



HAL
open science

Analyse microélectrochimique du stress oxydant à l'échelle de la cellule unique : application aux cellules cancéreuses du sein

Cong Lu

► **To cite this version:**

Cong Lu. Analyse microélectrochimique du stress oxydant à l'échelle de la cellule unique : application aux cellules cancéreuses du sein. Chimie analytique. Université Pierre et Marie Curie - Paris VI, 2012. Français. NNT : 2012PAO66242 . tel-00828217

HAL Id: tel-00828217

<https://theses.hal.science/tel-00828217>

Submitted on 30 May 2013

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



**THESE DE DOCTORAT DE
L'UNIVERSITE PIERRE ET MARIE CURIE**

Spécialité

PHYSICO-CHIMIE ANALYTIQUE
(Ecole Doctorale de Chimie Physique et de Chimie Analytique de Paris-Centre – ED 388)

Présentée par

Mlle Cong LU

Pour obtenir le grade de

DOCTEUR de l'UNIVERSITÉ PIERRE ET MARIE CURIE

Sujet de la thèse :

Analyse microélectrochimique du stress oxydant à l'échelle de la cellule unique. Application aux cellules cancéreuses du sein.

Soutenue le 20.09.2012

Devant le jury composé de :

Mme Sabine SZUNERITS	Rapporteur
Mme Elizabeth HILLARD	Rapporteur
M. Didier DEVILLIERS	Examineur
Mme Anne VESSIERES-JAOUEN	Examineur
M. Christian AMATORE	Directeur de thèse
Mme Manon GUILLE COLLIGNON	Co-encadrante
M. Frédéric LEMAITRE	Co-encadrant

REMERCIEMENTS

En tout premier lieu, je souhaite remercier profondément Christian Amatore, mon directeur de thèse, pour m'avoir accueillie dans son équipe, et donc m'avoir donné l'opportunité de venir en France et de découvrir ce pays. Je me souviens toujours clairement de ses nombreux conseils, ses enseignements scientifiques et de son savoir encyclopédique. Sa capacité scientifique et perspicacité de recherche m'impressionnent, et il a beaucoup de qualités admirables.

Je voudrais remercier également le Professeur Chen Hongyuan, qui m'avait donné beaucoup d'enseignements et beaucoup d'opportunités, et je lui en suis très redevable.

Je voudrais ensuite remercier Mesdames Sabine Szunerits et Elizabeth Hillard pour avoir accepté d'être rapporteurs de ma thèse, ainsi que Monsieur Didier Devilliers pour accepter d'évaluer mon travail.

J'aimerais témoigner toute ma gratitude envers Frédéric et Manon qui m'ont encadrée au cours de ma thèse, sans eux ce travail n'aurait jamais abouti. Ils m'ont aiguillée et dirigée tout au long de mon parcours avec tous leurs conseils, leur disponibilité au quotidien, et leur aide sur tous les plans : de la correction de mon français, jusqu'aux nombreuses corrections de ma thèse. J'aimerais remercier en particulier pour tous leurs efforts versés dans ma thèse. On ne pourrait pas imaginer l'ampleur de ce travail. Je leur suis énormément redevable et je voudrais l'exprimer à cette occasion. Je tiens également à remercier Stéphane Arbault qui était présent pendant la première année de ma thèse.

Un grand merci plus particulièrement à l'équipe de Anne Vessières-Jaouen, qui m'a accueillie toujours chaleureusement et m'a donné tout ce dont que j'avais besoin pour les manipulations, m'a proposé d'excellentes idées, enseigné des connaissances en biochimie et m'a donné tous les documents nécessaires quand j'en avais besoin. Je l'apprécie beaucoup.

J'exprime toute ma reconnaissance à Alaric, qui m'a initiée aux nombreuses techniques et connaissances du laboratoire et m'a expliqué, traduit beaucoup de choses chaque jour. En outre, je suis très heureuse de pouvoir compter de nombreux amis au

laboratoire. Anne était toujours à mes côtés pendant 3 ans, et m'a beaucoup aidé. Nous avons connu un grand nombre de moments joyeux ensemble avec Yun, Pier, Rémy, etc. Grâce à Yun, je pouvais m'approcher d'une vie avec plus de couleur. De plus, je suis très contente d'avoir pu rencontrer Marie-Aude, qui est non seulement une ingénieure supérieure mais aussi une amie précieuse.

Je voudrais également remercier toute l'équipe de Chen Yong, ils sont toujours gentils pour moi et m'ont soutenu à plusieurs reprises. Je souhaite remercier sincèrement tout notre groupe, avec eux, on a passé ensemble de nombreux bons moments. Je remercie toutes les personnes qui travaillent dans notre département, surtout Marie, M. Konaté, et nos secrétaires Anne et Dominique, elles sont toujours très gentilles.

Je tiens ensuite à remercier par la même occasion les amis que j'ai rencontrés ici, le groupe B3 Montrouge, qui m'a gardé tous les trois ans, ne m'a jamais quittée. On a passé beaucoup de temps passionnants et inoubliables. Ils sont vraiment les trésors, les amis d'une vie. Mes grands remerciements vont également à Zhou Xiongtu, Marc, Lu Dan, Tian Dandan, qui sont des piliers tout au long de ma thèse, sans eux, je n'arriverais toujours pas à avoir une vie normale. Je remercie également tous mes amis, en particulier Deng Qinyuan, Ruan Yibin, Zhang Xiaoxing, Xiao Qi, Béthy.

Je tiens à finir en remerciant de tout mon cœur mes parents, tous les membres de ma famille et Ji Liang, n'importe où je suis, ils sont toujours là.

PLAN

Introduction.....	1
Chapitre I : Application des ultramicroélectrodes à l'analyse de la sécrétion cellulaire à l'échelle de la cellule unique	5
1. Avantages des ultramicroélectrodes en électrochimie	5
2. Equations de courant	7
2.1. Les lois de Fick	7
2.2 Diffusion sur une ultramicroélectrode sphérique.....	8
2.3 Diffusion sur une ultramicroélectrode disque.....	10
3. Intérêts analytiques des ultramicroélectrodes.....	10
3.1. Le problème du courant capacitif	10
3.2. La chute ohmique.....	11
4. Importance des ultramicroélectrodes à l'échelle de la cellule unique et méthode de détection	12
4.1. Principe expérimental de détection	12
4.2. Modification de la surface de l'électrode	13
Chapitre II : Application à la détection du stress oxydant	15
1. Définition du stress oxydant	15
1.1. Nature de la réactivité des ROS/RNS.....	16
1.2. Les différents dérivés réactifs de l'oxygène en milieu biologique	17
1.2.1. Les dérivés primaires non radicalaires	17
1.2.2. Les radicaux libres oxygénés	20
1.3. Cas de la défense immunitaire	22
2. Méthodes de détection des ROS/RNS	24
2.1. Mesures globales sur cellules.....	25
2.1.1. Glutathion.....	25
2.1.2. Peroxidation lipidique	25
2.2. Mesures spécifiques.....	27
2.2.1. L'anion superoxyde	27
2.2.2. Le peroxyde d'hydrogène.....	31

2.2.3. Le Monoxyde d'azote	32
2.2.4. Anion Nitrite : la réaction de Griess	33
3. La détection électrochimique	34
3.1. Génération des ROS /RNS dans un système biologique	34
3.2. Nature de l'électrode de travail pour la détection électrochimique des ROS/RNS	36
3.3. Détection électrochimique des ROS/RNS	37
3.3.1. Anion superoxyde $O_2^{\cdot -}$	38
3.3.2. Peroxyde d'hydrogène H_2O_2	39
3.3.3. Oxyde d'azote NO^{\cdot}	39
3.3.4. Peroxynitrite $ONOO^-$	41
3.3.5 Anion nitrite NO_2^-	41
4. Mesures ampérométriques des espèces ROS et RNS (H_2O_2, NO^{\cdot}, $ONOO^-$, NO_2^-).....	43
4.1. Réactions d'oxydation mises en jeu et réponses ampérométriques à différents potentiels	43
4.2. Quantification des 4 ROS/RNS libérées	45
 Chapitre III. Détection du stress oxydant produit par une cellule du cancer du sein	49
1. Le cancer du sein	49
1.1. Situation actuelle et traitements.....	49
1.1.1. Causes du cancer du sein	50
1.1.2. Physiopathologie du cancer du sein	50
1.1.3. Traitements du cancer du sein.....	50
1.2 Lignée de cellules cancéreuses mammaires : les cellules MDA-MB-231 et MCF-7	53
1.2.1. Les cellules MCF-7.....	53
1.2.2. Les cellules MDA-MB-231	53
2. Intérêt du traitement avec les ferrocifènes	54
2.1. Mécanisme global de la prolifération de cellules cancéreuses par les œstrogènes	54
2.2. Le tamoxifène	55
2.3. Les ferrocifènes.....	57

2.3.1. Le ferrocène.....	57
2.3.2. Structure et propriété des ferrocifènes.....	58
2.3.3. Le cas des ferrocénophanes.....	62
3. Conclusion.....	64
Chapitre IV. Etude de la production de ROS induites par différents ferrocifènes sur les cellules cancéreuses du sein.....	65
1. Etudes antérieures / choix des modèles cellulaires et des ferrocifènes.....	65
1.1. Choix du modèle cellulaire.....	65
1.2. Choix des ferrocifènes testés.....	65
2. Configuration expérimentale choisie pour l'électrochimie.....	69
3. Etude électrochimique de l'effet de ferrocifènes sur les cellules MDA-MB-231.....	72
3.1. Comportement vis-à-vis d'une stimulation mécanique.....	74
3.2. Effet de l'incubation des ferrocifènes.....	72
3.2.1. Suivi électrochimique : résultats pour C = 1 ou 10 μM et t = 10 minutes.....	74
3.2.2. Modification du protocole : mise en relation avec les temps longs.....	75
3.2.3. Antiprolifération : résultats pour C = 25 μM et t = 24 h pour les cellules MDA-MB231.....	77
3.2.4. Suivi électrochimique : résultats pour C = 25 μM et t = 24 h pour les cellules MDA-MB231.....	82
4. Etude électrochimique de l'effet de ferrocifènes sur les cellules MCF-7.....	90
4.1. Antiprolifération : résultats pour C = 25 μM et t = 24 h pour les cellules MCF-7...	90
4.2. Suivi électrochimique : résultats pour C = 25 μM et t = 24 h pour les cellules MCF-7.....	92
5. Bilan des résultats et discussion.....	94
6. Perspectives.....	98
Conclusion.....	99
Partie Expérimentale.....	103
Références bibliographiques.....	113

Introduction

Ce travail s'inscrit dans un cadre plus large concernant l'application des ultramicroélectrodes à l'étude d'un phénomène biologique majeur qu'est le stress oxydant. Les dimensions des ultramicroélectrodes autorisent leur positionnement au contact d'une cellule vivante isolée. Les faibles quantités (femtomoles) d'espèces électroactives libérées par la cellule après stimulation dans la « synapse artificielle », créée entre sa surface et celle de l'électrode, se traduisent par des variations importantes de la concentration du messager chimique. Cette configuration garantit leur détection sous la forme d'un courant d'oxydation avec un rapport signal sur bruit élevé et offre notamment l'intérêt d'analyser en temps réel leurs flux d'émission.

Le stress oxydant est lié à une production excessive des espèces réactives de l'oxygène et de l'azote. Ainsi, une faible proportion de l'oxygène métabolique (<1%) n'est pas réduite en eau mais mène à la formation de l'ion superoxyde et de ses dérivés, radicalaires ou non, mais hautement réactifs *in fine*. Les mécanismes de défense anti-oxydants permanents ou mis en place suite à un stress permettent à l'organisme de se maintenir à un niveau redox physiologique. Si cet équilibre est rompu (défaut des défenses anti-oxydantes, inflammation, stress extérieur lié à des sources exogènes -soleil, tabac, alcool etc...), un état de stress oxydant s'installe. Ce mécanisme biologique majeur conduit par la suite à des pathologies, évidemment multifactorielles, telles que certains cancers, des dégénérescences neuronales, le diabète, des maladies cardio-vasculaires, etc...

