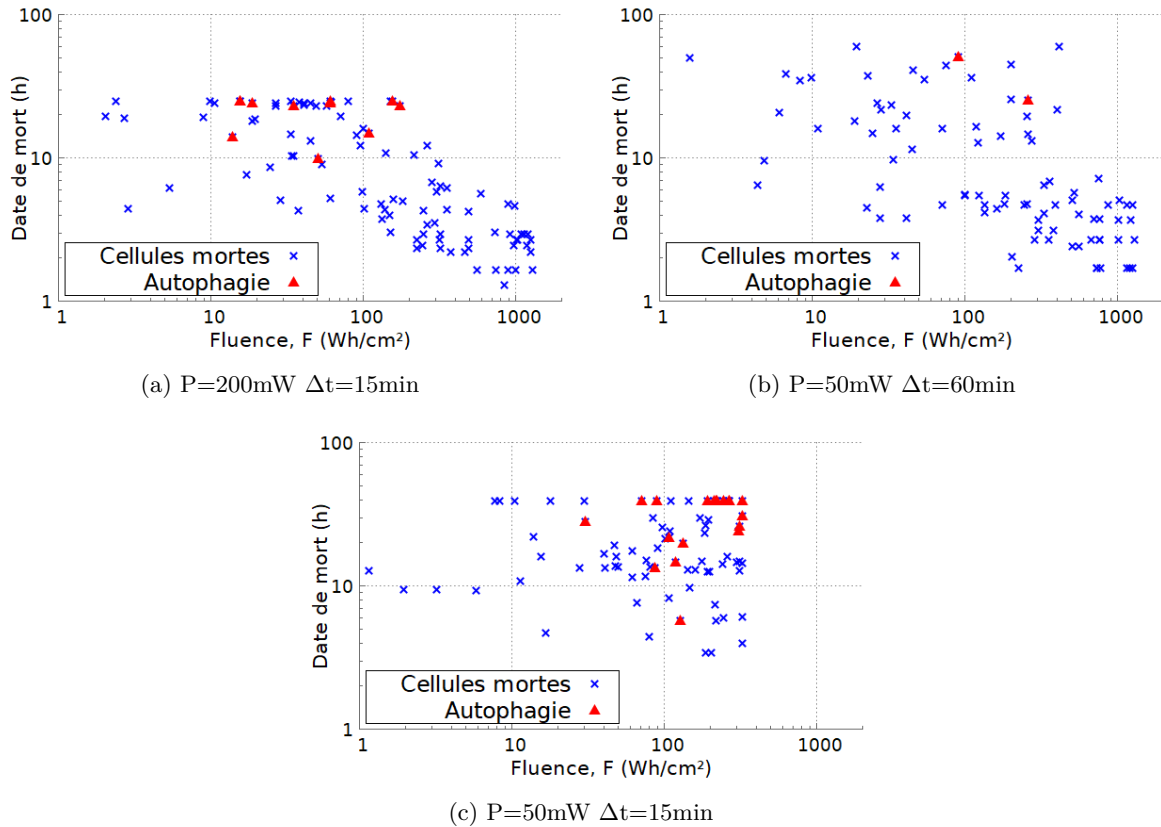


FIGURE 4.14 – **Distribution des cellules présentant des symptômes d'autophagie.** Les cellules mortes (tous modes de mort) sont représentées en bleu (croix). Lorsque les cellules mortes ont présenté des symptômes morphologiques d'autophagie (vacuoles) avant leur mort, un triangle rouge est superposé à la croix bleue correspondante. Les cellules sont exposées à différentes conditions d'irradiation : **Figure (a)** Puissance laser $P=200\text{mW}$, durée d'exposition $\Delta t=15\text{min}$ (Fluence $F < 1300\text{Wh/cm}^2$). **Figure (b)** $P=50\text{mW}$, $\Delta t=60\text{min}$ ($F < 1300\text{Wh/cm}^2$). **Figure (c)** $P=50\text{mW}$, $\Delta t=15\text{min}$ ($F < 330\text{Wh/cm}^2$).

irradiations de 15 min à puissance laser élevée ($P_{max}=200\text{mW}$), que des irradiations de 60min à puissance laser faible ($P_{max}=50\text{mW}$). Des expériences d'irradiation de 15 minutes avec une puissance laser faible ont permis de confirmer que cette différence n'est pas due à la puissance laser. Remarquons que la présence transitoire de vacuoles n'est observée que très rarement ($< 1\%$ des cellules, à comparer à la mort basale de 2% environ) chez des cellules non irradiées suivies jusqu'à 48h.

Remarquons que le suivi des cellules post-irradiation est respectivement de 25, 60 et 48h pour les graphes (a),(b),(c) de la figure 4.14. Dans les expériences de 25 et 38h, les cellules apoptotiques qui ont atteint la phase de recroquevillement (mais dont la membrane n'a pas encore éclaté) en fin de suivi sont représentées avec une date de mort coïncidant avec la fin du suivi. Pour cette raison, il y a une accumulation de cellules en fin de suivi.

La [tableau 4.3](#) regroupe le nombre et la fraction de cellules autophagiques pour différentes durées d'exposition des cellules. Au vu du faible nombre total de cellules autophagiques, nous nous sommes limités à compter la fraction de cellules autophagiques sur le nombre de cellules mortes, sur l'intervalle de fluence $[F_{min}; F_{max}]$, avec $F_{min}=1\text{ Wh/cm}^2$ et $F_{max}=350\text{ Wh/cm}^2$. F_{min} a été choisi égal à 10 Wh/cm^2 car il n'y a pas de cellules mortes (fraction de mort $< 3\%$, soit la fraction de mort basale) pour des fluences inférieures. F_{max} est la fluence maximale

auxquelles sont exposées les cellules irradiées 10 minutes. Afin de ne pas fausser la comparaison entre expériences aux durées d'exposition laser différentes, nous ne prenons pas en compte les cellules exposées à des fluences plus élevées lors des irradiations longues. Remarquons enfin que lors des irradiations longues ($\Delta t=30$ ou 60min), il n'y a aucune cellule présentant des symptômes d'autophagie pour $F > F_{max}=350\text{mWh/cm}^2$.

Δt	10	15	30	60
$f_{A(M)/tot(M)} =$ Autophagie(Mortes) / Total(Mortes)	22/160 = 13.8%	32/150 = 21.3%	18/179 = 10%	7/106 = 6.6%
$f_{Au(V)/tot(Au)} =$ Autophagie(Vivantes) / Total(Autophagie)	5/27 = 18.5%	2/34 = 5.9%	1/19 = 5.2%	1/8 = 12.5%
Intervalle de fluence (75% des cellules) Fluences en Wh/cm^2	[16 : 330]	[15 : 306]	[45 : 250]	[70 : 100]

TABLE 4.3 – **Table de caractérisation population de cellules autophagiques** La fraction $f_{A(M)/tot(M)}$ est le ratio entre le nombre de cellules mortes qui présentent des symptômes d'autophagie et le nombre total de cellules mortes dans l'intervalle de fluence [$1 \text{ Wh/cm}^2 ; 350 \text{ Wh/cm}^2$]. $f_{Au(V)/tot(Au)}$ correspond au ratio entre le nombre de cellules survivantes qui présentent des symptômes d'autophagie et le nombre total de cellules qui présentent des symptômes d'autophagie. L'intervalle de fluence regroupe 75% des cellules autophagiques mortes.

Les fractions de cellules mortes qui présentent des symptômes d'autophagie sur le nombre total de cellules mortes ($f_{A(M)/tot(M)}$) entre $\Delta t=15\text{min}$ et $\Delta t=60\text{min}$ diffèrent de manière statistiquement significatives ($p=0.0012$). Les résultats suggèrent ainsi que la réponse cellulaire, manifestée par la présence de vacuoles, n'est pas uniquement fonction de la fluence (et donc de la quantité cumulée d'oxygène singulet générée dans la cellule), mais également de la durée d'exposition : pour un même gamme de fluence, sur des durées d'irradiations courtes, les symptômes d'autophagie sont plus fréquents. Le suivi d'un plus grand nombre de cellules irradiées permettrait de conclure plus fermement.

Le faible nombre de cellules qui survivent suite à des symptômes autophagiques ne permet pas de conclure sur un éventuel lien entre survie des cellules et temps d'irradiation. L'hypothèse que l'autophagie est un mécanisme de défense de la cellule et qu'elle pourrait, pour des temps d'irradiations courts, permettre aux cellules irradiées de survivre, mérite néanmoins d'être étudiée plus en détail.

Enfin, la [figure 4.15](#) reprend la représentation de la réponse des cellules en fonction du taux de production de $^1\text{O}_2$ et la complète en ajoutant la zone de distribution des cellules autophagiques. Nous remarquons que cette zone est partiellement superposée avec la zone apoptotique et la zone mixte (aucun mode de mort majoritaire). Lorsque les taux de production d' $^1\text{O}_2$ sont suffisamment élevés pour induire une mort majoritairement ($>80\%$) nécrotique, aucun symptôme d'autophagie n'a été observé. On constate, pour les durée d'exposition $\Delta t=60\text{min}$, une restriction forte de l'intervalle de production de $^1\text{O}_2$ pour lesquels les cellules présentent des symptômes d'autophagie. Ainsi, pour les durées d'exposition longues, non seulement la fraction de cellules présentant des symptômes autophagiques semble plus faible, mais les quelques cellules concernées sont regroupés dans un intervalle plus restreint.

Pour des irradiations de durée $\Delta t=10$ et 30min en présence de 3mM de BSA (désactivateur

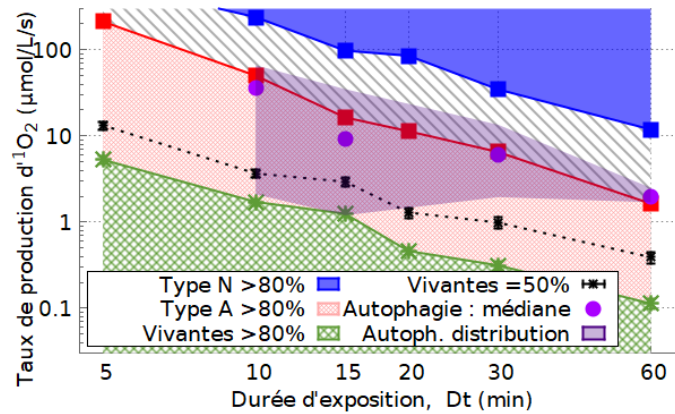


FIGURE 4.15 – **Mode de mort en incluant autophagie.** Modes de mort en fonction du taux de production d'oxygène singulet (Γ) et de la durée d'exposition. La zone magenta contient 75% des cellules mortes qui ont présenté des symptômes morphologiques associés à l'autophagie (vacuoles). Les ronds magenta sont la valeur médiane de Γ associé à cette population. Légende : Type N = type nécrotique, Type A = type apoptotique.

extracellulaire d' $^1\text{O}_2$) nous mesurons des ratios comparable de symptômes d'autophagie que lors des irradiations sans BSA. Par conséquent, les vacuoles et les différences de réponse cellulaire (pour $\Delta t \leq 30 \text{ min}$) sont attribuée à la génération intra-cellulaire de $^1\text{O}_2$.

Ces résultats suggèrent ainsi que la réponse cellulaire est fonction de la quantité d'oxygène singulet totale générée dans la cellule, mais également du temps d'exposition.

4.4 Conclusion et perspectives

4.4.1 Les modes de mort, déterminées à la fois par la concentration cumulée d' $^1\text{O}_2$ et la durée d'exposition

La réponse des cellules à de l'oxygène singulet généré par photo-excitation directe du dioxygène dépend des paramètres d'irradiation : l'intensité laser, qui définit un taux de production d'oxygène singulet, et le temps d'irradiation. Nous avons mesuré la fraction de cellules mortes sur une large gamme de paramètres d'irradiation et défini deux modes de mort à partir de critères morphologiques et à l'aide de marqueurs fluorescents. Nous distinguons ainsi les cellules mortes de type nécrotique et apoptotique. Plus la fraction de cellules mortes globale est élevée, plus le ratio de cellules nécrotiques est important. Ce résultat est en accord avec les études *in vitro* de PDT de S. Nagata *et al.* [287] et K. Plaetzer *et al.* [108]. Ces études ne se sont toutefois pas intéressés à la réponse à une même dose (définie comme la fluence laser) pour des paramètres d'irradiation (intensité et durée d'exposition) variables et n'ont pas suivi la cinétique de mort des cellules.

Le suivi des cellules sur plusieurs jours a permis d'identifier une sous population de cellules présentant des symptômes d'autophagie. Ces cellules sont présentes pour une gamme de taux d'irradiation restreinte. Plus le temps d'exposition des cellules à $^1\text{O}_2$ est long, plus la gamme de taux de production d' $^1\text{O}_2$ dans laquelle nous observons des symptômes autophagiques est réduite et plus le nombre de cellules autophagiques est faible. Les cellules sont ainsi sensibles à la fois au temps d'irradiation et au taux de production d' $^1\text{O}_2$: la concentration cumulée d'oxygène singulet seule ne permet pas de prédire précisément la fraction totale de cellules mortes et le ratio de chaque type de mort.

4.4.2 Voies de signalisation et mort cellulaire

Dans ce chapitre nous n'avons caractérisé la mort qu'au moyen de critères morphologiques et de marqueurs fluorescents. Dans le cas des symptômes autophagiques (vacuoles), la caractérisation a été exclusivement morphologique. Nous ne nous sommes pas intéressés aux voies de signalisation associées à la mort cellulaire. Il serait pertinent de caractériser plus rigoureusement la population de cellules mortes, en identifiant quelles voies de signalisation correspondent à quel mode de mort, et quelles voies rendent possible l'autophagie transitoire observée expérimentalement.

La revue de L. Galluzzi *et al.*^[296] propose une synthèse des différents acteurs de l'apoptose et de la nécroptose (mort programmée présentant les symptômes morphologiques de la nécrose) identifiés dans la littérature. L'apoptose est caractérisée notamment par la présence de caspases (3 ou 8 notamment) et l'activation de la voie de signalisation Caspase8/BID. Les kinases RIPK1, RIPK3 et MLKL sont quant à elles le plus souvent impliquées dans des processus de nécroptose. La mesure de ces facteurs permettrait potentiellement de différencier les deux modes de mort. De plus, les facteurs RIPK1 et RIPK3 participent, dans certaines conditions, à la régulation des caspases, ce qui va dans le sens d'une inter-connexion forte des voies associées aux différents modes de mort.

Dans ce sens, résultats de la littérature suggèrent une compétition entre les voies de signalisation associées aux mécanismes de réparation de la cellule (par exemple de maintien de l'homéostasie redox dans le cas d'un stress oxydant), et les voies associées aux processus de mort programmée, qui s'enclenchent suite à un stimulus de stress^[296;304]. Dans leur revue, L. Galluzzi *et al.*^[296] proposent une synthèse des processus de mort cellulaire et des acteurs biochimiques impliqués. Ils indiquent en outre que les résultats expérimentaux de la littérature favorisent l'hypothèse d'une co-activation, suite à un stimulus de stress, de voies de signalisation qui s'opposent à la mort et favorisent l'adaptation de la cellule, et de voies de signalisation qui déclenchent les processus de mort programmée. Ces voies s'inhibent mutuellement. En fonction du stimulus, soit la cellule retrouve son état initial soit le processus de mort atteint un point de non-retour qui entraîne la mort de la cellule.

De nombreux modèles mathématiques ont été développés afin de décrire les voies de signalisation associées à la survie des cellules suite à un stress et aux différents modes de mort. Notamment, L. Calzone *et al.*^[304] ont identifié 25 acteurs qui déterminent le destin cellulaire et modélisé leurs interactions (inhibition ou excitation). Ils proposent également un modèle plus simplifié, dans lequel l'inhibition mutuelle de trois acteurs moléculaires suffit à déterminer la mort cellulaire. Ces acteurs sont les caspases 3, associées à la mort par apoptose, les facteurs anti-apoptotiques NF κ b associés à la survie des cellules, et l'accroissement de la perméabilité de la membrane mitochondriale (MPT) associée à la mort par nécrose.

Ainsi, il serait intéressant d'utiliser les modèles mathématiques établis, ou d'en élaborer des nouveaux, afin d'explorer la possibilité de rendre compte de nos données expérimentales et éventuellement d'identifier des facteurs moléculaires responsables des réponses observées.

4.4.3 Réponse cellulaire et dose d'oxygène singulet

Notre étude soulève également des questions associées à la réponse à une dose. Plusieurs études *in vivo*^[315-317] en photo-thérapie dynamique encouragent à penser que la délivrance de la quantité de $^1\text{O}_2$ de manière fractionnée, avec une première irradiation d'amplitude moindre suivie d'une seconde irradiation apportant $\sim 90\%$ de la concentration cumulée d' $^1\text{O}_2$ totale, provoque une fraction de cellules mortes plus grande qu'une irradiation en une seule fois. Plusieurs études^[318-320] ont comparé la réponse de cellules *in vitro* traitées par PDT avec une source laser

continue et pulsée, et observé pour une même fluence laser de la mort par nécrose avec la source pulsée et par apoptose avec la source continue.

Nous n'avons étudié que la réponse des cellules à un stress initié par $^1\text{O}_2$ pour une irradiation continue à intensité laser constante. La génération d' $^1\text{O}_2$ par excitation directe du dioxygène permet néanmoins une grande flexibilité de modulation du taux de production d' $^1\text{O}_2$. Il serait intéressant d'étudier l'impact du fractionnement, et plus généralement de la modulation temporelle du taux de production d'oxygène singulet (exposition des cellules à une rampe d'intensité croissante par exemple), sur la fraction de cellules mortes et le mode de mort, et ainsi d'identifier le profil d'irradiation qui permet de tuer les cellules en minimisant la quantité d'oxygène singulet nécessaire, et de mesurer la cinétique de mort et les modes de mort associés à ce profil.

4.4.4 Intérêt thérapeutique

Une mort par nécrose (accidentelle ou programmée) déverse les contenus du cytoplasme de la cellule dans le milieu extra-cellulaire et provoque une réponse inflammatoire du système immunitaire. Celle-ci peut être à l'origine d'effets secondaires néfastes pour le patient. A l'inverse, une cellule endommagée apoptotique est prise en charge par le système immunitaire. Garantir une mort par apoptose peut donc présenter un intérêt thérapeutique. Au vu des résultats expérimentaux, afin d'obtenir un ratio de cellules mortes de type apoptotiques $>80\%$ la fraction totale de cellules mortes doit être inférieure à 0.8. La modulation du stimulus de stress oxydant à travers le contrôle du profil temporel de l'intensité laser et/ou le fractionnement de la dose, pourrait ainsi potentiellement permettre d'augmenter la fraction de cellules mortes tout en favorisant la mort par apoptose.

Nous avons uniquement étudié le mode de mort de cellules cultivées en mono-couches. Suite à l'identification en mono-couches des acteurs moléculaires principaux responsables des différents modes de mort, il serait intéressant de mesurer l'activité de ces acteurs dans des sphéroïdes irradiés afin de comparer la réponse des deux modèles cellulaires. Nous anticipons une différence des modes de mort en mono-couches et sphéroïdes liée à la différence entre les cinétiques de mort mesurées dans le chapitre 2. Nous avons en effet mis en évidence que la zone de mort en sphéroïdes s'étend pendant 48h tandis qu'elle atteint en mono-couches plus de 95% de sa valeur finale dès 24h après irradiation. I. Rizvi *et al.*^[313] se sont intéressés dans des sphéroïdes au ratio de cellules mortes par apoptose 24h après irradiation pour différentes fluences, et ont mesuré une augmentation de la fraction globale de cellules mortes pendant 3 jours. Leur étude montre que différentes combinaisons d'intensité (I), de temps d'irradiation (Δt) et de concentrations de photo-agents ([PS]) donnent une fraction de cellules mortes différente à dose ($I^* \Delta t^* [PS]$) constante. Une corrélation entre la FCM et la concentration de caspases, et ainsi la fraction de mort apoptotique, n'est que observée pour des FCM faibles. Cela suggère qu'en sphéroïdes également, la mort n'est majoritairement de type apoptotique que lorsque la FCM globale est faible. La revue de P. Mroz *et al.*^[109] relève en outre que la déplétion en nutriments et en dioxygène favorise la nécrose secondaire au dépend de l'aboutissement du processus d'apoptose. Ainsi, à dose égale, le ratio de cellules nécrotiques au cœur des sphéroïdes devrait être plus important qu'en surface.

Enfin, en l'absence de désactivateur extra-cellulaire d' $^1\text{O}_2$, la photo-production directe de $^1\text{O}_2$ permettrait également d'étudier les modes de mort en présence d'ERO secondaires et la synergie éventuelle entre les différentes ERO.

Conclusions

Mon travail de thèse a cherché à préciser le lien entre la dose d'oxygène singulet ($^1\text{O}_2$) générée par photo-production et la mort de cellules vivantes. Cette étude pose la question de la définition de la dose, et des paramètres les plus appropriés pour caractériser la mort cellulaire suite à un stress oxydant. Dans la littérature de la Photo-Thérapie dynamique (PDT), le mode traditionnel de photo-production, plusieurs définitions de dose sont utilisées. La dose est communément définie comme une fluence^[27-31;108;287], c'est-à-dire la densité d'énergie par unité de surface délivrée par le laser, ou comme le produit de la fluence avec la concentration de photo-agents^[313] (PS). Dans les études dites quantitatives, la dose est définie comme la concentration cumulée d' $^1\text{O}_2$ ^[19;20;33-36] générée pendant l'irradiation. De ce corps d'études, il se dégage que la concentration cumulée d'oxygène singulet est le paramètre le mieux corrélé avec la mort des cellules. En effet, la fluence seule ne permet pas de rendre compte de la production effective d' $^1\text{O}_2$ ^[18;33], affectée notamment par la déplétion en dioxygène dans les tissus, le photo-blanchiment des PS pendant l'irradiation et les interactions PS-cellules. Elle reste néanmoins, malgré ses limites, une métrique couramment utilisée pour caractériser un traitement PDT car l'estimation de la production d' $^1\text{O}_2$ en PDT est complexe et requiert, pour être quantitative, une détection directe d' $^1\text{O}_2$, par exemple par la détection de la luminescence émise par les molécules d' $^1\text{O}_2$ à 1270nm.

La concentration cumulée létale est définie pour une Fraction de Cellules Mortes totale donnée (généralement FCM=0.5). Elle dépend de la lignée cellulaire, du type et de la concentration de photo-agents^[36], et du mode de culture : *in vitro* en mono-couches^[19] ou sphéroïdes^[33;34], ou *in vivo*^[20;36]. Les concentrations mesurées sont de l'ordre de 0.1-1mM *in vivo* et 1-10mM *in vitro*. La sensibilité plus grande des cellules *in vivo* au stress oxydant est attribuée à des effets qui ne sont pas directement induits par $^1\text{O}_2$ et qui amplifient ainsi en PDT l'effet du stress oxydant *in vivo*^[36]. Afin d'étudier la mort initiée par $^1\text{O}_2$, nous avons généré de l'oxygène singulet par photo-excitation directe du dioxygène à 1270nm. Cette méthode permet de s'affranchir des photo-agents et ainsi d'estimer plus facilement le taux de production d' $^1\text{O}_2$ dans les cellules. Pour des FCM de 0.5, nous retrouvons effectivement dans cette étude une concentration cumulée [$^1\text{O}_2$]_C proche des valeurs de la littérature de la PDT : *in vitro* dans des cellules MCF-7 cultivées en mono-couches [$^1\text{O}_2$]_C=2 à 4mM, et évolue assez peu avec la durée d'exposition des cellules au stress (Δt =5 à 60 min).

Afin de mieux caractériser la mort cellulaire en fonction de la concentration cumulée d' $^1\text{O}_2$, nous avons généré dans des cellules une gamme de concentrations cumulées d' $^1\text{O}_2$ permettant d'obtenir des fractions de cellules mortes allant de 0 à 1. Nous remarquons ainsi une dépendance en Δt de la concentration cumulée associée à une FCM donnée. A concentration cumulée égale, la fraction de cellules mortes mesurée suite à une irradiation longue est inférieure à la FCM mesurée suite à une irradiation courte. Cette dépendance de la mort cellulaire en Δt est encore plus prononcée lorsque l'on s'intéresse au mode de mort des cellules. Ainsi, la dose d' $^1\text{O}_2$ n'est pas déterminée par la concentration cumulée d' $^1\text{O}_2$ seule, elle est fonction à la fois du taux de production d' $^1\text{O}_2$ et de la durée d'irradiation.

En fonction de la dose et, en PDT, des interactions PS-cellules^[14;109], les cellules subissent différents mode de mort. Nous avons caractérisé, au moyen de critères morphologiques et de marqueurs fluorescents, deux modes de mort : une mort de type apoptotique et une mort de type nécrotique. La cinétique de mort est associée à la fois au mode de mort et à la lignée cellulaire^[310]. La mort de type apoptotique est, dans la littérature^[296] comme dans nos expériences, associée à des cinétiques plus longues et des stress moins intenses que la mort de type nécrotique. Nous observons en outre des vacuoles autophagiques chez une sous-population de cellules, présentes dans une gamme de taux de production d' $^1\text{O}_2$ et de durées d'exposition restreintes.

L'hypothèse d'une compétition entre la mort apoptotique et nécrotique nous semble une piste pertinente à explorer lors de travaux ultérieurs. De nombreuses études de la littérature, synthétisées dans la revue de L. Galluzzi *et al.*^[296] vont dans le sens de l'activation simultanée suite à un stress des voies de signalisation cellulaire associées à la survie (mécanismes antioxydants et de réparation) et aux différents processus de mort programmée. Ces voies sont en compétition, c'est-à-dire que certains acteurs impliqués dans chaque voie inhibent ceux des autres. Plusieurs modèles^[304-308] de niveaux de complexité différents se sont intéressés à la compétition entre les différents processus de mort pour expliquer la réponse cellulaire à un stress. Le groupe de E. Barillot^[304;305] notamment, a cherché à identifier les acteurs moléculaires principaux associés à la mort nécrotique, la mort apoptotique et la survie des cellules. Afin de poursuivre nos travaux, il serait pertinent de mieux caractériser les deux modes de mort en identifiant les acteurs moléculaires impliqués, le lien entre dose d' $^1\text{O}_2$ et leur activation, et les acteurs responsables des symptômes d'autophagie.

Nous ne sommes pas les premiers à remarquer une dépendance, à dose égale, de la réponse des cellules en fonction du profil temporel d'intensité de la source d'irradiation. Plusieurs études *in vivo*^[315-317] en PDT mettent en évidence une fraction de cellules mortes plus importante lorsque la quantité totale d' $^1\text{O}_2$ est administrée de manière fractionnée, par plusieurs irradiations espacées d'un temps sans irradiation. La nature de la source laser, pulsée ou continue^[318-320], affecte également le mode de mort des cellules, avec une augmentation de la mort par nécrose avec une source pulsée. Ainsi, une perspective intéressante de ce travail de thèse serait de moduler le profil temporel de l'intensité de la source laser à 1270nm, afin d'identifier les paramètres d'irradiation qui maximisent la mort cellulaire et l'impact d'une telle modulation sur le mode de mort. En PDT, le processus de photo-blanchiment des photo-agent est un des éléments mis en avant pour expliquer l'efficacité d'une irradiation fractionnée^[315-317], en plus de la re-oxygénation des tissus. Le fractionnement de la dose par photo-excitation directe du dioxygène pourrait ainsi permettre de déterminer si le fractionnement affecte effectivement les processus de mort cellulaires pour une même dose de $^1\text{O}_2$, ou s'il s'agit uniquement d'une méthode pour optimiser le taux de production d' $^1\text{O}_2$ par les photo-agents.

De manière plus générale, la photo-production directe de $^1\text{O}_2$ est un outil pertinent pour étudier la réponse cellulaire à une dose quantifiée d' $^1\text{O}_2$. En PDT, les processus de photo-blanchiment des PS^[52] limitent la production d' $^1\text{O}_2$ pour de fortes intensités de lumière et lors d'irradiations longues. La photo-production directe, en plus de permettre un estimation quantitative du taux de production d' $^1\text{O}_2$, permet ainsi d'explorer la réponse des cellules pour des gammes de taux de production plus étendues, contraintes uniquement par la concentration en dioxygène dans les cellules. En outre, en PDT, les PS, en fonction de leur nature, se fixent préférentiellement dans certains compartiments cellulaires^[50;51;109] et affectent ainsi, à concentration cumulée d' $^1\text{O}_2$ égale, le mode de mort des cellules^[109]. La photo-production directe permet de mieux contrôler spatialement le lieux de production de $^1\text{O}_2$. Dans cette thèse, nous nous sommes intéressés à des stress létaux, toutefois, le contrôle du taux et du lieux de production de $^1\text{O}_2$ accordés par la photo-production directe a également permis d'étudier le rôle de $^1\text{O}_2$ dans d'autres fonctions cellulaires, telles la prolifération^[65-67] et le contrôle du cycle cellulaire^[68], ou

la mesure des niveaux de ERO suite à la génération d' $^1\text{O}_2$ dans des compartiments cellulaires spécifiques^[59]. L'oxygène singulet est impliqué dans de nombreux processus biologiques^[70], la maîtrise de sa concentration offre ainsi des possibilités intéressantes^[55] en vue de la compréhension des voies de signalisation rédox et de l'utilisation de $^1\text{O}_2$ et du stress oxydant dans le cadre de la recherche biomédicale et des thérapies.

L'estimation du taux de production d' $^1\text{O}_2$ est en particulier utile pour comparer la réponse à une même quantité d' $^1\text{O}_2$ de mono-couches et de cellules cultivées en sphéroïdes. L'avantage des mono-couches est de permettre d'évaluer facilement la dose d' $^1\text{O}_2$ générée, elles servent ainsi d'expérience de contrôle et ont permis de vérifier que la dose létale en PDT et lors de l'excitation directe de $^1\text{O}_2$ à 1270nm est similaire. Les sphéroïdes sont quant à eux reconnus comme des modèles plus pertinents que les mono-couches^[122-124] pour rendre compte *in vitro* des effets biologiques *in vivo*. L'organisation des sphéroïdes en agrégats tridimensionnels affecte le métabolisme des cellules, notamment la concentration d'ATP, la consommation de glucose^[143], de dioxygène^[139] et l'accès en nutriments et dioxygène des cellules en fonction de leur position par rapport à la surface du sphéroïde. Tous ces facteurs ont une action sur le mode de mort : par exemple une concentration élevée d'ATP favorise la mort par apoptose^[107], tandis que la déplétion en dioxygène et nutriments favorise la mort par nécrose^[109]. Ainsi, la réponse à un stress oxydant des sphéroïdes est potentiellement altérée par rapport à la réponse en mono-couches. Remarquons en outre l'existence de variations fortes de ces facteurs entre sphéroïdes de différentes lignées cellulaires^[143], qui justifient d'étendre l'étude de la réponse du stress oxydant à plusieurs lignées. Ces variations affectent également l'assimilation des PS par les sphéroïdes^[143] et donc la dose d' $^1\text{O}_2$ en PDT. Par conséquent, en s'affranchissant de la variabilité induite par les photo-agents, l'excitation optique directe du dioxygène permettrait d'étudier la variabilité^[309;312] de réponse exclusivement liée aux différences génétiques inter ou intra-lignées, ou au taux de protéines entre cellules génétiquement identiques.

Dans des sphéroïdes, nous avons quantifié la fraction globale de cellules mortes. Nous n'avons pas mesuré de différence de réponse, suite à la génération d'une même quantité intra-cellulaire d' $^1\text{O}_2$, entre les cellules de surface du sphéroïde et les cellules cultivées en mono-couches. Une estimation plus précise de la concentration de dioxygène dans les sphéroïdes est néanmoins nécessaire pour conclure sur la réponse des cellules au cœur des sphéroïdes. Une fois les acteurs moléculaires principaux des voies de signalisation associées à chaque mode de mort identifiés en mono-couches, il serait intéressant de quantifier l'expression de ces acteurs dans des sphéroïdes, suite à un stress oxydant généré par $^1\text{O}_2$, et de déterminer si nous retrouvons un effet comparable de compétition entre les différents processus de mort. Au vu de la cinétique de mort plus longue mesurée dans des sphéroïdes comparé aux cellules cultivées en mono-couches, nous nous attendons à une différence de réponse entre les deux modèles.

Enfin, l'irradiation de sphéroïdes par génération optique directe a permis de mettre en évidence un effet de $^1\text{O}_2$ produit dans le milieu extra-cellulaire et l'existence d'espèces réactives de l'oxygène (ERO) secondaires, générées en quantités toxiques dans l'espace inter-cellules. Pour un même taux de production d' $^1\text{O}_2$, lorsque les mono-couches et sphéroïdes sont irradiés dans du milieu de culture, les ERO secondaires sont beaucoup plus toxiques dans les sphéroïdes. Les expériences de PDT *in vitro* sur des sphéroïdes n'ont pas pu constater de tels effets car l'emploi de PS exclusivement intra-cellulaires ne permet pas de générer des ERO secondaires extra-cellulaires. Afin d'identifier ces ERO secondaires, j'ai mis en place une expérience d'irradiation dans laquelle le faisceau laser est focalisé à l'extérieur de cellules cultivées en mono-couches. Une série d'irradiations en présence de désactivateurs de différentes ERO et une expérience ultérieure de génération d' $^1\text{O}_2$ dans une solution tampon phosphate sans cellules en présence de dihydroethidium (HE) ont permis d'identifier O_2^- comme produit de $^1\text{O}_2$. $\text{HO}\cdot$ a également été identifié comme acteur de la mort cellulaire et proposé comme produit de réaction de O_2^- dans

les cellules. A court terme, il serait intéressant d'identifier le mécanisme de génération de O_2^- par 1O_2 en reproduisant l'expérience de détection de O_2^- en présence de HE dans de l'eau déionisée, puis dans de l'eau déionisée complétée avec différents composants du PBS, jusqu'à détecter O_2^- . Enfin, les résultats expérimentaux suggèrent l'existence d'une seconde ERO secondaire, qui reste à être identifiée.

Ainsi, l'excitation optique directe du dioxygène permet d'exploiter l'espace inter-cellules comme source de 1O_2 et de dommages aux cellules, et ainsi d'induire de la mort cellulaire à longue portée du lieu de génération de 1O_2 . La reproduction de ces effets à longue portée *in vivo* pourrait présenter un intérêt thérapeutique. Enfin, la génération dans du PBS de ERO secondaires par 1O_2 pose la question de la génération d'ERO secondaires dans d'autres solvants et de l'utilisation de l'excitation directe du dioxygène comme source contrôlée de ERO, dans le cadre, par exemple, de l'étude de la chimie des espèces réactives de l'oxygène.

Annexes

Annexe A

Culture et caractérisation des cellules et des sphéroïdes

Cet annexe contient les protocoles de culture des cellules en mono-couche et des sphéroïdes, la mesure des dimensions des cellules en mono-couches et de la géométrie des sphéroïdes, et la caractérisation de la croissance des sphéroïdes. Les expériences d'irradiations de cellules ont été effectuées exclusivement sur des cellules humaines cancéreuses du sein MCF-7 de type sauvage (lignée ATCC-HTB-22).

A.1 Culture cellulaire

A.1.1 Culture cellulaire en mono-couches

Les cellules MCF-7 sont cultivées en mono-couches selon des protocoles de culture standard. Les cellules en suspension dans du milieu cellulaire sont déposées sur une surface adhérente, y adhèrent et se divisent afin de former un tapis homogène d'une cellule d'épaisseur (mono-couche). La fraction de la surface adhérente couverte par les cellules est qualifiée de "confluence", les cellules sont passées en utilisant de la trypsine/EDTA (0.25%) lorsqu'elles atteignent une confluence de 70-80%. Une boîte de culture T75 (surface de 75cm²) confluite à 80% contient ~5 million de cellules. Les MCF-7 en mono-couche ont un cycle cellulaire d'environ 35 heures.

Les cellules sont cultivées dans un milieu de culture DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) contenant 4,5g/L de glucose et complété avec 10% de sérum de veau fœtal (SVF), 1% de L-glutamine et 0.4% d'antibiotiques (pénicilline/streptomycine). Tous ces composants sont achetés chez Lonza. Le milieu de culture est remplacé tous les 2-3 jours. Les boîtes de culture/flacons sont conservés dans un incubateur, qui régule la température (37 °C), la composition de l'air (5% de CO₂) et l'humidité (100%) de l'atmosphère auxquelles sont exposées les cellules.

Les expériences sont faites sur des cellules de passage P+5 à P+18, avec P le numéro de passage de la lignée ATCC envoyée par le fournisseur. La comparaison d'expériences identiques (irradiation de sphéroïdes et mesure de la mort cellulaire) effectuées à P+7 et P+16 ne révèle aucune différence statistiquement significative.

A.1.2 Culture de sphéroïdes

En ensemençant des cellules MCF-7 dans des conditions où elles ne peuvent qu'adhérer entre elles, les cellules vont s'agréger. Nous cherchons à obtenir des agrégats globalement sphériques, et de limiter la variabilité entre deux ensemençements. Les cellules sont comptées (compteur BioRad) et ensemençées dans des plaques 384 puits (100 µL)/puits) à fond en U non-adhérent

(Corning CLS3830). Les puits en périphérie de la plaque (lignes A et P, colonnes 1 et 24) sont remplis avec 100 μL de solution tampon (PBS) pour limiter l'évaporation du milieu dans les puits contenant les sphéroïdes. Ces derniers sont remplis avec 25 μL de cellules. 75 μL de milieu de culture sont ajoutés par puits le lendemain de l'ensemencement. Le milieu est remplacé partiellement (50%, pour éviter d'aspirer le sphéroïde) tout les deux jours. 1000 cellules MCF-7 produisent un sphéroïde d'environ 200 μm de diamètre 3 jours après ensemencement.

A.2 Caractérisation des cellules en mono-couches

A.2.0.1 Volume des cellules MCF-7

Le diamètre des cellules MCF-7 individuelles en suspension est mesuré à l'aide d'un compteur BioRAD, qui calcule automatiquement un histogramme des diamètres des cellules. La distribution des diamètres se répartit en deux populations, la première (>90% des cellules) décrit les cellules qui ne sont pas en phase de division, et a un diamètre de 14.2 \pm 1 μm . Une population minoritaire de cellules a entamé sa phase de division, et a un diamètre plus grand. En faisant l'hypothèse que les cellules en suspension ont une forme sphérique, le volume moyen d'une cellule est donc de $V=1500 \mu\text{m}^3$.

A.2.0.2 Géométrie des cellules MCF-7 cultivées en mono-couches

Afin d'obtenir l'aire A moyenne des cellules, le périmètre de chaque cellule est approximé à la main par un hexagone. Les cellules proviennent de 4 champs, tirés de 4 expériences d'irradiation différentes. Le champs caméra correspondant aux coordonnées "laser" a été zoomé jusqu'à avoir ~ 25 cellules par champs à caractériser. L'aire A et la longueur des petits et grands axes l et L d'une centaine de cellules ont été mesurés avec le logiciel de traitement d'image ImageJ.

La longueur L et la largeur l des cellules sont comprises entre 10 et 50 μm (histogramme [figure A.1a](#)). Nous obtenons une distribution des ratios d'aspect L/l : 50% des cellules ont L/l < 1.5, 75% L/l < 2 et 95% L/l < 2.5 ([figure A.1b](#)). Le diamètre médian, $\sqrt{L \times l}$ déduit vaut $D= 30 \pm 6.3 \mu\text{m}$. En faisant l'hypothèse que le volume $V=1500 \mu\text{m}^3$ des cellules en suspension est conservé lorsqu'elles forment une mono-couche, une hauteur médiane de $H= 5.2 \pm 2.2 \mu\text{m}$ est estimée en assimilant la cellule à une demi-sphère de diamètre D.

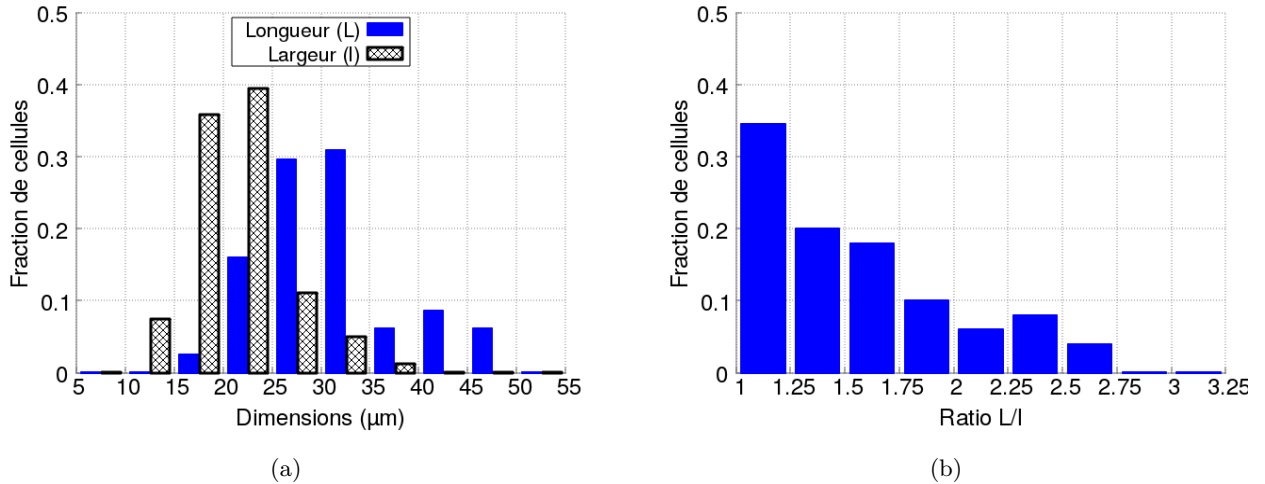


FIGURE A.1 – Géométrie et modèle de cellules MCF-7. (a) Histogramme normalisé de la distribution des dimensions (longueur L et largeur l) d’une population de $n=100$ cellules. (b) Histogramme normalisé de la distribution des ratio L/l .

A.3 Croissance et caractérisation des sphéroïdes

Nous souhaitons mesurer l’évolution du nombre de cellules composant les sphéroïdes. En mono-couches, on s’attend à ce que la population de cellules (pour MCF7-wt) double toute les 35h environ. En sphéroïdes, seules les cellules en surface se divisent, donc le nombre de cellules augmente beaucoup plus lentement.

La croissance des sphéroïdes est caractérisée par deux mesures (figure A.2) : l’évolution du diamètre des sphéroïdes, mesuré sur des images de phase prises au microscope, et l’évolution du nombre de cellules (vivantes) mesuré avec le test CellTiter Glo (Promega). CellTiter Glo lyse les cellules et donne un signal lumineux proportionnel à la quantité d’ATP (adénosine triphosphate) présente dans les cellules vivantes. Ce test dissocie donc entièrement les sphéroïdes, ce qui permet de s’affranchir des contraintes de diffusion dans des sphéroïdes de marqueurs de viabilité non lytiques.

A.3.1 Protocole

Les cellules sontensemencées à partir des mêmes solutions stock de cellules en suspension afin de limiter l’erreur sur le nombre de cellulesensemencées. Le nombre de cellules dans la solution stock est compté avec un compteur de cellules. Les sphéroïdes ne sont pas assez compacts pour être transférés sans risquer de les briser avant 4 jours aprèsensemencement, ils doivent donc être cultivés dans les plaques utilisées pour mesurer le signal de luminescence émis par CellTiter Glo. Afin de comparer les signaux mesurés en mono-couches et sphéroïdes, les mono-couches doivent également être cultivés dans ces mêmes plaques.

Les plaques 384 puits à fond non-adhérent ne permettent pas la culture de mono-couches. Des plaques 96 puits a fond adhérent plat sont donc utilisées. Les puits sont revêtis de 50 μL d’agar agar 1.5% adapté à la culture cellulaire (Sigma), afin de créer une surface non-adhérente propice à la formation de sphéroïdes. Les puits dans lesquels les cellules se sont agrégés en un sphéroïde unique (environ 70% contre >95% dans une plaque 384 puits à fond non adhérent) sont retenus pour mesurer la viabilité cellulaire. L’agar agar a la même densité que l’eau et ne perturbe pas les mesures de luminescence (vérifié en expérience contrôle).

Remarque : un puits sur deux estensemencé avec des cellules, c'est-à-dire que chaque puits contenant des cellules est entouré de puits vides. Ceci est nécessaire pour éviter une contamination de l'intensité de luminescence dans un puits par celle de puits adjacents. Les plaques utilisées sont de couleur noire pour les mêmes raisons.

Les sphéroïdes sont trop petits pour présenter un cœur nécrotique. L'absence de cœur nécrotique est vérifiée avec le fluorophore CellTox Green (marqueur de mort) : absence de marquage de cellules mortes au centre du sphéroïde pour des sphéroïdes de diamètre $D < 450 \mu\text{m}$, présence de marquage pour sphéroïdes de $600 \mu\text{m}$ de diamètre).

A.3.2 ATP en mono-couches et sphéroïdes

L'adénosine triphosphate (ATP) est la principale source d'énergie des cellules. En mono-couches, chaque cellule vivante a a priori une concentration d'ATP similaire. Au vu des gradients spatiaux en dioxygène et de nutriments dans le sphéroïde, il se peut que les cellules au cœur des sphéroïdes aient une concentration d'ATP plus faible que les cellules en surface. Afin de comparer l'intensité de signal (et donc la concentration d'ATP moyenne) dans un sphéroïde et des mono-couches constituées du même nombre de cellules, les sphéroïdes sontensemencés la veille, et les mono-couches 7h avant la mesure. Ainsi, les mono-couches n'ont pas vécu un cycle de division et les sphéroïdes ont acquis un minimum de compacité.

La [figure A.2a](#) montre que l'intensité de luminescence du signal émis par CellTiter Glo est bien proportionnelle au nombre de cellulesensemencées (l'intensité double lorsque le nombre de cellules double), en mono-couches et en sphéroïdes. L'intensité émise par les sphéroïdes est deux fois plus faible qu'en mono-couches. Ce résultat va dans le sens d'un gradient d'ATP dans les sphéroïdes.

A.3.3 Diamètre et nombre de cellules

Le diamètre des sphéroïdes devrait doubler lorsque le nombre de cellules est multiplié par 8. Nous obtenons aprèsensemencement ([figure A.2a](#)) un diamètre d'environ $150 \mu\text{m}$ pour les sphéroïdesensemencés avec 500 cellules, et $350 \mu\text{m}$ pour des sphéroïdesensemencés avec 4000, comparé au facteur 2 attendu. Il se peut donc que la densité des sphéroïdes 30h après irradiation dépende du nombre de cellules. La [figure A.2b](#) illustre l'évolution du diamètre des sphéroïdes dans le temps. Le facteur 2 attendu est retrouvé dans des sphéroïdes à partir de 3 jours après l'irradiation, ce qui est cohérent avec l'hypothèse d'une densité différente pendant la phase d'agrégation.

A.3.4 Étapes de croissance des sphéroïdes.

Les agrégats de cellules acquièrent une forme de sphéroïde dès 7h aprèsensemencement, le diamètre de ces jeunes sphéroïdes diminue pendant la période d'agrégation (environ 72h) ([figure A.2a](#)). La diamètre des sphéroïdes augmente ensuite lentement : seules les cellules en surface se divisent ([figure A.2b](#)). Des sphéroïdes de 6 à 13 jours d'âge sont utilisés pour les expériences.

Nous avons suivi sur 7 jours l'évolution du nombre de cellules en mono-couches et dans un sphéroïde, enensemencant 250 cellules au jour 0 (résultats [figure A.2c](#)). Les cellules cultivées en mono-couches forment un tapis confluent dans les plaques 96 puits au bout de 5 jours (la mesure prise 7 jours aprèsensemencement reflète donc une confluence excessive des cellules), nous n'avons donc pas comparé l'évolution en mono-couches et sphéroïdes pour un nombre plus grand de cellules. Pendant les 4 premiers jours aprèsensemencement, le nombre de cellules en mono-couches double à la vitesse attendue ($\sim 35\text{h}$). En sphéroïdes, l'évolution du signal est

beaucoup plus lente. Le signal double entre 7h et 4 jour après ensemencement et n'augmente plus de manière significative entre le 4e et le 7e jours.

L'évolution du nombre de cellules d'un sphéroïde dépend du nombre de cellules ensemencées. Plus le diamètre des sphéroïdes est important, plus la fraction de cellules en surface des sphéroïdes, seules à se diviser, est faible. La [figure A.2d](#) montre que, proportionnellement, le nombre de cellules vivantes des sphéroïdes plus grands (2000 cellules \sim 250 μm) évolue peu dans les 72h après irradiation par rapport aux sphéroïdes plus petits. On peut donc considérer, pour les sphéroïdes ensemencées avec 2000 cellules et plus, que le nombre de cellules n'évolue pas ($<10\%$) en 72h. Les expériences d'irradiation à 1270nm sont effectuées sur des sphéroïdes d'au moins 500 cellules lors de l'ensemencement.

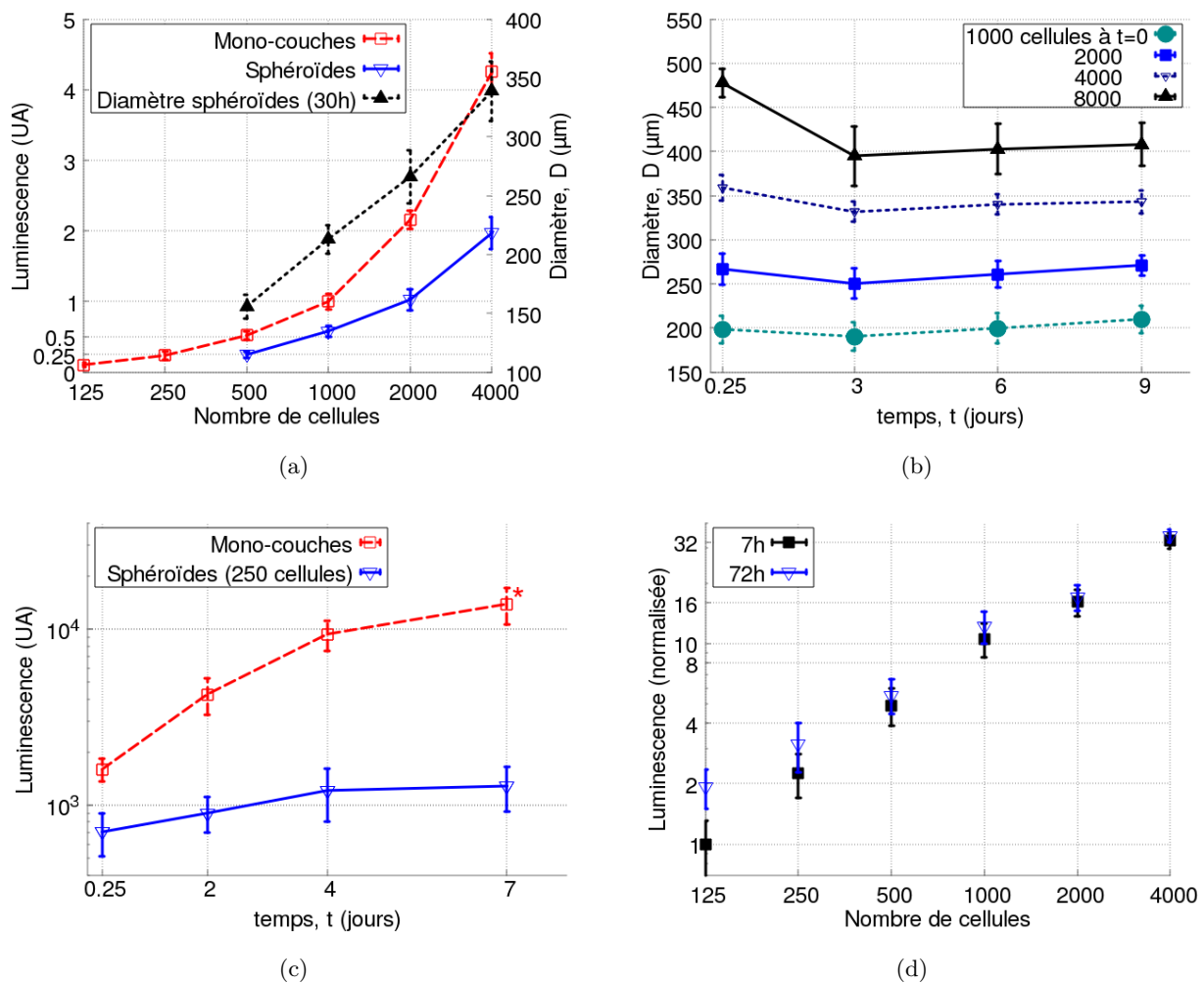


FIGURE A.2 – **Calibration de la croissance des sphéroïdes.** **Figure (a)** Comparaison du signal CellTiter Glo (viabilité) sur des cellules cultivées en mono-couches (7h après ensemencement) et des sphéroïdes (30h après ensemencement). Le signal est proportionnel au nombre de cellules mais moitié moins intense pour des sphéroïdes. **Figure (b)** Évolution sur 9 jours du diamètre D de sphéroïdes en fonction du nombre de cellules ensemencées par sphéroïde ($n=30$ sphéroïdes pour chaque condition d'ensemencement). Après une première période d'agrégation (J0-J3), le diamètre des sphéroïdes augmente légèrement avec le temps. **Figure (c)** Intensité du signal luminescent (CellTiter Glo) sur 7 jours de mono-couches et sphéroïdes mesurés 7h, 2j, 4j et 7j après ensemencement de 250 cellules ($n=14$ mono-couches/sphéroïdes par point de mesure). * : au jour 7, les cellules en mono-couches forment un tapis confluent. Le nombre de cellules évolue beaucoup plus lentement en sphéroïdes qu'en mono-couches. **Figure (d)** Intensité du signal luminescent (CellTiter Glo) 7h et 72h après ensemencement de sphéroïdes ($n=14$ par point de mesure) : plus le nombre de cellules est élevé, moins la proportion de cellules se divisant sur 72h est importante. Barres d'erreur (toutes figures) : écarts types à la moyenne. L'erreur est due au nombre de cellules ensemencées réellement par rapport au nombre théorique, et décroît proportionnellement plus le nombre de cellules ensemencées est élevé.

A.3.5 CellTiter Glo et viabilité des sphéroïdes après irradiation laser

Afin de mesurer l'impact de la génération de $^1\text{O}_2$ sur la viabilité des sphéroïdes, l'intensité Glo est comparée au signal moyen mesuré pour une population contrôle de sphéroïdes de même diamètre, ensemencés le même jour que le sphéroïde irradié, afin d'obtenir une fraction de cellules vivantes. Cette population contrôle a subi les mêmes transferts (de la plaque 384 puits de culture, à la boîte de culture dans laquelle les sphéroïdes sont irradiés, à la plaque 96 puits dans laquelle CellTiter Glo est ajouté au sphéroïde pour mesurer l'intensité dans un lecteur de plaque), et les mêmes conditions atmosphériques/de température que les sphéroïdes irradiés.

Afin d'évaluer la mort dite "basale" liée aux conditions expérimentales, nous comparons le ratio de signal CellTiter Glo entre des sphéroïdes conservés dans l'incubateur et jamais transférés (conditions optimales), et des sphéroïdes qui serviront de contrôles par comparaison aux sphéroïdes irradiés. La fraction de cellules vivantes mesurée est $93 \pm 7\%$ par rapport aux cellules vivantes dans les sphéroïdes jamais sortis de l'incubateur. Sachant que la variabilité du nombre de cellules lors de l'ensemencement est de 10% (pour 2000-8000 cellules ensemencées), on peut considérer que le protocole expérimental (hors irradiation 1270nm) n'endommage pas les sphéroïdes.

A.3.6 Géométrie des sphéroïdes

Nous souhaitons évaluer s'il est pertinent d'assimiler les sphéroïdes à des agrégats sphériques, notamment pour simuler la propagation de la lumière et la diffusion d'espèces dans les sphéroïdes. Les sphéroïdes seront finalement considérés des ellipsoïde symétriques, de diamètre D et d'épaisseur $z=0.6 \times D$. Nous souhaitons également estimer le volume occupé dans les cellules dans des sphéroïdes.

A.3.6.1 Modèle géométrique des sphéroïdes

Les images des sphéroïdes en vue de dessus et en vue latérale, comme illustré [figure A.3](#), nous donnent les dimensions de largeur L , longueur l , diamètre D et épaisseur z des sphéroïdes. Il s'agit premièrement de confirmer qu'il est raisonnable de parler de diamètre $D=\sqrt{L \times l}$ des sphéroïdes, c'est-à-dire que les sphéroïdes, en vue de dessus, présentent un bon indice de circularité. Nous avons utilisé le plugin ImageJ développé par Ivanov *et al.*^[321] pour calculer l'aire et la circularité C d'une population de $n=120$ sphéroïdes (7 jours après ensemencement) à partir de leur images en contraste de phase (500, 1000, 4000 & 8000 cellules ensemencées ; diamètre $D=150-400 \mu\text{m}$). L'indice de circularité C obtenu est $C = 0.75 \pm 0.06$. Les sphéroïdes utilisés pour les expériences d'irradiation, sélectionnés pour leur aspect, ont une circularité $C=0.81 \pm 0.02$. Cette valeur est suffisamment élevée pour parler de diamètre D .

Il n'est pas évident de faire pivoter les sphéroïdes afin d'obtenir une vue latérale. Nous ne pouvons donc pas mesurer z directement pour tous les sphéroïdes. Nous souhaitons donc obtenir un ratio moyen D/z afin de déduire à partir de D une valeur approchée de z . La distribution de l'épaisseur des sphéroïdes en fonction de leur diamètre est présentée [figure A.3c](#). Nous pouvons assimiler les sphéroïdes à des ellipsoïdes symétriques ([équation \(A.1\)](#)) de diamètre D avec une épaisseur $z=0.6 D$.

$$\frac{x^2 + y^2}{R^2} + \frac{z^2}{z_s^2} = 1 \quad (\text{A.1})$$

Contrairement au diamètre et à la circularité des sphéroïdes, leur ratio d'aspect D/z ne fait pas partie des mesures effectuées de manière standard dans la littérature. Il est donc difficile de dire si le facteur 0.6 trouvé est lié à notre méthode de culture des sphéroïdes, aux cellules

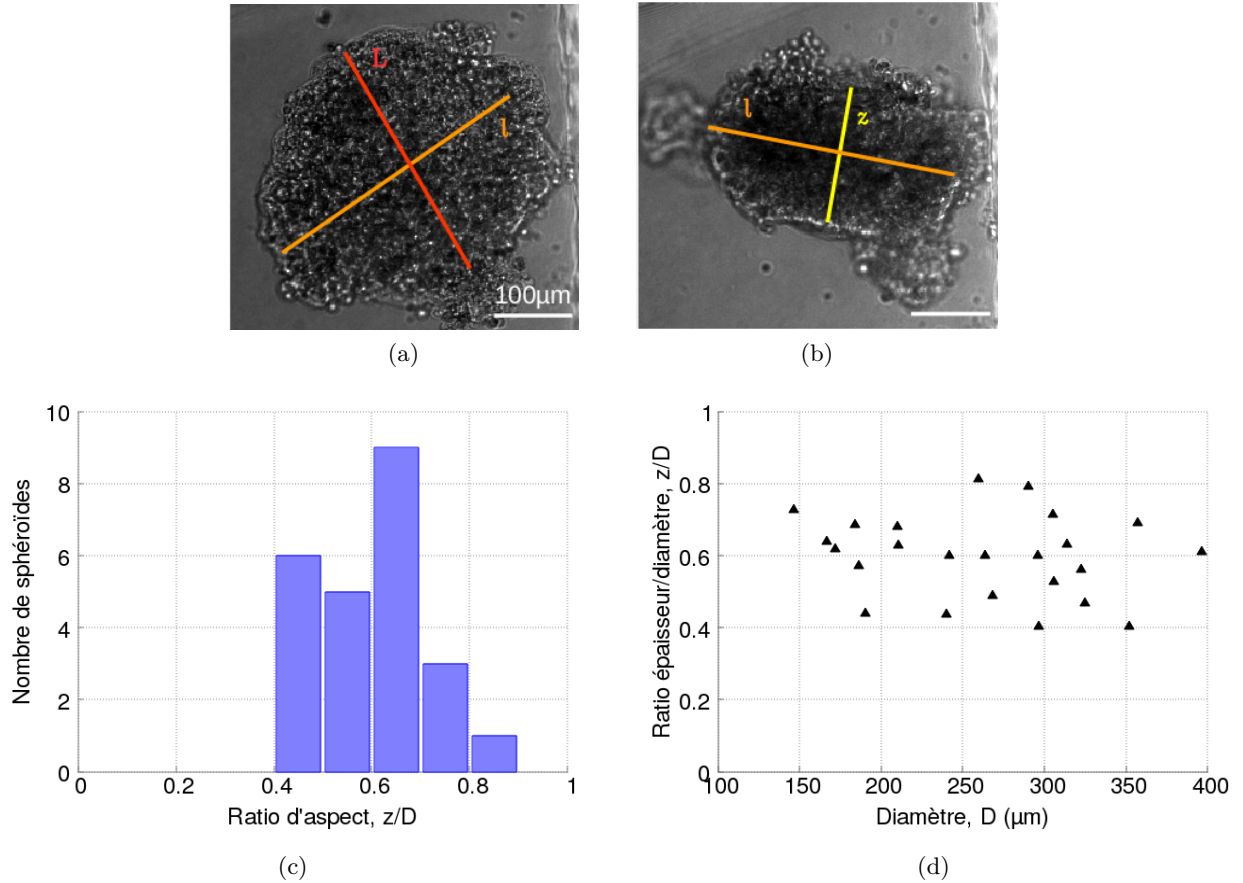


FIGURE A.3 – **Géométrie des sphéroïdes.** **Figures (a,b)** Longueur L , largeur l , et épaisseur z d'un sphéroïde vu **(a)** de face et **(b)** de côté. Diamètre $D = \sqrt{L \times l}$. **Figure (c)** Histogramme des ratios entre l'épaisseur z et le diamètre D des sphéroïdes, $z/D = 0.60 \pm 0.12$ pour $n=24$. Nous pouvons ainsi assimiler les sphéroïdes à des ellipsoïdes symétriques de diamètre D avec une épaisseur $z=0.6 \times D$. **Figure (d)** Dépendance du ratio z/D en fonction de D : aucune corrélation observée.

MCF-7 en particulier, ou si, biologiquement, il est naturel de trouver une telle asymétrie. Doglega *et al.* [322] ont étudié l'effet de forces de pression sur les sphéroïdes et ont identifié un stress mécanique accru au cœur du sphéroïde. Il se peut donc que le sphéroïde s'organise préférentiellement de manière allongée (plutôt que de former une sphère) à cause de contraintes mécaniques. L'élongation permet également de limiter la fraction de cellules à plus de $>250 \mu\text{m}$ de la surface, c'est-à-dire les cellules qui constituent le cœur nécrotique du sphéroïde.

A.3.6.2 Densité cellulaire des sphéroïdes

La mesure de la luminescence CellTiter Glo permet de suivre l'évolution du nombre de cellules dans un sphéroïde. Nous avons précédemment mesuré le volume d'une cellule MCF-7 ($V_{cell}=1500 \mu\text{m}^3$) et estimé la géométrie des sphéroïdes. A partir de ces mesures, nous pouvons comparer le volume occupé par les n cellules constituant un sphéroïde donné ($V_n=nV_{cell}$), et le volume du sphéroïde : $V = \frac{4\pi}{3}r^2 \times a$, avec r le rayon et a la demi-épaisseur du sphéroïde assimilé à un ellipsoïde symétrique. V_n/V donne la densité cellulaire du sphéroïde.

Les sphéroïdes ensemencés avec 2000 cellules ont un diamètre d'environ $D=250 \mu\text{m}$ après 72h (fin de la phase d'agrégation du sphéroïde). Le nombre de cellules n'a pas évolué de ma-

nière significative sur les 3 jours (voir précédemment, [figure A.2d](#)). La densité est de 0.6. Par conséquent, l'espace inter-cellules représente près de 40% du volume total des sphéroïde.

La densité des sphéroïdes sert à estimer la consommation en dioxygène des cellules : 60 amol/cellule/s (2 fois plus que des cellules en mono-couches), soit 40 $\mu\text{M/s}$ pour un sphéroïde de densité 1. Les simulations de consommation de dioxygène seront donc faites pour une consommation de 25 $\mu\text{M/s}$.