La méthode d'analyse des phases initiales du stress oxydant au moyen d'ultramicroélectrodes est appliquée au laboratoire depuis de nombreuses années et a permis l'analyse de la réponse oxydative de cellules de la peau (fibroblastes), de cellules immunitaires, lymphocytes et macrophages... Le travail présenté dans ce manuscrit a pour but d'étendre la méthodologie analytique d'utilisation des microélectrodes de carbone platiné à l'étude du lien entre stress oxydant et l'effet de substances anti-cancéreuses sur des cellules tumorales du sein (nommées MCF-7 et MDA-MB-231). Dans ce cadre, une collaboration a été mise en place avec l'équipe des Pr. Gérard Jaouen et Dr. Anne Vessières à l'Ecole Nationale Supérieure de Chimie de Paris qui ont pour spécialité la synthèse d'une nouvelle classe de molécules anticancéreuses, les ferrocifènes, qu'ils ont inventées.

Le tamoxifène (TAM) est l'un des médicaments les plus vendus pour ce qui est du traitement du cancer du sein. Malheureusement, il n'est efficace que contre les cancers dits hormono-dépendants, alors qu'un tiers des cancers du sein est hormono-indépendant (notés ER-). Dans ce contexte, la famille des ferrocifènes représente une alternative prometteuse. Ces composés, dont le cycle aromatique β du tamoxifène est substitué par un ferrocène, ont un effet antiprolifératif à la fois sur des lignées cellulaires cancéreuses du sein ER+ (lignée MCF-7) et ER- (lignée MDA-MB-231). L'action anticancéreuse des ferrocifènes semble impliquer la formation d'une espèce cytotoxique de type quinone méthide issue de l'oxydation initiale du squelette ferrocène en cation ferricinium. Une fois formé, le cation ferricinium facilite l'oxydation intramoléculaire du phénol, conduisant alors à la production de quinone méthide, agent hautement toxique. Cette spécificité, induite par la présence du groupement ferrocène, semble expliquer la meilleure activité des ferrocifènes par comparaison avec le tamoxifène seul. Le mode d'action des ferrocifènes n'est peut-être pas unique et on ne peut exclure l'existence d'une réactivité directe du médicament avec les systèmes enzymatiques (NADPH-oxydase, NO-synthase) faisant intervenir la production des espèces du stress oxydant aidant ainsi à la mort des cellules cancéreuses.

Dans ce contexte, le chapitre I présente les avantages des ultramicroélectrodes pour la détection de flux cellulaires infinitésimaux à l'échelle de la cellule unique isolée. Leurs propriétés physico-chimiques y sont développées par le biais de la présentation des lois qui régissent la diffusion au voisinage de ces objets micrométriques et donc des équations de courant qui en résultent, montrant ainsi leur grand intérêt analytique et leur utilisation possible selon le principe expérimental de détection de la « synapse artificielle » sur cellule unique. Dans le chapitre II, nous avons donné une description non exhaustive des mécanismes du stress oxydant, de la nature des espèces émises ainsi que de leur réactivité et des systèmes enzymatiques membranaires responsables du stress oxydant selon les mécanismes étudiés historiquement au laboratoire. Les méthodes (spectrophotométriques, chimiluminescence, RPE, colorimétrie, fluorescence...) de détection du stress oxydant sont ensuite présentées et comparées aux techniques électrochimiques sur ultramicroélectrodes afin d'estimer les avantages et inconvénients de chaque technique. Un résumé de la méthodologie analytique mise au point au laboratoire est également proposé.

Le cancer du sein (physiopathologie, causes, incidence, traitements) ainsi que les lignées cellulaires modèles étudiées dans ce travail (cellules MCF-7 et MDA-MB-231) sont décrits au début du chapitre III. Le mode d'action des molécules anticancéreuses synthétisées par l'équipe d'Anne Vessières (ferrocifènes et ferrocénophanes) sur ces cellules tumorales est ensuite dressé, de même que leur structure et réactivité. Le chapitre IV décrit l'étude de la production des espèces réactives de l'oxygène et de l'azote par

ultramicroélectrodes : le choix des ferrocifènes, les conditions expérimentales (configuration de l'expérience, temps et concentration d'incubation, type de stimulation) y sont discutées. Puis les résultats proprement dits sont analysés et interprétés (étude morphologique de l'antiprolifération cellulaire et étude électrochimique).

Bilan, conclusions et perspectives clôtureront cette partie afin de mettre en lumière l'apport de ce travail dans la littérature. Enfin, en annexe, la partie expérimentale regroupera la méthode de fabrication des ultramicroélectrodes, la description des méthodes de mesures électrochimiques, les modes opératoires de culture et de préparation cellulaire ainsi que le protocole expérimental de mesure du stress oxydant utilisé.

Chapitre I : Application des ultramicroélectrodes à l'analyse de la sécrétion cellulaire à l'échelle de la cellule unique

1. Avantages des ultramicroélectrodes en électrochimie

En électrochimie analytique, lorsque la dimension de l'électrode de travail devient micrométrique, le comportement de l'électrode commence à se distinguer de celui des électrodes millimétriques habituelles. Ainsi, la vitesse du transfert de masse de la solution à l'électrode, le rapport signal sur bruit, la chute ohmique, ou la constante de temps sont modifiés de manière avantageuse. Ces électrodes micrométriques sont communément nommées « microélectrodes » ou « ultramicroélectrodes ». Leurs dimensions sont de l'ordre de la dizaine de microns et vont jusqu'à quelques dizaines de nanomètres.^a Les paragraphes qui suivent seront consacrés à la présentation des propriétés particulières de ces électrodes.

Le régime de diffusion change suivant les dimensions de l'électrode. Pour ce qui est d'une électrode millimétrique, la couche de diffusion (zone où la concentration en espèces électroactives est différente de celle en solution) a une épaisseur de quelques microns, négligeable devant la taille de l'électrode.[1]



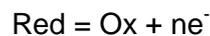
Figure I-1. a. Diffusion de la matière à la surface d'une électrode plane. b. Diffusion de la matière à la surface d'une ultramicroélectrode de type disque.

De ce fait, puisque l'on peut négliger les effets de bord, le régime de diffusion est linéaire semi-infini. Au contraire, pour une ultramicroélectrode, l'épaisseur de la couche de

^a Les termes « microélectrodes » et « ultramicroélectrodes » ont normalement un sens différent. Dans le domaine de l'électrochimie moléculaire, on distingue le cas où l'expérience électrochimique consomme la totalité de l'espèce détectée (électrolyse) du cas où l'expérience n'altère pas (ou de manière négligeable) la quantité d'espèce détectée (analyse). Cette distinction est basée sur le rapport A/V (où A est l'aire de l'électrode et V le volume de la solution). Quand ce rapport est élevé, les conditions expérimentales sont celles de l'électrolyse. Quand ce rapport est inférieur à 1 (électrodes millimétriques et volume de quelques dizaines de mL), les conditions sont celles de l'analyse et l'électrode est alors nommée « microélectrode ». Parce que leurs propriétés ne découlent qu'indirectement de leur taille et pour se démarquer de cette nomenclature utilisée en électrochimie moléculaire, les électrodes micrométriques sont donc appelées « ultramicroélectrodes ». Néanmoins, la terminologie actuelle semble ne plus respecter ces règles et certains désignent les électrodes micrométriques uniquement en référence à leur dimension, c'est-à-dire « microélectrodes ».

diffusion est alors du même ordre de grandeur que la taille de l'électrode. Les effets de bord ne peuvent plus être négligés et une couche de diffusion hémisphérique se forme (**Figure I-1**). La vitesse du transfert de masse augmente jusqu'à atteindre une valeur stationnaire. Le courant faradique résultant, contrairement aux électrodes millimétriques, ne décroît donc pas du temps.

Pour illustrer ce constat, considérons une solution contenant une espèce oxydable Red à la concentration C^*_{Red} . Le potentiel (noté E) d'une électrode immergée dans la solution est fixé, par rapport à une référence, de manière à oxyder Red selon la réaction ($E \gg E^0$, où E^0 est le potentiel standard du couple Ox/Red) :



Dès l'instant où Red est consommé au voisinage de l'électrode, un transfert de masse a lieu du sein de la solution vers la surface de l'électrode. Nous considérerons le cas où ce transfert est uniquement assuré par diffusion. La différence de comportement entre électrodes millimétriques et micrométriques peut être illustrée (**Figure I-2**) en voltammétrie cyclique linéaire à balayage de tension ($E = E_i \pm vt$; où v est la vitesse de balayage et E_i le potentiel initial).

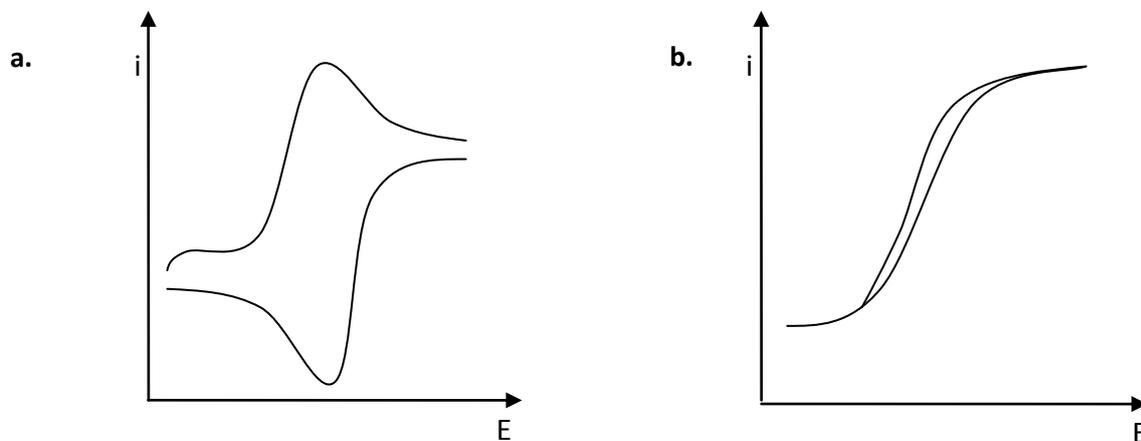


Figure I-2. a. Voltammétrie cyclique sur électrode millimétrique. b. Voltammétrie cyclique sur ultramicroélectrode disque.

Pour ce qui est d'une électrode millimétrique, le régime de diffusion linéaire ne peut atteindre un état stationnaire permettant de compenser la consommation de Red à l'électrode et l'épaisseur de la couche de diffusion augmente au cours du temps. Le transfert de masse est donc de plus en plus lent, d'où un courant faradique décroissant dès lors que $E > E^0$ (Ox/Red) (**Figure I-2a**). Pour une ultramicroélectrode, l'établissement d'une couche de diffusion stationnaire est possible, ce qui se traduit par un courant constant pour $E > E^0$ (Ox/Red) (le courant atteint une valeur plateau pour $E > E^0$; **Figure I-2b**).