La densité des sphéroïdes est également un argument pour l'estimation du coefficient de diffusion de O_2 (et les autres ERO) dans les sphéroïdes : le coefficient de diffusion de O_2 dans de l'eau pure est de $D_{\text{O}_2}=2\times 10^{-5}\text{cm}^2\text{s}^{-1}$, et dans les cellules de $D_{\text{O}_2}=2-4 \cdot 10^{-6}\text{cm}^2\text{s}^{-1}$. Le coefficient moyen de diffusion du dioxygène dans un sphéroïde est donc probablement une valeur intermédiaire.

Annexe B

Laser : caractérisation du faisceau

Cette annexe présente les mesures du waist du faisceau laser pour différentes largeurs de faisceau. La source laser 1270nm utilisée pour la génération d'oxygène singulet est un laser Raman à fibre^[5] avec une pompe accordable achetée chez Lea Photonics (ML10-CW-R-OEM-TUNE-180). Le faisceau produit est à profil gaussien.

Le profil d'intensité d'un faisceau gaussien est défini en coordonnées cylindriques (r,z), centré sur l'axe du laser (r=0), par les équations suivantes :

$$I(r, z) = 2 \frac{P}{\pi \omega(z)^2} \exp -2 \frac{r^2}{\omega(z)^2}$$
$$\omega(z) = \omega_0 \sqrt{1 + (z/z_R)^2}$$
$$z_R = \pi \frac{\omega_0^2}{\lambda}$$

Avec I (W/cm²) l'intensité laser, P (W) la puissance, et ω (μm) le rayon du faisceau à $1/e^2$ (waist). ω_0 est le rayon du faisceau à $z=0$. La longueur de Rayleigh, z_R (m) détermine l'écartement du faisceau en fonction de la longueur d'onde $\lambda=1270\text{nm}$.

Les propriétés du faisceau laser sont caractérisées par le choix de la puissance laser, et du rayon ω_0 (déterminé par le montage optique et l'objectif de microscope utilisé). La puissance laser est mesurée à l'aide d'une tête de puissance IR (Newport). La mesure de la position et du rayon du faisceau, nécessaire pour évaluer l'intensité laser et donc le taux de production d'oxygène singulet, peut être effectuée de plusieurs façons.

B.1 Mesure expérimentale du rayon du faisceau laser

B.1.1 Méthode

Le rayon des faisceaux dépend du choix de l'objectif du microscope : **Liste des objectifs utilisés.**

- Nikon 20X, S Plan Fluor ELWD 20X/0.45 WD 8.2-6.9. Irradiation de mono-couches et sphéroïdes.
- Nikon 60X, Plan APO 60X/1.40 OFN25 (immersion à huile). Irradiation focalisée hors des cellules.

B.1.1.1 Position du faisceau

Avant de mesurer le rayon du faisceau laser, il s'agit de le positionner l'axe du faisceau, et de localiser le plan de focalisation du faisceau par rapport au plan imagé par la caméra. Cette

dernière étape est critique lors de la génération extra-cellulaire de $^1\text{O}_2$, où l'on souhaite placer le laser précisément $10\mu\text{m}$ au dessus de l'interface verre/liquide de la boîte de culture.

L'axe du faisceau peut être localisé en utilisant le signal réfléchi du laser à l'interface verre/liquide ou plastique/liquide d'une boîte de culture (méthode la plus simple). La réflexion permet de déterminer également si le laser est bien aligné (perpendiculaire avec l'interface). Une seconde méthode consiste à utiliser des billes en polystyrène fluorescentes de 1 à $10\mu\text{m}$ de diamètre (des billes plus grandes sont adaptés aux faisceaux laser plus larges). Le faisceau à 1270nm génère de la chaleur, et donc un phénomène de convection localisé. Un laser fortement focalisé (de diamètre de l'ordre du micron) a des propriétés de pince optique. Le signal de fluorescence d'une bille 'capturée' par le laser focalisé est maximal si le plan de focalisation du laser et le plan caméra coïncident.

B.1.1.2 Mesure du rayon et de la divergence du faisceau

Pour les faisceaux laser de rayon $>15\mu\text{m}$, le rayon est mesuré en plaçant une caméra face au faisceau laser. La précision de mesure est limitée par la taille d'un pixel de la caméra (Pixelink, 1 pixel = $3\mu\text{m}$). Des images sont prises à intervalles réguliers en déplaçant verticalement l'objectif du microscope avec un pas $z < 10 \times z_R$. Elles permettent d'évaluer la divergence du faisceau en désalignant l'objectif par rapport au reste du montage optique. Une seconde série d'images est prise avec l'objectif du microscope dans une position fixe en déplaçant verticalement la caméra. Il permet d'imager la divergence du faisceau dans les conditions d'irradiation. La précision de déplacement de la caméra, fixée sur une plate-forme, est moins élevée que la précision de déplacement d'un objectif de microscope et justifie l'intérêt de la première série d'images.

Pour des faisceaux laser focalisés à la limite de la diffraction de la lumière, le rayon est plus petit que les pixels des capteurs des caméras disponibles. Le signal réfléchi à l'interface verre/milieu sert à mesurer le rayon du faisceau. Le signal réfléchi traverse l'objectif du microscope avant d'atteindre le capteur de la caméra. La taille des pixels de la caméra est définie par le grossissement de l'objectif : 1 pixel = $0.11\mu\text{m}$ avec l'objectif 60X ON=1.4 et la caméra Hamamatsu C11440-22CU associée (1 pixel = $6.5\mu\text{m}$ sans grossissement). Pour des faisceaux plus larges, le signal réfléchi est déformé^[325] de manière importante, et la mesure de son rayon n'est pas précise.

La valeur du rayon ω est obtenue en traçant le profil d'intensité du laser sur chaque image (plusieurs profils mesurés pour évaluer la symétrie du faisceau, puis moyennés). La meilleure courbe d'ajustement est tracée avec un logiciel mathématique (MATLAB).

B.1.2 Résultats

Le profil du faisceau et sa divergence est mesuré pour des faisceaux focalisés collimatés avec l'objectif 20X (utilisé pour générer de l'oxygène singulet dans des sphéroïdes ou des populations de mono-couches), et l'objectif 60X (utilisé pour générer de l'oxygène singulet à l'extérieur des cellules et mettre en évidence l'existence de dommages indirects).

Il résulte des mesures présentées [figure B.1](#) que les sphéroïdes sont irradiés avec un laser à profil gaussien de rayon $\omega_0 = 39.5\mu\text{m}$, dont la divergence est suffisamment faible pour considérer ω constant sur l'épaisseur du sphéroïde ($< 0.5\text{mm}$). Les mono-couches de cellules irradiées avec le même objectif sont irradiées dans un incubateur et donc ne sont pas irradiées dans le même plan. Le rayon du laser mesuré est $\omega_0 = 43\mu\text{m}$. L'intensité maximale est donc 80% de l'intensité d'irradiation des sphéroïdes. Dans le texte des chapitres 1-4, nous écrivons que le rayon vaut $\omega = 40\mu\text{m}$, mais les valeurs exactes des rayons sont utilisés pour estimer l'intensité laser I et les taux de production d'oxygène singulet.

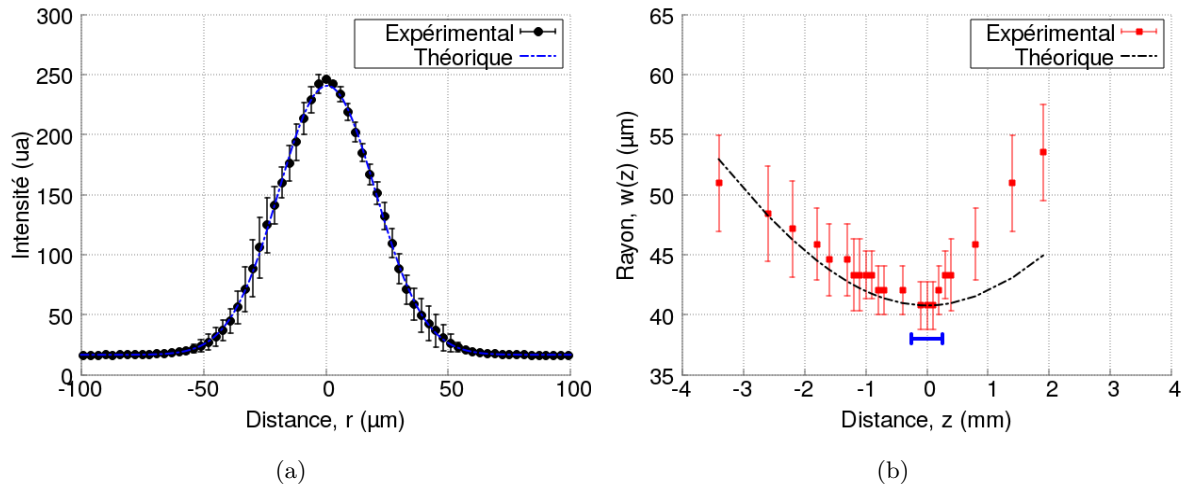


FIGURE B.1 – **Caractérisation du faisceau laser.** **Figure (a)** Profil d'intensité du faisceau laser en fonction de la distance r à l'axe du laser. Profil expérimental associée à un objectif de microscope 20X, dans la position associée à l'irradiation des sphéroïdes. Extrapolation du profil expérimental par un profil gaussien de rayon à $1/e^2$ $\omega_0=39.5\mu\text{m} \pm 1.5 \mu\text{m}$. **Figure (b)** Profil de divergence du faisceau $w(z)$ expérimental et théorique. Objectif 20X dans la position associée à l'irradiation de mono-couches. $\omega_0 = 43\mu\text{m} \pm 1.5 \mu\text{m}$. Les profils expérimentaux et théoriques coïncident sur une épaisseur de $500 \mu\text{m}$ (barre bleue), soit l'épaisseur maximale des sphéroïdes irradiés.

Les images du faisceau réfléchi à l'interface verre/liquide (liquide = tampon phosphate salin) donnent le rayon du laser avec un objectif 60X a immersion ([figure B.2a](#)). Le profil du faisceau correspond à un profil gaussien de rayon $\omega_0=0.64 \pm 0.15 \mu\text{m}$.

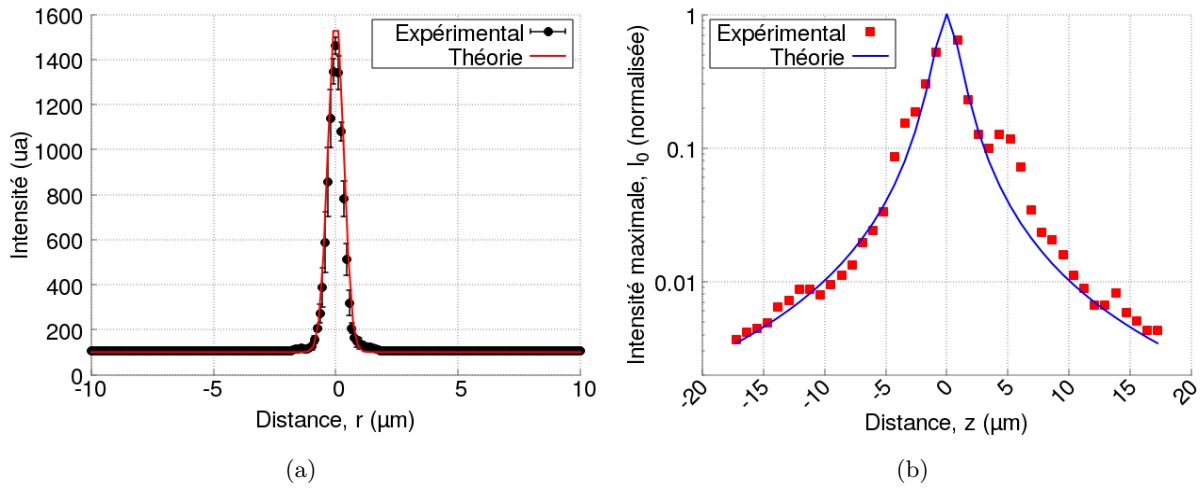


FIGURE B.2 – **Caractérisation du faisceau laser focalisé avec un objectif de microscope 60X à immersion.** **Figure (a)** Profil expérimental du faisceau laser au point de focalisation ($z=z_0$), comparé à un profil de faisceau gaussien de rayon $\omega=0.64\ \mu\text{m}$. **Figure (b)** Profils expérimentaux et théoriques de l'intensité I_0 maximale (normalisée) en fonction de z pour un faisceau de rayon $\omega_0=0.64\ \mu\text{m}$. On constate une bonne adéquation des deux courbes.

Annexe C

Simulations numériques de concentration d'espèces : dioxygène, ERO et ERO en présence de désactivateurs.

Cet annexe présente les équations associées à la réaction, production et diffusion des espèces chimiques et courbes de concentration spatiales obtenues par simulation avec le logiciel Comsol Multiphysics v5.3^[323]. Les équations associées à la diffusion d'espèces et aux réactions chimiques sont intégrés à la physique "transport d'espèces diluées" du logiciel.

C.1 Vérification de l'outil de simulation

Deux simulations numériques avec des solutions analytiques connues ont été effectuées pour vérifier les résultats des simulations et valider l'utilisation de l'outil de simulation.

C.1.1 Vérification 1 : simulation sans diffusion des espèces

Une vérification de l'outil de modélisation a été faite en simulant sans terme de diffusion ($D=0$), et sans terme de réaction dans le PBS ($K_{ox}=0$) la concentration de 1O_2 pendant une irradiation avec un laser focalisé (équation (C.1)).

$$\frac{d[^1O_2]}{dt} = D_{O_2}\nabla^2[^1O_2] - K[^1O_2] - K_{ox}[^1O_2] + \gamma[^3O_2] \quad (C.1)$$

La concentration en dioxygène [3O_2] est considérée constante à 0.25mM. Ainsi la production d'oxygène singulet par le laser $\gamma[^3O_2]=\Gamma$. Les équations associées à Γ sont rappelées annexe C.2. $K=\frac{\ln(2)}{\tau_{1/2}}$ avec $\tau_{1/2}$ la demi-vie de 1O_2 dans de l'eau pure.

A l'état stationnaire (atteint en moins de 10ms), $[^1O_2]=\frac{\Gamma\tau_{1/2}}{\ln(2)}$, avec un taux de production Γ défini par l'équation (C.3). Nous voyons figure C.1 que la simulation donne un résultat très proche du calcul analytique. L'écart entre la simulation et la valeur analytique dépasse les 2% lorsque la concentration en dioxygène $[^1O_2]<10^{-15}$ M (les concentrations sont toxiques pour $[^1O_2]>10^{-9}$ M). Pour les valeurs de concentration très faibles des erreurs d'arrondi sont à l'origine de la différence entre les valeurs obtenues par simulation et le calcul analytique.

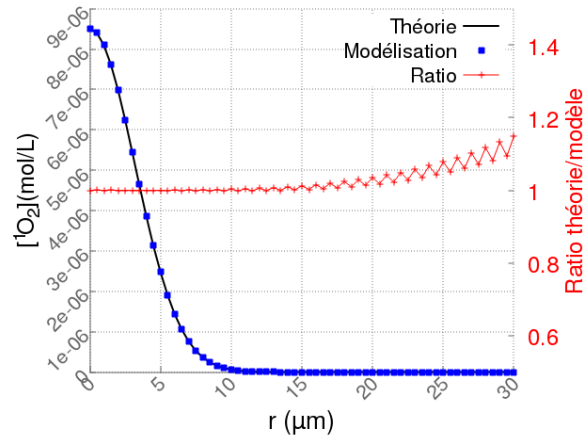


FIGURE C.1 – Comparaison de la valeur de concentration d’oxygène singlet, $[^1\text{O}_2]$, à l’état stationnaire, en fonction de la distance r au laser, obtenue par calcul analytique et par simulation numérique, en absence de diffusion de $^1\text{O}_2$. Valeur dans le plan $z=0$ (laser focalisé dans le plan $z=10\ \mu\text{m}$). Les courbes analytiques et de simulation sont confondues pour $[^1\text{O}_2] > 10^{-15}\ \text{M}$. Pour des concentrations inférieures, une erreur apparaît dans les simulations.

C.1.2 Vérification 2 : diffusion à partir d’une source ponctuelle

Modélisation d’un problème de diffusion soluble analytiquement : une quantité M de moles contenue dans un point est déposée à $t=0$ dans un volume et commence à diffuser en 3D avec un coefficient de diffusion D .

Solution analytique (en coordonnées cylindriques)^[324] équation (C.2).

$$C(r, z, t) = \frac{M}{(4\pi t D)^{3/2}} \exp\left(-\frac{r^2 + z^2}{4Dt}\right) \quad (\text{C.2})$$

Modélisation du "point" : cylindre $R=2.5\text{nm}$ et $h=5\text{nm}$ contenant une concentration initiale c à $t=0$. $M=cV$ avec $V=5\pi \times 2.5^2\ \text{nm}^3$.

La simulation (figure C.2) donne les mêmes valeurs de concentration que le calcul analytique.

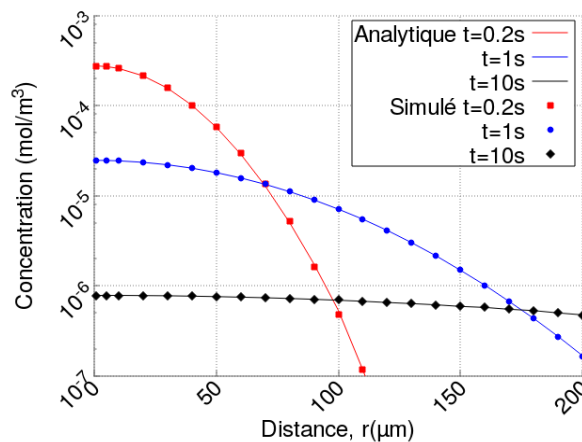


FIGURE C.2 – Comparaison de la concentration d’espèces obtenues par calcul analytique (courbes 'A') et simulation Comsol (courbes 'C') dans le cas d’une source ponctuelle.

C.2 Déplétion en dioxygène lors de photo-production par excitation optique directe de $^1\text{O}_2$

Cette section détaille l'estimation par simulation numérique du profil de concentration en dioxygène dans des sphéroïdes et des mono-couches pendant l'irradiation laser (Chapitre 2). Nous estimons dans un second temps la déplétion en dioxygène pour des irradiations extracellulaires (Chapitre 3).

Rappelons la production Γ de $^1\text{O}_2$ par photo-excitation directe du dioxygène à 1270nm en fonction des paramètres laser (équation (C.3)), dans un repère de coordonnées cylindriques centré sur l'axe du faisceau laser ($r=0$).

$$\Gamma(\text{mol/L/s}) = \frac{\sigma}{h\nu} [^3\text{O}_2] I \quad (\text{C.3})$$

$$I(r, z)(\text{W/cm}^2) = \frac{2P}{\pi\omega^2} \left(\frac{\omega_0}{\omega(z)}\right)^2 \exp\left(\frac{-2r^2}{\omega(z)^2}\right) \quad (\text{C.4})$$

$$\omega(z) = \omega_0 \sqrt{1 + \left(\frac{z - z_{\text{laser}}}{z_R}\right)^2} \quad (\text{C.5})$$

$$z_R(\text{mm}) = \frac{\pi\omega^2}{\lambda} \quad (\text{C.6})$$

$$(\text{C.7})$$

Γ dépend de l'intensité I (équation (C.4)), de la concentration en dioxygène [$^3\text{O}_2$], et de la section efficace $\sigma = 10^{-23} \text{ cm}^2$ associées à la transition $^3\text{O}_2 \rightarrow ^1\text{O}_2$ à $\lambda=1270\text{nm}$. $h\nu = 10^{-19}\text{J}$ correspond à l'énergie d'un photon à 1270nm. Enfin, l'intensité $I(r,z)$ du laser dépend de la puissance laser P , et du rayon à $1/e^2$ ($\omega(z)$) du faisceau laser gaussien (équation (C.5)). Elle est également affectée par les propriétés d'absorption et de diffusion des sphéroïdes. L'impact des propriétés optiques des sphéroïdes sur la distribution d'intensité dans les sphéroïdes est simulé numériquement dans la section Protocoles et Méthodes du chapitre 2.

La photo-production d'oxygène singulet consomme également du dioxygène. L'évolution des concentrations de dioxygène $^3\text{O}_2$ et de l'oxygène singulet $^1\text{O}_2$ sont décrite par les équations (C.8) et (C.9).

$$\frac{d[^3\text{O}_2]}{dt} = D_{\text{O}_2} \nabla^2 [^3\text{O}_2] - q_c - \gamma [^3\text{O}_2] + K [^1\text{O}_2] \quad (\text{C.8})$$

$$\frac{d[^1\text{O}_2]}{dt} = D_{\text{O}_2} \nabla^2 [^1\text{O}_2] - K [^1\text{O}_2] - K_{\text{ox}} [^1\text{O}_2] + \gamma [^3\text{O}_2] \quad (\text{C.9})$$

Les concentrations en dioxygène et oxygène singulet sont des fonction du taux de production d'oxygène singulet par le laser, du coefficient de diffusion D_{O_2} du dioxygène, de la consommation de dioxygène des cellules q_c (en mol/L/s), du taux de production d'oxygène singulet par le laser, $\gamma [^3\text{O}_2]$ (en M/s $^{-1}$), avec $\gamma = \frac{\sigma}{h\nu} I(r, z)$, et enfin des coefficients de réaction K et K_{ox} . Le coefficient K (en s $^{-1}$) traduit la désexcitation spontanée de l'oxygène singulet et la réaction avec le solvant. $K = \ln(2)/\tau_{^1\text{O}_2}$ avec $\tau_{^1\text{O}_2} = 3.5 \mu\text{s}$. L'oxygène singulet retrouve suite à cette réaction son état fondamental $^3\text{O}_2$. Le coefficient K_{ox} caractérise les réactions de $^1\text{O}_2$ dans le milieu extracellulaire ou dans la cellule qui ne sont pas source de $^3\text{O}_2$. Lorsque $K_{\text{ox}} = 0$, tout l'oxygène singulet généré se désexcite et on retrouve le gradient en dioxygène d'un sphéroïde non irradié.

En l'absence de cellules, la concentration en dioxygène à l'équilibre vaut [$^3\text{O}_2$]=0.25mM dans de l'eau à 25 °C pour une atmosphère constituée à 21% d'oxygène^[62]. Dans l'eau, le PBS, ou le milieu de culture, le coefficient de diffusion du dioxygène est $D_{\text{O}_2} = 2 \times 10^{-5} \text{ cm}^2/\text{s}$. Dans les cellules, il vaut entre 2 et $4 \times 10^{-6} \text{ cm}^2/\text{s}$ ^[24].

C.2.1 Déplétion en dioxygène dans des sphéroïdes

Les échanges de dioxygène entre la boîte de culture et l'air ambiant sont définis par un flux entrant d'oxygène à 0.25mM (concentration à saturation dans une atmosphère à 21% de O₂). Les parois de la boîte de culture par des frontières à flux nul. L'axe du laser est centré sur le sphéroïde.

D.R. Grimes *et al.* ont proposé un modèle analytique de gradient en dioxygène dans des sphéroïdes sphériques^[126], et estimé l'écart au modèle obtenu dans le cas de sphéroïdes ellipsoïdes^[127]. Cet écart est important lorsque le ratio d'aspect du sphéroïde s'éloigne de 1. Au vu de la géométrie de nos sphéroïdes, assimilés à des ellipsoïdes symétriques de diamètre D et d'épaisseur z, avec $z=0.6/D$ (résultats expérimentaux présentés [annexe A.3.6](#)), le modèle analytique adapté aux sphéroïdes sphériques n'est pas pertinent. Nous avons donc simulé numériquement la diffusion et la consommation du dioxygène.

Les cellules MCF-7 consomment $q_c=20\mu\text{M/s}$ de dioxygène en mono-couches^[63;64], et le double en sphéroïdes^[139]. Les sphéroïdes ont une densité cellulaire de 0.6 (calculée [annexe A.3.6](#)), nous estimons donc la consommation de dioxygène à q_c à $25\mu\text{M/s}$ ($40\mu\text{M}\times 0.6$). Les sphéroïdes sont irradiés à puissance $P=100\text{mW}$ avec un faisceau laser de waist $\omega=40\mu\text{m}$.

Nous allons simuler la déplétion en dioxygène en faisant varier deux paramètres : le coefficient K_{ox} et le coefficient de diffusion D_{O_2} dans les cellules. Ces simulations sont utilisées pour analyser la mort cellulaire dans les sphéroïdes dans le chapitre 2 ([section 2.3.2.2](#)).

C.2.1.1 Impact du coefficient de diffusion du dioxygène

Dans l'eau ou le PBS, le coefficient de diffusion du dioxygène est $D_{O_2}=2\times 10^{-5}\text{ cm}^2/\text{s}$, et dans les cellules $D_{O_2}=2$ à $4\times 10^{-6}\text{ cm}^2\text{s}^{-1}$ ^[24]. Les sphéroïdes ont une densité de 0.6. L'espace inter-cellules a a priori des propriétés de diffusion proches de celles du milieu de culture. Nous nous attendons donc à ce que le coefficient de O₂ moyen dans le sphéroïde ait une valeur intermédiaire entre sa valeur dans l'eau et sa valeur dans une cellule. La concentration en dioxygène est par conséquent simulée pour les valeurs $D_{O_2} = 2\times 10^{-5}\text{ cm}^2/\text{s}$ (diffusion dans l'eau : majorant), $10^{-5}\text{ cm}^2/\text{s}$, $5\times 10^{-6}\text{ cm}^2/\text{s}$ et $2\times 10^{-6}\text{ cm}^2/\text{s}$ (valeur basse de la diffusion dans une cellule : minorant).

La [figure C.3a](#) montre l'impact du coefficient de diffusion D_{O_2} pour $K_{ox}=0$. Le profil de concentration obtenu est identique au profil en absence d'irradiation 1270nm. Plus le coefficient de diffusion est faible, plus le gradient est prononcé.

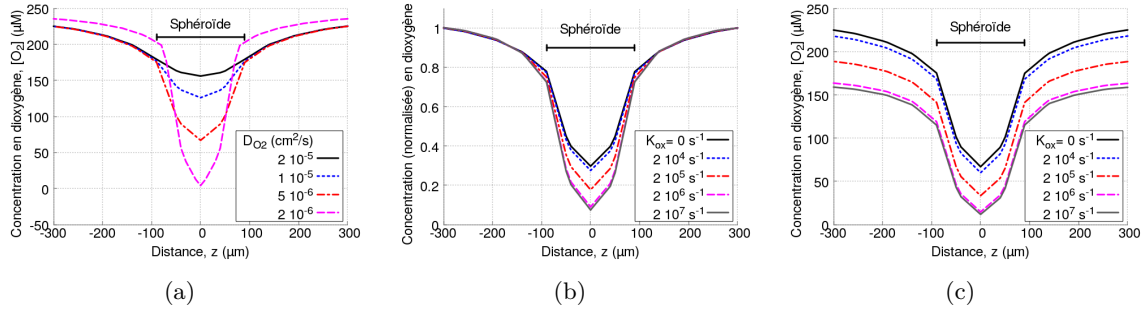


FIGURE C.3 – **Simulation numérique de la concentration en dioxygène dans des sphéroïdes** en fonction des paramètres D_{O_2} (coefficient de diffusion du dioxygène, en cm^2/s) et K_{ox} (coefficient de réaction de $^1\text{O}_2$, en s^{-1}). Les profils sont tracés dans un repère cylindrique (r,z) en fonction de l'épaisseur z du sphéroïde (centre du sphéroïde en $z=0$) pour $r=0$ (axe du laser). **Figure (a)** Impact de D_{O_2} pour un sphéroïde de diamètre $D=300\ \mu\text{m}$ et $K_{ox}=0$. **Figure (b)** Impact de K_{ox} pour un sphéroïde de diamètre $D=300\ \mu\text{m}$ et $D_{O_2}=5\times 10^{-6}\ \text{cm}^2\text{s}^{-1}$. K_{ox} est ici considéré nul à l'extérieur du sphéroïde. La concentration normalisée à 1 correspond à 0.25mM . **Figure (c)** Idem figure (b), K_{ox} a la même valeur à l'intérieur et à l'extérieur du sphéroïde. La concentration en surface du sphéroïde est réduite lorsque K_{ox} augmente.

C.2.1.2 Impact du coefficient de réaction K_{ox}

Le coefficient de réaction K_{ox} (en s^{-1}) traduit les réactions de $^1\text{O}_2$ avec les cellules ou le PBS qui ne donnent pas $^3\text{O}_2$ comme produit. K_{ox} n'a pas forcément la même valeur à l'extérieur des cellules et à l'intérieur. Le choix d'un K_{ox} non nul à l'extérieur du sphéroïde fait diminuer la concentration de dioxygène en surface du sphéroïde mais affecte peu ($<5\%$) le ratio entre la concentration en dioxygène en surface et la concentration au centre du sphéroïde.

P.R. Ogilby *et al.* [24] ont obtenu dans des cellules cultivées dans une solution aqueuse saline une durée de vie de $^1\text{O}_2$ de $3\text{-}3.2\ \mu\text{s}$, estimée à partir de la durée de vie de $^1\text{O}_2$ mesurée par détection de la phosphorescence à 1270nm dans du deutérium, soit $K_{ox} \sim 2 \cdot 10^4\ \text{s}^{-1}$. La concentration en dioxygène est simulée pour $K_{ox}=0$, $K_{ox}=2\times 10^4\ \text{s}^{-1}$, $K_{ox}=2\times 10^5\ \text{s}^{-1}$, $K_{ox}=2\times 10^6\ \text{s}^{-1}$ et $K_{ox}=2\times 10^7\ \text{s}^{-1}$. La concentration en dioxygène ne diminue plus ($<1\%$ de variation) au delà de $K_{ox}=2\times 10^7\ \text{s}^{-1}$. En deçà de $K_{ox}=2\times 10^4\ \text{s}^{-1}$, la concentration est très proche de la concentration obtenue pour $K_{ox}=0$.

Pour $K_{ox} \ll K=2\times 10^5\ \text{s}^{-1}$, l'effet de la génération d'oxygène singulet sur la concentration en dioxygène est négligeable : l'oxygène singulet se désactive suffisamment vite pour qu'il n'y ait pas de déplétion. Pour $K_{ox} \sim K$, environ la moitié de l'oxygène singulet réagit pour former des produits autre que $^3\text{O}_2$ (ERO, lipides peroxydés etc.). La déplétion est accrue lors de l'irradiation. Pour $K_{ox} \geq K$, tout l'oxygène singulet généré réagit pour former des produits autre que $^3\text{O}_2$: le terme $+K[^1\text{O}_2]$ de [équation \(C.8\)](#) est négligeable et la déplétion en dioxygène est importante lors de l'irradiation.

La [figure C.3b](#) montre l'impact du coefficient de réaction K_{ox} (défini à l'intérieur du sphéroïde), pour $D_{O_2}=5\times 10^{-6}\ \text{cm}^2\text{s}^{-1}$ et $K_{ox}=0$ à l'extérieur du sphéroïde. Plus K_{ox} est grand, plus le gradient est prononcé. La concentration en dioxygène à quelques centaines de micromètres du sphéroïde est stable à 0.25mM (normalisé à 1 dans la figure), quelque soit la valeur de K_{ox} . Lorsque K_{ox} a la même valeur à l'intérieur et à l'extérieur du sphéroïde ([figure C.3c](#)), la concentration en dioxygène à proximité du sphéroïde dépend également de K_{ox} . Ainsi, la concentration en dioxygène, et donc le taux de production de $^1\text{O}_2$, en surface d'un sphéroïde et de cultures cultivées en mono-couches est différente.

Les valeurs de concentration en dioxygène présentées sont obtenues en intégrant sur une durée d'irradiation de 30min. Plus K_{ox} est grand (et plus le coefficient de diffusion D_{O_2} est faible), plus l'état stationnaire est atteint tardivement (pour $D_{O_2}=5\times 10^{-6}\text{cm}^2\text{s}^{-1}$ et $K_{ox}=2\times 10^7\text{s}^{-1}$ l'état stationnaire n'est pas atteint dans les 30 minutes).

C.2.2 Déplétion en dioxygène dans des cellules cultivées mono-couches

C.2.2.1 Irradiation de populations de cellules

Dans les chapitres 2 et 4, des populations de cellules cultivées en mono-couches sont irradiées avec un faisceau laser de waist $\omega=40\mu\text{m}$. Les irradiations durent 5 à 60 minutes et, dans le chapitre 4, la puissance laser varie de 50 à 200mW ($P=100\text{mW}$ uniquement pour les résultats du chapitre 2). En mono-couches, le coefficient de diffusion du dioxygène et le coefficient de réaction K_{ox} dans les cellules ont un impact faible ($<5\%$) sur la concentration en dioxygène (mesurée à hauteur de cellules $z=5\mu\text{m}$). La déplétion est déterminée par K_{ox} dans le milieu extra-cellulaire.

Dans la [figure C.4](#) les concentrations sont mesurées 30min après le début de l'irradiation. Pour une puissance laser $P=100\text{mW}$, la concentration en dioxygène est réduite d'au plus 30% ([figure C.4a](#)) au niveau de l'axe du laser. Plus K_{ox} est élevé, plus l'effet d'une augmentation de puissance laser est limité par la déplétion en dioxygène ([figure C.4b](#)) : lorsque $P=200\text{mW}$, le taux de production en oxygène singulet au niveau de l'axe du laser est deux fois plus important qu'à $P=100\text{mW}$ pour $K_{ox}=0$ mais uniquement 1.6 fois plus important pour $K_{ox}=2\times 10^6\text{s}^{-1}$. La mort cellulaire concerne des cellules jusqu'à $100\mu\text{m}$ de l'axe du laser : une augmentation de la puissance n'a pas un effet homogène sur la quantité de $^1\text{O}_2$ reçue par toutes les cellules. Au vu des résultats chapitre 3, nous nous attendons à ce que $6\times 10^5\text{s}^{-1} < K_{ox} < 2\times 10^6\text{s}^{-1}$.

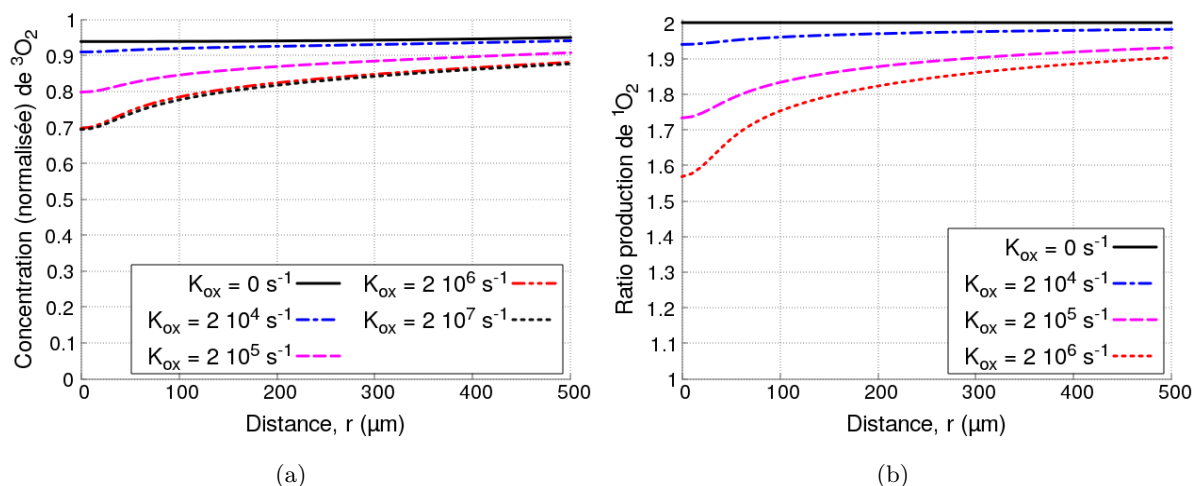


FIGURE C.4 – **Simulation de la déplétion de la concentration de dioxygène $^3\text{O}_2$ en mono-couches**, pour une irradiation de durée 30 minutes. La concentration est normalisée par rapport à la concentration en dioxygène avant irradiation laser. **Figure (a)** Concentration de $^3\text{O}_2$ pour différentes valeurs de K_{ox} . **Figure (b)** Ratio de concentration de $^3\text{O}_2$ entre une irradiation laser de puissance $P=200\text{mW}$ et $P=100\text{mW}$.

Enfin, la déplétion en dioxygène varie également avec la durée d'exposition des cellules ([figure C.5](#)) : au niveau de l'axe du laser, le taux de production d'oxygène singulet moyen dans des cellules irradiées 5 minutes est $\sim 15\%$ plus élevé que dans des cellules irradiées 60 minutes.

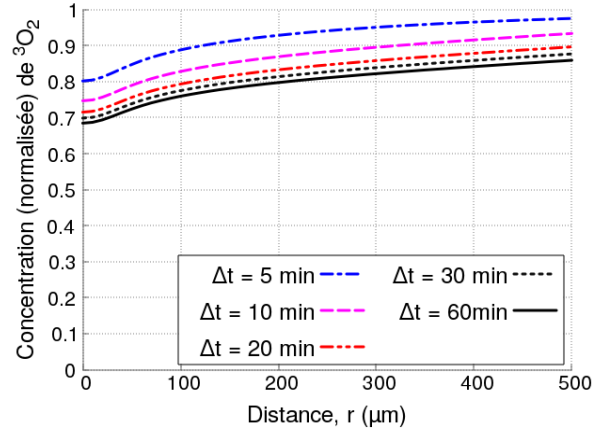


FIGURE C.5 – Simulation de la déplétion de la concentration de dioxygène $^3\text{O}_2$ en mono-couches en fonction de la durée d'exposition Δt , pour $K_{ox}=2 \times 10^6 \text{ s}^{-1}$. La concentration est normalisée par rapport à la concentration en dioxygène hors irradiation.

C.2.2.2 Irradiation extra-cellulaire

Dans le Chapitre 3, le faisceau laser est focalisé (waist $\omega=0.64 \mu\text{m}$) dans du PBS, et très petit comparé à une cellule (diamètre $\sim 30 \mu\text{m}$, hauteur $z=5 \mu\text{m}$). Le profil de concentration en dioxygène a une composante radiale et axiale. La majorité des expériences a été faite avec une puissance laser $P=50\text{mW}$. L'irradiation dure $\Delta t=10\text{min}$. L'évolution dans le temps de la concentration en dioxygène (simulée numériquement) au niveau du point de focalisation du faisceau laser ($r=0, z=10 \mu\text{m}$), pour une puissance laser $P=50\text{mW}$ est représentée [figure C.6a](#).

La concentration est normalisée par rapport à la concentration maximale ($[\text{O}_2]_0=0.25\text{mM}$) dans le PBS. La concentration en dioxygène diminue avec K_{ox} et atteint $0.75 \times [\text{O}_2]_0$ pour $K_{ox}=2 \times 10^7 \text{ s}^{-1}$. Au niveau de l'interface verre/PBS sur lequel adhèrent les cellules ($z=0$), la déplétion au niveau de l'axe du laser ($r=0$) atteint $0.8 \times [\text{O}_2]_0$ (marqué par une astérisque * sur le graphique) pour $K_{ox}=2 \times 10^7 \text{ s}^{-1}$. Spatialement, la différence de déplétion d'oxygène entre $z=10 \mu\text{m}$ et $z=0$ disparaît pour $r>3 \mu\text{m}$ ([figure C.6b](#)). Au delà de cette distance, la concentration en dioxygène est homogène en z pour les cellules.

La majorité de l'oxygène singulet est généré au niveau du point de focalisation du laser, où la déplétion est maximale. Ce phénomène a donc un impact important sur la concentration des ERO secondaires (produits potentiels de $^1\text{O}_2$ extra-cellulaire).

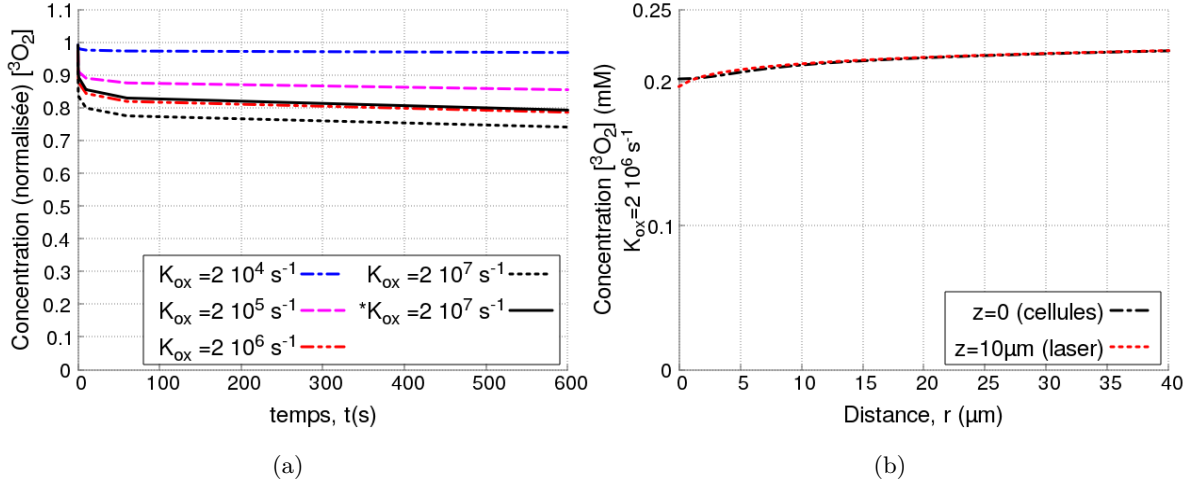


FIGURE C.6 – **Simulation numérique de la concentration de dioxygène $^3\text{O}_2$ lors d'une irradiation extra-cellulaire.** $[\text{O}_2]_0$: concentration de dioxygène initiale. **Figure (a)** Évolution temporelle de la concentration normalisée de dioxygène (suivi sur 600s = 10 min) pour $\omega=0.64\mu\text{m}$ ($P=50\text{mW}$, soit $I_{max}=8\text{kW}/\text{cm}^2$), au niveau du point de focalisation du faisceau ($r=0, z=10\mu\text{m}$). * : concentration en ($r=0, z=0$), soit au niveau de l'interface verre/PBS où adhèrent les cellules. **Figure (b)** Distribution spatiale de la concentration 10 min après le début de l'irradiation laser (waist $\omega=0.64\mu\text{m}$ et $P=100\text{mW}$.)

C.3 Profils de concentration de $^1\text{O}_2$ et des ERO secondaires

Considérons que $^1\text{O}_2$ réagisse dans le PBS pour produire des ERO dites "secondaires". Nous souhaitons estimer la concentration de ces ERO. Les simulations sont faites dans un milieu (PBS) sans cellules.

Dans l'hypothèse que la concentration en oxygène singulet [$^1\text{O}_2$] est limitante, la production d'ERO secondaires est caractérisée par un coefficient de réaction du premier ordre K_{ox} (en s^{-1}). Elle est également déterminée par le coefficient de désexcitation $K=\ln(2)/\tau_{1/2}$ ($\tau_{1/2}=3.5\mu\text{s}$, $K=2\times 10^5\text{s}^{-1}$) qui caractérise le retour de l'oxygène singulet à son état triplet dans de l'eau pure. Le ratio K_{ox}/K détermine la fraction d'oxygène singulet qui réagit pour produire et ERO secondaires et donc la concentration d'ERO secondaires à l'état stationnaire.

Dans l'hypothèse d'une unique ERO secondaire, cette ERO est produite avec un taux de production $K_{ox}[^1\text{O}_2]$. La concentration de cette ERO dépend de son mode de dégradation dans le PBS. Pour les espèces dont la dégradation peut être assimilée à une équation d'ordre 1 (H_2O_2 , O_3 , H_2O_3), la concentration est décrite par l'équation (C.10). K_{ERO} (s^{-1}) = $\ln(2)/\tau_{ERO}$, avec τ_{ERO} le temps de demi-vie de l'espèce en question dans le PBS. H_2O_2 , O_3 et H_2O_3 ont une demi-vie dans le PBS (ou, à défaut d'informations dans la littérature, dans l'eau pure) de respectivement $>24\text{h}$, 5 minutes et 20ms.

$$\frac{d[ERO]}{dt} = K_{ox}[^1\text{O}_2] + D\nabla^2[ERO] - K_{ERO}[ERO] \quad (\text{C.10})$$

$$\frac{d[ERO]}{dt} = K_{ox}[^1\text{O}_2] + D\nabla^2[ERO] - K_{ERO}[ERO]^2 \quad (\text{C.11})$$

Pour les espèces dont la dégradation est d'ordre 2 (O_2^- , $\text{HO}\cdot$), la concentration est décrite par l'équation (C.11). Le coefficient de dégradation K_{ERO} est en $\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$. Le temps de demi-vie $\tau_{ERO} = \frac{1}{2 K_{ERO}[ERO]}$ dépend de la concentration de l'espèce. Le temps associé à la concentration

initiale d'espèces, $\tau_{ERO}(0) = \frac{1}{2 K_{ERO}[ERO]_0}$, est qualifié de temps de première demi-vie. K_{ox} détermine la concentration $[ERO]$ et donc le temps de première demi-vie des espèces d'ordre 2. Les coefficients de dégradation associés à l'anion superoxyde et le radical hydroxyle sont respectivement $K_{O_2^-} = 2 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ [221;328] et $K_{HO\cdot} = 10^{10} \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ [213] (réaction limitée par la diffusion de $HO\cdot$).

C.3.1 Impact de la puissance laser sur la concentration en 1O_2

Si la concentration en dioxygène était constante, le taux de production en oxygène singulet serait une fonction linéaire de l'intensité (et donc de la puissance) du laser. La figure C.7 montre le ratio des taux de production d'oxygène singulet entre une irradiation à $P=50\text{mW}$ et une irradiation à puissance inférieure, au niveau du point de focalisation du laser.

Pour $K_{ox}=0$ (pas génération de ERO secondaires), la déplétion en dioxygène est nulle et le taux de production est une fonction linéaire de la puissance laser. Plus K_{ox} est grand, plus la déplétion est élevée. Le ratio des taux de production est plus faible que le ratio des puissances car la réduction de la déplétion compense partiellement la réduction de puissance. Par exemple, à une puissance $P=7\text{mW}$, le taux de production d'oxygène singulet est divisé (par rapport à $P=50\text{mW}$), par 7.14, 6.98, 6.37, 5.91 et 5.73 pour respectivement $K_{ox}=0$, $2 \cdot 10^5 \text{ s}^{-1}$, $2 \cdot 10^6 \text{ s}^{-1}$ et $2 \cdot 10^7 \text{ s}^{-1}$. Plus on s'éloigne du point de focalisation du laser, plus le taux de production d' 1O_2 et la déplétion en dioxygène sont faibles, donc plus le ratio se rapproche du ratio estimé pour $K_{ox}=0$.

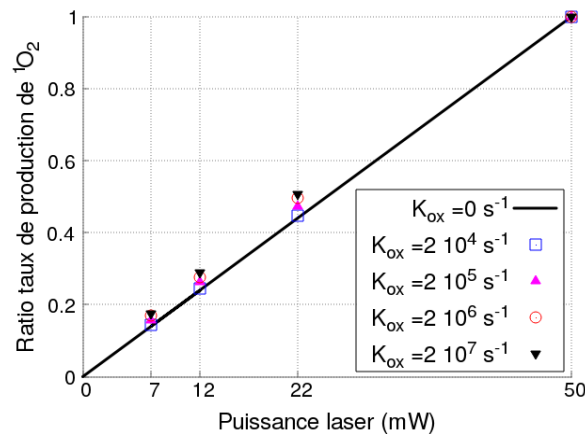


FIGURE C.7 – Effet de la puissance laser, P (mW), sur le taux de production de 1O_2 , en fonction de la constante de réaction K_{ox} associée à la production d'espèces secondaires.

C.3.2 Concentration d'ERO secondaires d'ordre 1

La concentration d'ERO qui subissent une dégradation d'ordre 1 dépend de leur temps de demi-vie $\tau_{1/2}$ et du coefficient de réaction K_{ox} de 1O_2 dans le PBS. Dans la figure C.8, la concentration d'ERO produites avec un laser focalisé est moyennée sur la durée d'irradiation (10 minutes) et la hauteur d'une cellule ($h=5 \mu\text{m}$) : plus K_{ox} et $\tau_{1/2}$ sont grands, plus la concentration est élevée. Nous avons simulés la concentration de tous les ERO secondaires potentiels identifiés en début de chapitre 3. La concentration maximale de ERO est atteinte pour H_2O_2 ($\tau_{1/2} = 24\text{h}$) et $K_{ox} = 2 \cdot 10^7 \text{ s}^{-1}$ et vaut $48.7 \mu\text{M}$ au niveau de l'axe du laser.

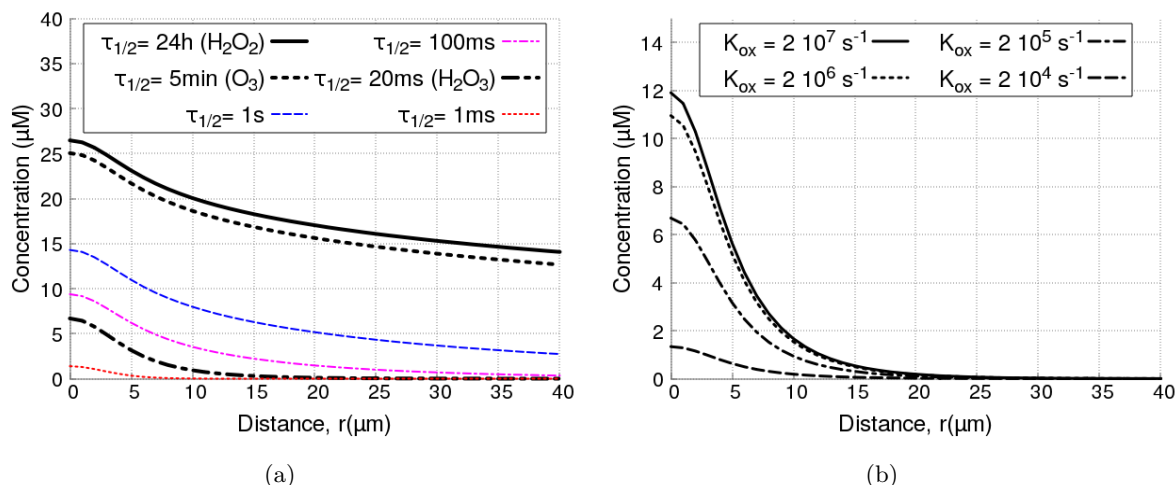


FIGURE C.8 – **Concentration d’ERO secondaires d’ordre 1.** Concentration moyenne, intégrées sur la hauteur d’une cellule et une durée d’irradiation de 10min. **Figure (a)** : Concentration d’ERO pour $K_{ox}=2 \cdot 10^5 \text{ s}^{-1}$ en fonction de la distance r à l’axe du laser, et du temps de demi-vie $\tau_{1/2}$ de l’ERO produite. **Figure (b)** Concentration d’ERO pour $\tau_{1/2}=20\text{ms}$ en fonction de la distance r à l’axe du laser, et du coefficient de réaction K_{ox} de $^1\text{O}_2$ dans le PBS.

C.3.3 Concentration d’ERO secondaires d’ordre 2

Pour les ERO d’ordre 2, K_{ox} détermine à la fois le taux de production de l’ERO et son temps de (première) demi-vie. Le profil de concentration (moyenné sur la durée de l’irradiation et la hauteur d’une cellule) de l’anion superoxyde est représenté [figure C.9](#). Le profil de concentration normalisé permet de mieux identifier le temps de première demi-vie en fonction de K_{ox} . Le profil de concentration de $\text{HO}\cdot$ est représenté [figure C.10](#). La simulation de la concentration de $\text{HO}\cdot$ ne tient pas compte d’éventuelle réaction de $\text{HO}\cdot$ avec les composants du PBS (tels les ions phosphates). Il est donc possible que nous surestimions les concentrations de radical hydroxyle présentes dans le PBS.

Rappelons que l’ordre de grandeur de concentrations toxiques (associées à une fraction de cellules mortes de 0.5) est d’environ $100 \mu\text{M}$ pour $\text{O}_2^{\cdot-}$ et $0.1 \mu\text{M}$ pour $\text{HO}\cdot$.

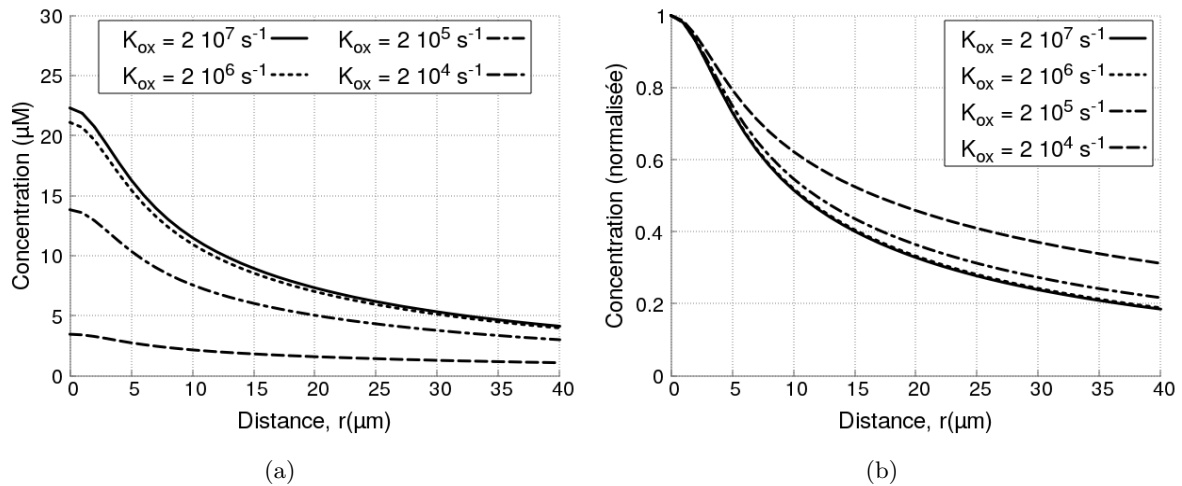


FIGURE C.9 – **Concentration d’anion superoxyde en fonction de la distance à l’axe du laser.** Concentration moyennée sur la durée d’irradiation (10 min) et la hauteur d’une cellule. **Figure (a)** Concentration en micromoles/L pour différentes valeurs de K_{ox} . Plus K_{ox} est élevé, plus la concentration est grande. **Figure(b)** Concentration normalisée pour différentes valeurs de K_{ox} : plus K_{ox} est élevé, plus le temps de première demi-vie de O_2^- est court (pente de la courbe forte).

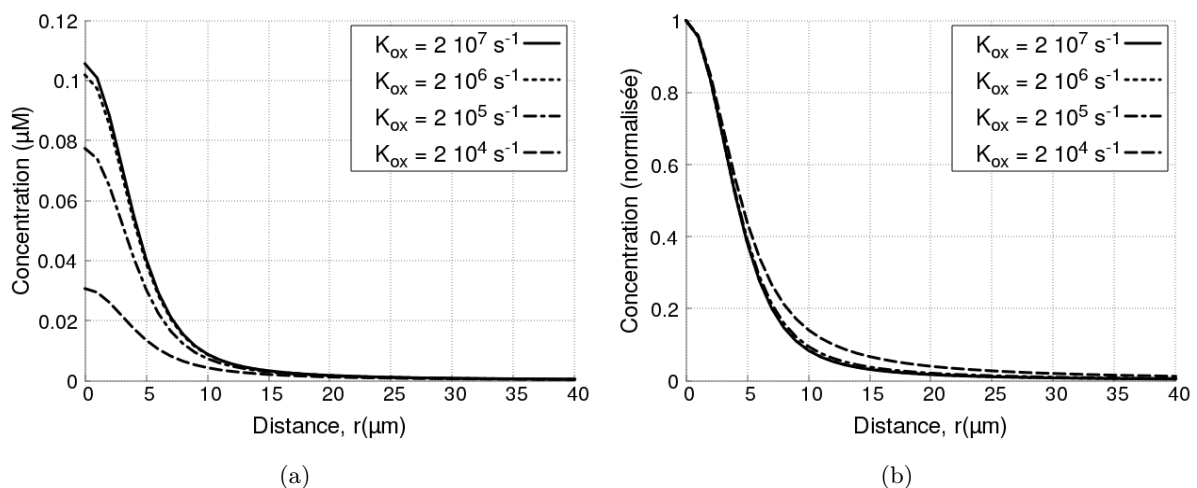


FIGURE C.10 – **Concentration de radical hydroxyle $\text{HO}\cdot$ en fonction de la distance à l’axe du laser.** Concentration moyennée sur la durée d’irradiation (10 min) et la hauteur d’une cellule, pour différentes valeurs de K_{ox} . **Figure (a)** Concentration en micromoles/L. **Figure(b)** Concentration normalisée.

C.3.4 Concentration en superoxyde en fonction de la puissance laser

Dans le chapitre 3, les cellules ont été irradiées à différentes puissances ($P=7\text{mW}$, $P=22\text{mW}$) pour mesurer l'impact de la puissance sur la mort cellulaire. Nous comparons [figure C.11](#) la concentration simulée de superoxyde produite à une puissance P et la concentration produite à $P=50\text{mW}$. Deux facteurs font que le ratio de concentration est inférieur au ratio des puissances : la déplétion en dioxygène, qui affecte le taux de production de $^1\text{O}_2$, et la dépendance en concentration du temps de demi-vie du superoxyde, qui augmente le temps de demi-vie (et donc proportionnellement la concentration) de O_2^- pour les puissances faibles.

Ainsi au niveau de l'axe du laser ($r=0$), pour $K_{ox}=2 \times 10^6 \text{ s}^{-1}$, le ratio de concentration au niveau des cellules entre $P=50\text{mW}$ et respectivement $P=22\text{mW}$ et $P=7\text{mW}$ ne vaut pas $50/22=2.3$ et $50/7=7.14$ mais 1.8 et 4.6 .

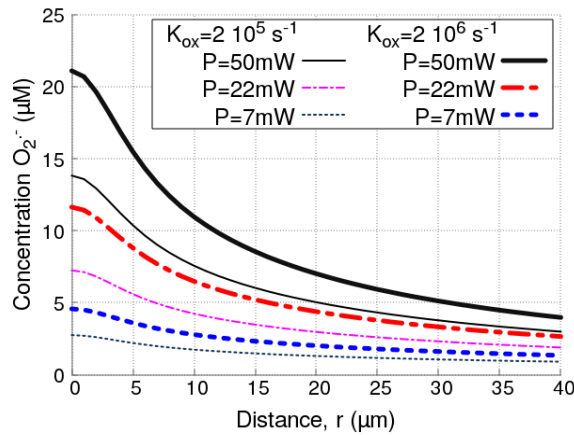


FIGURE C.11 – Concentration en superoxyde en fonction de la puissance laser, avec pour paramètre le coefficient de réaction K_{ox} . Valeur intégrée sur une irradiation de 10min et la hauteur d'une cellule ($z=0$ à $z=5 \mu\text{m}$).

C.4 Action des désactivateurs d'ERO sur les concentrations

Dans le chapitre 3, nous évaluons analytiquement ([section 3.2.7.2](#)) l'effet des désactivateurs sur la concentration totale d'espèces réactives de l'oxygène. La simulation de la concentration de ERO en présence de désactivateurs permet de préciser le profil de concentration spatial. Nous constatons que nous obtenons des données cohérentes avec les valeurs analytiques.

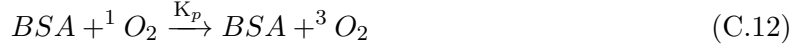
C.4.1 Albumine de sérum bovin (BSA)

L'albumine de sérum de bœuf est une protéine ($M_{BSA}=67\text{kDa}$) soluble dans l'eau et non-toxique pour les cellules. Elle est peu sensible aux variations de pH autour de $\text{pH}=7.4$ et de température autour de $25\text{-}37^\circ\text{C}$ [[329](#)] (dénaturation à partir de 65°C). La taille de cette protéine l'empêche de traverser la membrane des cellules. Elle ne peut donc réagir qu'avec les espèces contenues dans le milieu extra-cellulaire. Elle diffuse avec un coefficient de diffusion $D=7 \times 10^{-11} \text{ m}^2\text{s}^{-1}$ [[326,327](#)].

C.4.1.1 Réaction de la BSA avec $^1\text{O}_2$

La BSA réagit avec l'oxygène singulet, avec un coefficient de réaction $K_{BSA}^{^1\text{O}_2} \sim 8 \times 10^8 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ [[186](#)]. La désactivation de $^1\text{O}_2$ peut être physique [équation \(C.12\)](#), ou chimique [équation \(C.13\)](#). Dans

le premier cas, la BSA n'est pas modifiée lors de l'interaction avec 1O_2 . Dans le second cas, elle est oxydée.



$K_{BSA}^{^1O_2} = K_c + K_p$, avec $K_c \sim 0.37 \times K_p$: 37% des interactions 1O_2 -BSA sont de nature chimique. Une molécule de BSA peut accepter au maximum 13 atomes d'oxygène^[186]. Il est donc possible de saturer cette voie de réaction, lorsque les molécules de BSA sont amenées à réagir avec environ 35 ou plus molécules de 1O_2 .

Estimons le nombre de molécules de 1O_2 par molécules de BSA pour une concentration de 3mM de BSA (0.2g/L). La BSA est ajoutée à un volume d'environ 2mL de PBS. Nous générons au niveau du point de focalisation du laser ($1 \mu m^3$, soit 1 nL) 0.16M/s de 1O_2 . La concentration de BSA dans un volume de $1 \mu m^3$ est renouvelée environ toutes les 5ms. En 5ms le taux de production maximal d' 1O_2 est 0.8mM/s. Ainsi, même au point de focalisation du laser, la concentration de BSA reste plus importante que la concentration de 1O_2 . Nous nous permettrons donc de considérer que la voie de réaction chimique de la BSA avec 1O_2 n'est pas saturée, et donc que la concentration de BSA dans le milieu extra-cellulaire peut être considérée constante pendant l'irradiation.

C.4.1.2 Simulation numérique de la concentration de 1O_2 en présence de BSA

Par simulation numérique de la diffusion des espèces, nous obtenons la réduction de la concentration de ERO extra-cellulaire en fonction du coefficient de réaction K_{ox} qui caractérise la formation d'ERO secondaires. L'équation (C.14) rend compte de la réaction entre la BSA et l'oxygène singulet.

$$\frac{d[^1O_2]}{dt} = \gamma[^3O_2] + D\nabla^2[^1O_2] - K[^1O_2] - K_{ox}[^1O_2] - K_{BSA}[BSA][^1O_2] \quad (C.14)$$

$$\frac{d[^3O_2]}{dt} = D\nabla^2[^3O_2] - \gamma[^1O_2] + K[^1O_2] + 0.63K_{BSA}[BSA][^1O_2] \quad (C.15)$$

Comme 37% des interactions sont de nature chimique, seulement 63% de l'oxygène singulet désactivé retrouve sont état fondamental. En plus de la désactivation de l'oxygène singulet, la présence de BSA (équation (C.15)) affecte la concentration en dioxygène et donc le taux d'oxygène singulet généré.

En négligeant la déplétion en dioxygène et la diffusion, on peut résoudre analytiquement l'équation de réaction à l'état stationnaire (équation (C.16)) et estimer ainsi le ratio de concentration $\alpha = [^1O_2](BSA=0) / [^1O_2](BSA=3mM)$ (équation (C.17)), entre la concentration d' 1O_2 en absence de BSA et en présence de BSA. Plus K_{ox} est faible, plus la division de la concentration est importante.

$$0 = \gamma[^3O_2]_0 - K[^1O_2] - K_{ox}[^1O_2] - K_{BSA}[BSA][^1O_2] \quad (C.16)$$

$$\frac{[^1O_2](BSA=0)}{[^1O_2](BSA)} = 1 + \frac{K_{BSA}[BSA]}{K + K_{ox}} \quad (C.17)$$

Effet de la déplétion en dioxygène sur l'efficacité de la BSA. Des simulations sans diffusion de 1O_2 ($D=0$ pour 1O_2 uniquement) de la concentration en dioxygène sont effectuées pour estimer l'impact de la déplétion en dioxygène et de K_{ox} sur l'efficacité de la BSA. Dans

un système où $K_{ox}=0$, le ratio de concentration d' 1O_2 ($\alpha=[^1O_2](BSA=0)/[^1O_2](BSA=3mM)$) augmente pendant l'irradiation (figure C.12a), ce qui est cohérent avec l'augmentation de la consommation de dioxygène. L'écart entre la valeur théorique sans déplétion ($\alpha=13.1$) et la valeur simulée est maximale au niveau de l'axe du laser ($r=0$). L'écart entre la valeur théorique sans déplétion et en tenant compte de la consommation d'oxygène dépend également de K_{ox} (figure C.12b). Si $K_{ox} < K$, l'ajout de BSA augmente la déplétion. Si $K_{ox} > K$, l'ajout de BSA réduit la déplétion d'oxygène, le taux de production d'oxygène singulet est plus élevé que sans BSA. Remarquons néanmoins que l'écart avec la valeur obtenue en négligeant la déplétion en dioxygène reste inférieur à 10%.