2. Equations de courant

2.1. Loïs de Fick

Si on estime la réaction électrochimique limitée par la diffusion, le courant détecté à l'électrode est directement lié au flux de l'espèce s'oxydant à l'électrode. Cela revient donc à résoudre les lois de Fick qui établissent un lien entre flux et concentration d'une espèce en fonction du temps et de la distance à l'électrode.[2]

Première loi de Fick

La première loi de Fick établit que le flux d'une espèce « i » est proportionnel au gradient de concentration C_i . D_i est le coefficient de diffusion ($m^2 \cdot s^{-1}$) de l'espèce « i » :

$$\vec{J}_i = -D_i \vec{\text{grad}} C_i \quad (\text{Eq. I-1})$$

Deuxième loi de Fick

La deuxième loi de Fick exprime que la variation de concentration en fonction du temps est proportionnelle au Laplacien de la concentration :

$$\frac{\partial C_i}{\partial t} = D_i \nabla^2 C_i \quad (\text{Eq. I-2})$$

On remarquera que la formulation du Laplacien n'est pas unique et dépend de la géométrie du système, elle-même déterminée par la géométrie de l'électrode (**Tableau I-1**).

Type	Variable	∇^2
Linéaire	x	$\frac{\partial^2}{\partial x^2}$
Sphérique	r	$\frac{\partial^2}{\partial r^2} + \left(\frac{2}{r}\right) \frac{\partial}{\partial r}$
Cylindrique	r	$\frac{\partial^2}{\partial r^2} + \left(\frac{1}{r}\right) \frac{\partial}{\partial r}$
Disque	r, z	$\frac{\partial^2}{\partial r^2} + \left(\frac{1}{r}\right) \frac{\partial}{\partial r} + \frac{\partial^2}{\partial z^2}$

Tableau I-1. Différentes formes du Laplacien suivant la géométrie du système (i.e., de l'électrode).[3]

2.2. Diffusion sur une ultramicroélectrode sphérique

Il s'agit du cas analytique le plus simple et le plus à même d'illustrer l'effet de la dimension micrométrique sur le comportement de l'électrode. Considérons une électrode sphérique de rayon « r_0 ». La distance entre l'espèce et le centre de l'électrode est notée « r ». La deuxième loi de Fick sur s'écrit alors :

$$\frac{\partial C_{i(r,t)}}{\partial t} = D_i \left(\frac{\partial^2 C_{i(r,t)}}{\partial r^2} + \frac{2}{r} \frac{\partial C_{i(r,t)}}{\partial r} \right) \quad (\text{Eq. I-3})$$

Pour la réaction électrochimique décrite plus haut, et supposée rapide, conditions initiales et limites s'écrivent :

$$\begin{aligned} C_{i(r,0)} &= C_i^* \\ C_{i(r_0,t)} &= 0 \\ \lim_{r \rightarrow \infty} C_{i(r,t)} &= C_i^* \end{aligned}$$

Dans ce contexte, le courant faradique s'écrit, à partir de la première loi de Fick :

$$i = nFAD_i \left(\frac{\partial C_{i(r,t)}}{\partial r} \right)_{r=r_0} \quad (\text{Eq. I-4})$$

Pour la réaction $\text{Red} = \text{Ox} + ne^-$, la résolution de l'équation I-3 associée à l'équation (I-4) donne :^b

$$i = nFD_{\text{Red}} C_{\text{Red}}^* \frac{A}{r_0} \left(1 + \frac{r_0}{\sqrt{\pi D_{\text{Red}} t}} \right) \quad (\text{Eq. I-5})$$

Aux temps courts ($\frac{r_0}{\sqrt{\pi D_{\text{Red}} t}} \gg 1$), on a alors un régime transitoire analogue à celui

observé sur une électrode plane (diffusion linéaire semi-infinie) :

^b Cette résolution nécessite de déterminer en premier lieu l'expression mathématique qui donne la dérivée de la concentration de l'espèce C_i en fonction de « r » et de « t ». Ces calculs nécessitent de passer par un changement de variable ainsi que par les transformées de Laplace.[1, 2] Afin de ne pas surcharger ce chapitre, nous préférons ne pas détailler ces calculs et conseillons au lecteur de consulter les ouvrages spécialisés cités dans cette note.

$$i = nFD_{Red}C_{Red}^* \frac{A}{r_0} \left(\frac{r_0}{\sqrt{\pi D_{Red}t}} \right) = nFD_{Red}C_{Red}^* \frac{A}{\sqrt{\pi D_{Red}t}} \quad (Eq. I-6)$$

Il s'agit de l'équation de Cottrell.

Aux temps longs ($\frac{r_0}{\sqrt{\pi D_{Red}t}} \ll 1$), le courant tend vers une valeur constante (diffusion sphérique/régime stationnaire), c'est-à-dire pour une sphère totalement exposée ($A=4\pi r_0^2$) :

$$i = i_{stat} = nFD_{Red}C_{Red}^* \frac{A}{r_0} = 4\pi nFD_{Red}C_{Red}^* r_0 \quad (Eq. I-7)$$

Si l'on utilise la notation de Nernst pour définir la couche de diffusion (δ est l'épaisseur de la couche de diffusion), on obtient :

$$i = nFAD_{Red} \frac{C_{Red}^*}{\delta} \quad (Eq. I-8)$$

On passe donc au cours du temps d'une épaisseur transitoire ($\delta = \sqrt{\pi D_{Red}t}$) qui augmente jusqu'à obtenir une épaisseur constante ($\delta = r_0$).

Toute électrode est censée, pour peu que le temps de l'expérience le permette, atteindre ces deux régimes. En réalité, il n'en est rien pour les électrodes millimétriques, et ce pour deux raisons :

- La bascule temps courts/temps longs ($\frac{r_0}{\sqrt{\pi D_{Red}t}} = 1$) correspond à (pour $D_i = 10^{-9}$ m².s⁻¹ et $r_0 = 1$ mm) à $t = 318$ s. La relation $\frac{r_0}{\sqrt{\pi D_{Red}t}} \ll 1$ ne sera alors vérifiée pour des temps largement supérieurs et jamais atteints dans une expérience classique.
- Quand bien même ces temps seraient atteints, un autre régime stationnaire aura été obtenu bien avant. En effet, la couche de diffusion correspondant au régime diffusif stationnaire doit être de l'ordre de la taille de l'électrode, grandeur impossible à

atteindre pour une électrode millimétrique puisqu'une couche de convection (quelques centaines de microns) sera rencontrée bien avant.

Pour des électrodes micrométriques, la bascule temps courts/temps longs s'effectue

pour des temps assez faibles ($\frac{r_0}{\sqrt{\pi D_{Red} t}} = 1$ pour $t = 0,318$ ms pour $D_i = 10^{-9} \text{ m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$ et $r_0 = 1$

μm) et accessibles à l'échelle de l'expérience électrochimique. Une couche de diffusion stationnaire micrométrique peut donc être obtenue avant établissement de la couche de convection. Une ultramicroélectrode est donc une électrode pour laquelle un régime de diffusion sphérique et stationnaire peut être atteint. Certes, ce sont les dimensions micrométriques de l'électrode qui permettent d'obtenir ce régime mais elles n'en sont pas la seule cause directe car les coefficients de diffusion des espèces électroactives jouent un rôle primordial.

2.3. Diffusion sur une ultramicroélectrode disque

La diffusion à la surface d'une ultramicroélectrode disque est nettement plus complexe à résoudre. Néanmoins, le comportement global est similaire à celui de l'électrode sphérique et un régime diffusif stationnaire peut rapidement être atteint. Le courant faradique stationnaire est alors de la forme :

$$i = \frac{4nFAD_{Red}C_{Red}^*}{r_0} = 4nFD_{Red}C_{Red}^*r_0 \quad (\text{Eq. I-9})$$

Comme pour une microélectrode sphérique et contrairement à une électrode millimétrique (Cottrell), le courant faradique d'une ultramicroélectrode ne dépend alors plus de l'aire de l'électrode (r_0^2) mais directement de son rayon r_0 . L'épaisseur de la couche de diffusion est micrométrique, et dépend de la taille de l'électrode, ce qui fait d'une ultramicroélectrode un capteur local de concentration. En effet l'électrode reste « aveugle » à tout phénomène se déroulant au-delà d'une distance de quelques fois son rayon. C'est cette propriété qui a conduit à la notion de microscopie électrochimique (SCEM développée par R.Engström puis A.J.Bard à partir des travaux de C.Amatore et R.M. Wightman).

3. Intérêts analytiques des ultramicroélectrodes

3.1. Le problème du courant capacitif

Indépendante de tout processus faradique, la réorganisation de la solution au voisinage immédiat de l'électrode (mouvement d'ions, double couche électrochimique)

génère un courant capacitif dès lors que l'on applique un potentiel à l'électrode de travail. Ce courant est de la forme :

$$i_c = \frac{\Delta E}{R} e^{-t/RC} \quad (\text{Eq. I-10})$$

Où ΔE est la différence de potentiel imposée, R la résistance de la solution et C la capacité de la double couche. De par sa forme (exponentielle décroissante), le courant capacitif sera rapidement négligeable si la constante de temps $\tau = RC$ est faible. Or la capacité de la double couche est proportionnelle à la surface de l'électrode ($C=AC_d$ avec A la surface d'électrode et C_d la capacité surfacique). Pour une électrode millimétrique ou de taille inférieure, la résistance de la solution est inversement proportionnelle au rayon ($R \propto 1/r_0$). Pour un disque de rayon r_0 ($A = \pi r_0^2$), on aura donc : $\tau \propto r_0$. Diminuer la taille de l'électrode permet donc dans de diminuer la constante de temps et de rapidement limiter l'implication du courant capacitif pour un potentiel donné. Les ultramicroélectrodes sont donc adaptées pour la mesure de phénomènes très rapides.

Par ailleurs, le courant capacitif pose un problème dès lors que l'on varie le potentiel de l'électrode volontairement (balayage) ou non (bruit électrique) :

$$i_c = C \frac{dE}{dt} \quad (\text{Eq. I-11})$$

i_c est alors dépendant de C et donc de r_0^2 . Le rapport signal/bruit, c'est-à-dire le rapport entre le signal résultant de la réaction électrochimique (faradique) et la contribution capacitive est tel que :

$$\text{Electrode millimétrique :} \quad \frac{i_F}{i_c} \propto \frac{r_0^2}{C} \neq f(r_0) \quad (\text{Eq. I-12})$$

$$\text{Ultramicroélectrode :} \quad \frac{i_F}{i_c} \propto \frac{r_0}{C} \propto \frac{1}{r_0} \quad (\text{Eq. I-13})$$

Diminuer la taille de l'électrode et atteindre la dimension d'une ultramicroélectrode permet donc d'augmenter le rapport signal/bruit.

3.2. La chute ohmique

Si l'expérimentateur contrôle la différence de potentiel appliquée entre l'électrode de travail et l'électrode de référence, ce dernier ne contrôle le potentiel de l'électrode de travail qu'à une chute de potentiel près, la chute ohmique Ri . Même si un système à trois

électrodes (ajout d'une électrode auxiliaire) permet de la limiter, la chute ohmique n'est jamais totalement annihilée (résistance non compensée) et peut poser un problème, notamment en milieu résistif ou en voltamétrie à haute vitesse de balayage. On a alors :

- Pour une électrode millimétrique : $Ri \propto \frac{1}{r_0} \times r_0^2 = r_0$
- Pour une ultramicroélectrode : $Ri \propto \frac{1}{r_0} \times r_0 = cste$

Diminuer la taille de l'électrode de travail permet donc de diminuer la chute ohmique jusqu'à atteindre une valeur constante indépendante de la taille de l'électrode. On peut donc, avec les ultramicroélectrodes, travailler à haute vitesse de balayage, dans des milieux résistifs ou en régime stationnaire avec un système à deux électrodes pourvu que la contre-électrode soit de taille suffisante pour que son potentiel ne dévie pas de manière significative de son potentiel à courant nul car elle joue alors de facto le rôle d'électrode de référence.

4. Importance des ultramicroélectrodes à l'échelle de la cellule unique et méthode de détection

Au-delà de leurs propriétés particulières en électrochimie, les ultramicroélectrodes sont particulièrement adaptées à la détection de l'émission de molécules au niveau d'une cellule unique. Leur taille est en effet comparable aux cellules étudiées (quelques microns), offrant alors une bonne résolution spatiale. De plus, à travers leurs propriétés intrinsèques, elles permettent la détection de variations de concentrations ayant lieu dans une gamme inférieure à la milliseconde. Leurs caractéristiques les rendent donc compatibles avec l'étude d'événements biologiques rapides et la compréhension de leurs mécanismes.

4.1. Principe expérimental de détection

Les mesures sont réalisées directement sur des cellules cultivées dans des boîtes de Petri et identifiées à l'aide d'un microscope (voir Partie expérimentale). L'analyse est effectuée dans un tampon PBS (Phosphate Buffer Saline) aéré qui permet de conserver l'équilibre osmotique des cellules et un pH physiologique de 7,4 tout en ayant des propriétés compatibles avec les contraintes électrochimiques (bonne conductance, contributions faradiques faibles ou à peu près constantes en potentiel). Pour ce qui est de la mesure de l'activité d'une cellule en état de stress oxydant, une ultramicroélectrode de carbone platinée est placée au dessus d'une cellule à une distance de l'ordre de 5 μm (contrôlée par des micromanipulateurs de précision submicrométrique). La stimulation est assurée grâce à un capillaire de verre étiré (<1 μm) dont la pointe bouchée est positionnée entre la cellule et la surface active de l'ultramicroélectrode. L'action mécanique du capillaire sur la cellule (**Figure**

I-3) provoque la dépolarisation de la membrane cellulaire ce qui active alors les systèmes enzymatiques responsables du stress oxydant (NADPH oxydase, NO synthases, voir chapitre II). Les molécules résultantes libérées dans l'espace extracellulaire diffusent ensuite vers l'ultramicroélectrode où elles sont oxydées si le potentiel de l'électrode le permet. Dans ce contexte, la méthode électrochimique la plus simple est l'ampérométrie à potentiel constant. Le choix du potentiel est guidé par la nature de l'électrode et des espèces à détecter, lesquelles doivent être électroactives dans une gamme de potentiel allant de 0 à 1 V. Au-delà de ces deux valeurs limites, la réduction de l'oxygène (dont la concentration de l'ordre de 0.24 mmol.L^{-1} dans les conditions physiologiques utilisées ici est très supérieure à celle des espèces détectées) et l'oxydation de l'eau (le solvant) empêchent toute détection précise.

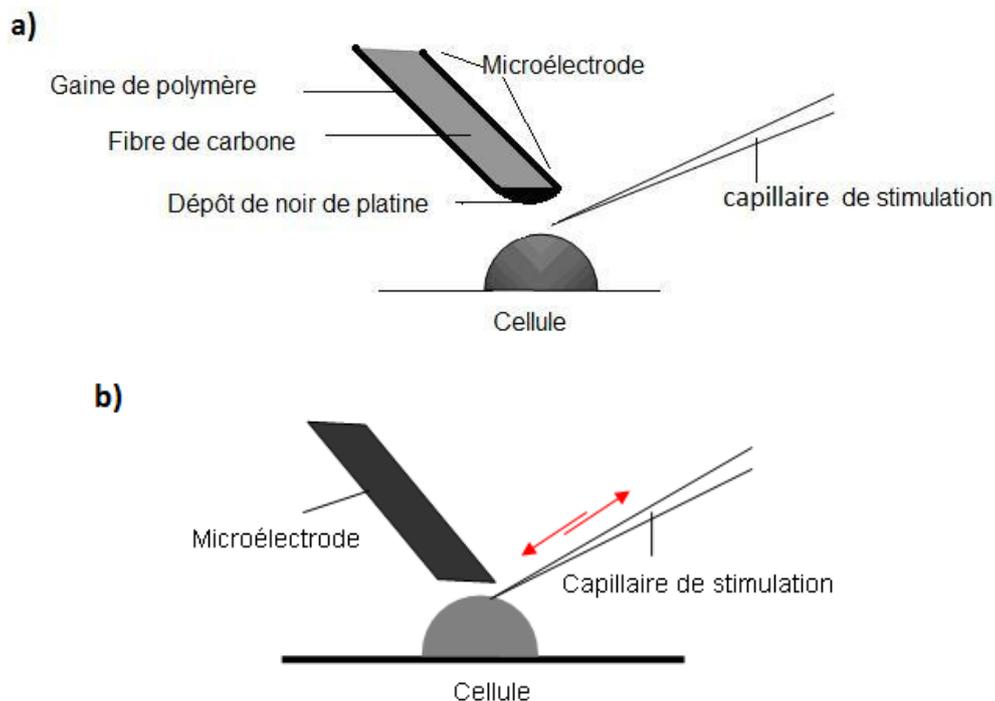


Figure I-3. a) Configuration expérimentale classique d'une expérience de mesure de stress oxydant sur cellule unique avec ultramicroélectrode de carbone platiné. b) Stimulation mécanique du stress oxydant. En pratique, la pointe du capillaire est rapidement abaissée selon l'axe normal et immédiatement relevée pour ne pas perturber la détection du flux d'espèces libérées.

4.2. Modification de la surface de l'électrode

L'une des ultramicroélectrodes les plus simples à fabriquer et dont à la fois le faible coût et la robustesse en fait un outil de choix est la fibre de carbone. Elle convient parfaitement, par exemple, pour la détection des neurotransmetteurs émis par exocytose.[4] Malheureusement, les espèces électroactives caractéristiques du stress oxydant (H_2O_2 , ONOO^- , NO , NO_2^-) se détectent mal en oxydation sur carbone (vitesse de transfert

électronique lente, potentiels de détection élevés proches ou au-delà de l'oxydation de l'eau). Pour éviter ce problème, la surface de carbone est modifiée par un dépôt de noir de platine, c'est-à-dire un réseau dendritique de platine nanométrique couramment utilisé pour la modification de surface des matériaux.[5, 6] Dans notre cas (voir partie expérimentale), le dépôt de noir de platine est effectué par voie électrochimique (électrolyse à potentiel constant : réduction de l'acide hexachloroplatinique (H_2PtCl_6)). Un « cluster de noir de platine » est alors observé sur la surface de l'électrode (**Figure I-4**). La morphologie de la surface est totalement changée par cette déposition de noir de platine, dont la structure dendritique permet d'augmenter la surface spécifique de l'électrode et le nombre de sites actifs mais augmente le bruit thermique (également nommé bruit de résistance, ou bruit de Johnson), qui est le bruit généré par l'agitation thermique des électrons des conducteurs (résistances) laquelle croît avec la température.

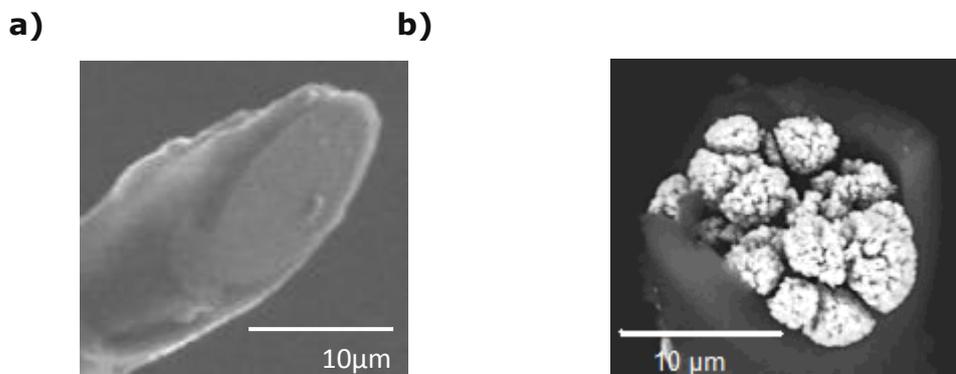


Figure I-4. Photographie d'une fibre de carbone non platinée (a), puis platinée (b), (ultramicroélectrode de diamètre 10 μm en microscopie électronique à balayage)

Conclusion

Dans ce chapitre, nous avons présenté les principales propriétés des ultramicroélectrodes et plus particulièrement décrit comment les utiliser pour détecter l'activité biologique d'une cellule émettrice. Dans le chapitre qui suit, nous nous attacherons à présenter le phénomène biologique d'intérêt majeur que nous souhaitons étudier grâce à ces outils électrochimiques : le stress oxydant.

Chapitre II : Application à la détection du stress oxydant

1. Définition du stress oxydant

Lorsque les cellules utilisent l'oxygène pour produire de l'énergie, des radicaux libres peuvent être créés en parallèle de la production de l'ATP (adénosine triphosphate), au sein des mitochondries, mais cette voie n'est pas unique. Ces sous-produits sont généralement des espèces réactives de l'oxygène (ROS, Reactive Oxygen Species en anglais), ou de l'azote (RNS, pour Reactive Nitrogen Species) qui résultent de processus redox cellulaires. Ces espèces peuvent avoir un effet néfaste sur le métabolisme de l'organisme lorsque leur concentration augmente trop. Ainsi, à concentration élevée, elles génèrent une situation dite de stress oxydant, processus délétère qui peut endommager les structures cellulaires et conduire à l'apoptose.[7] La définition du stress oxydant se réfère à une rupture de l'équilibre homéostatique normalement maintenu entre la production des espèces réactives de l'oxygène et de l'azote et la défense antioxydante de l'organisme. Il s'agit donc d'une perturbation dans l'équilibre pro-oxydant/antioxydant en faveur de la formation des espèces réactives, conduisant à des dommages potentiels sur les cellules, les tissus, l'ADN, etc...[8] Les ROS et RNS jouent ainsi un rôle majeur dans le développement d'affections chroniques et dégénératives, comme le cancer, l'arthrite, le vieillissement cellulaire, les maladies auto-immunes, les maladies cardiovasculaires et les maladies neurodégénératives. Par ailleurs un déficit de plusieurs ROS et RNS est tout aussi délétère, en particulier en conduisant à une vulnérabilité par rapport aux attaques virales ou bactériennes. Un système de contrôle adapté est donc primordial dans la vie des organismes afin de maintenir des concentrations optimales en ROS et RNS, ce qui est défini par l'homéostasie. Ainsi, des mécanismes sont mis en jeu pour limiter ces concentrations et s'opposer aux effets délétères oxydants en produisant des antioxydants naturellement in situ, ou en les extrayant de l'extérieur à partir des aliments ou des suppléments comme la vitamine C par exemple. Antioxydants endogènes et exogènes agissent comme « nettoyeur de radicaux libres » en anticipant et en réparant les dommages provoqués par les ROS et les RNS, tout en autorisant son utilisation comme arme « multi-cible » du système de défense immunitaire contre certaines agressions.

Le stress oxydant peut résulter par exemple de :

- Une capacité antioxydante diminuée: comme des mutations affectant les activités des enzymes antioxydantes telles que la CuZn-SOD (superoxyde dismutase), la glutathion (GSH) peroxydase, ou les toxines, appauvrissant alors la défense antioxydante. Par exemple, de nombreux xénobiotiques sont métabolisés en se combinant avec la GSH. A

haute dose, cela peut épuiser le stock de GSH et provoquer un stress oxydant, même si les xénobiotiques ne génèrent pas eux-mêmes d'espèces réactives. L'insuffisance en oligo-éléments (Zn^{2+} , Mg^{2+} , Fe^{2+} , Cu^{2+} , Se) ou en antioxydants peut également causer le stress oxydant.

- Une augmentation de la production d'espèces réactives: par exposition des cellules à l'oxygène dissous à une concentration élevée ou à d'autres toxines qui sont des espèces réactives (NO_2) ou sont métabolisées puis engendrent des espèces réactives (le paraquat), ou par une activation excessive des systèmes «naturels» de production de ces espèces (activation inappropriée de cellules phagocytaires dans les maladies inflammatoires chroniques par exemple).