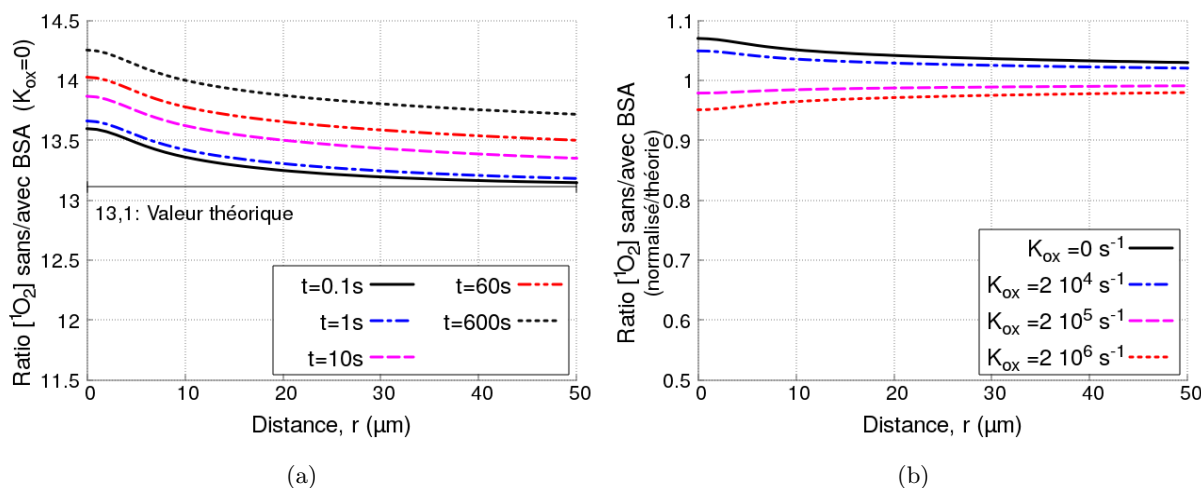


FIGURE C.12 – **Effet de 3mM de BSA sur la concentration en 1O_2 , dans un système sans diffusion de 1O_2 .** Simulation numérique des concentrations suite à une irradiation à 1270nm avec un laser focalisé d'axe $r=0$ et de waist $\omega=0.64 \mu m$. **Figure (a)** cinétique en fonction du temps t après le début de l'irradiation, pour $K_{ox}=0$. La résolution analytique de l'équation de réaction donne un ratio théorique de 13.1 **Figure (b)** Ratios de concentrations normalisés par rapport à la valeur théorique attendue (résolution analytique en négligeant la consommation de dioxygène), en fonction de la distance au laser r en fonction de K_{ox} ($t=600s$). Les concentrations sont moyennées sur la hauteur d'une cellule ($0 < z < 5 \mu m$). Les ratios normalisés à 1 valent 13.1, 7 et 2.1 pour respectivement $K_{ox}=0$, $2 \cdot 10^5$ et $2 \cdot 10^6 s^{-1}$.

Concentration d'oxygène singulet en présence de BSA. La réduction de la fraction de cellules mortes en présence de BSA (chapitre 3) est cohérente avec une valeur du paramètre K_{ox} compris entre $6 \cdot 10^5 s^{-1}$ et $2 \cdot 10^6 s^{-1}$. Les concentrations de 1O_2 obtenues à l'état stationnaire sans et avec BSA sont simulées numériquement (figure C.13a) pour ces deux valeurs de K_{ox} . Nous retrouvons une division par la concentration par 6.7 à 6.9 et 2.05 à 2.09 respectivement, en accord avec le calcul analytique et l'effet de la déplétion en dioxygène.

Réaction de la BSA avec les autres ERO. La BSA réagit également avec O_2^- [245], $K_{BSA}^{O_2^-} = 8 \cdot 10^4 M^{-1} s^{-1}$ (soit $1.3 \cdot 10^4$ fois moins efficace que l'enzyme superoxide dismutase CuZn-SOD). L'effet de la BSA sur la concentration de O_2^- au niveau des cellules dépend de K_{ox} et de la concentration en superoxyde (simulée numériquement figure C.13b). La concentration de O_2^- maximale en présence de 3mM BSA (concentration au niveau de l'axe du laser, $r=0$) est inférieure à la concentration en $r=40 \mu m$ sans ajout de BSA. Il n'y a pas de mort cellulaire initiée par l'oxygène singulet à $r=40 \mu m$. La concentration de O_2^- est donc trop faible pour être toxique en présence de BSA.

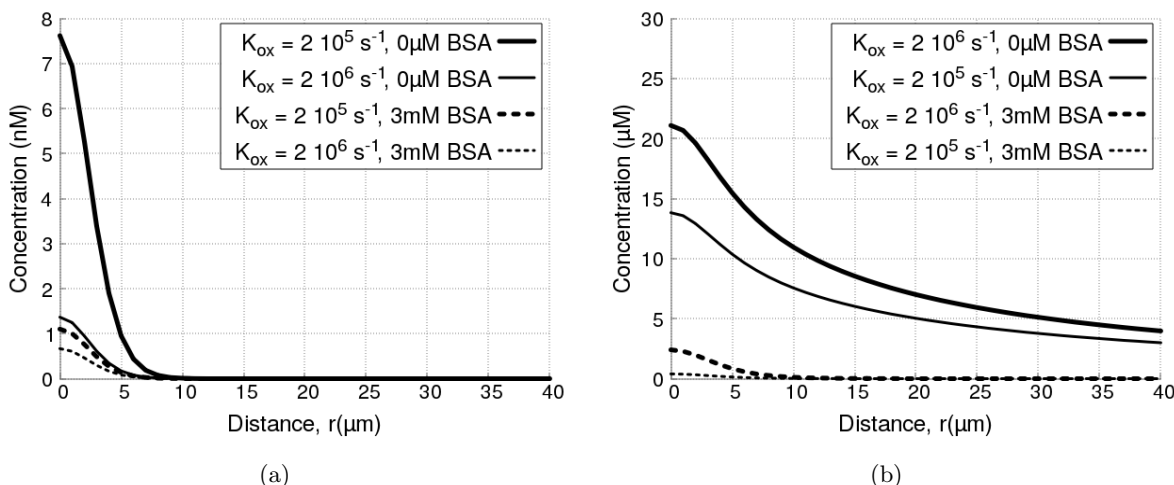


FIGURE C.13 – **Simulation numérique de l'effet de la BSA sur la concentration d'ERO.** Les concentrations sont moyennées sur la hauteur d'une cellule ($0 < z < 5 \mu\text{m}$) et la durée de l'irradiation (10min). **Figure (a)** Concentrations d'oxygène singulet en présence de 0 et 3mM de BSA pour $K_{ox} = 2 \cdot 10^5 \text{ s}^{-1}$ et $2 \cdot 10^6 \text{ s}^{-1}$. Le ratio de concentration est compris entre 2.1 et 7. **Figure (b)** Concentration d'anion superoxyde en présence de 0 et 3mM de BSA, en fonction de K_{ox} . En présence de BSA, à $r=0$, la concentration est réduite de 13.5 à 0.4 μM (ratio de 34) et de 21.5 à 2.4 μM (ratio de 9) à $K_{ox} = 2 \cdot 10^5 \text{ s}^{-1}$ et $2 \cdot 10^6 \text{ s}^{-1}$ respectivement.

La BSA réagit dans une moindre mesure avec O_3 , H_2O_2 et $\text{HO}\cdot$. Au vu de l'effet d'ajout de BSA dans les études de L. Restaino *et al.* [240] et B.S. Berlett *et al.* [241] (travail dans de l'eau dé-ionisée à température ambiante), 3mM de BSA diviserait la concentration $[\text{O}_3]$ par plus d'un facteur 100 et $K_{BSA}^{\text{O}_3} \sim 10^5\text{-}10^6 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$.

G. Okamoto *et al.* [237] ont montré que la BSA est environ 20x moins efficace à concentration égale ($[\text{BSA}] \sim 5 \mu\text{M}$) sur H_2O_2 que sur O_2^- (incubation avec BSA de 15min, l'état stationnaire n'est donc pas atteint pour H_2O_2). Et que pour obtenir la même réduction de concentration d'espèces, il faut $[\text{BSA}]$ 10 fois plus élevée pour $\text{HO}\cdot$ que pour O_2^- . Ces expériences ont été faites dans du PBS à pH variable (7.4 ou 6), à température ambiante ou 37°C . A défaut de mesures des constantes de réaction des ERO avec BSA, ces valeurs suggèrent que 3mM de BSA divisent la concentration de H_2O_2 et de $\text{HO}\cdot$ par respectivement ~ 2 et 5.

C.4.2 Catalase : désactivateur de H_2O_2

La catalase est une protéine (masse molaire 240kDa) présente dans les cellules vivantes pour réguler le taux de peroxyde d'hydrogène (H_2O_2). Elle est non-toxique pour les cellules et soluble dans l'eau (et le DPBS) à hauteur de 1mg/mL, soit 4 μM . La catalase (d'origine bovine, fournisseur Sigma) catalyse la dismutation de H_2O_2 en O_2 et H_2O (équation (C.18)).



La présence de catalase augmente la concentration de dioxygène dans le milieu. Le taux de production d'oxygène singulet accru en présence de catalase réduit donc légèrement le ratio entre concentration de H_2O_2 sans catalase et en présence de catalase.

D'après des études de la littérature, la catalase réagit avec H_2O_2 avec une constante de réaction de $K_{cat} = 10^5 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ [205;206]. Cette valeur est plus faible que celle annoncée par le fournisseur (Sigma). Une concentration de catalase $[\text{Cat}] = 4 \mu\text{M}$ correspond d'après le fournisseur à une activité 2-5ku/mL. Une unité d'activité enzymatique par mL (1 ua/mL) correspond

(à pH=7, pour une température T=25 °C) à une dégradation de H₂O₂ de 1 μM/min^[330] (soit $\frac{d[{}^1O_2]}{dt}=0.02 \mu\text{M/s}$). Cette définition reste vraie tant que $[H_2O_2] \gg [CAT]$, avec [CAT] la concentration de catalase. Nous trouvons ainsi une valeur de K_{cat} comprise entre $\sim 4 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ à $10^6 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$. Nous n'avons pas calibré expérimentalement l'activité de l'enzyme.

C.4.2.1 Action de la catalase sur la concentration de H₂O₂.

L'équation (C.19) rend compte de la réaction entre catalase et peroxyde d'hydrogène.

$$\frac{d[H_2O_2]}{dt} = K_{ox}[{}^1O_2] + D\nabla^2[H_2O_2] - K_1[H_2O_2] - K_{cat}[CAT][H_2O_2] \quad (\text{C.19})$$

$$\frac{d[{}^1O_2]}{dt} = \gamma[{}^3O_2] + D\nabla^2[{}^1O_2] - K[{}^1O_2] - K_{ox}[{}^1O_2] \quad (\text{C.20})$$

$$\frac{d[{}^3O_2]}{dt} = D\nabla^2[{}^3O_2] - \gamma[{}^1O_2] + K[{}^1O_2] + 0.5K_{cat}[CAT][H_2O_2] \quad (\text{C.21})$$

La production de H₂O₂ par l'oxygène singulet dans du PBS est fonction de K_{ox} . Au vu des résultats d'irradiation en présence de BSA, nous avons établi que $2 \times 10^5 \text{ s}^{-1} < K_{ox} < 2 \times 10^6 \text{ s}^{-1}$. La concentration en oxygène singulet [¹O₂] (équation (C.20)) dépend de la concentration en dioxygène [³O₂] (équation (C.21)), elle-même affectée par la présence de catalase. Le coefficient de réaction $K_1 = \ln(2)/\tau_{1/2}$ traduit la dégradation de H₂O₂ dans le PBS, avec $\tau_{1/2} > 24\text{h}$ le temps de demi-vie de H₂O₂. Ce temps est fixé à 24h pour les simulations numériques. La consommation de H₂O₂ en présence de catalase dépend de la concentration de catalase [CAT] (mol/L) et du coefficient de réaction K_{cat} (en $\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$).

Le temps d'irradiation (10 minutes) est très faible devant la demi-vie de H₂O₂ dans le PBS. L'estimation analytique du ratio de concentration $\alpha = [H_2O_2](CAT=0)/[H_2O_2](CAT=4 \mu\text{M})$ à l'état stationnaire ne donne pas une estimation pertinente de l'effet de la catalase pendant l'irradiation. Les cellules sont irradiées dans du PBS, remplacé par du milieu de culture après la fin de l'irradiation (soit au maximum 2h après que le premier champs de cellules de la boîte de culture ait été irradié). Aucune différence significative de mort cellulaire n'est observée entre les premiers et les derniers champs de cellules irradiées.

La simulation numérique (figure C.14) donne ainsi une division d'un facteur supérieur à 2 en présence de 4 μM de catalase, quelque soit la valeur de K_{ox} ou de K_{cat} (dans les gammes considérées). La concentration en présence de catalase est plus faible que la concentration à $r=40 \mu\text{m}$ sans ajout de catalase. Nous n'observons pas de mort cellulaire initiée par l'oxygène singulet à 40 μm du laser. La contribution de H₂O₂ à la mort des cellules en présence de catalase devrait donc être négligeable.

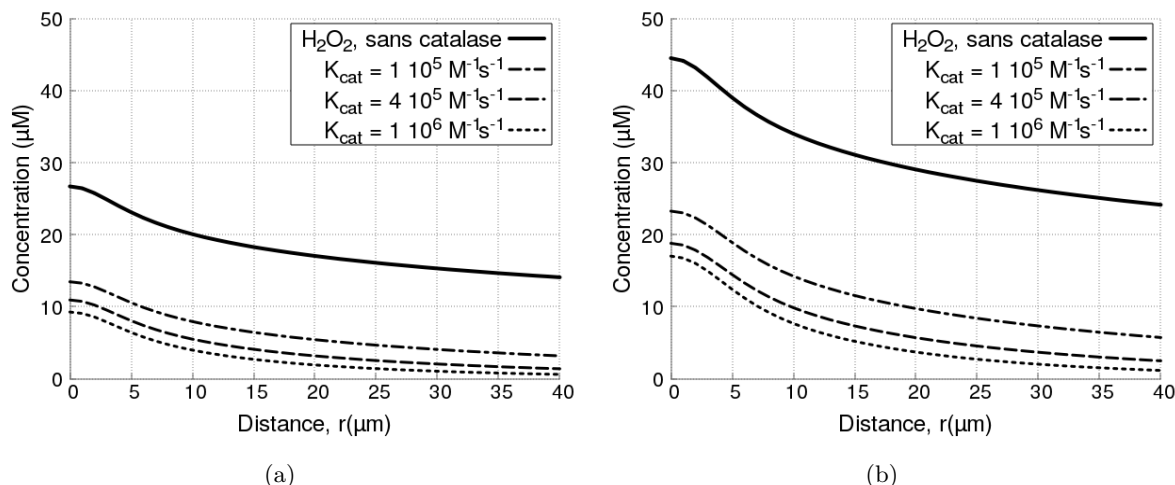


FIGURE C.14 – **Simulation numérique de l'effet de catalase sur la concentration d' H_2O_2** en fonction de la distance r à l'axe du laser et de la constante de réaction K_{cat} entre la catalase et H_2O_2 dans le PBS. Les concentrations sont moyennées sur la hauteur d'une cellule ($0 < z < 5 \mu\text{m}$) et la durée de l'irradiation (10min). **Figure (a)** Concentrations pour un coefficient de réaction $K_{ox} = 2 \cdot 10^5 \text{ s}^{-1}$ **Figure (b)** $K_{ox} = 2 \cdot 10^6 \text{ s}^{-1}$.

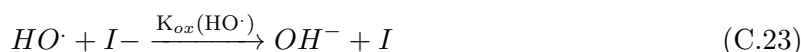
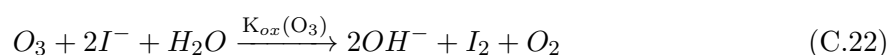
C.4.2.2 Action de la catalase sur les autres ERO.

D'après la littérature, l'oxygène singulet inactive l'activité de la catalase avec une constante de réaction $K = 2.5 \times 10^7 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ [231]. Cette constante est trop faible pour affecter la concentration d'oxygène singulet (et de catalase) pour $[\text{catalase}] = 4 \mu\text{M}$ ($[^1\text{O}_2] > 99.9\%$ de la concentration sans ajout de catalase, en présence de catalase).

La catalase ne réagit pas avec $\text{HO}\cdot$ [211;242]. Elle réagit avec l'ion superoxyde avec une constante $K_{cat}(\text{O}_2^-) = 2 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ [246] à $\text{pH} = 7.4$ (buffer phosphate 1mM). Pour $[\text{catalase}] = 4 \mu\text{M}$, la concentration de $[\text{O}_2^-]$ est divisée par < 1.08 (simulée numériquement), soit un effet négligeable sur la toxicité de O_2^- . L'inactivation de la catalase en présence d'ozone a été identifiée [242] comme être le produit d'ERO intermédiaires, sous-produits de l'ozone en milieu aqueux, tels que H_2O_2 et, potentiellement, O_2^- .

C.4.3 Iodure de potassium (KI) : désactivateur de $\text{HO}\cdot$ et O_3

L'iodure de potassium (KI) est un sel inorganique. Les cellules ont été exposées 24h à des concentrations de KI jusqu'à 100mM sans que l'on observe de la mort cellulaire, nous le considérons donc non toxique pour une concentration de 1mM. KI se solubilise dans l'eau en ions I^- et K^+ . Les ions iodure I^- réagissent avec l'ozone (O_3) [258] (équation (C.22)) avec une constante de réaction $K_{\text{O}_3} = 10^8 - 10^9 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ [219;243], et le radical hydroxyle $\text{HO}\cdot$ [208;209] (équation (C.23)), $K_{\text{HO}\cdot} = 10^{10} \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$.



C.4.3.1 Action de KI sur la concentration de O_3 et $HO\cdot$.

L'équation (C.24) rend compte de la réaction entre KI et le radical hydroxyle, l'équation (C.25) la réaction entre KI et l'ozone.

$$\frac{d[HO\cdot]}{dt} = K_{ox}[^1O_2] + D\nabla^2[HO\cdot] - K_2[HO\cdot]^2 - K_{KI}[KI][HO\cdot] \quad (C.24)$$

$$\frac{d[O_3]}{dt} = K_{ox}[^1O_2] + D\nabla^2[O_3] - K_1[O_3] - K_{KI}[KI][O_3] \quad (C.25)$$

$$\frac{d[^3O_2]}{dt} = D\nabla^2[^3O_2] - \gamma[^1O_2] + K[^1O_2] + K_{KI}[KI][O_3] \quad (C.26)$$

Le coefficient de dismutation de l'anion hydroxyle vaut $K_2=10^{10}M^{-1}s^{-1}$. Le coefficient de réaction $K_1=\ln(2)/\tau_{1/2}$ traduit la dégradation de O_3 dans le PBS, avec $\tau_{1/2} \sim 5$ min le temps de demi-vie de O_3 . Lors de la simulation de l'effet de KI en présence d'ozone, la production de dioxygène lors de la désactivation est prise en compte (équation (C.26)).

La résolution analytique à l'état stationnaire de équations (C.24) et (C.25) (qui ne tient pas compte de la diffusion ou de la déplétion en dioxygène) donne un ratio de concentration supérieur à 1000 entre la concentration de $HO\cdot$ ou O_3 sans ajout de KI et la concentration avec 1mM de KI. Des résultats très similaires sont obtenus par simulation numérique de la réaction et la diffusion des espèces (figure C.15).

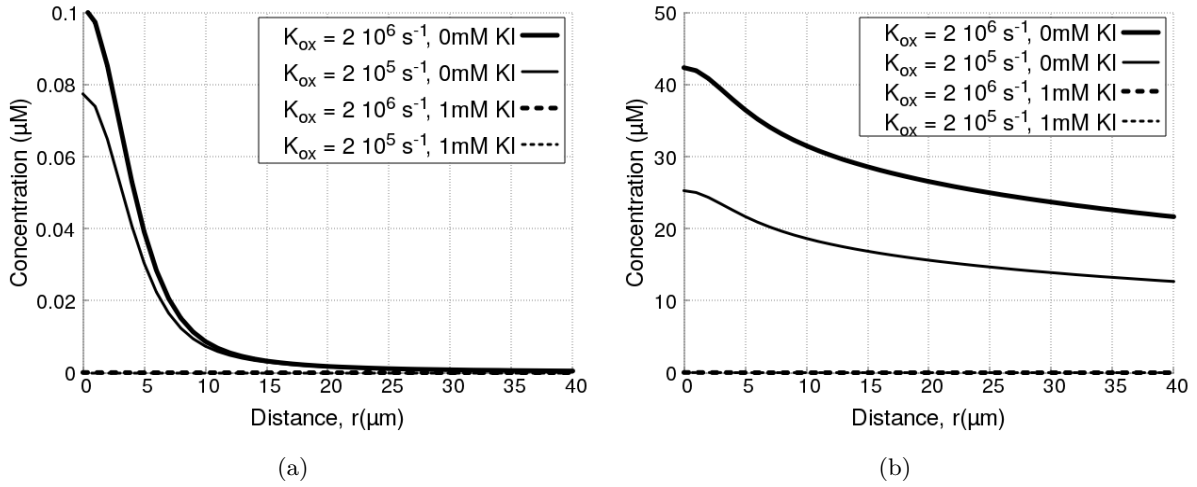


FIGURE C.15 – **Simulation numérique de l'effet de KI sur la concentration de ERO** en fonction de la distance r à l'axe du laser. Les concentrations sont moyennées sur la hauteur d'une cellule ($0 < z < 5 \mu m$) et la durée de l'irradiation (10min). **Figure (a)** Action de KI sur $HO\cdot$, en fonction de K_{ox} . La concentration est réduite en présence de KI de plus d'un facteur 1000 : de 77 à 0.011 nM à $r=0$ pour $K_{ox}=2 \cdot 10^5 s^{-1}$, et de 108 à 0.042 nM pour $K_{ox}=2 \cdot 10^6 s^{-1}$. **Figure (b)** Action de KI sur O_3 . La concentration est réduite en présence de KI de plus d'un facteur 1000 : de 25 à 0.016 μM à $r=0$ pour $K_{ox}=2 \cdot 10^5 s^{-1}$, et de 42 à 0.027 μM pour $K_{ox}=2 \cdot 10^6 s^{-1}$.

C.4.3.2 Action de KI sur les autres ERO.

KI réagit avec l'oxygène singulet avec une constante $K_{KI}(^1O_2) \sim 10^6 M^{-1}s^{-1}$ [232–234]. KI est donc près de 1000 fois moins efficace que la BSA et est ajouté au PBS en concentrations similaires (1mM à comparer à 3mM de BSA). Nous ne nous attendons pas à ce que KI ait

un effet sur la concentration en 1O_2 . La simulation numérique de la réaction nous fait obtenir $[^1O_2]_{KI=1mM} \sim 0.997 \times [^1O_2]_{KI=0}$, soit un effet négligeable.

I^- réagit avec le peroxyde d'hydrogène. L'ordre et la valeur de la constante de réaction de la décomposition de H_2O_2 en présence d'ions I^- dépend des conditions expérimentales (pH, température, concentrations) [238]. A pH=7, $K_{ox}(H_2O_2) \sim 10^{-2} M^{-1}s^{-1}$. Analytiquement, pour KI=1mM, KI est plus de 1000 fois moins efficace que $4\mu M$ de catalase ($K_{ox}^{cat}(H_2O_2) = 10^5 M^{-1}s^{-1}$), nous ne nous attendons donc pas à voir d'effet sur H_2O_2 .

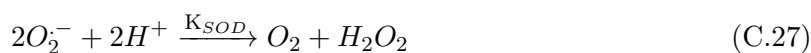
I^- ne semble pas réagir avec O_2^- : H.P. Li *et al.* [334] ont montré une oxydation de I^- en présence de superoxyde mais n'ont pas identifié si l'oxydation était due à une réaction directe avec O_2^- ou avec un de ses sous-produits (notamment H_2O_2). L'étude de K.I. Ogawa *et al.* [247] dans laquelle des marqueurs à base de iode sont utilisés pour identifier spécifiquement le lieu de génération de H_2O_2 et ne se fixent pas sur les lieux de génération de O_2^- (identifiés à l'aide d'un marqueur de O_2^- , le NBT) confirme que I^- réagit avec H_2O_2 et non O_2^- .

C.4.3.3 Action de KI sur les cellules.

Les ions I^- peuvent traverser la membrane cellulaire, et réduisent la peroxydation des lipides des membranes [264;335;336], ainsi augmentant la résistance des cellules aux ERO. Les cellules MCF-7 font partie des types cellulaires capables d'accumuler des ions I^- [264]. Dans les conditions expérimentales *in vitro* testées, c'est-à-dire pour une exposition des cellules à 1mM de KI pendant 30min à 2h, il est toutefois possible que l'effet de I^- soit pro-oxydant en favorisant la peroxydation des lipides des membranes [337]. Nos résultats expérimentaux ne permettent pas de conclure sur cet aspect.

C.4.4 Superoxyde dismutase (SOD) : désactivateur de O_2^-

Le radical anion superoxyde est généré par le métabolisme lors de réactions notamment la phosphorylation oxydative [221;249;250]. Afin de limiter sa concentration à des niveaux physiologiques, les cellules produisent une enzyme : la superoxyde dismutase (SOD). La SOD catalyse, avec une constante de réaction $K_{SOD} \sim 10^9 M^{-1}s^{-1}$, la réaction de O_2^- avec des protons pour former O_2 et H_2O_2 (équation (C.27)). En présence de SOD, la déplétion en dioxygène est ainsi réduite pendant l'irradiation.



La SOD est une protéine (masse molaire 37kDa) caractérisée par le métal sur son site actif. Nous utilisons CuZn-SOD (origine bovine, fournisseur Sigma, ref S5395). Cette SOD contient des ions cuivre (les ions Zn ne sont pas impliqués dans la réaction avec O_2^-), liés au reste de la protéine par des forces électrostatiques. Le complexe est très stable $K_d = 6 \times 10^{-18} M$ [259].

Dans la littérature, les constantes de réaction/activité de SOD sont mesurées dans des buffers phosphate à pH variables, ou dans de l'eau dé-ionisée. Le DPBS (avec calcium et magnésium) est un buffer phosphate à pH=7.4 avec en plus des composés à base de calcium, magnésium et sodium. Nous ne nous attendons pas à une forte modification de l'activité de l'enzyme.

C.4.4.1 Action de la SOD sur la concentration de O_2^- .

L'équation (C.28) rend compte de la réaction entre la SOD et l'anion superoxyde. La production de dioxygène par les réactions de dismutation de O_2^- sont prises en compte dans le

calcul de la concentration de dioxygène, qui détermine le taux de production de 1O_2 .

$$\frac{d[O_2^-]}{dt} = K_{ox}[^1O_2] + D\nabla^2[O_2^-] - K_2[O_2^-]^2 - K_{SOD}[SOD][O_2^-] \quad (C.28)$$

$$\frac{d[^3O_2]}{dt} = D\nabla^2[^3O_2] - \gamma[^1O_2] + K[^1O_2] + 0.5K_2[O_2^-]^2 + 0.5K_{SOD}[SOD][O_2^-] \quad (C.29)$$

Le coefficient de réaction K_2 vaut $2 \times 10^5 M^{-1} s^{-1}$ à $pH=7.4$ [221].

Nous simulons numériquement (figure C.16) le profil de concentration de O_2^- lors de l'ajout de $20 \mu M$ de SOD dans le PBS. Le ratio de concentration sans/avec SOD est minimal là où le taux de production de O_2^- est maximal, donc au niveau de l'axe du laser ($r=0$). Soit $[O_2^-]$ la concentration moyenne à laquelle sont exposées les cellules pendant une irradiation de 10 minutes (moyennée dans le temps et sur la hauteur d'une cellule), pour $r=0$, $\frac{[O_2^-](SOD=0)}{[O_2^-](SOD=20 \mu M)} > 150$ pour $2 \cdot 10^6 s^{-1} < K_{ox} < 2 \cdot 10^5 s^{-1}$ au niveau du tapis cellulaire ($z=0-5$). La contribution de O_2^- à la fraction de cellules mortes devrait être nulle en présence de $20 \mu M$ de SOD.

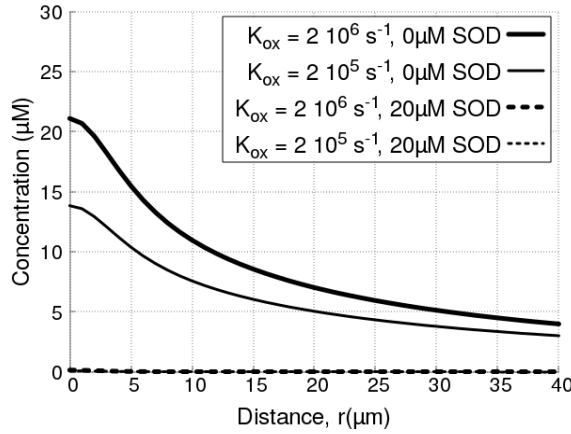


FIGURE C.16 – **Simulation numérique de la concentration d'anion superoxyde en présence de superoxyde dismutase (SOD)**. Les concentrations sont moyennées sur la hauteur d'une cellule ($0 < z < 5 \mu m$) et la durée de l'irradiation (10min). En présence de $20 \mu M$ de SOD la concentration $[O_2^-]$ en $r=0$ vaut respectivement 0.12 et $0.06 \mu M$ pour $K_{ox} = 2 \cdot 10^6 s^{-1}$ et $2 \cdot 10^5 s^{-1}$, comparé à 21 et $14 \mu M$ sans ajout de SOD. Soit une réduction de la concentration de plus d'un facteur 100.

C.4.4.2 Réaction de la SOD avec d'autres ERO.

La SOD ne réagit ni avec O_3 [244], ni avec $HO\cdot$ [211]. L'efficacité de la SOD est réduite en présence de H_2O_2 [221;239], avec une constante de réaction à $pH 7.8$ $K \sim 0.5 M^{-1} s^{-1}$, soit $\sim 10^5$ fois inférieure à la constante de réaction de H_2O_2 avec la catalase. L'inactivation de la SOD par H_2O_2 produit potentiellement des ERO secondaires toxiques, tel $HO\cdot$ [239], toutefois la constante de réaction est trop faible pour qu'on observe un effet sur une irradiation de 10min.

Selon les études de la littérature, SOD réagirait avec 1O_2 avec une constante $K_{SOD}^{^1O_2} = 2.7 \times 10^9 M^{-1} s^{-1}$ [236] (origine de la SOD pas précisée), de $K_{SOD}^{^1O_2} = 3 \times 10^7 M^{-1} s^{-1}$ [231] (SOD d'origine bovine, comme pour nos expériences), ou alors ne réagirait pas du tout [331;332].

La réaction avec 1O_2 serait responsable de l'inactivation de l'enzyme [231;333]. Plaçons nous dans le cas de figure le plus défavorable. Avec $K_{SOD}^{^1O_2} = 2.7 \times 10^9 M^{-1} s^{-1}$ et $[SOD] = 20 \mu M$, $[^1O_2]$

est divisée par moins d'un facteur 1.12 (valeur obtenue analytiquement et confirmée par simulation pour $2 \times 10^6 \text{s}^{-1} < K_{ox} < 2 \times 10^5 \text{s}^{-1}$. Le facteur atteint 1.25 si $K_{ox}=0$). Cela signifie qu'une irradiation à puissance laser $P=50\text{mW}$, en présence de $20 \mu\text{M}$ de SOD, est équivalente à une irradiation à $P \sim 45 \text{ mW}$. Or, nous obtenons en présence de SOD une réduction de la fraction de cellules mortes en deçà de la fraction de cellules mortes obtenue pour $P=22\text{mW}$ (figure 3.11). Cette réduction ne peut donc pas s'expliquer par une éventuelle réaction de la SOD avec $^1\text{O}_2$.