Les conséquences du stress oxydant incluent notamment:

- Un dommage cellulaire: cela implique des dommages oxydants à tout ou partie des cibles moléculaires: lipides, ADN, protéines, glucides, etc. Ils peuvent également avoir lieu lors de l'adaptation de la cellule aux conséquences du stress oxydant.
- La mort cellulaire: si la cellule ne peut pas réparer les dommages oxydants ou remplacer les molécules endommagées, en particulier par des dommages à l'ADN, elle ne peut survivre et déclenche la mort cellulaire, par apoptose qui correspond à un suicide cellulaire, ou mort cellulaire programmée, selon un programme génétique établi ou par nécrose suite à un arrêt pathologique du fonctionnement d'une cellule, ce qui provoque sa mort.

1.1. Nature de la réactivité des ROS/RNS

ROS et RNS sont des termes génériques imprécis utilisés en biologie et en médecine. Ils décrivent plusieurs espèces, pouvant être radicalaires, chargées ou non. On peut citer par exemple les radicaux hydroxyle (OH^\bullet), l'anion-radical superoxyde ($O_2^{\bullet-}$), le monoxyde d'azote (NO^\bullet), le dioxyde d'azote (NO_2^\bullet), les peroxydes (ROO^\bullet) et les lipides peroxydés (LOO^\bullet). En outre, le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2), l'ozone (O_3), l'oxygène singulet (1O_2), l'acide hypochloreux ($HOCl$), l'acide nitreux (HNO_2), le peroxydinitrite ($ONOO^-$), le trioxyde d'azote (N_2O_3), et le peroxyde lipidique ($LOOH$), sont des dérivés non radicalaires tout aussi bien couverts par ces acronymes. Toutes ces espèces peuvent conduire à des réactions radicalaires ou globalement oxydantes dans les organismes vivants.[9] Dans la famille des radicaux mentionnés plus haut, on distinguera les radicaux primaires qui ont un rôle physiologique particulier et les radicaux secondaires, produits par réactions (non contrôlées, généralement) des radicaux primaires avec plusieurs matériaux biologiques présents dans une cellule soumise à un stress oxydant (lipides, protéines, glucides...).[7] Nous nous limiterons dans cet exposé à la description des dérivés primaires.

1.2. Les différents dérivés réactifs de l'oxygène en milieu biologique

1.2.1. Les dérivés primaires non radicalaires

Bien que ne possédant pas d'électrons non appariés, ils sont aussi réactifs globalement que des radicaux dont ils sont souvent les précurseurs.

Le peroxyde d'hydrogène H₂O₂

A forte concentration, cette espèce interagit instantanément avec les sucres, les acides aminés, les lipides, en particulier les phospholipides, et les acides nucléiques bien que cela nécessite généralement la présence de certains ions métalliques libres dont Fe²⁺ plus particulièrement (réaction de Fenton) pour conduire à la formation de radicaux OH[•]. Le peroxyde d'hydrogène H₂O₂ se forme par dismutation directe de l'anion superoxyde O₂^{•-} ou sous l'action d'une superoxyde dismutase (SOD).



La transformation du radical superoxyde O₂^{•-} en H₂O₂ peut s'effectuer spontanément mais l'enzyme superoxyde dismutase SOD l'accélère environ d'un facteur 10 000.

Une autre enzyme, la catalase, présente dans le cytosol (mais absente dans les mitochondries) détruit le peroxyde d'hydrogène H₂O₂ en réalisant une coupure réductrice hétérolytique de sa liaison O-O, créant de ce fait deux molécules d'eau H₂O, et oxyde ensuite une autre molécule de H₂O₂ pour donner du dioxygène. Ce processus évite ainsi la formation de radicaux [•]OH.



Une autre enzyme, la glutathion peroxydase (notée GSHPx), présente à la fois dans le cytosol et la mitochondrie, détruit le peroxyde d'hydrogène H₂O₂ en produisant de l'eau H₂O et du dioxygène O₂ (GSH représente le monomère réduit du glutathion, et GS-SG représente le disulfure de glutathion oxydé).



On constate que la superoxyde dismutase a un effet protecteur contre les réactions radicalaires mais seulement dans la mesure où la catalase et la glutathion peroxydase sont présentes en quantités suffisantes pour détruire le H₂O₂ formé. Sinon, ce dernier conduit à la

formation de radicaux hydroxyles $\cdot\text{OH}$. Il existe plusieurs voies de transformation du peroxyde d'hydrogène H_2O_2 en radical hydroxyle $\cdot\text{OH}$.

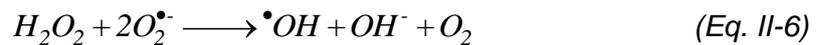
a. L'homolyse de HOOH , sous l'influence de rayonnements ionisants par exemple, génère deux radicaux $\cdot\text{OH}$:



b. La décomposition de H_2O_2 catalysée en présence de cations métalliques, en particulier Fe^{2+} (réaction de Fenton) ou de Cu^+ , donne un radical $\cdot\text{OH}$:



c. La réduction de H_2O_2 par l'anion superoxyde $\text{O}_2^{\cdot-}$ donne un radical $\cdot\text{OH}$ (réaction de Haber-Weiss) :



d. H_2O_2 peut être converti en acide hypochloreux HOCl par la myéloperoxydase (MPO) des cellules neutrophiles en présence d'ions chlorures. HOCl est ensuite transformé en radical $\cdot\text{OH}$ via sa réduction par l'ion superoxyde $\text{O}_2^{\cdot-}$.



Le peroxyde d'hydrogène, bien que moins réactif que certaines autres ROS, n'en est pas moins une espèce à risque, mais jouant tout aussi bien un rôle de signalisation efficace de par sa grande durée de vie qui lui permet de diffuser loin de sa source, à la différence du radical hydroxyle $\cdot\text{OH}$ qui a un effet éphémère et local du fait de sa durée de vie courte (bien que son effet initial puisse être propagé par des réactions en chaîne).

L'anion peroxynitrite ONOO^-

En présence de l'anion superoxyde ($\text{O}_2^{\cdot-}$), NO^\cdot réagit avec $\text{O}_2^{\cdot-}$ (**Figure II-1**) et génère rapidement l'anion peroxynitrite (ONOO^-). Par contre, en présence de dioxygène O_2 , NO^\cdot produit des oxydes d'azote (NO_3^- , NO_2^- , N_2O_3), généralement des agents nitrosants, qui

conduisent à la formation de nitrites et de nitrosothiols par nitrosation dans les milieux biologiques.[10]

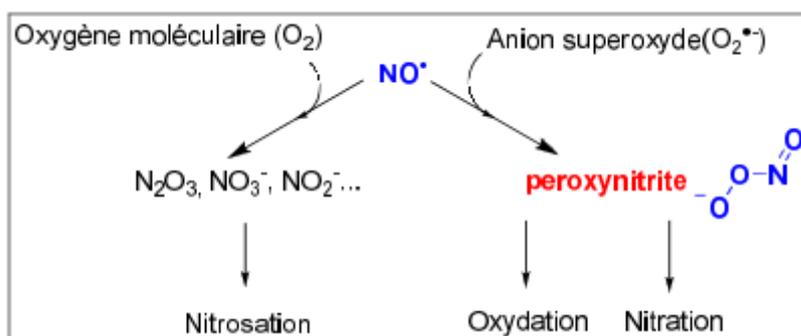
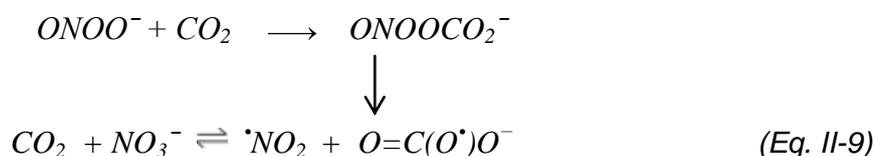


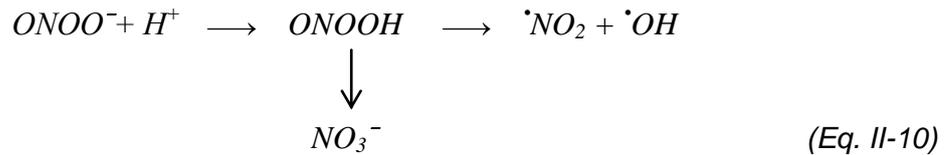
Figure II-1. Espèces réactives de l'azote dérivées de NO• [11]

Le peroxynitrite ONOO⁻ est un isomère du nitrate NO₃⁻. Bien que l'acide peroxynitrique soit très réactif et spontanément assez instable, sa base conjuguée est stable en milieu très basique.[12]

Le peroxynitrite ONOO⁻ peut effectuer une réaction nucléophile avec le dioxyde de carbone CO₂. C'est la réaction prédominante pour ONOO⁻ dans les conditions physiologiques en formant du nitrosoperoxycarbonate ONOOCO₂⁻. Ce dernier s'homolyse et donne du dioxyde d'azote [•]NO₂ et le radical-anion carbonate O=C(O[•])O⁻, c'est-à-dire une paire de radicaux de nouveau encagés. Environ 66 % de ces deux radicaux se recombinent en formant du dioxyde de carbone CO₂ et un ion nitrate NO₃⁻. Les 33 % restants s'échappent de la cage de solvant et réagissent comme des radicaux libres. Ce sont ces radicaux (O=C(O[•])O⁻ et [•]NO₂) qui sont soupçonnés causer plusieurs des dommages cellulaires liés à la formation de peroxynitrite.



Le peroxynitrite est cependant lui-même une espèce très réactive qui peut réagir directement avec les différentes cibles biologiques et des composants de la cellule, comme les lipides, les thiols, les résidus d'acides aminés, les bases de l'ADN, et les antioxydants de faible poids moléculaire. En outre, le peroxynitrite peut réagir avec d'autres molécules pour former d'autres types de RNS, y compris le dioxyde d'azote [•]NO₂, ainsi que d'autres types de radicaux libres puisque la décomposition homolytique de sa forme acide en environnement apolaire produit [•]OH.



1.2.2. Les radicaux libres oxygénés

Le radical hydroxyle $\cdot\text{OH}$

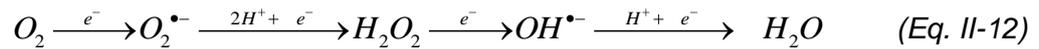
Outre ses propriétés radicalaires (il est capable d'arracher un atome d'hydrogène à toutes les molécules organiques et biologiques), le radical hydroxyle $\cdot\text{OH}$ est parmi les oxydants connus les plus puissants avec un potentiel redox de 2,73 V/ENH en solution acide. En milieu alcalin fort, les radicaux $\text{HO}\cdot$ existent sous leur forme basique conjuguée: le radical anion oxygène $\text{O}\cdot^{-}$ ($\text{pK}_a=11,9$) qui réagit par attaque nucléophile.[13] Aux pH moins basiques, c'est la forme acide qui prédomine et qui réagit sur la matière organique par attaque radicalaire ou transfert d'électron.