C.4.5 Pyridine

La pyridine ($\text{C}_5\text{H}_5\text{N}$) est une base faible aromatique avec un atome N comportant deux électrons célibataires en son centre. La pyridine combinées à des nucléotides [338] forme les biomolécules NADH/NAD+ (état non-phosphorylé) et NADPH/NADP+ (état phosphorylé). Ces molécules sont impliquées dans de nombreux mécanismes d'oxydo-réduction dont la production d'ERO, comme O_2^- , essentiels du métabolisme cellulaire.

C.4.5.1 Pyridine : désactivateur potentiel de H_2O_3

La pyridine serait selon J. Cerkovnik un bon désactivateur de H_2O_3 [200]. Le coefficient de réaction de la pyridine avec H_2O_3 n'a à notre connaissance jamais été mesuré. La concentration maximale non-toxique de pyridine a donc été ajoutée au PBS lors des irradiations. Afin d'évaluer la toxicité de pyridine, les cellules ont été exposées à des concentrations de 0.1, 1, 10, 30 et 100mM de pyridine diluée dans du PBS pendant 4h. Une fois le PBS remplacé par du milieu de culture (DMEM), les cellules ont été suivies pendant 48h. Après une exposition à 30mM, la mort cellulaire est équivalente à la mort basale. Après une exposition de 4h à 100mM de pyridine, les cellules montrent des symptômes de détresse morphologique, la division des cellules est ralentie, et la mort cellulaire dépasse le double de la mort basale (10% au lieu de 3-4% en 48h).

La pyridine est utilisée comme solvant dans des études sur l'effet de O_2^- [248], elle ne désactive donc pas le superoxyde. Elle est également un mauvais désactivateur de $^1\text{O}_2$ (constante de vitesse $K=10^5 \text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$ [235]).

C.4.5.2 Pyridine : toxicité en présence de ERO

L'irradiation en présence de pyridine seule n'a pas d'effet significatif sur la mort cellulaire. Nous irradiions les cellules en présence de pyridine et de 1mM de KI, et nous attendons à une fraction de cellules mortes inférieure ou égale à la fraction de cellules mortes obtenues en présence de KI, donc une fraction de cellules mortes très faible pour une distance au laser $r > 15 \mu\text{m}$. La pyridine réagit avec I_2 [339] dans des solvants apolaires, mais nous n'avons pas trouvé d'indications qu'elle puisse réagir avec I^- , et donc KI, dans le PBS.

Le profil spatial de la FCM, figure C.17, montre une réduction statistiquement significative de la FCM pour $5 < r < 15 \mu\text{m}$. La FCM est toutefois beaucoup plus élevée sur $r \geq 15 \mu\text{m}$ que la FCM en présence de KI seul. Nous en concluons que la pyridine réagit avec $^1\text{O}_2$ ou un de ses sous produits pour générer des espèces toxiques.

Cette toxicité accrue en présence de pyridine, et le manque d'information sur H_2O_3 et ses propriétés d'interaction avec la pyridine, empêche de conclure sur la présence ou l'absence de H_2O_3 . La pyridine (lorsqu'elle est combinée avec KI et de la catalase) est néanmoins le seul désactivateur autre que la BSA à réduire la FCM sur l'intervalle $5 < r < 15 \mu\text{m}$. Il serait donc pertinent de poursuivre des recherches dans le sens de la détection de H_2O_3 .

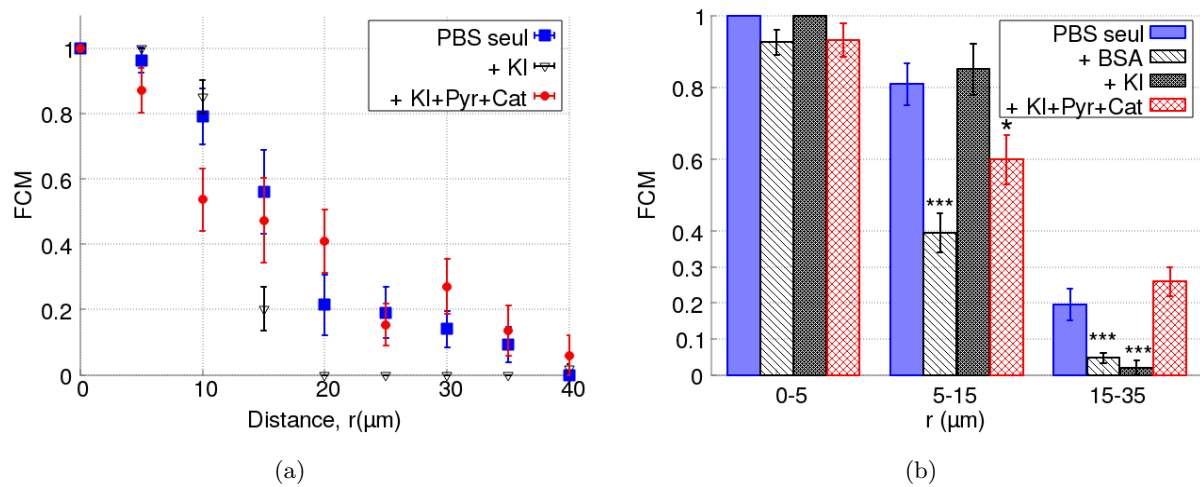


FIGURE C.17 – **Effet de la pyridine sur la fraction de cellules mortes lors d’une irradiation extra-cellulaire.** **Figure (a)** Fraction de cellules mortes en fonction de la distance r au laser, pour différents des désactivateurs présents dans le PBS, 3mM de BSA, 1mM de KI, ou 30mM Pyridine +1mM KI + 4 μM catalase. Chaque point est la FCM calculée sur un intervalle de 5 μm [$r-2.5 \mu\text{m} : r+2.5 \mu\text{m}$]. **Figure (b)** FCM pour une distance au laser $0 < r < 5 \mu\text{m}$ ($12 < n_{cell} < 25$), $5 \geq r \geq 15 \mu\text{m}$ ($30 < n_{cell} < 60$), et $15-35 \mu\text{m}$ ($50 < n_{cell} < 150$). Barres d’erreurs : erreur standard à la moyenne estimées par méthode bootstrap. Indicateurs statistiques : * $p < 0.05$, *** $p < 0.001$

Annexe D

Irradiation de cellules en flux

Dans le chapitre 3 ([section 3.3.4](#)), nous cherchons à identifier si des composés organiques présents sous forme de débris dans le milieu extra-cellulaire, ou secrétés par les cellules, participent aux réactions de $^1\text{O}_2$ qui permettent de former des espèces réactives de l'oxygène secondaires. Le dispositif expérimental est présenté dans la partie Protocole et Méthodes du Chapitre 3. Cette annexe présente le protocole de culture cellulaire associé, le calcul analytique de la vitesse de flux et les simulations numériques des concentrations d'espèces lors d'une irradiation sous flux.

D.1 Culture cellulaire

Nous souhaitons ensemercer des cellules sur une fraction de lame en verre de $25\text{mm} \times 75\text{mm} \times 0.170\text{mm}$ (Ibidi, ref 10812), de la forme d'un canal de $50\text{mm} \times 5\text{mm}$. Pour ce faire, la zone qui n'est pas à ensemercer est recouverte d'une fine couche de graisse à vide (Apiezon 'M Grease' Silicon & Halogen free 25g). La graisse à vide est hydrophobe et permet de déposer 1mL de milieu de culture (DMEM) contenant des cellules sur le canal. Les cellules sont cultivées pendant 48h, avec un changement de milieu au bout de 24h. Une confluence d'environ 50% est attendue à la fin des 48h. Pour ne pas faire subir aux cellules un choc osmotique, un film de milieu doit toujours couvrir les cellules.

48h après ensemencement, le milieu de culture est retiré et remplacé par du PBS contenant 1X de CellTox Green. Le PBS est retiré pour l'assemblage de la lame avec une puce en plastique dans lequel est gravé un canal ouvert de $50\text{mm} \times 5\text{mm} \times 0.1\text{mm}$ (Ibidi, ref 81128). Une pression est appliquée sur la zone de contact entre la puce et la graisse à vide pour assurer l'adhésion de deux composants. Du PBS (contenant 1X de CellTox Green) est ajouté jusqu'à remplir le canal et les deux entrées.

La puce est ensuite reliée au circuit fluide et placée sous le microscope. Avant de relier la puce, le circuit est rempli avec du PBS à température ambiante contenant 1X de CellTox Green, et le flux (0.5mL/h) stabilisé. Une puce sans cellules est reliée au circuit le temps de la stabilisation du flux.

D.2 Concentrations des espèces chimiques

Les cellules sont irradiées en présence d'un flux de 0.5mL/h (soit une vitesse moyenne $V_{\text{moy}}=0.19\text{mm/s}$ dans un canal de section $5\text{mm} \times 0.15\text{mm}$) en [section 3.3.4](#). Des simulations permettent d'estimer l'effet du flux sur le profil de concentration spatial des espèces, et les éventuelles asymétries engendrées.

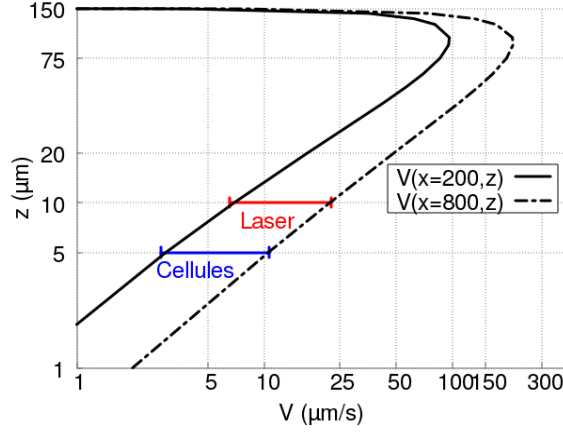


FIGURE D.1 – **Profil théorique de la vitesse de flux**, dans un canal de section $5\text{mm} \times 150\ \mu\text{m}$ pour un flux de 0.5mL/h (vitesse moyenne $v_m=0.19\ \text{mm/s}$). Les deux profils tracés donnent un encadrement des vitesses de flux en fonction de la position des cellules dans le canal.

D.2.1 Vitesse de flux

La vitesse du flux détermine l'effet du flux sur les cellules et sur la diffusion des espèces extracellulaires. Un renouvellement trop faible du milieu provoque de la mort cellulaire (déplétion des nutriments etc.). Un flux trop grand exerce de fortes contraintes de cisaillement sur les cellules, et provoque des dommages. Une vitesse moyenne de flux $V_{moy}=0.19\text{mm/s}$ produit des contraintes de cisaillement $<0.2\ \text{dyn/cm}^2$ ^[251], en théorie trop faibles pour endommager des cellules MCF-7^[252-254]. Nous constatons une perte d'adhérence chez certaines cellules pour des vitesses de flux de l'ordre de $V_{moy}=1\text{mm/s}$.

La vitesse du flux en tout point du canal peut être calculée analytiquement^[340]. L'équation analytique est une approximation calculée par la méthode intégrale de Ritz^[341] (équations (D.1) et (D.2)).

$$U(z) = \frac{6U}{b h^3}(hz - z^2) \quad (\text{D.1})$$

$$U(Y, Z) = \frac{2}{9}U(1 - Y^2)(1 - Z^2)(9 + 8YZ) \quad (\text{D.2})$$

Avec b la largeur du canal ($b=5\text{mm}$), h la hauteur du canal ($h=0.15\text{mm}$), U la vitesse moyenne de flux dans le canal, $Y=2(y-y_0)/b$, $Z=2(z-z_0)/h$, et (y_0, z_0) les coordonnées correspondant à la vitesse de flux maximale (soit le centre de la section de $5\text{mm} \times 0.150\text{mm}$ du canal).

La vitesse de flux suit un profil spatial parabolique (annexe D.2.1). La position des cellules irradiées par rapport au bord du canal détermine la vitesse de flux. Les cellules sont adhérentes au fond du canal ($0 < z < 5\ \mu\text{m}$). A hauteur des cellules, $z=5\ \mu\text{m}$, la vitesse de flux vaut $3 < U < 10\ \mu\text{m/s}$. Au niveau du point focal du laser $z=10\ \mu\text{m}$, $7 < U < 22\ \mu\text{m/s}$.

D.2.2 Simulation de la concentration d'espèces

La flux a une conséquence sur la concentration d'espèces chimiques, et peut induire une asymétrie de concentration selon l'axe de propagation du flux. L'effet du flux, simulé numériquement, dépend de la durée de demi-vie de l'espèce considérée. Les profils de concentration obtenus pour des espèces chimiques subissant une dégradation du premier ordre sont représentés figure D.2.

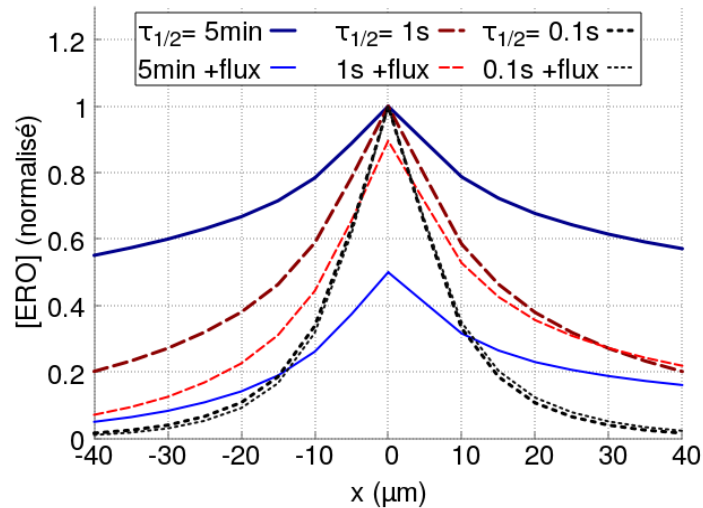


FIGURE D.2 – Simulation du profil de concentration [ERO] avec et sans flux pour des espèces de demi-vie $\tau_{1/2}$. Espèces subissant une dégradation du 1^{er} ordre dans le PBS. Le flux est dirigé de X- (amont) en X+ (aval). La concentration d'ERO est normalisée par rapport à la concentration X=0 en absence de flux. La concentration est moyennée en z, sur $0 < z < 5 \mu\text{m}$ (hauteur d'une cellule), et Y=0 (position laser). Une forte asymétrie apparaît en présence de flux pour $\tau_{1/2} \sim 1\text{s}$. De plus, pour $\tau_{1/2} \sim 5\text{min}$, la concentration d'ERO est fortement réduite.

La simulation d'une irradiation en présence de flux requiert quelques modifications de la physique utilisée dans le logiciel Comsol Multiphysics pour simuler les concentrations d'espèces sans flux. Une physique "écoulement laminaire" est ajouté en amont de la physique de transport d'espèces diluées. Un flux laminaire entrant avec vitesse moyenne $V_{moy} = 0.19 \text{ mm.s}^{-1}$ définit le flux de 0.5mL/h dans un canal. Le profil de concentration est calculé une fois l'état stationnaire du flux atteint.

Bibliographie

- [1] Sivery, A., Anquez, F., Pierlot, C., Aubry, J. M., & Courtade, E. (2013). Singlet oxygen ($^1\text{O}_2$) generation upon 1270 nm laser irradiation of ground state oxygen ($^3\text{O}_2$) dissolved in organic solvents : simultaneous and independent determination of $^1\text{O}_2$ production rate and reactivity with chemical traps. *Chemical Physics Letters*, 555, 252-257.
- [2] Sivery, A., Barras, A., Boukherroub, R., Pierlot, C., Aubry, J. M., Anquez, F., & Courtade, E. (2014). Production rate and reactivity of singlet oxygen $^1\text{O}_2$ ($1\Delta_g$) directly photoactivated at 1270 nm in lipid nanocapsules dispersed in water. *The Journal of Physical Chemistry C*, 118(5), 2885-2893.
- [3] Anquez, F., El Yazidi-Belkoura, I., Randoux, S., Suret, P., & Courtade, E. (2012). Cancerous cell death from sensitizer free photoactivation of singlet oxygen. *Photochemistry and Photobiology*, 88(30), 167-174.
- [4] Anquez, F., Belkoura, I. E. Y., Suret, P., Randoux, S., & Courtade, E. (2012). Cell death induced by direct laser activation of singlet oxygen at 1270 nm. *Laser Physics*, 23(2), 025601.
- [5] Anquez, F., E. Courtade, A. Sivery, P. Suret & S. Randoux (2010) A high-power tunable Raman fiber ring laser for the investigation of singlet oxygen production from direct laser excitation around 1270nm. *Optics Express* 18, 22928-22936.
- [6] Krasnovsky Jr, A. A., & Ambartzumian, R. V. (2004). Tetracene oxygenation caused by infrared excitation of molecular oxygen in air-saturated solutions : the photoreaction action spectrum and spectroscopic parameters of the $1\Delta_g \leftarrow 3\Sigma_g$ -transition in oxygen molecules. *Chemical physics letters*, 400(4-6), 531-535.
- [7] Krasnovsky Jr, A. A., Drozdova, N. N., Roubal, Y. V., Ivanov, A. V., & Ambartzumian, R. V. (2005). Biophotonics of molecular oxygen : activation efficiencies upon direct and photosensitized excitation. *Chinese Optics Letters*, 3(101), S1-S4.
- [8] Krasnovsky Jr, A. A., & Kozlov, A. S. (2016). Photonics of dissolved oxygen molecules. Comparison of the rates of direct and photosensitized excitation of oxygen and reevaluation of the oxygen absorption coefficients. *Journal of Photochemistry and Photobiology A : Chemistry*, 329, 167-174.
- [9] Yusupov, A. S., Goncharov, S. E., Zalevskii, I. D., Paramonov, V. M., & Kurkov, A. S. (2010). Raman fiber laser for the drug-free photodynamic therapy. *Laser Physics*, 20(2), 357-359.
- [10] Sokolovski, S. G., Zolotovskaya, S. A., Goltsov, A., Pourreyron, C., South, A. P., & Rafailov, E. U. (2013). Infrared laser pulse triggers increased singlet oxygen production in tumour cells. *Scientific reports*, 3, 3484.
- [11] Dougherty, T. J., Grindey, G. B., Fiel, R., Weishaupt, K. R., & Boyle, D. G. (1975). Photoradiation therapy. II. Cure of animal tumors with hematoporphyrin and light. *Journal of the National Cancer Institute*, 55(1), 115-121.
- [12] Dougherty, T. J., Kaufman, J. E., Goldfarb, A., Weishaupt, K. R., Boyle, D., & Mittleman, A. (1978). Photoradiation therapy for the treatment of malignant tumors. *Cancer research*, 38(8), 2628-2635.
- [13] Dolmans, D. E., Fukumura, D., & Jain, R. K. (2003). Photodynamic therapy for cancer. *Nature reviews cancer*, 3(5), 380.

- [14] Agostinis, P., Berg, K., Cengel, K. A., Foster, T. H., Girotti, A. W., Gollnick, S. O., ... & Korbek, M. (2011). Photodynamic therapy of cancer : an update. *CA : a cancer journal for clinicians*, 61(4), 250-281
- [15] Quirk, B. J., Brandal, G., Donlon, S., Vera, J. C., Mang, T. S., Foy, A. B., ... & Connelly, J. M. (2015). Photodynamic therapy (PDT) for malignant brain tumors—where do we stand?. *Photodiagnosis and photodynamic therapy*, 12(3), 530-544.
- [16] Baptista, M. S., Cadet, J., Di Mascio, P., Ghogare, A. A., Greer, A.,... & Vignoni, M. (2017). Type I and type II photosensitized oxidation reactions : guidelines and mechanistic pathways. *Photochemistry and photobiology*, 93(4), 912-919.
- [17] Wilson, B. C., Patterson, M. S., & Lilge, L. (1997). Implicit and explicit dosimetry in photodynamic therapy : a new paradigm. *Lasers in medical science*, 12(3), 182-199.
- [18] Li, B., Lin, L., Lin, H., & Wilson, B. C. (2016). Photosensitized singlet oxygen generation and detection : Recent advances and future perspectives in cancer photodynamic therapy. *Journal of biophotonics*, 9(11-12), 1314-1325.
- [19] Dysart, J. S., Singh, G., & Patterson, M. S. (2005). Calculation of singlet oxygen dose from photosensitizer fluorescence and photobleaching during mTHPC photodynamic therapy of MLL cells. *Photochemistry and photobiology*, 81(1), 196-205.
- [20] Niedre, M. J., Yu, C. S., Patterson, M. S., & Wilson, B. C. (2005). Singlet oxygen luminescence as an in vivo photodynamic therapy dose metric : validation in normal mouse skin with topical amino-levulinic acid. *British journal of cancer*, 92(2), 298.
- [21] Jarvi, M. T., Patterson, M. S., & Wilson, B. C. (2012). Insights into photodynamic therapy dosimetry : simultaneous singlet oxygen luminescence and photosensitizer photobleaching measurements. *Biophysical journal*, 102(3), 661-671.
- [22] Wilson, B. C., Patterson, M. S., Li, B., & Jarvi, M. T. (2015). Correlation of in vivo tumor response and singlet oxygen luminescence detection in mTHPC-mediated photodynamic therapy. *Journal of Innovative Optical Health Sciences*, 8(01), 1540006.
- [23] Ogilby, P. R. (2010). Singlet oxygen : there is indeed something new under the sun. *Chemical Society Reviews*, 39(8), 3181-3209.
- [24] Snyder, J. W., Skovsen, E., Lambert, J. D., Poulsen, L., & Ogilby, P. R. (2006). Optical detection of singlet oxygen from single cells. *Physical Chemistry Chemical Physics*, 8(37), 4280-4293.
- [25] Jenny, T. A., & Turro, N. J. (1982). Solvent and deuterium isotope effects on the lifetime of singlet oxygen determined by direct emission spectroscopy at 1.27 μm . *Tetrahedron Letters*, 23(29), 2923-2926.
- [26] Borgia, F., Giuffrida, R., Caradonna, E., Vaccaro, M., Guarneri, F., & Cannavo, S. P. (2018). Early and Late Onset Side Effects of Photodynamic Therapy. *Biomedicines*, 6(1), 12.
- [27] West, C. M. L. (1989). Size-dependent resistance of human tumour spheroids to photodynamic treatment. *British journal of cancer*, 59(4), 510.
- [28] Chen, Y. C., Lou, X., Zhang, Z., Ingram, P., & Yoon, E. (2015). High-throughput cancer cell sphere formation for characterizing the efficacy of photodynamic therapy in 3D cell cultures. *Scientific reports*, 5, 12175.
- [29] Cramer, G. M., Jones, D. P., El-Hamidi, H., & Celli, J. P. (2016). ECM composition and rheology regulate growth, motility, and response to photodynamic therapy in 3D models of pancreatic ductal adenocarcinoma. *Molecular Cancer Research*.
- [30] Manoto, S. L., Houreld, N. N., & Abrahamse, H. (2013). Phototoxic effect of photodynamic therapy on lung cancer cells grown as a monolayer and three dimensional multicellular spheroids. *Lasers in surgery and medicine*, 45(3), 186-194.

- [31] Muehlmann, L. A., Rodrigues, M. C., Longo, J. P. F., Garcia, M. P., Py-Daniel, K. R., Veloso, A. B., ... & Azevedo, R. B. (2015). Aluminium-phthalocyanine chloride nanoemulsions for anticancer photodynamic therapy : Development and in vitro activity against monolayers and spheroids of human mammary adenocarcinoma MCF-7 cells. *Journal of nanobiotechnology*, 13(1), 36.
- [32] Nichols, M. G., & Foster, T. H. (1994). Oxygen diffusion and reaction kinetics in the photodynamic therapy of multicell tumour spheroids. *Physics in Medicine & Biology*, 39(12), 2161.
- [33] Foster, T. H., Hartley, D. F., Nichols, M. G., & Hilf, R. (1993). Fluence rate effects in photodynamic therapy of multicell tumor spheroids. *Cancer research*, 53(6), 1249-1254.
- [34] Coutier, S., Mitra, S., Bezdetsnaya, L. N., Parache, R. M., Georgakoudi, I., Foster, T. H., & Guillemin, F. (2001). Effects of Fluence Rate on Cell Survival and Photobleaching in Meta-Tetra-(hydroxyphenyl) chlorin-photosensitized Colo 26 Multicell Tumor Spheroids. *Photochemistry and photobiology*, 73(3), 297-303.
- [35] Wang, K. K. H., Mitra, S., & Foster, T. H. (2008). Photodynamic dose does not correlate with long-term tumor response to mTHPC-PDT performed at several drug-light intervals. *Medical physics*, 35(8), 3518-3526.
- [36] Zhu, T. C., Kim, M. M., Liang, X., Finlay, J. C., & Busch, T. M. (2015). In-vivo singlet oxygen threshold doses for PDT. *Photonics & lasers in medicine*, 4(1), 59-71.
- [37] Kapellos, G. E., Alexiou, T. S., & Payatakes, A. C. (2007). A multiscale theoretical model for diffusive mass transfer in cellular biological media. *Mathematical biosciences*, 210(1), 177-237.
- [38] Stratonnikov, A. A., Meerovich, G. A., & Loschenov, V. B. (2000). Photobleaching of photosensitizers applied for photodynamic therapy. *Optical Methods for Tumor Treatment and Detection : Mechanisms and Techniques in Photodynamic Therapy IX* (Vol. 3909, pp. 81-92). International Society for Optics and Photonics.
- [39] Georgakoudi, I., & Foster, T. H. (1998). Singlet oxygen- versus non singlet oxygen-mediated mechanisms of sensitizer photobleaching and their effects on photodynamic dosimetry. *Photochemistry and photobiology*, 67(6), 612-625.
- [40] Weston, M. A., & Patterson, M. S. (2014). Measurement of intracellular oxygen concentration during photodynamic therapy in vitro. *Photochemistry and photobiology*, 90(4), 878-888.
- [41] Wang, K. K. H., Finlay, J. C., Busch, T. M., Hahn, S. M., & Zhu, T. C. (2010). Explicit dosimetry for photodynamic therapy : macroscopic singlet oxygen modeling. *Journal of biophotonics*, 3(5-6), 304-318.
- [42] Redmond, R. W., & Gamlin, J. N. (1999). A compilation of singlet oxygen yields from biologically relevant molecules. *Photochemistry and photobiology*, 70(4), 391-475.
- [43] Ormond, A. B., & Freeman, H. S. (2013). Dye sensitizers for photodynamic therapy. *Materials*, 6(3), 817-840.
- [44] Abrahamse, H., & Hamblin, M. R. (2016). New photosensitizers for photodynamic therapy. *Biochemistry*, 473(4), 347-364.
- [45] Aveline, B., Hasan, T., & Redmond, R. W. (1994). Photophysical and photosensitizing properties of benzoporphyrin derivative monoacid ring A (BPD-MA). *Photochemistry and photobiology*, 59(3), 328-335.
- [46] Felgenträger, A., Maisch, T., Dobler, D., & Späth, A. (2013). Hydrogen bond acceptors and additional cationic charges in methylene blue derivatives : photophysics and antimicrobial efficiency. *BioMed research international*, 2013.
- [47] Foster, T. H., Murant, R. S., Bryant, R. G., Knox, R. S., Gibson, S. L., & Hilf, R. (1991). Oxygen consumption and diffusion effects in photodynamic therapy. *Radiation research*, 126(3), 296-303.

- [48] Hu, X. H., Feng, Y., Lu, J. Q., Allison, R. R., Cuenca, R. E., Downie, G. H., & Sibata, C. H. (2005). Modeling of a type II photofrin-mediated photodynamic therapy process in a heterogeneous tissue phantom. *Photochemistry and photobiology*, 81(6), 1460-1468.
- [49] Kareliotis, G., Liossi, S., & Makropoulou, M. (2018). Assessment of singlet oxygen dosimetry concepts in photodynamic therapy through computational modeling. *Photodiagnosis and photodynamic therapy*, 21, 224-233.
- [50] Abrahamse, H., & Hamblin, M. R. (2016). New photosensitizers for photodynamic therapy. *Biochemical Journal*, 473(4), 347-364.
- [51] da Silva, E. F., Pimenta, F. M., Pedersen, B. W., Blaikie, F. H., Bosio, G. N., Breitenbach, T., ... & Ogilby, P. R. (2016). Intracellular singlet oxygen photosensitizers : on the road to solving the problems of sensitizer degradation, bleaching and relocalization. *Integrative Biology*, 8(2), 177-193.
- [52] Bonnett, R., & Martinez, G. (2001). Photobleaching of sensitizers used in photodynamic therapy. *Tetrahedron*, 57(47), 9513-9547.
- [53] Bregnhøj, M., Blázquez-Castro, A., Westberg, M., Breitenbach, T., & Ogilby, P. R. (2015). Direct 765 nm optical excitation of molecular oxygen in solution and in single mammalian cells. *The Journal of Physical Chemistry B*, 119(17), 5422-5429.
- [54] Westberg, M., Bregnhøj, M., Blázquez-Castro, A., Breitenbach, T., Etzerodt, M., & Ogilby, P. R. (2016). Control of singlet oxygen production in experiments performed on single mammalian cells. *Journal of Photochemistry and Photobiology A : Chemistry*, 321, 297-308.
- [55] Blázquez-Castro, A. (2017). Direct $^1\text{O}_2$ optical excitation : A tool for redox biology. *Redox biology*, 13, 39-59.
- [56] Anquez, F., Sivéry, A., El Yazidi-Belkoura, I., Zemmouri, J., Suret, P., Randoux, S., & Courtade, E. (2016). Production of Singlet Oxygen by Direct Photoactivation of Molecular Oxygen. In *Singlet Oxygen* (pp. 75-91).
- [57] Saenko, Y. V., Glushchenko, E. S., Zolotovskii, I. O., Sholokhov, E., & Kurkov, A. (2016). Mitochondrial dependent oxidative stress in cell culture induced by laser radiation at 1265 nm. *Lasers in medical science*, 31(3), 405-413.
- [58] Gening, T. Y. P., Voronova, O. G. S., Dolgova, D. R., Abakumova, T. Y. V., Zolotovskii, I. O., Sholokhov, E. M., ... & Gening, S. O. (2012). Analysis of the efficiency of using 1265-nm cw laser radiation for initiating oxidative stress in the tissue of a solid malignant tumour. *Quantum Electronics*, 42(9), 805-807.
- [59] Khokhlova, A., Zolotovskii, I., Stoliarov, D., Vorsina, S., Liamina, D., Pogodina, E., ... & Rafailov, E. U. (2019). The Photobiomodulation of Vital Parameters of the Cancer Cell Culture by Low Dose of Near-IR Laser Irradiation. *IEEE Journal of Selected Topics in Quantum Electronics*, 25(1), 1-10.
- [60] Weldor, D., Poulsen, T. D., Mikkelsen, K. V., & Ogilby, P. R. (1999). Singlet sigma : the "other" singlet oxygen in solution. *Photochemistry and photobiology*, 70(4), 369-379.
- [61] Bregnhøj, M., Westberg, M., Minaev, B. F., & Ogilby, P. R. (2017). Singlet Oxygen Photophysics in Liquid Solvents : Converging on a Unified Picture. *Accounts of chemical research*, 50(8), 1920-1927.
- [62] Kolev N.I. (2011) Solubility of O₂, N₂, H₂ and CO₂ in water. In : *Multiphase Flow Dynamics 4*. Springer, Berlin, Heidelberg.
- [63] Wagner, B. A., Venkataraman, S., & Buettner, G. R. (2011). The rate of oxygen utilization by cells. *Free Radical Biology and Medicine*, 51(3), 700-712.
- [64] Cook, C. C., Kim, A., Terao, S., Gotoh, A., & Higuchi, M. (2013). Consumption of oxygen : a mitochondrial-generated progression signal of advanced cancer. *Cell death & disease*, 3(1), e258.
- [65] Blázquez-Castro, A., Breitenbach, T., & Ogilby, P. R. (2014). Singlet oxygen and ROS in a new light : low-dose subcellular photodynamic treatment enhances proliferation at the single cell level. *Photochemical & Photobiological Sciences*, 13(9), 1235-1240.

- [66] Zhou, X., Wang, Y., Si, J., Zhou, R., Gan, L., Di, C., ... & Zhang, H. (2015). Laser controlled singlet oxygen generation in mitochondria to promote mitochondrial DNA replication in vitro. *Scientific reports*, 5, 16925.
- [67] Sasnauskiene, A., Kadziauskas, J., Vezelyte, N., Jonusiene, V., & Kirvelienu, V. (2009). Damage targeted to the mitochondrial interior induces autophagy, cell cycle arrest and, only at high doses, apoptosis. *Autophagy*, 5(5), 743-744.
- [68] Blazquez-Castro, A., Breitenbach, T., & Ogilby, P. R. (2018). Cell cycle modulation through sub-cellular spatially resolved production of singlet oxygen via direct 765 nm irradiation : manipulating the onset of mitosis. *Photochemical & Photobiological Sciences*.
- [69] Girotti, A. W. (2001). Photosensitized oxidation of membrane lipids : reaction pathways, cytotoxic effects, and cytoprotective mechanisms. *Journal of Photochemistry and Photobiology B : Biology*, 63(1-3), 103-113.
- [70] Onyango, A. N. (2016). Endogenous generation of singlet oxygen and ozone in human and animal tissues : mechanisms, biological significance, and influence of dietary components. *Oxidative medicine and cellular longevity*, 2016.
- [71] Michaeli A, Feitelson J. (1994) Reactivity of singlet oxygen toward amino acids and peptides. *Photochemistry and Photobiology* 59 :284-298.
- [72] Rougee M, Bensasson RV, Land EJ, Pariente R. (1988) Deactivation of singlet molecular oxygen by thiols and related compounds, possible protectors against skin photosensitivity. *Photochemistry Photobiology* 47 :485-489.
- [73] Maskos Z, Rush JD, Koppenol WH. (1992) The hydroxylation of tryptophan. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 296 : 514-520.
- [74] Jin F, Lietich J, von Sonntag C. (1995) The photolysis ($\lambda=254$ nm) of tyrosine in aqueous solutions in the absence and presence of oxygen. The reaction of tyrosine with singlet oxygen. *Journal of Photochemistry & Photobiology A*. 92 :147-153.
- [75] Devasagayam, T. P., Steenken, S., Obendorf, M. S., Schulz, W. A., & Sies, H. (1991). Formation of 8-hydroxy (deoxy) guanosine and generation of strand breaks at guanine residues in DNA by singlet oxygen. *Biochemistry*, 30(25), 6283-6289.
- [76] Cadet, J., Ravanat, J. L., Helen, G. W., Yeo, H. C., & Ames, B. N. (1994). [8] Singlet oxygen DNA damage : Chromatographic and mass spectrometric analysis of damage products. In *Methods in enzymology* (Vol. 234, pp. 79-88). Academic Press.
- [77] Bisby, R. H., Morgan, C. G., Hamblett, I., & Gorman, A. A. (1999). Quenching of singlet oxygen by Trolox C, ascorbate, and amino acids : effects of pH and temperature. *The Journal of Physical Chemistry A*, 103(37), 7454-7459.
- [78] Kramarenko, G. G., Hummel, S. G., Martin, S. M., & Buettner, G. R. (2006). Ascorbate reacts with singlet oxygen to produce hydrogen peroxide. *Photochemistry and Photobiology*, 82(6), 1634-1637.
- [79] Hayyan, M., Hashim, M. A., & AlNashef, I. M. (2016). Superoxide ion : generation and chemical implications. *Chemical reviews*, 116(5), 3029-3085.
- [80] Saito, I., Matsuura, T., & Inoue, K. (1983). Formation of superoxide ion via one-electron transfer from electron donors to singlet oxygen. *Journal of the American Chemical Society*, 105(10), 3200-3206.
- [81] Ueda, J. I., Takeshita, K., Matsumoto, S., Yazaki, K., Kawaguchi, M., & Ozawa, T. (2003). Singlet Oxygen-mediated Hydroxyl Radical Production in the Presence of Phenols : Whether DMPO-OH Formation Really Indicates Production of $\cdot\text{OH}$? *Photochemistry and Photobiology*, 77(2), 165-170.
- [82] Takeshita, K., Olea-Azar, C. A., Mizuno, M., & Ozawa, T. (2000). Singlet oxygen-dependent hydroxyl radical formation during uroporphyrin-mediated photosensitization in the presence of NADPH. *Antioxidants & redox signaling*, 2(2), 355-362.

- [83] <http://photobiology.info/Buettner.html>
- [84] Reiter, R. J. (1998). Melatonin, active oxygen species and neurological damage. *Drug News and Perspectives*, 11(5), 291-296.
- [85] Bae, Y. S., Oh, H., Rhee, S. G., & Do Yoo, Y. (2011). Regulation of reactive oxygen species generation in cell signaling. *Molecules and cells*, 32(6), 491-509.
- [86] Davalli, P., Mitic, T., Caporali, A., Lauriola, A., & D'Arca, D. (2016). ROS, cell senescence, and novel molecular mechanisms in aging and age-related diseases. *Oxidative medicine and cellular longevity*, 2016.
- [87] Berlett, B. S., & Stadtman, E. R. (1997). Protein oxidation in aging, disease, and oxidative stress. *Journal of Biological Chemistry*, 272(33), 20313-20316.
- [88] Cabiscol Català, E., Tamarit Sumalla, J., & Ros Salvador, J. (2000). Oxidative stress in bacteria and protein damage by reactive oxygen species. *International Microbiology*, 2000, vol. 3, núm. 1, p. 3-8.
- [89] Hauck, A. K., & Bernlohr, D. A. (2016). Oxidative stress and lipotoxicity. *Journal of lipid research*, jlr-R066597.
- [90] Chakraborty, A., Held, K. D., Prise, K. M., Liber, H. L., & Redmond, R. W. (2009). Bystander effects induced by diffusing mediators after photodynamic stress. *Radiation research*, 172(1), 74-81.
- [91] Yakes, F. M., & Van Houten, B. (1997). Mitochondrial DNA damage is more extensive and persists longer than nuclear DNA damage in human cells following oxidative stress. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 94(2), 514-519.
- [92] Barzilai, A., & Yamamoto, K. I. (2004). DNA damage responses to oxidative stress. *DNA repair*, 3(8), 1109-1115.
- [93] Kryston, T. B., Georgiev, A. B., Pissis, P., & Georgakilas, A. G. (2011). Role of oxidative stress and DNA damage in human carcinogenesis. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 711(1), 193-201.
- [94] Finkel, T., & Holbrook, N. J. (2000). Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing. *Nature*, 408(6809), 239.
- [95] Giorgio, M., Trinei, M., Migliaccio, E., & Pelicci, P. G. (2007). Hydrogen peroxide : a metabolic by-product or a common mediator of ageing signals?. *Nature reviews Molecular cell biology*, 8(9), 722.
- [96] Birch-Machin, M. A., & Bowman, A. (2016). Oxidative stress and ageing. *British Journal of Dermatology*, 175, 26-29.
- [97] Sosa, V., Moliné, T., Somoza, R., Paciucci, R., Kondoh, H., & LLeonart, M. E. (2013). Oxidative stress and cancer : an overview. *Ageing research reviews*, 12(1), 376-390.
- [98] Visconti, R., & Grieco, D. (2009). New insights on oxidative stress in cancer. *Current opinion in drug discovery & development*, 12(2), 240-245.
- [99] Rains, J. L., & Jain, S. K. (2011). Oxidative stress, insulin signaling, and diabetes. *Free Radical Biology and Medicine*, 50(5), 567-575.
- [100] Evans, J. L., Goldfine, I. D., Maddux, B. A., & Grodsky, G. M. (2003). Are oxidative stress-activated signaling pathways mediators of insulin resistance and β -cell dysfunction?. *Diabetes*, 52(1), 1-8.
- [101] Halliwell, B. (2006). Oxidative stress and neurodegeneration : where are we now?. *Journal of neurochemistry*, 97(6), 1634-1658.
- [102] Andersen, J. K. (2004). Oxidative stress in neurodegeneration : cause or consequence?. *Nature medicine*, 10(7), S18.

- [103] Aitken, R. J., & Krausz, C. (2001). Oxidative stress, DNA damage and the Y chromosome. *Reproduction*, 122(4), 497-506.
- [104] Davies, K. J. (2000). Oxidative stress, antioxidant defenses, and damage removal, repair, and replacement systems. *IUBMB life*, 50(4-5), 279-289.
- [105] Espinosa-Diez, C., Miguel, V., Mennerich, D., Kietzmann, T., Sánchez-Pérez, P., Cadenas, S., & Lamas, S. (2015). Antioxidant responses and cellular adjustments to oxidative stress. *Redox biology*, 6, 183-197.
- [106] Oleinick, N. L., Morris, R. L., & Belichenko, I. (2002). The role of apoptosis in response to photodynamic therapy : what, where, why, and how. *Photochemical & Photobiological Sciences*, 1(1), 1-21.
- [107] Higgins, G., Beart, P. & Nagley P. (2012). Apoptosis, Necrosis and Much More - Is oxidative stress getting on your nerves? *Australian Biochemist.* 43, 1, p.16-20.
- [108] Plaetzer, K., Kiesslich, T., Krammer, B., & Hammerl, P. (2002). Characterization of the cell death modes and the associated changes in cellular energy supply in response to ALPcS 4-PDT. *Photochemical & Photobiological Sciences*, 1(3), 172-177.
- [109] Mroz, P., Yaroslavsky, A., Kharkwal, G. B., & Hamblin, M. R. (2011). Cell death pathways in photodynamic therapy of cancer. *Cancers*, 3(2), 2516-2539.
- [110] Shen, S., Kepp, O. & Kroemer, G. (2012). The end of autophagic cell death? *Autophagy* 8, 1-3.
- [111] Fuchs, Y., & Steller, H. (2015). Live to die another way : modes of programmed cell death and the signals emanating from dying cells. *Nature reviews Molecular cell biology*, 16(6), 329.
- [112] Liu, Y., & Levine, B. (2015). Autosis and autophagic cell death : the dark side of autophagy. *Cell death and differentiation*, 22(3), 367.
- [113] Yonekawa, T., & Thorburn, A. (2013). Autophagy and cell death. *Essays in biochemistry*, 55, 105-117.
- [114] Swart, C., Du Toit, A., & Loos, B. (2016). Autophagy and the invisible line between life and death. *European journal of cell biology*, 95(12), 598-610.
- [115] Kroemer, G., Galluzzi, L., Vandenabeele, P., Abrams, J., Alnemri, E. S., Baehrecke, E. H., ... & Hengartner, M. (2009). Classification of cell death : recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2009. *Cell death and differentiation*, 16(1), 3.
- [116] Galluzzi, L., Vitale, I., Abrams, J. M., Alnemri, E. S., Baehrecke, E. H., Blagosklonny, M. V., ... & Gottlieb, E. (2012). Molecular definitions of cell death subroutines : recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2012. *Cell death and differentiation*, 19(1), 107.
- [117] Vanden Berghe, T., Kaiser, W. J., Bertrand, M. J., & Vandenabeele, P. (2015). Molecular crosstalk between apoptosis, necroptosis, and survival signaling. *Molecular & Cellular Oncology*, 2(4), e975093.
- [118] Jain, M. V., Paczulla, A. M., Klonisch, T., Dingba, F. N., ... ,& Los, M. (2013). Interconnections between apoptotic, autophagic and necrotic pathways : Implications for cancer therapy development. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 17(1), 12-29.
- [119] Berghe, T. V., Linkermann, A., Jouan-Lanhouet, S., Walczak, H., & Vandenabeele, P. (2014). Regulated necrosis : the expanding network of non-apoptotic cell death pathways. *Nature reviews Molecular cell biology*, 15(2), 135.
- [120] Higgins, G. C., Beart, P. M., Shin, Y. S., Chen, M. J., Cheung, N. S., & Nagley, P. (2010). Oxidative stress : emerging mitochondrial and cellular themes and variations in neuronal injury. *Journal of alzheimer's disease*, 20(s2), S453-S473.
- [121] Leist, M. & Jäättelä, M. (2001). Four deaths and a funeral : from caspases to alternative mechanisms. *Natural reviews Molecular cell biology.* 2, 589-598

- [122] Pampaloni, F., Reynaud, E. G., & Stelzer, E. H. (2007). The third dimension bridges the gap between cell culture and live tissue. *Nature reviews Molecular cell biology*, 8(10), 839.
- [123] Evans, C.L., Abu-Yousif, A.O., Park, Y.J., Klein, O.J., ... & Hasan, T. (2011). Killing hypoxic cell populations in a 3D tumor model with EtNBS-PDT. *PLoS one*, 6(8), e23434.
- [124] Lin, R.Z., & Chang, H.Y. (2008). Recent advances in three-dimensional multicellular spheroid culture for biomedical research. *Biotechnology journal*, 3(9-10), 1172-1184.
- [125] Jacques, S. L. (2013). Optical properties of biological tissues: a review. *Physics in Medicine & Biology*, 58(11), R37.
- [126] Grimes, D. R., Kelly, C., Bloch, K., & Partridge, M. (2014). A method for estimating the oxygen consumption rate in multicellular tumour spheroids. *Journal of The Royal Society Interface*, 11(92), 20131124.
- [127] Grimes, D. R., & Currell, F. J. (2018). Oxygen diffusion in ellipsoidal tumor spheroids. *bioRxiv*, 271890. **[Preprint]**
- [128] Langan, L. M., Dodd, N. J., Owen, S. F., Purcell, W. M., Jackson, S. K., & Jha, A. N. (2016). Direct measurements of oxygen gradients in spheroid culture system using electron parametric resonance oximetry. *PLoS One*, 11(2), e0149492.
- [129] Mueller-Klieser, W. F., & Sutherland, R. M. (1982). Oxygen tensions in multicell spheroids of two cell lines. *British journal of cancer*, 45(2), 256.
- [130] Carlsson, J., & Yuhas, J. M. (1984). Liquid-overlay culture of cellular spheroids. In *Spheroids in cancer research* (pp. 1-23). Springer, Berlin, Heidelberg.
- [131] Hanahan, D., & Weinberg, R. A. (2011). Hallmarks of cancer : the next generation. *Cell*, 144(5), 646-674.
- [132] Santini, M.T., & Rainaldi, G. (1999). Three-dimensional spheroid model in tumor biology. *Pathology*, 67(3), 148-157.
- [133] Mehta, G., Hsiao, A. Y., Ingram, M., Luker, G. D., & Takayama, S. (2012). Opportunities and challenges for use of tumor spheroids as models to test drug delivery and efficacy. *Journal of Controlled Release*, 164(2), 192-204.
- [134] Hirschhaeuser, F., Menne, H., Dittfeld, C., West, J., Mueller-Klieser, W., Kunz-Schughart, & L. A. (2010). Multicellular tumor spheroids : an underestimated tool is catching up again. *Journal of biotechnology*, 148(1), 3-15.
- [135] Jędrzejczak-Silicka, M. (2017). History of Cell Culture. *New Insights into Cell Culture Technology*. InTech.
- [136] Scherer, K. M., Bisby, R. H., Botchway, S. W., Hadfield, J. A., Haycock, J. W., & Parker, A. W. (2015). Three-dimensional imaging and uptake of the anticancer drug combretastatin in cell spheroids and photoisomerization in gels with multiphoton excitation. *Journal of biomedical optics*, 20(7), 078003.
- [137] Sandell, J. L., & Zhu, T. C. (2011). A review of in-vivo optical properties of human tissues and its impact on PDT. *Journal of biophotonics*, 4(11-12), 773-787.
- [138] Mallidi, S., Anbil, S., Bulin, A. L., Obaid, G., Ichikawa, M., & Hasan, T. (2016). Beyond the barriers of light penetration : strategies, perspectives and possibilities for photodynamic therapy. *Theranostics*, 6(13), 2458.
- [139] Pacheco-Marín, R., Melendez-Zajgla, J., Castillo-Rojas, G., ... & Maldonado, V. (2016). Transcriptome profile of the early stages of breast cancer tumoral spheroids. *Scientific reports*, 6, 23373.
- [140] Kopp, S., Sahana, J., Islam, T., Petersen, A. G., Bauer, J., Corydon, T. J., ... & Riwaltdt, S. (2018). The role of NF κ B in spheroid formation of human breast cancer cells cultured on the Random Positioning Machine. *Scientific reports*, 8(1), 921.

- [141] Friedrich, J., Ebner, R., & Kunz-Schughart, L. A. (2007). Experimental anti-tumor therapy in 3-D : spheroids—old hat or new challenge?. *International journal of radiation biology*, 83(11-12), 849-871.
- [142] Astashkina, A., & Grainger, D. W. (2014). Critical analysis of 3-D organoid in vitro cell culture models for high-throughput drug candidate toxicity assessments. *Advanced drug delivery reviews*, 69, 1-18.
- [143] Pereira, P. M., Berisha, N., Bhupathiraju, N. D. K., Fernandes, R., Tomé, J. P., & Drain, C. M. (2017). Cancer cell spheroids are a better screen for the photodynamic efficiency of glycosylated photosensitizers. *PLoS one*, 12(5), e0177737.
- [144] Lim S.H., Chang W. & Sagong M. (2013). Efficacy of half-fluence photodynamic therapy depending on the degree of choroidal hyperpermeability in chronic central serous chorioretinopathy. *Eye (Basingstoke)*, 27(3), 353–362.
- [145] Reibaldi M., Cardascia N.,... & Boscia F. (2009) Standard-Fluence versus Low-Fluence Photodynamic Therapy in Chronic Central Serous Chorioretinopathy : A Nonrandomized Clinical Trial. *American Journal of Ophthalmology*, 149(2) 307-315.
- [146] Henderson, B. W., Busch, T. M., & Snyder, J. W. (2006). Fluence rate as a modulator of PDT mechanisms. *Lasers in surgery and medicine*, 38(5), 489-493.
- [147] Mathews, M. S., Angell-Petersen, E., Sanchez, R.,... & Madsen, S.J. (2009). The effects of ultra low fluence rate single and repetitive photodynamic therapy on glioma spheroids. *Lasers in surgery and medicine*, 41(8), 578-584.
- [148] Hartl, B. A., Hirschberg, H., Marcu, L., & Cherry, S. R. (2015). Characterizing low fluence thresholds for in vitro photodynamic therapy. *Biomedical Optics Express*, 6(3), 770.
- [149] Teshima, S., Rokutan, K., Nikawa, T., & Kishi, K. (1998). Guinea pig gastric mucosal cells produce abundant superoxide anion through an NADPH oxidase-like system. *Gastroenterology*, 115(5), 1186-1196.
- [150] Bagchi, D., Bhattacharya, G., & Stohs, S. J. (1996). Production of reactive oxygen species by gastric cells in association with *Helicobacter pylori*. *Free radical research*, 24(6), 439-450.
- [151] Matsubara, T., & Ziff, M. (1986). Increased superoxide anion release from human endothelial cells in response to cytokines. *The Journal of Immunology*, 137(10), 3295-3298.
- [152] Palmer, K. F., & Williams, D. (1974). Optical properties of water in the near infrared. *JOSA*, 64(8), 1107-1110.
- [153] Hildebrandt, B., Wust, P., Ahlers, O., Dieing, A., Sreenivasa, G., Kerner, T., ... & Riess, H. (2002). The cellular and molecular basis of hyperthermia. *Critical reviews in oncology/hematology*, 43(1), 33-56.
- [154] Khan, I., Tang, E., & Arany, P. (2015). Molecular pathway of near-infrared laser phototoxicity involves ATF-4 orchestrated ER stress. *Scientific reports*, 5, srep10581.
- [155] Belhadj Slimen, I., Najjar, T., Ghram, A., Dabbebi, H., Ben Mrad, M., & Abdrabbah, M. (2014). Reactive oxygen species, heat stress and oxidative-induced mitochondrial damage. A review. *International journal of hyperthermia*, 30(7), 513-523.
- [156] Kikusato, M., Yoshida, H., Furukawa, K., & Toyomizu, M. (2015). Effect of heat stress-induced production of mitochondrial reactive oxygen species on NADPH oxidase and heme oxygenase-1 mRNA levels in avian muscle cells. *Journal of thermal biology*, 52, 8-13.
- [157] Crombie, T. A., Tang, L., Choe, K. P., & Julian, D. (2016). Inhibition of the oxidative stress response by heat stress in *Caenorhabditis elegans*. *Journal of Experimental Biology*, jeb-135327.
- [158] Henyey, L. G., & Greenstein, J. L. (1941). Diffuse radiation in the galaxy. *The Astrophysical Journal*, 93, 70-83.

- [159] Saccomandi, P., Vogel, V., Bazrafshan, B., Schena, E., Vogl, T. J., Silvestri, S., & Mäntele, W. (2014, August). Estimation of anisotropy coefficient and total attenuation of swine liver at 850 nm based on a goniometric technique : influence of sample thickness. In *Engineering in Medicine and Biology Society (EMBC), 2014 36th Annual International Conference of the IEEE* (pp. 5332-5335). IEEE.
- [160] Peters, V. G., Wyman, D. R., Patterson, M. S., & Frank, G. L. (1990). Optical properties of normal and diseased human breast tissues in the visible and near infrared. *Physics in Medicine & Biology*, 35(9), 1317.
- [161] El-Sharkawy, Y. H. (2016). Breast Cancer Detection by Determination of Optical Properties of Non-Malignant and Malignant Breast Tissues. *J Cancer Sci Clin Oncol*, 3(1), 106.
- [162] Source code for scattering model : <http://omlc.org/software/mc/mcxyz/>
- [163] Binzoni, T., Leung, T. S., Gandjbakhche, A. H., Rufenacht, D., & Delpy, D. T. (2006). The use of the Henyey–Greenstein phase function in Monte Carlo simulations in biomedical optics. *Physics in Medicine & Biology*, 51(17), N313.
- [164] Dufour, P., Dufour, S., Castonguay, A., McCarthy, N., & De Koninck, Y. (2006). Microscopie à deux photons pour l'imagerie cellulaire fonctionnelle : avantages et enjeux ou Un photon c'est bien... mais deux c'est mieux!. *médecine/sciences*, 22(10), 837-844.
- [165] Decrock, E., Hoorelbeke, D., Ramadan, R., Delvaeye, T., De Bock, M., Wang, N., ... & Vinken, M. (2017). Calcium, oxidative stress and connexin channels, a harmonious orchestra directing the response to radiotherapy treatment ?. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research*, 1864(6), 1099-1120.
- [166] Georgakilas, A. G. (2014). Bystander and non-targeted effects : A unifying model from ionizing radiation to cancer. *Cancer Letters*, 356(1), 6–7. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2014.03.032>
- [167] Nagasawa, H., Cremesti, A., Kolesnick, R., Fuks, Z., & Little, J. B. (2002). Involvement of membrane signaling in the bystander effect in irradiated cells. *Cancer research*, 62(9), 2531-2534.
- [168] Azzam, E. I., de Toledo, S. M., & Little, J. B. (2003). Oxidative metabolism, gap junctions and the ionizing radiation-induced bystander effect. *Oncogene*, 22(45), 7050.
- [169] Maeda, S., Nakagawa, S., Suga, M., Yamashita, E., Oshima, A., Fujiyoshi, Y., & Tsukihara, T. (2009). Structure of the connexin 26 gap junction channel at 3.5 Å resolution. *Nature*, 458(7238), 597.
- [170] Goodman, T. T., Chen, J., Matveev, K., & Pun, S. H. (2008). Spatio-temporal modeling of nanoparticle delivery to multicellular tumor spheroids. *Biotechnology and bioengineering*, 101(2), 388-399.
- [171] Autsavapornporn, N., de Toledo, S. M., Little, J. B., Jay-Gerin, J. P., Harris, A. L., & Azzam, E. I. (2011). The role of gap junction communication and oxidative stress in the propagation of toxic effects among high-dose α -particle-irradiated human cells. *Radiation research*, 175(3), 347-357.
- [172] Liu, Z., Wang, Q., Fan, L., Wu, D. P., Zhang, Y., Liu, L., & Tao, L. (2015). Gap junction enhances phototoxicity of photodynamic therapy agent 2-[1-hexyloxyethyl]-2-devinylpyropheophorbide-a (HPPH). *Lasers in surgery and medicine*, 47(1), 68-76.
- [173] Wu, D. P., Lin, T. Y., Bai, L. R., Huang, J. L., Zhou, Y., Zhou, N., ... & Yin, X. X. (2017). Enhanced phototoxicity of photodynamic treatment by Cx26-composed GJIC via ROS-, calcium- and lipid peroxide-mediated pathways. *Journal of biophotonics*, 10(12), 1586-1596.
- [174] Feine, I., Pinkas, I., Salomon, Y., & Scherz, A. (2012). Local oxidative stress expansion through endothelial cells—a key role for gap junction intercellular communication. *PLoS One*, 7(7), e41633.
- [175] Le, H. T., Sin, W. C., Lozinsky, S., Bechberger, J., Vega, J. L., Guo, X. Q., ... & Naus, C. C. (2013). Gap junction intercellular communication mediated by connexin43 in astrocytes is essential for their resistance to oxidative stress. *Journal of Biological Chemistry*, jbc-M113.

- [176] Shi, W., Riquelme, M. A., Gu, S., & Jiang, J. X. (2018). Connexin hemichannels mediate glutathione transport and protect lens fiber cells from oxidative stress. *J Cell Sci*, 131(6), jcs212506.
- [177] Berthoud, V. M., & Beyer, E. C. (2009). Oxidative stress, lens gap junctions, and cataracts. *Antioxidants & redox signaling*, 11(2), 339-353.
- [178] Dahle, J., Angell-Petersen, E., Steen, H. B., & Moan, J. (2001). Bystander Effects in Cell Death Induced by Photodynamic Treatment, UVA Radiation and Inhibitors of ATP Synthesis. *Photochemistry and photobiology*, 73(4), 378-387.
- [179] Dahle, J., Mikalsen, S. O., Rivedal, E., & Steen, H. B. (2000). Gap junctional intercellular communication is not a major mediator in the bystander effect in photodynamic treatment of MDCK II cells. *Radiation research*, 154(3), 331-341.
- [180] Carystinos, G. D., Alaoui-Jamali, M. A., Phipps, J., Yen, L., & Batist, G. (2001). Upregulation of gap junctional intercellular communication and connexin 43 expression by cyclic-AMP and all-trans-retinoic acid is associated with glutathione depletion and chemosensitivity in neuroblastoma cells. *Cancer chemotherapy and pharmacology*, 47(2), 126-132.
- [181] Zhang, X., Ren, Z., Zuo, J., Su, C., Wang, R., Chang, Y., & Fang, F. (2002). The effect of all-trans retinoic acid on gap junctional intercellular communication and connexin 43 gene expression in glioma cells. *Chinese medical sciences journal= Chung-kuo i hsueh k'o hsueh tsa chih*, 17(1), 22-26.
- [182] Wu, J., Taylor, R. N., & Sidell, N. (2013). Retinoic acid regulates gap junction intercellular communication in human endometrial stromal cells through modulation of the phosphorylation status of connexin 43. *Journal of cellular physiology*, 228(4), 903-910.
- [183] Fiorini, C., Gilleron, J., Carette, D., Valette, A., Tilloy, A., Chevalier, S., ... & Pointis, G. (2008). Accelerated internalization of junctional membrane proteins (connexin 43, N-cadherin and ZO-1) within endocytic vacuoles : an early event of DDT carcinogenicity. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*, 1778(1), 56-67.
- [184] Ren, P., Mehta, P. P., & Ruch, R. J. (1998). Inhibition of gap junctional intercellular communication by tumor promoters in connexin43 and connexin32-expressing liver cells : cell specificity and role of protein kinase C. *Carcinogenesis*, 19(1), 169-175.
- [185] Guan, X., & Ruch, R. J. (1996). Gap junction endocytosis and lysosomal degradation of connexin43-P2 in WB-F344 rat liver epithelial cells treated with DDT and lindane. *Carcinogenesis*, 17(9), 1791-1798.
- [186] Giménez, R. E., Vargová, V., Rey, V., Turbay, M. B. E., Abatedaga, I., ... & Borsarelli, C. D. (2016). Interaction of singlet oxygen with bovine serum albumin and the role of the protein nano-compartmentalization. *Free Radical Biology and Medicine*, 94, 99-109.
- [187] McKeown, S. R. (2014). Defining normoxia, physoxia and hypoxia in tumours -implications for treatment response. *The British journal of radiology*, 87(1035), 20130676.
- [188] Pimenta, F. M., Jensen, R. L., Holmegaard, L., Esipova, T. V., Westberg, M., Breitenbach, T., & Ogilby, P. R. (2012). Singlet-oxygen-mediated cell death using spatially-localized two-photon excitation of an extracellular sensitizer. *The Journal of Physical Chemistry B*, 116(34), 10234-10246.
- [189] Freshney, R. I. (2015). *Culture of animal cells : a manual of basic technique and specialized applications*. John Wiley & Sons.
- [190] Babich, H., Liebling, E. J., Burger, R. F., Zuckerbraun, H. L., & Schuck, A. G. (2009). Choice of DMEM, formulated with or without pyruvate, plays an important role in assessing the in vitro cytotoxicity of oxidants and prooxidant nutraceuticals. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Animal*, 45(5-6), 226-233.
- [191] [Composition of Lonza PBS](#)

- [192] Tan, A. A., Phang, W. M., Gopinath, S. C., Hashim, O. H., Kiew, L. V., & Chen, Y. (2015). Revealing glycoproteins in the secretome of MCF-7 human breast cancer cells. *BioMed research international*, 2015.
- [193] Bauer, G. (2014). Targeting extracellular ROS signaling of tumor cells. *Anticancer research*, 34(4), 1467-1482.
- [194] Fisher, A. B. (2009). Redox signaling across cell membranes. *Antioxidants & redox signaling*, 11(6), 1349-1356.
- [195] Koppenol, W. H. (1976). Reactions involving singlet oxygen and the superoxide anion. *Nature*, 262(5567), 420.
- [196] Maetzke, A., & Jensen, S. J. K. (2006). Reaction paths for production of singlet oxygen from hydrogen peroxide and hypochlorite. *Chemical physics letters*, 425(1-3), 40-43.
- [197] Kanofsky, J. R. (1988). Singlet oxygen production from the peroxidase-catalyzed oxidation of indole-3-acetic acid. *Journal of Biological Chemistry*, 263(28), 14171-14175.
- [198] Wentworth, P., Jones, L. H., Wentworth, A. D., Zhu, X., Larsen, N. A., Wilson, I. A., ... & Lerner, R. A. (2001). Antibody catalysis of the oxidation of water. *Science*, 293(5536), 1806-1811.
- [199] Xu, X., Muller, R. P., & Goddard, W. A. (2002). The gas phase reaction of singlet dioxygen with water : a water-catalyzed mechanism. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 99(6), 3376-3381.
- [200] Cerkovnik, J., & Plesnicar, B. (2013). Recent advances in the chemistry of hydrogen trioxide (HOOOH). *Chemical reviews*, 113(10), 7930-7951.
- [201] Plesnicar, B. (2005). Progress in the chemistry of dihydrogen trioxide (HOOOH). *Acta Chim. Slov*, 52, 1-12.
- [202] Wentworth, P., McDunn, J. E., Wentworth, A. D., Takeuchi, C., Nieva, J., Jones, T., ... & Babior, B. M. (2002). Evidence for antibody-catalyzed ozone formation in bacterial killing and inflammation. *Science*, 298(5601), 2195-2199.
- [203] Von Gunten, U. (2003). Ozonation of drinking water : Part I. Oxidation kinetics and product formation. *Water research*, 37(7), 1443-1467.
- [204] Morozov, P. A., & Ershov, B. G. (2010). The influence of phosphates on the decomposition of ozone in water : chain process inhibition. *Russian Journal of Physical Chemistry A*, 84(7), 1136-1140.
- [205] Halliwell, B. (2006). Reactive species and antioxidants. Redox biology is a fundamental theme of aerobic life. *Plant physiology*, 141(2), 312-322.
- [206] Catalase : H₂O₂ : H₂O₂ Oxidoreductase Boon, E. M., Downs, A. & Marcey, D. Catalase : H₂O₂ :H₂O₂ Oxidoreductase. [Proposed mechanisms of catalase](#)
- [207] Vetrano, A. M., Heck, D. E., Mariano, T. M., Mishin, V., Laskin, D. L., & Laskin, J. D. (2005). Characterization of the oxidase activity in mammalian catalase. *Journal of Biological Chemistry*, 280(42), 35372-35381.
- [208] Thomas, J. K. (1965). Rates of reaction of the hydroxyl radical. *Transactions of the Faraday Society*, 61, 702-707.
- [209] Miyachi, Y., & Niwa, Y. (1982). Effects of potassium iodide, colchicine and dapsone on the generation of polymorphonuclear leukocyte-derived oxygen intermediates. *British Journal of Dermatology*, 107(2), 209-214.
- [210] Qiu, X., Takemura, G., Koshiji, M., Hayakawa, Y., Kanoh, M., Maruyama, R., ... & Fujiwara, T. (2000). Gallic acid induces vascular smooth muscle cell death via hydroxyl radical production. *Heart and vessels*, 15(2), 90-99.