$\text{HO}\cdot$ est très réactif, son temps de demi-vie étant estimé inférieur à 70 ns dans l'eau.[14] Il diffuse donc peu et agit directement sur son site de production. Son mode de formation a été détaillé plus haut. Le radical hydroxyle $\cdot\text{OH}$ est particulièrement nocif à l'égard des milieux biologiques. Les vitesses de réaction entre les radicaux $\text{HO}\cdot$ et les composés organiques sont très rapides, de l'ordre de 10^6 à 10^{10} $\text{Lmol}^{-1}\text{s}^{-1}$.[15] Le radical hydroxyle peut endommager virtuellement tous les types de macromolécules en domaine biologique: les glucides, les acides nucléiques (mutations), les lipides (peroxydation lipidique) et des acides aminés (par exemple la conversion de la phénylalanine en m-tyrosine et o-tyrosine). Contrairement à l'anion superoxyde dont la quantité peut être limitée par la superoxyde dismutase, le radical hydroxyle ne peut pas être éliminé par une réaction enzymatique. Les mécanismes éliminant les radicaux hydroxyles pour protéger les structures cellulaires comprennent donc les antioxydants endogènes comme la mélatonine et le glutathion, et les antioxydants alimentaires comme le mannitol et la vitamine E.[16]

L'anion superoxyde $\text{O}_2^{\cdot-}$ et le radical hydroperoxyde $\text{HO}_2\cdot$

L'anion superoxyde est le premier sous-produit de l'oxygène issu de la respiration. Lors de cette dernière, le dioxygène consommé par les cellules eucaryotes aérobies est normalement réduit en eau à travers 4 étapes de réduction monoélectroniques par la cytochrome c oxydase située à la fin de la chaîne respiratoire mitochondriale :





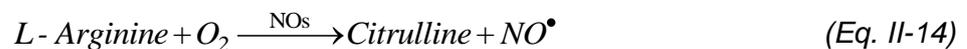
Cependant, une faible proportion (1 à 2%) de l'oxygène absorbé est réduite partiellement en anion superoxyde. La NADPH oxydase, présente dans la membrane plasmique, est également une source importante d'anion superoxyde dans le cadre de la défense immunitaire.



Dans ce contexte, l'anion superoxyde et ses dérivés est utilisé par le système immunitaire pour détruire les micro-organismes envahisseurs. Cependant, même dans ces conditions, quand la concentration en superoxyde augmente, il devient dangereux puisqu'il est le précurseur d'autres entités nettement plus nocives. Comme mentionnée plus haut, sa production peut être limitée ou régulée par différents systèmes enzymatiques comme la superoxyde dismutase (SOD) qui catalyse la dismutation du superoxyde en dioxygène et peroxyde d'hydrogène (Eq. II-11).

Le monoxyde d'azote NO[•]

Le NO[•] est un composé radicalaire. En milieu biologique, son temps de demi-vie est estimé être de l'ordre de quelques secondes, voire quelques dizaines de secondes. C'est une molécule importante de la signalisation cellulaire impliquée dans de nombreux processus physiologiques et pathologiques des mammifères.[17] Il est synthétisé à partir de la L-arginine grâce à l'enzyme NO-synthase (NOs). En présence de NADPH et d'oxygène, la NOs transforme l'arginine en hydroxyarginine qui, après réduction, est transformée en NO[•] et citrulline selon la réaction globale :



Dès sa synthèse, le NO[•] diffuse sous forme gazeuse aussi bien à travers les compartiments polaires aqueux que lipidiques (membranes) et peut donc atteindre tous les compartiments cellulaires et l'environnement extracellulaire. La synthèse et la libération sont simultanées et il n'y a a priori pas de stockage de NO[•] dans les tissus. Le NO[•] exerce un grand rôle dans la vasodilatation,[18] en participant à la régulation de la pression artérielle. Il joue aussi un rôle de messenger puisqu'il diffuse à travers les membranes et pénètre dans les cellules voisines.

Le NO[•] est cependant une molécule instable en présence d'oxygène libre, pouvant alors être transformée spontanément dans l'organisme, en nitrite NO₂⁻ puis en nitrate NO₃⁻.



En dépit de sa simplicité moléculaire, le NO[•] est une composante fondamentale des systèmes neurologiques, physiologiques et immunologiques. Le NO[•] joue un rôle comme neurotransmetteur entre les cellules nerveuses, et sa cible est certains neurones post-synaptiques où il agit dans la fente synaptique. La petite molécule de NO[•] diffuse largement et peut atteindre plusieurs neurones environnants, y compris à plusieurs microns de distance. On a mis en évidence que ce processus est par exemple impliqué dans la mémorisation. De faibles niveaux de production du NO[•] jouent un rôle important dans la protection d'un organe comme le foie contre les dommages ischémiques.[19]

Alors que le NO[•] était considéré initialement comme n'ayant que des effets bénéfiques, des études ultérieures ont montré qu'une production endogène excessive de NO[•] peut avoir des effets néfastes.[20] Par exemple, à concentration élevée, le NO[•] est associé à des maladies inflammatoires et provoque des lésions cérébrales, peut-être par libération excessive de glutamate responsable de l'ouverture de canaux cationiques. Il jouerait également un rôle dans la genèse de la maladie de Parkinson et au cours du choc septique. L'excès de NO[•] pourrait aussi stimuler le développement de certaines tumeurs comme de divers carcinomes ainsi que l'angiogenèse. Des travaux théoriques en cours au laboratoire démontrent qu'il peut être à l'origine de la maladie d'Alzheimer via la production de peroxynitrite. En outre, comme mentionné plus haut, en présence d'un taux élevé d'anion superoxyde O₂^{•-}, le monoxyde d'azote permet la formation d'anion peroxynitrite ONOO⁻ (**Figure II-1**).[21]

1.3. Cas de la défense immunitaire

Dans ce cas particulier, une situation de stress oxydant peut être volontairement mise en place par l'organisme (à travers les macrophages et la phagocytose par exemple), en activant deux types de systèmes enzymatiques afin de déclencher une réponse immunitaire générale.

- Les NADPH oxydases

La NADPH oxydase (nicotinamide-adénine-dinucléotide-phosphate oxydase) est un complexe enzymatique multiprotéique, appartenant entre autres types cellulaires, aux phagocytes (polynucléaires neutrophiles et éosinophiles, monocytes et macrophages) et aux lymphocytes B. Elle existe sous forme de composants pré-assemblés dans les membranes.

Une entrée locale d'ions calcium permet son assemblage (des ions phosphate présents initialement sont aussi impliqués) et elle catalyse alors le transfert d'électrons de son substrat le NADPH à l'accepteur final l'oxygène entraînant la production d'anions superoxyde (**Eq. II-13**) donnant H_2O_2 par dismutation spontanée (à pH acide dans les phagosomes) ou enzymatique (par la superoxyde-dismutase cytosolique), ou d'autres dérivés ROS par réduction: le radical hydroxyle et l'oxygène singulet. Ces composés oxydants sont capables de détruire les micro-organismes ou des cellules endommagées préalablement endocytés.

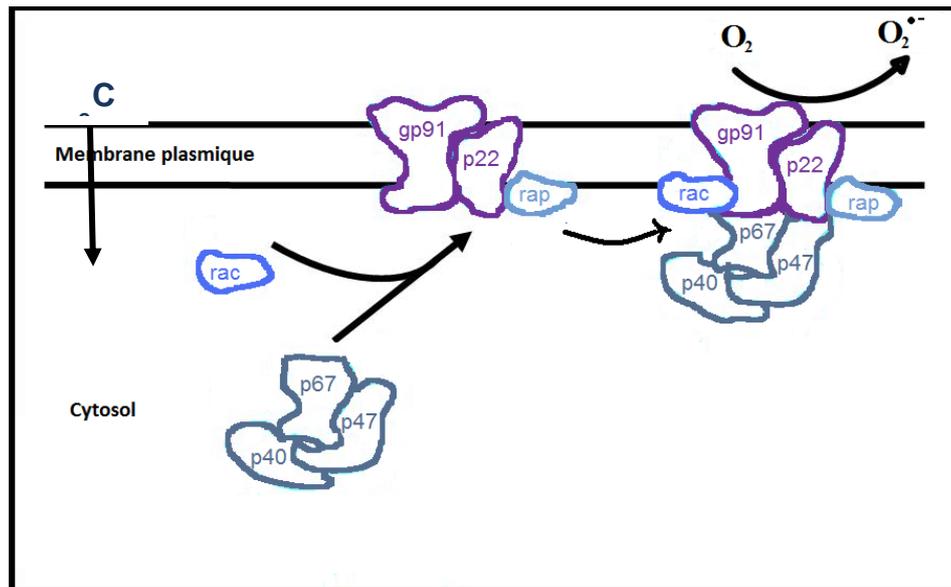


Figure II-2. Assemblage et activation de la NADPH.[22] Dans les cellules quiescentes, la NADPH oxydase est composée d'un complexe cytosolique (p67, p47, p40) et d'un complexe membranaire (gp91, p22). Sous l'activation de rac, les sous-unités cytosoliques de la NADPH oxydase vont être phosphorylées et transloquées au niveau de la membrane plasmique pour former la NADPH oxydase active et ainsi produire l'anion superoxyde $O_2^{\bullet-}$.

- L'oxyde nitrique synthétase

L'oxyde nitrique synthétase ou NO synthase (NOs) dirige l'oxydation de la L-arginine en citrulline donnant ainsi naissance au monoxyde d'azote (NO^*) dans les tissus biologiques.[9, 23-26]

Trois isoformes de la NOs ont été identifiées : la NOs neuronale (nNOs), qui est présente dans le système nerveux ; la NOs inducible (iNOs), présente dans les macrophages et autres cellules immunitaires ; et la NOs endothéliale (eNOs), présente dans les cellules endothéliales. Les enzymes nNOs et eNOs sont activées par des agents qui augmentent la concentration intracellulaire du Ca^{2+} dans les conditions physiologiques. Le NO^* est produit dans le cytoplasme par la iNOs, et diffuse dans le phagosome pour réagir, lui et ses dérivés, avec les microbes internalisés. Le schéma ci-dessous (**Figure II-3**) explicite

les grandes relations existant entre les ROS/RNS et les enzymes impliquées ainsi que leurs conséquences.

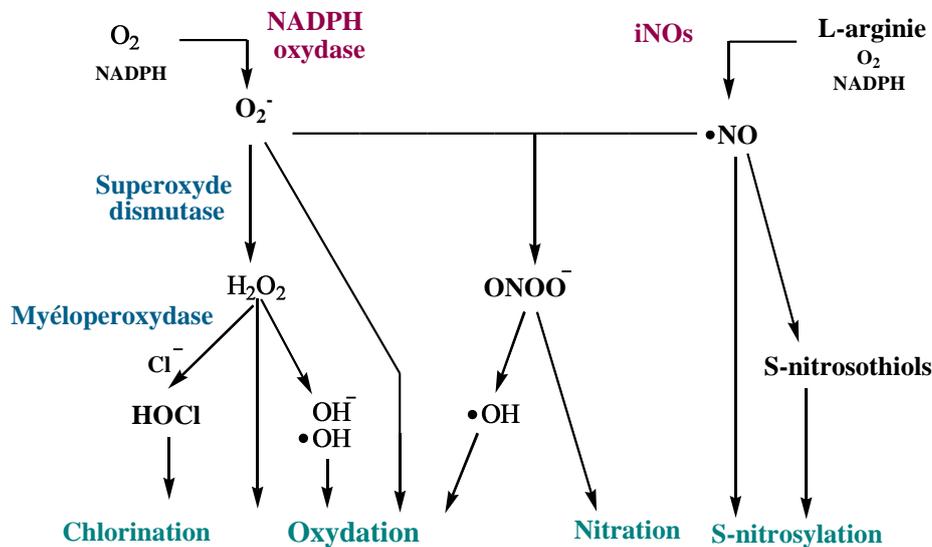


Figure II-3. Production des ROS et RNS par les phagocytes.[27]

Conclusion

Les espèces de type ROS/RNS, issues du stress oxydant sont des entités versatiles pouvant contribuer à des pathologies graves pour les organismes lorsque leur concentration dépasse les niveaux homéostatiques.[28] Il est donc crucial de pouvoir détecter, mesurer, quantifier les ROS/RNS voire d'accéder à leur origine spatiale ou à la dynamique de leur libération. Pour cela il existe beaucoup de techniques différentes, qui seront résumées dans les paragraphes suivants.