- [211] Suthanthiran, M., Solomon, S. D., Williams, P. S., Rubin, A. L., Novogrodsky, A., & Stenzel, K. H. (1984). Hydroxyl radical scavengers inhibit human natural killer cell activity. *Nature*, 307(5948), 276.
- [212] Das, K. C., & Misra, H. P. (2004). Hydroxyl radical scavenging and singlet oxygen quenching properties of polyamines. *Molecular and cellular biochemistry*, 262(1-2), 127-133.
- [213] Attri, P., Kim, Y. H., Park, D. H., Park, J. H., Hong, Y. J., Uhm, H. S., ... & Choi, E. H. (2015). Generation mechanism of hydroxyl radical species and its lifetime prediction during the plasma-initiated ultraviolet (UV) photolysis. *Scientific reports*, 5, 9332.
- [214] Onyango, A. N. (2016). Endogenous generation of singlet oxygen and ozone in human and animal tissues : mechanisms, biological significance, and influence of dietary components. *Oxidative medicine and cellular longevity*, 2016.
- [215] Alam Khan, F. (2015). Ozone induced cell death in hela cell culture mediated through stimulation of TNF-alpha. *MOJ Immunol*, 2, 2-7.
- [216] Klestadt, D., Laval-Gilly, P., & Falla, J. (2002). Ozone-mediated cytotoxicity after short-term exposure and its relation to the production of cellular metabolites (NO, H₂O₂). *Cell biology and toxicology*, 18(4), 259-269.
- [217] Gardoni, D., Vailati, A., & Canziani, R. (2012). Decay of ozone in water : a review. *Ozone : Science & Engineering*, 34(4), 233-242.
- [218] Lerner, R. A., & Eschenmoser, A. (2003). Ozone in biology. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 100(6), 3013-3015.
- [219] Von Gunten, U. (2003). Ozonation of drinking water : Part II. Disinfection and by-product formation in presence of bromide, iodide or chlorine. *Water Research*, 37(7), 1469-1487.
- [220] Nogales, C. G., Ferreira, M. B., Montemor, A. F., Rodrigues, M. F. D. A., Lage-Marques, J. L., & Antoniazzi, J. H. (2016). Ozone therapy as an adjuvant for endodontic protocols : microbiological-ex vivo study and cytotoxicity analyses. *Journal of Applied Oral Science*, 24(6), 607-613.
- [221] Sheng, Y., Abreu, I. A., Cabelli, D. E., Maroney, M. J., Miller, A. F., Teixeira, M., & Valentine, J. S. (2014). Superoxide dismutases and superoxide reductases. *Chemical reviews*, 114(7), 3854-3918.
- [222] Novo, E., Marra, F., Zamara, E., Di Bonzo, L. V., Caligiuri, A., Cannito, S., ... & Parola, M. (2006). Dose dependent and divergent effects of superoxide anion on cell death, proliferation, and migration of activated human hepatic stellate cells. *Gut*, 55(1), 90-97.
- [223] Valencia, A., & Morán, J. (2004). Reactive oxygen species induce different cell death mechanisms in cultured neurons. *Free Radical Biology and Medicine*, 36(9), 1112-1125.
- [224] Mahalingaiah, P. K. S., & Singh, K. P. (2014). Chronic oxidative stress increases growth and tumorigenic potential of MCF-7 breast cancer cells. *PloS one*, 9(1), e87371.
- [225] Akman, S. A., Forrest, G., Chu, F. F., & Doroshov, J. H. (1989). Resistance to hydrogen peroxide associated with altered catalase mRNA stability in MCF7 breast cancer cells. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Gene Structure and Expression*, 1009(1), 70-74.
- [226] Gulden, M., Jess, A., Kammann, J., Maser, E., & Seibert, H. (2010). Cytotoxic potency of H₂O₂ in cell cultures : impact of cell concentration and exposure time. *Free Radical Biology and Medicine*, 49(8), 1298-1305.
- [227] Wasserstein, R. L., & Lazar, N. A. (2016). The ASA's statement on p-values : context, process, and purpose. *The American Statistician*, 70(2), 129-133.
- [228] Nuzzo, R. (2014). Scientific method : statistical errors. *Nature News*, 506(7487), 150.
- [229] Efron, B., & Tibshirani, R. (1986). Bootstrap methods for standard errors, confidence intervals, and other measures of statistical accuracy. *Statistical science*, 54-75.

- [230] Efron, B. (1992). Bootstrap methods : another look at the jackknife. *In Breakthroughs in statistics* (pp. 569-593). Springer, New York, NY.
- [231] Escobar, J. A., Rubio, M. A., & Lissi, E. A. (1996). SOD and catalase inactivation by singlet oxygen and peroxy radicals. *Free Radical Biology and Medicine*, 20(3), 285-290.
- [232] Huang, L., Szewczyk, G., Sarna, T., & Hamblin, M. R. (2017). Potassium iodide potentiates broad-spectrum antimicrobial photodynamic inactivation using Photofrin. *ACS infectious diseases*, 3(4), 320-328.
- [233] Wen, X., Zhang, X., Szewczyk, G., El-Hussein, A., Huang, Y. Y., Sarna, T., & Hamblin, M. R. (2017). Potassium iodide potentiates antimicrobial photodynamic inactivation mediated by Rose Bengal : in vitro and in vivo studies. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, AAC-00467.
- [234] Huang, L., Szewczyk, G., Sarna, T., & Hamblin, M. R. (2017). Potassium iodide potentiates broad-spectrum antimicrobial photodynamic inactivation using Photofrin. *ACS infectious diseases*, 3(4), 320-328.
- [235] Wilkinson, F., Helman, W. P., & Ross, A. B. (1995). Rate constants for the decay and reactions of the lowest electronically excited singlet state of molecular oxygen in solution. An expanded and revised compilation. *Journal of Physical and Chemical Reference Data*, 24(2), 663-677.
- [236] Suzuki, N., Mizumoto, I., Toya, Y., Nomoto, T., Mashiko, S., & Inaba, H. (1990). Steady-state near-infrared detection of singlet molecular oxygen : a Stern-Volmer quenching experiment with luminol, superoxide dismutase, and Cypridina luciferin analogues. *Agricultural and biological chemistry*, 54(11), 2783-2787.
- [237] Okamoto, G., Hayase, F., & Kato, H. (1992). Scavenging of active oxygen species by glycosylated proteins. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry*, 56(6), 928-931.
- [238] Liebhaftsky, H. A., & Mohammad, A. (1933). The kinetics of the reduction, in acid solution, of hydrogen peroxide by iodide ion. *Journal of the American Chemical Society*, 55(10), 3977-3986.
- [239] Yim, M. B., Chock, P. B., & Stadtman, E. R. (1990). Copper, zinc superoxide dismutase catalyzes hydroxyl radical production from hydrogen peroxide. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 87(13), 5006-5010.
- [240] Restaino, L., Frampton, E. W., Hemphill, J. B., & Palnikar, P. (1995). Efficacy of ozonated water against various food-related microorganisms. *Applied and Environmental Microbiology*, 61(9), 3471-3475.
- [241] Berlett, B. S., Levine, R. L., & Stadtman, E. R. (1996). Comparison of the effects of ozone on the modification of amino acid residues in glutamine synthetase and bovine serum albumin. *Journal of Biological Chemistry*, 271(8), 4177-4182.
- [242] Whiteside, C., & Hassan, H. M. (1988). Role of oxyradicals in the inactivation of catalase by ozone. *Free Radical Biology and Medicine*, 5(5-6), 305-312.
- [243] Hoigné, J. H. W. R. J., Bader, H., Haag, W. R., & Staehelin, J. (1985). Rate constants of reactions of ozone with organic and inorganic compounds in water-III. Inorganic compounds and radicals. *Water Research*, 19(8), 993-1004.
- [244] Pitcher, L. H., Brennan, E., Hurley, A., Dunsmuir, P., Tepperman, J. M., & Zilinskas, B. A. (1991). Overproduction of petunia chloroplast copper/zinc superoxide dismutase does not confer ozone tolerance in transgenic tobacco. *Plant physiology*, 97(1), 452-455.
- [245] Yan, G., He, Y., Li, G., Xiong, Y., Song, P., & Wang, R. M. (2016). Bovine serum albumin metal complexes for mimic of SOD. *Journal of Chemical Sciences*, 128(11), 1783-1788.
- [246] Shimizu, N., Kobayashi, K., & Hayashi, K. (1984). The reaction of superoxide radical with catalase. Mechanism of the inhibition of catalase by superoxide radical. *Journal of Biological Chemistry*, 259(7), 4414-4418.

- [247] Ogawa, K. I., Kanematsu, S., & Asada, K. (1997). Generation of superoxide anion and localization of CuZn-superoxide dismutase in the vascular tissue of spinach hypocotyls : their association with lignification. *Plant and cell physiology*, 38(10), 1118-1126.
- [248] Suksrichavalit, T., Prachayasittikul, S., Nantasenamat, C., Isarankura-Na-Ayudhya, C., & Prachayasittikul, V. (2009). Copper complexes of pyridine derivatives with superoxide scavenging and antimicrobial activities. *European journal of medicinal chemistry*, 44(8), 3259-3265.
- [249] Barlow, G. E., Bisby, R. H., & Cundall, R. B. (1979). Does disproportionation of superoxide produce singlet oxygen. *Radiation Physics and Chemistry*, 13(1-2), 73-75.
- [250] Khan, A. U., & Kasha, M. (1994). Singlet molecular oxygen in the Haber-Weiss reaction. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 91(26), 12365-12367.
- [251] [Ibidi support AN11 - shear stress and flow profiles](#)
- [252] Triantafyllu, U. L., Park, S., Klaassen, N. L., Raddatz, A. D., & Kim, Y. (2017). Fluid shear stress induces cancer stem cell-like phenotype in MCF7 breast cancer cell line without inducing epithelial to mesenchymal transition. *International journal of oncology*, 50(3), 993-1001.
- [253] Barnes, J. M., Nauseef, J. T., & Henry, M. D. (2012). Resistance to fluid shear stress is a conserved biophysical property of malignant cells. *PLoS one*, 7(12), e50973.
- [254] Moss, M. A., Zimmer, S., & Anderson, K. W. (2000). Role of metastatic potential in the adhesion of human breast cancer cells to endothelial monolayers. *Anticancer research*, 20(3A), 1425-1433.
- [255] Bielski, B. H., & Schwarz, H. A. (1968). Absorption spectra and kinetics of hydrogen sesquioxide and the perhydroxyl radical. *The Journal of Physical Chemistry*, 72(11), 3836-3841.
- [256] Engdahl, A., & Nelander, B. (2002). The vibrational spectrum of H₂O₃. *Science*, 295(5554), 482-483.
- [257] Nyffeler, P. T., Boyle, N. A., Eltepu, L., Wong, C. H., Eschenmoser, A., Lerner, R. A., & Wentworth Jr, P. (2004). Dihydrogen trioxide (HOOOH) is generated during the thermal reaction between hydrogen peroxide and ozone. *Angewandte Chemie*, 116(35), 4756-4759.
- [258] Gálvez, Ó., Baeza-Romero, M. T., Sanz, M., & Pacios, L. F. (2016). A theoretical study on the reaction of ozone with aqueous iodide. *Physical Chemistry Chemical Physics*, 18(11), 7651-7660.
- [259] Rakhit, R., & Chakrabartty, A. (2006). Structure, folding, and misfolding of Cu, Zn superoxide dismutase in amyotrophic lateral sclerosis. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Basis of Disease*, 1762(11-12), 1025-1037.
- [260] Kwon, B. G., & Lee, J. H. (2006). Determination of Hydroperoxyl/superoxide Anion Radical (HO₂/O₂⁻) Concentration in the Decomposition of Ozone Using a Kinetic Method. *Bulletin of the Korean Chemical Society*, 27(11), 1785-1790.
- [261] Candeias, L. P., Patel, K. B., Stratford, M. R., & Wardman, P. (1993). Free hydroxyl radicals are formed on reaction between the neutrophil-derived species superoxide anion and hypochlorous acid. *FEBS letters*, 333(1-2), 151-153.
- [262] Scandalios, J. G. (1993). Oxygen stress and superoxide dismutases. *Plant physiology*, 101(1), 7.
- [263] Phaniendra, A., Jestadi, D. B., & Periyasamy, L. (2015). Free radicals : properties, sources, targets, and their implication in various diseases. *Indian Journal of Clinical Biochemistry*, 30(1), 11-26.
- [264] Aceves, C., Anguiano, B., & Delgado, G. (2013). The extrathyronine actions of iodine as antioxidant, apoptotic, and differentiation factor in various tissues. *Thyroid*, 23(8), 938-946.
- [265] Mumbengegwi, D. R., Li, Q., Li, C., Bear, C. E., & Engelhardt, J. F. (2008). Evidence for a superoxide permeability pathway in endosomal membranes. *Molecular and cellular biology*, 28(11), 3700-3712.

- [266] Zielonka, J., Vasquez-Vivar, J., & Kalyanaraman, B. (2008). Detection of 2-hydroxyethidium in cellular systems : a unique marker product of superoxide and hydroethidine. *Nature protocols*, 3(1), 8.
- [267] Zielonka, J., & Kalyanaraman, B. (2010). Hydroethidine-and MitoSOX-derived red fluorescence is not a reliable indicator of intracellular superoxide formation : another inconvenient truth. *Free Radical Biology and Medicine*, 48(8), 983-1001.
- [268] Nazarewicz, R. R., Bikineyeva, A., & Dikalov, S. I. (2013). Rapid and specific measurements of superoxide using fluorescence spectroscopy. *Journal of biomolecular screening*, 18(4), 498-503.
- [269] Chen, J., Rogers, S. C., & Kavdia, M. (2013). Analysis of kinetics of dihydroethidium fluorescence with superoxide using xanthine oxidase and hypoxanthine assay. *Annals of biomedical engineering*, 41(2), 327-337.
- [270] Cao, L., Wu, Q., Li, Q., Shao, S., & Guo, Y. (2014). Fluorescence and HPLC detection of hydroxyl radical by a rhodamine-nitroxide probe and its application in cell imaging. *Journal of fluorescence*, 24(2), 313-318.
- [271] Cohn, C. A., Simon, S. R., & Schoonen, M. A. (2008). Comparison of fluorescence-based techniques for the quantification of particle-induced hydroxyl radicals. *Particle and fibre toxicology*, 5(1), 2.
- [272] Liu, F., Du, J., Song, D., Xu, M., & Sun, G. (2016). A sensitive fluorescent sensor for the detection of endogenous hydroxyl radicals in living cells and bacteria and direct imaging with respect to its ecotoxicity in living zebra fish. *Chemical communications*, 52(25), 4636-4639.
- [273] Alessandri, K., Sarangi, B. R., Gurchenkov, V. V., Sinha, B., Kiessling, T. R., Fetler, L., ... & Geraldo, S. (2013). Cellular capsules as a tool for multicellular spheroid production and for investigating the mechanics of tumor progression in vitro. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 110(37), 14843-14848.
- [274] Fink, S. L., & Cookson, B. T. (2005). Apoptosis, pyroptosis, and necrosis : mechanistic description of dead and dying eukaryotic cells. *Infection and immunity*, 73(4), 1907-1916.
- [275] Xie, Y., Hou, W., Song, X., Yu, Y., Huang, J., Sun, X., ... & Tang, D. (2016). Ferroptosis : Process and function. *Cell Death and Differentiation*, 23(3), 369-379.
- [276] Silva, M. T. (2010). Secondary necrosis : the natural outcome of the complete apoptotic program. *FEBS letters*, 584(22), 4491-4499.
- [277] Rock, K. L., & Kono, H. (2008). The inflammatory response to cell death. *Annu. Rev. pathmechdis. Mech. Dis.*, 3, 99-126.
- [278] Davidovich, P., Kearney, C. J., & Martin, S. J. (2014). Inflammatory outcomes of apoptosis, necrosis and necroptosis. *Biological chemistry*, 395(10), 1163-1171.
- [279] Jacobsson, L. T., Turesson, C., Gülfe, A., Kapetanovic, M. C., Petersson, I. F., Saxne, T., & Geborek, P. (2005). Treatment with tumor necrosis factor blockers is associated with a lower incidence of first cardiovascular events in patients with rheumatoid arthritis. *The Journal of rheumatology*, 32(7), 1213-1218.
- [280] Lotze, M. T., & Demarco, R. A. (2009). Dying Dangerously : Necrotic Cell Death and Chronic Inflammation. *Discovery Medicine*, 4(24), 448-456.
- [281] Vitale, M., Zamai, L., Mazzotti, G., Cataldi, A., & Falcieri, E. (1993). Differential kinetics of propidium iodide uptake in apoptotic and necrotic thymocytes. *Histochemistry*, 100(3), 223-229.
- [282] Green, D. R. (2005). Apoptotic pathways : ten minutes to dead. *Cell*, 121(5), 671-674.
- [283] Bhola, P. D., & Simon, S. M. (2009). Determinism and divergence of apoptosis susceptibility in mammalian cells. *Journal of cell science*, 122(23), 4296-4302.

- [284] Berghe, T. V., Vanlangenakker, N., Parthoens, E., Deckers, W., Devos, M., Festjens, N., ... & Vandenberghe, P. (2010). Necroptosis, necrosis and secondary necrosis converge on similar cellular disintegration features. *Cell death and differentiation*, 17(6), 922.
- [285] Orozco, S., & Oberst, A. (2017). RIPK 3 in cell death and inflammation : the good, the bad, and the ugly. *Immunological reviews*, 277(1), 102-112.
- [286] Leist, M., Single, B., Castoldi, A. F., Kühnle, S., & Nicotera, P. (1997). Intracellular adenosine triphosphate (ATP) concentration : a switch in the decision between apoptosis and necrosis. *Journal of Experimental Medicine*, 185(8), 1481-1486.
- [287] Nagata, S., Obana, A., Gohto, Y., & Nakajima, S. (2003). Necrotic and apoptotic cell death of human malignant melanoma cells following photodynamic therapy using an amphiphilic photosensitizer, ATX-S10 (Na). *Lasers in Surgery and Medicine : The Official Journal of the American Society for Laser Medicine and Surgery*, 33(1), 64-70.
- [288] Zeiss, C. J. (2003). The apoptosis-necrosis continuum : insights from genetically altered mice. *Veterinary Pathology*, 40(5), 481-495.
- [289] Degtarev, A., Huang, Z., Boyce, M., Li, Y., Jagtap, P., Mizushima, N., ... & Yuan, J. (2005). Chemical inhibitor of nonapoptotic cell death with therapeutic potential for ischemic brain injury. *Nature chemical biology*, 1(2), 112.
- [290] Higgins, G. C., Beart, P. M., & Nagley, P. (2009). Oxidative stress triggers neuronal caspase-independent death : endonuclease G involvement in programmed cell death-type III. *Cellular and molecular life sciences*, 66(16), 2773-2787.
- [291] Loos, B., & Engelbrecht, A. M. (2009). Cell death : A dynamic response concept. *Autophagy*, 5(5), 590-603.
- [292] Thorburn, J., Andrysiak, Z., Staskiewicz, L., Gump, J., ... & Thorburn, A. (2014). Autophagy controls the kinetics and extent of mitochondrial apoptosis by regulating PUMA levels. *Cell reports*, 7(1), 45-52.
- [293] Sun Q, Fan W, Chen K, Ding X, Chen S, & Zhong Q. (2008) Identification of Barkor as a mammalian autophagy-specific factor for Beclin 1 and class III phosphatidylinositol 3-kinase. *PNAS*, 105 :49 :19211-6.
- [294] Apel A, Herr I, Schwarz H, Rodemann HP, & Mayer A. (2008) Blocked autophagy sensitizes resistant carcinoma cells to radiation therapy. *Cancer Res*, 5 :1485-94.
- [295] Chen, Q., Kang, J., & Fu, C. (2018). The independence of and associations among apoptosis, autophagy, and necrosis. *Signal transduction and targeted therapy*, 3(1), 18.
- [296] Galluzzi, L., Bravo-San Pedro, J. M., Vitale, I., ... & Baehrecke, E. H. (2015). Essential versus accessory aspects of cell death : recommendations of the NCCD 2015. *Cell death and differentiation*, 22(1), 58.
- [297] Martin, S., Reutelingsperger, C. P., McGahon, A. J., Rader, J. A., Van Schie, R. C., LaFace, D. M., & Green, D. R. (1995). Early redistribution of plasma membrane phosphatidylserine is a general feature of apoptosis regardless of the initiating stimulus : inhibition by overexpression of Bcl-2 and Abl. *Journal of Experimental Medicine*, 182(5), 1545-1556.
- [298] Kepp, O., Galluzzi, L., Lipinski, M., Yuan, J., & Kroemer, G. (2011). Cell death assays for drug discovery. *Nature reviews Drug discovery*, 10(3), 221.
- [299] Yang, Y. H. C., & Johnson, J. D. (2013). Multi-parameter, single-cell, kinetic analysis reveals multiple modes of cell death in primary pancreatic beta-cells. *J Cell Sci*, jcs-133017.
- [300] Sawai, H., & Domae, N. (2011). Discrimination between primary necrosis and apoptosis by necrostatin-1 in Annexin V-positive/propidium iodide-negative cells. *Biochemical and biophysical research communications*, 411(3), 569-573.

- [301] Turner, C., Devitt, A., Parker, K., MacFarlane, M., Giuliano, M., Cohen, G. M., & Gregory, C. D. (2003). Macrophage-mediated clearance of cells undergoing caspase-3-independent death. *Cell death and differentiation*, 10(3), 302.
- [302] Jänicke, R. U. (2009). MCF-7 breast carcinoma cells do not express caspase-3. *Breast cancer research and treatment*, 117(1), 219-221.
- [303] Xue, L. Y., Chiu, S. M., & Oleinick, N. L. (2001). Photodynamic therapy-induced death of MCF-7 human breast cancer cells : a role for caspase-3 in the late steps of apoptosis but not for the critical lethal event. *Experimental cell research*, 263(1), 145-155.
- [304] Calzone, L., Tournier, L., Fourquet, S., Thieffry, D., Zhivotovsky, B., Barillot, E., & Zinovyev, A. (2010). Mathematical modelling of cell-fate decision in response to death receptor engagement. *PLoS computational biology*, 6(3), e1000702.
- [305] Zinovyev, A., Fourquet, S., Tournier, L., Calzone, L., & Barillot, E. (2012). Cell death and life in cancer : mathematical modeling of cell fate decisions. In *Advances in Systems Biology*, 61-274. Springer, New York, NY.
- [306] Legewie, S., Blüthgen, N., & Herzog, H. (2006). Mathematical modeling identifies inhibitors of apoptosis as mediators of positive feedback and bistability. *PLoS computational biology*, 2(9), e120.
- [307] Kapuy, O., Vinod, P. K., Mandl, J., & Bánhegyi, G. (2013). A cellular stress-directed bistable switch controls the crosstalk between autophagy and apoptosis. *Molecular BioSystems*, 9(2), 296-306.
- [308] Spencer, S. L., & Sorger, P. K. (2011). Measuring and modeling apoptosis in single cells. *Cell*, 144(6), 926-939.
- [309] Cohen, A. A., Geva-Zatorsky, N., Eden, E., Frenkel-Morgenstern, M., Issaeva, I., Sigal, A., ... & Cohen, L. (2008). Dynamic proteomics of individual cancer cells in response to a drug. *Science*, 322(5907), 1511-1516.
- [310] Wolbers, F., Buijtenhuijs, P., Haanen, C., & Vermes, I. (2004). Apoptotic cell death kinetics in vitro depend on the cell types and the inducers used. *Apoptosis*, 9(3), 385-392.
- [311] Skommer, J., Brittain, T., & Raychaudhuri, S. (2010). Bcl-2 inhibits apoptosis by increasing the time-to-death and intrinsic cell-to-cell variations in the mitochondrial pathway of cell death. *Apoptosis*, 15(10), 1223-1233.
- [312] Spencer, S. L., Gaudet, S., Albeck, J. G., Burke, J. M., & Sorger, P. K. (2009). Non-genetic origins of cell-to-cell variability in TRAIL-induced apoptosis. *Nature*, 459(7245), 428.
- [313] Rizvi, I., Anbil, S., Alagic, N., Celli, J.P., Zheng, L.Z., ... & Hasan, T. (2013). PDT dose parameters impact tumoricidal durability and cell death pathways in a 3D ovarian cancer model. *Photochemistry and photobiology*, 89(4), 942-952.
- [314] Wang, X., Ryter, S. W., Dai, C., Tang, Z. L., Watkins, S. C., Yin, X. M., ... & Choi, A. M. (2003). Necrotic cell death in response to oxidant stress involves the activation of the apoptogenic caspase-8/bid pathway. *Journal of biological chemistry*, 278(31), 29184-29191.
- [315] Curnow, A., McIlroy, B. W., Postle-Hacon, M. J., MacRobert, A. J., & Bown, S. G. (1999). Light dose fractionation to enhance photodynamic therapy using 5-aminolevulinic acid in the normal rat colon. *Photochemistry and photobiology*, 69(1), 71-76.
- [316] Robinson, D. J., de Bruijn, H. S., Star, W. M., & Sterenborg, H. J. (2003). Dose and Timing of the First Light Fraction in Two-fold Illumination Schemes for Topical ALA-mediated Photodynamic Therapy of Hairless Mouse Skin. *Photochemistry and photobiology*, 77(3), 319-323.
- [317] Kessels, J., Hendriks, J., Nelemans, P., Mosterd, K., & Kelleners-Smeets, N. (2016). Two-fold illumination in topical 5-aminolevulinic acid (ALA)-mediated photodynamic therapy (PDT) for superficial basal cell carcinoma (sBCC) : A retrospective case series and cohort study. *Journal of the American Academy of Dermatology*, 74(5), 899-906.

- [318] Miyamoto, Y., Umebayashi, Y., & Nishisaka, T. (1999). Comparison of phototoxicity mechanism between pulsed and continuous wave irradiation in photodynamic therapy. *Journal of Photochemistry and Photobiology B : Biology*, 53(1-3), 53-59.
- [319] Klimenko, V. V., Bogdanov, A. A., Knyazev, N. A., Rusanov, A. A., & Dubina, M. V. (2014). Different photodynamic effect between continuous wave and pulsed laser irradiation modes in k562 cells in vitro. In *Journal of Physics : Conference Series* (Vol. 541, No. 1, p. 012040). IOP Publishing.
- [320] Estevez, J. P., Ascencio, M., Colin, P., Farine, M. O., Collinet, P., & Mordon, S. (2010). Continuous or fractionated photodynamic therapy ? Comparison of three PDT schemes for ovarian peritoneal micrometastasis treatment in a rat model. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*, 7(4), 251-257.
- [321] Ivanov, D. P., Parker, T. L., Walker, D. A., Alexander, C., Ashford, M. B., Gellert, P. R., & Garnett, M. C. (2014). Multiplexing spheroid volume, resazurin and acid phosphatase viability assays for high-throughput screening of tumour spheroids and stem cell neurospheres. *PLoS ONE*, 9(8), 1-14.
- [322] Dolega, M. E., Delarue, M., Ingremeau, F., Prost, J., Delon, A., & Cappello, G. (2017). Cell-like pressure sensors reveal increase of mechanical stress towards the core of multicellular spheroids under compression. *Nature communications*, 8, 14056.
- [323] "COMSOL Multiphysics Reference Manual, version 5.3", COMSOL, Inc, www.comsol.com
- [324] web.mit.edu/1.061/www/dream/THREE/.THREETHEORY
- [325] Marchington, R. F., Mazilu, M., Kuriakose, S., Garces-Chavez, V., Reece, P. J., Krauss, T. F., ... & Dholakia, K. (2008). Optical deflection and sorting of microparticles in a near-field optical geometry. *Optics express*, 16(6), 3712-3726.
- [326] Gaigalas, A. K., Hubbard, J. B., McCurley, M., & Woo, S. (1992). Diffusion of bovine serum albumin in aqueous solutions. *The Journal of Physical Chemistry*, 96(5), 2355-2359.
- [327] M. Nobuhiro, & A. P. Minton. Tracer Diffusion of Globular Proteins in Concentrated Protein Solutions. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 85, no. 9, 1988, pp. 2984-2988.
- [328] Amatore, C., & Arbault, S. (2007). Oxidative stress at the single cell level (Chapter 13).
- [329] Kongraksawech, T., Vázquez-Landaverde, P., Huerta-Ruelas, J., & Torres, J. A. (2007). IONIC STRENGTH AND pH EFFECTS ON OPTICAL THERMOGRAPHS FOR BOVINE SERUM ALBUMIN (BSA) EFECTOS DE LA FUERZA IÓNICA Y EL pH SOBRE LOS TERMOGRAMAS ÓPTICOS DE LA SEROALBUMINA BOVINA (BSA). *CYTA-Journal of Food*, 5(4), 259-264.
- [330] [Manufacturer \(Sigma\) protocol.](#)
- [331] Michelson, A. M. (1974). Is singlet oxygen a substrate for superoxide dismutase ? No. *FEBS letters*, 44(1), 97-100.
- [332] Goda, K., Kimura, T., Thayer, A. L., Kees, K., & Schaap, A. P. (1974). Singlet molecular oxygen in biological systems : non-quenching of singlet oxygen-mediated chemiluminescence by superoxide dismutase. *Biochemical and biophysical research communications*, 58(3), 660-666.
- [333] Kim, S. Y., Kwon, O. J., & Park, J. W. (2001). Inactivation of catalase and superoxide dismutase by singlet oxygen derived from photoactivated dye. *Biochimie*, 83(5), 437-444.
- [334] Li, H. P., Daniel, B., Creeley, D., Grandbois, R., Zhang, S., Xu, C., ... & Hansel, C. M. (2014). Superoxide production by a manganese-oxidizing bacterium facilitates iodide oxidation. *Applied and environmental microbiology*, AEM-00400.
- [335] Winkler, R. (2015). Iodine-a potential antioxidant and the role of Iodine/Iodide in health and disease. *Natural Science*, 7(12), 548.

- [336] Smyth, P. P. (2003). Role of iodine in antioxidant defence in thyroid and breast disease. *Biofactors*, 19(3-4), 121-130.
- [337] Milczarek, M., Stepniak, J., Lewiński, A., & Karbownik-Lewinska, M. (2013). Potassium iodide, but not potassium iodate, as a potential protective agent against oxidative damage to membrane lipids in porcine thyroid. *Thyroid research*, 6(1), 10.
- [338] Nakamura, M., Bhatnagar, A., & Sadoshima, J. (2012). Overview of pyridine nucleotides review series. *Circulation research*, 111(5), 604-610.
- [339] Tassaing, T., & Besnard, M. (1997). Ionization reaction in iodine/pyridine solutions : what can we learn from conductivity measurements, far-infrared spectroscopy, and Raman scattering?. *The Journal of Physical Chemistry A*, 101(15), 2803-2808.
- [340] Jossen, V., Portner, R., Kaiser, S. C., Kraume, M., Eibl, D., & Eibl, R. (2014). Mass production of mesenchymal stem cells—impact of bioreactor design and flow conditions on proliferation and differentiation. *Cells and Biomaterials in Regenerative Medicine*. InTech. Chapter 5.
- [341] Kundu, B., Simlandi, S., & Das, P. K. (2011). Analytical techniques for analysis of fully developed laminar flow through rectangular channels. *Heat and mass transfer*, 47(10), 1289.