2. Méthodes de détection des ROS/RNS

La mesure des ROS/RNS dans les organismes vivants constitue un défi analytique important. Etant donné que la plupart des ROS/RNS sont très réactives et donc à faible durée de vie, il est difficile de les détecter dans des environnements biologiques complexes. Par ailleurs, une autre limitation vient de la localisation de leur émission. Les ROS/RNS sont en effet souvent produites ou dégradées dans des compartiments subcellulaires.

En raison de ces caractéristiques, la méthode de détection doit être suffisamment rapide et sensible pour rivaliser avec les vitesses spontanées de leur réaction avec les enzymes intracellulaires et autres cibles intracellulaires. Idéalement, la détection doit avoir accès à l'espace intracellulaire ou se localiser à un niveau subcellulaire donné puisque les

ROS/RNS endogènes se concentrent à proximité des sites de synthèse. Le capteur « idéal » doit par ailleurs être spécifique afin d'identifier individuellement les espèces. En complément, des tests moins spécifiques peuvent toujours être utilisés pour quantifier la totalité des ROS/RNS produites. En pratique, les ROS/RNS peuvent être mesurées soit directement, soit indirectement en étudiant certains de leurs produits de dégradation.[29, 30] L'approche la plus commune en biologie consiste à effectuer une analyse par spectroscopie (fluorescence, chimiluminescence, RPE...). Nous en présenterons ci-dessous une liste non exhaustive. Comme nous allons le voir, les méthodes électrochimiques en général, et plus particulièrement celles impliquant les ultramicroélectrodes se sont révélées extrêmement performantes.

2.1. Mesures globales sur cellules

2.1.1. Glutathion

Le glutathion existe en quantités relativement élevées (concentrations de l'ordre du mM),[31] et sert, sous sa forme réduite (GSH), à la détoxification des peroxydes et à la régénération de certains antioxydants (par exemple l' α -tocophérol et l'acide ascorbique).[30] GSH est régénéré à partir de sa forme oxydée (GSSH) à l'aide de la glutathion réductase (notée GSR, **Eq. II-15**).



En raison de la rapidité de cette réaction, le rapport de GSH/GSSH constitue un bon indicateur du niveau de stress oxydant dans les cellules. Les niveaux de GSH et GSSH peuvent être déterminés par CLHP (chromatographie en phase liquide à haute performance),[32] électrophorèse capillaire,[33] ou biochimie sur microplaques.[34] D'autres méthodes peuvent être mises en oeuvre, par luminescence (conversion d'un dérivé de la luciférine en présence de GSH),[35] ou par colorimétrie (réaction du GSH avec le DTNB (dinitro-2,2'-dithio-5,5'-benzoïque) conduisant notamment à la formation de TNB (acide 5-thio-2-nitrobenzoïque) qui absorbe à 412 nm).[36, 37]

2.1.2. Peroxydation lipidique

La peroxydation lipidique est un bon indicateur de la formation de radicaux libres, acteurs du stress oxydant. En effet, les acides gras polyinsaturés des membranes cellulaires sont les cibles principales des radicaux libres. Ainsi, il se produit généralement une réaction en chaîne dans laquelle un radical hydroxyle OH \cdot capte un atome d'hydrogène sur un carbone insaturé, générant alors une molécule d'eau. L'acide gras possède alors un électron célibataire capable d'interagir avec le dioxygène, formant ainsi des peroxydes lipidiques

(Figure II-4). Ces derniers sont instables et se décomposent en une série de sous-produits complexes, notamment des composés carbonylés très réactifs, comme le malondialdéhyde $\text{CH}_2(\text{CHO})_2$ (**MDA**). Néanmoins, à court terme l'aspect le plus important est que de par son mécanisme même la réaction radicalaire en chaîne conduit à la formation de domaines où les lipides peroxydés ne sont plus capables d'assurer la cohésion membranaire du fait de la polarité des restes peroxydes. Cela conduit à la formation de « trous » dans les membranes conduisant *in fine* à une mort cellulaire.

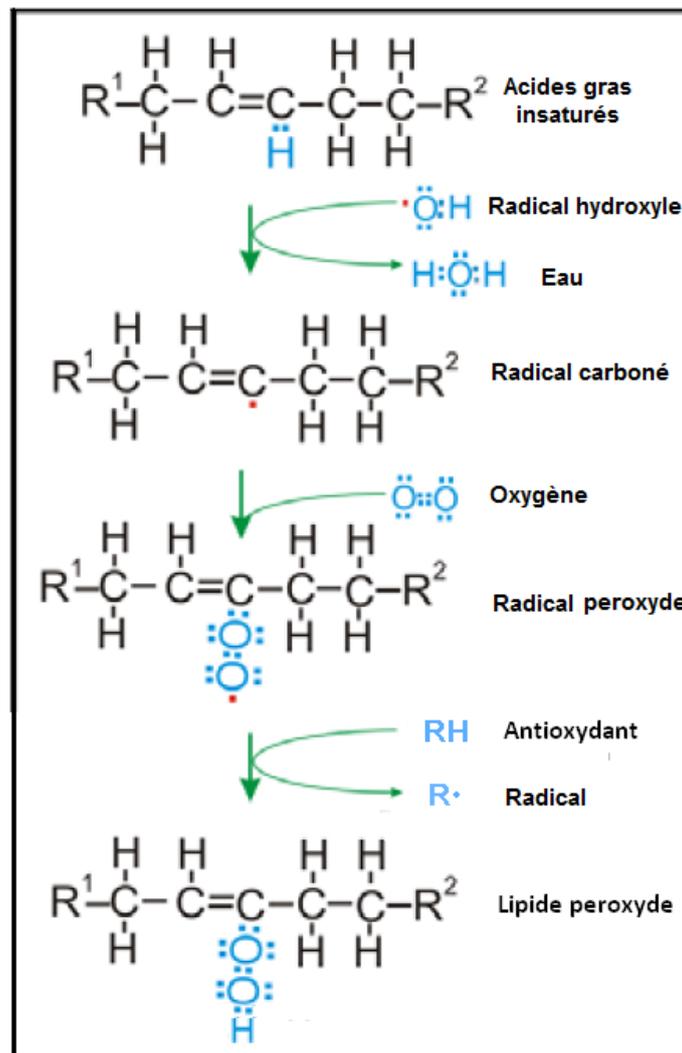


Figure II-4. Illustration de la peroxydation lipidique.[38]

Le dosage du MDA par l'acide thiobarbiturique (TBA) est largement utilisé pour évaluer la présence d'une peroxydation lipidique dans des préparations cellulaires ou tissulaires. Il se déroule sous conditions acides, à une température avoisinant les 90-100°C, et le produit est un adduit qui peut être mesuré par colorimétrie à 532 nm ou par fluorescence aux longueurs d'onde d'excitation de 530 nm et d'émission de 550 nm (**Figure II-5**).[39] Cette méthode peut néanmoins donner des résultats erronés car elle est non spécifique et sensible à de très nombreux artefacts. Il est toutefois possible de doser le MDA

par d'autres techniques comme la CLHP. Cependant, le niveau de MDA ne représente qu'un faible pourcentage (1%) du processus de décomposition des peroxydes lipidiques, et à ce titre, il ne constitue pas nécessairement un marqueur quantitatif et fiable de la présence du stress oxydant même si sa détection est répandue dans ce but.

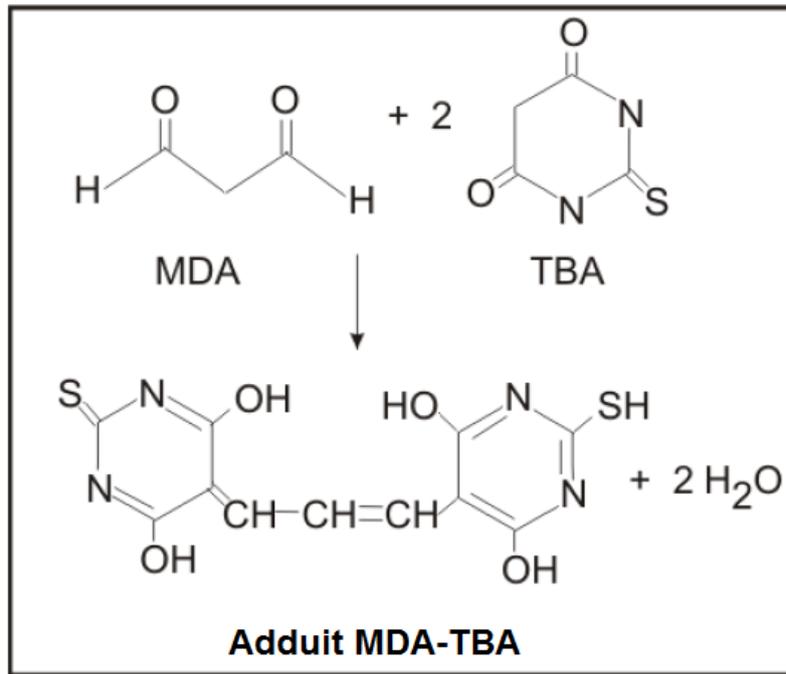


Figure II-5. Formation d'un adduit MDA-TBA

On notera que les méthodes mentionnées ci-dessus représentent des mesures de dosage global de métabolites issus de stress oxydants. Elles sont donc limitées par le fait que les ROS/RNS ne sont pas clairement distinguées et identifiées. Le paragraphe qui suit sera dévolu à la présentation de méthodes analytiques plus spécifiques du stress oxydant.

2.2. Mesures spécifiques

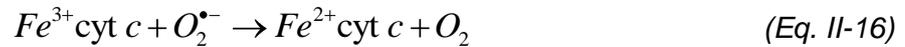
Les méthodes décrites dans cette section ont pour vocation d'être spécifiques pour une espèce donnée. Dans certains cas, ce but n'est pas toujours atteint malgré les assertions de la littérature biologique car d'autres espèces peuvent interférer avec la cible initialement choisie.

2.2.1. L'anion superoxyde

L'anion superoxyde peut être dosé via sa réaction avec différents composés générant ainsi un produit suffisamment stable pour être mesuré par des techniques spectroscopiques (colorimétrie, chimiluminescence ou RPE...).

a) Le Cytochrome c

Le ferricytochrome c est réduit en ferrocycytochrome c par réaction avec l'anion superoxyde en présence de nombreuses enzymes selon la réaction suivante : [40]



Cette réaction peut être suivie par spectrophotométrie puisque le ferricytochrome c absorbe à 550 nm. On notera que cette méthode n'est pas toujours fiable car le ferricytochrome c peut être réduit par d'autres sources que l'anion superoxyde.

b) L'Aconitase

L'aconitase est une protéine fer-soufre [4Fe-4S] qui catalyse l'isomérisation du citrate en isocitrate, en passant par un intermédiaire cis-aconitate. L'anion superoxyde inactive cette enzyme par perte d'un atome de fer. Ainsi la concentration en anion superoxyde peut être estimée par le niveau d'inactivation enzymatique. Cette inactivation peut être suivie par spectrophotométrie à 240 nm, longueur d'onde à laquelle absorbe le cis-aconitate. Une variante de cette méthode consiste à travailler en présence de NADP⁺ et d'isocitrate déshydrogénase. L'isocitrate est alors converti en α-cétoglutarate, générant ainsi NADPH, qui absorbe à 340 nm.[41] [42] A l'instar de la méthode mettant en jeu le ferricytochrome c, d'autres sources que l'anion superoxyde peuvent entrer en compétition avec ce dernier.

c) L'Hydrocyanine

L'hydrocyanine est susceptible de réagir avec les anions superoxyde et/ou hydroxyle. Elle est synthétisée par réduction d'un colorant commercial, la cyanine, en présence de borohydrure de sodium. L'hydrocyanine est utilisée comme sonde du stress oxydant via sa réaction avec les ROS/RNS, réaction qui forme en retour de la cyanine, un colorant fluorescent très intense, 100 fois plus que l'hydrocyanine elle-même (**Figure II-6**). On notera par ailleurs que contrairement à l'hydrocyanine, la cyanine ne peut traverser les membranes.[43] L'entrée de l'hydrocyanine au sein de l'organisme permet donc de réaliser le dosage. A l'inverse, la cyanine formée ne peut s'échapper, ce qui limite les pertes qui fausseraient le dosage en question.

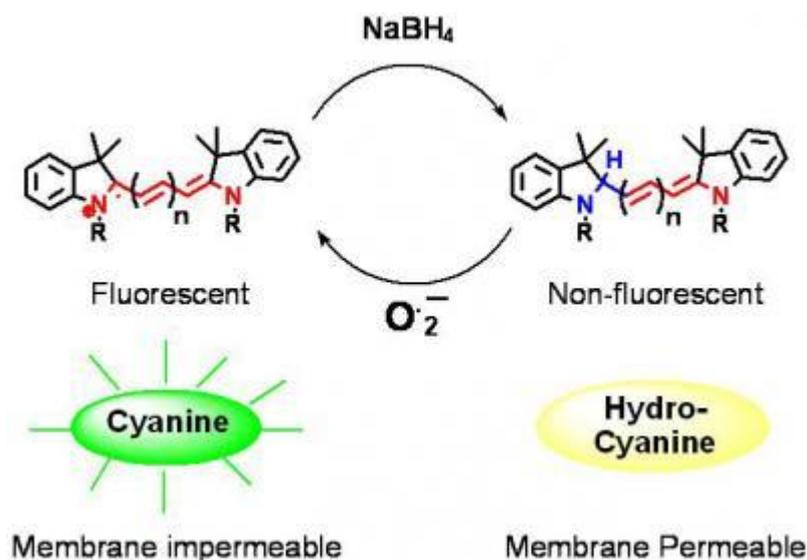


Figure II-6. Transformation de l'hydrocyanine en cyanine.[44]

d) Chimiluminescence

La luminescence est le phénomène par lequel certaines molécules portées à un état excité reviennent à l'état fondamental en restituant une partie de l'énergie sous forme d'émission de lumière. Lorsque l'énergie qui permet aux molécules d'atteindre l'état excité provient d'une réaction chimique, on parle de chimiluminescence. Les méthodes de chimiluminescence sont en général extrêmement sensibles parce que l'on peut mesurer facilement des faibles niveaux de lumière en absence de bruit. De plus, le signal émis est monochromatique et sa détection est donc directe sans atténuation par un filtre ou par un monochromateur. Ainsi, les limites de détection sont plutôt conditionnées par la pureté du réactif utilisé pour générer la chimiluminescence.

Les composés chimiluminescents les plus utilisés sont la lucigénine, la coelentérazine ou le luminol. Cependant, certains problèmes peuvent se poser. Par exemple, la lucigénine est susceptible de subir une oxydation monoélectronique et de générer un radical réagissant à son tour avec du dioxygène. En d'autres termes, cette sonde peut elle-même former des ROS/RNS.[45] Ce problème peut être minimisé à faible concentration. La coelentérazine ne présente pas ce type de problème mais possède une spécificité limitée vis-à-vis de l'anion peroxyde. Elle peut notamment produire de la chimiluminescence avec l'anion peroxydinitrite.[46]

e) Résonance paramagnétique électronique (RPE)

La spectroscopie de Résonance Paramagnétique Electronique (RPE) est une méthode de spectroscopie sous champ magnétique qui permet la détection directe des

molécules paramagnétiques, c'est-à-dire possédant au moins un électron célibataire. Cette méthode peut donc s'appliquer à l'étude des ROS/RNS qui sont pour la plupart radicalaires. Dans le cas d'un seul électron célibataire ($S = 1/2$), la présence d'un champ magnétique extérieur donne lieu à $(2S + 1) = 2$ états, correspondant aux deux états de spin $m_s = -1/2$ et $m_s = +1/2$. C'est l'effet Zeeman électronique (**Figure II-7**) :

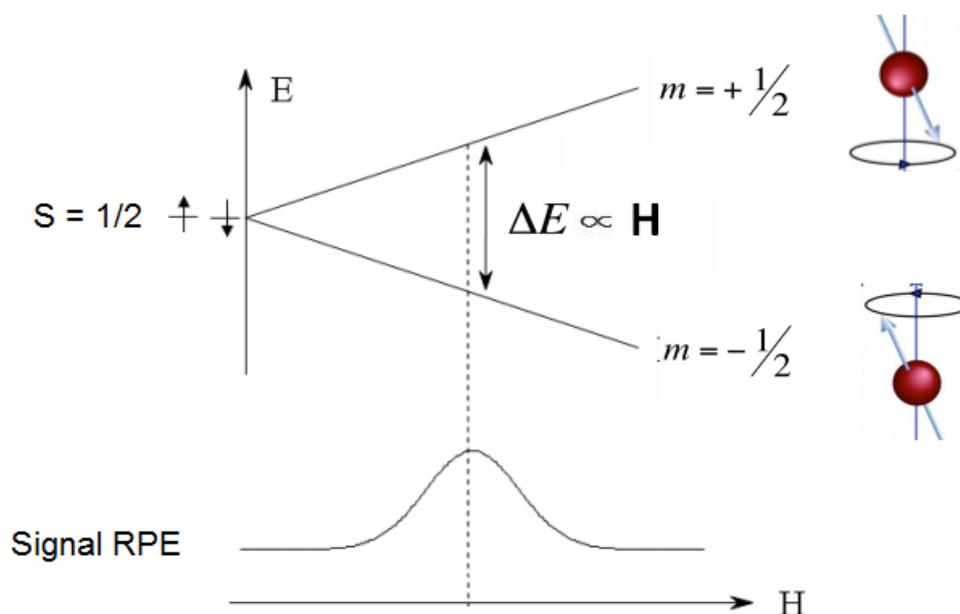


Figure II-7. Schéma de l'effet Zeeman électronique et du signal RPE.[47]

La différence d'énergie ΔE entre les deux états est proportionnelle à l'intensité du champ magnétique appliqué. Dans ce contexte, l'anion superoxyde peut être détecté directement par RPE.[48, 49] L'intensité du signal obtenu sera proportionnelle à la quantité de superoxyde, de sorte qu'il sera possible d'obtenir une mesure quantitative de sa production. Cependant, en raison de sa faible durée de vie, sa mesure directe n'est pas fiable et on préfère avoir recours à des piègeurs de radicaux (un exemple est le 5,5-diméthyl-1-pyrroline N-oxyde ou DMPO). L'anion superoxyde à détecter réagit avec le piègeur, générant ainsi un adduit plus stable dans le temps et plus facilement analysable par RPE.[50] Toutefois, la RPE, équipement assez coûteux, présente elle-aussi des problèmes de spécificité pour le dosage de l'anion superoxyde, en particulier des interférences avec le NO. On notera également que de manière générale, le produit résultant de la réaction radical-piégeur n'est pas nécessairement stable dans un environnement biologique et peut être décomposé à son tour en espèces silencieuses en RPE.

2.2.2. Le peroxyde d'hydrogène

a) Détection en présence de peroxydase

La décomposition du peroxyde d'hydrogène H_2O_2 en eau par des substrats donneurs d'hydrogène (RH_2) peut être catalysée en présence d'enzymes de type peroxydase, par exemple, la HRP (Peroxydase de raifort ou Horseradish Peroxydase en langue anglaise).



Les substrats de type RH_2 les plus utilisés sont la diacetyldichlorofluorescéine,[51] et l'acide homovanillique,[52, 53] dont les produits d'oxydation peuvent être suivis par colorimétrie ou fluorescence. En général, les méthodes colorimétriques sont moins sensibles que les méthodes fluorescentes. Cependant, des composants cellulaires comme les thiols peuvent affecter la relation entre H_2O_2 et le signal de fluorescence car ils sont eux-mêmes des substrats de la HRP.

b) Détection par fluorescence via la dichlorofluorescéine (DCF)

La détection de la DCF (dichlorofluorescéine), une sonde fluorescente, peut être utilisée pour mesurer H_2O_2 . Pour ce faire, on part d'une molécule non fluorescente, le DCFH-DA (dichlorofluorescéine diacétate).

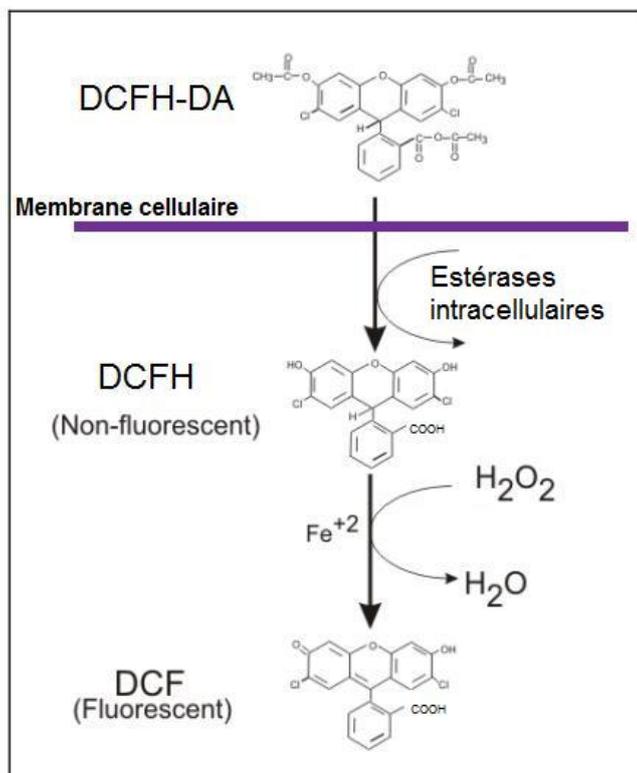


Figure II-8. Schéma récapitulatif de formation de DCF lors de la détection intracellulaire de H_2O_2 .

Cette espèce diffuse dans les cellules où elle est alors hydrolysée par les estérases intracellulaires en DCFH (dichlorodihydrofluorescéine). Cette dernière réagit alors avec le peroxyde d'hydrogène via une réaction de Fenton en présence de Fe^{2+} , formant alors de l'eau et de la dichlorofluorescéine (DCF), molécule fluorescente dont les longueurs d'onde d'excitation et d'émission sont de 495 et 515 nm respectivement.

Comme précédemment, la spécificité du DCF envers le peroxyde d'hydrogène n'est pas absolue. Ainsi, il a été récemment mis en évidence que l'anion peroxyde ONOO⁻ et l'acide hypochloreux HOCl peuvent également oxyder la DCFH.[54]

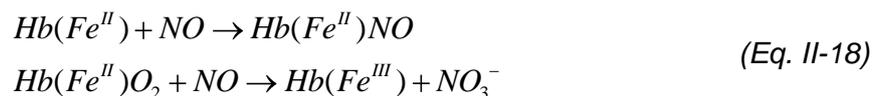
2.2.3. Le monoxyde d'azote

a) Colorimétrie/ Spectrophotométrie

Comme précédemment, le principe de cette méthode consiste à faire réagir le monoxyde d'azote avec une molécule endogène ou exogène, l'un des produits de réaction pouvant être suivi par spectrophotométrie.

a-1) Hémoglobine

NO[•] peut réagir avec des molécules biologiques contenant des motifs de type porphyrines de fer, telles que l'hémoglobine (Hb) ou l'oxyhémoglobine (OxyHb). L'affinité du NO[•] pour l'hémoglobine est 1000 fois plus importante que celle de l'oxygène,[55, 56] et des études récentes montrent que l'hémoglobine peut servir de transporteur de NO[•]. [57] Par ailleurs, le NO[•] peut transformer l'hémoglobine ou l'oxyhémoglobine selon les réactions suivantes: [58]



Dans les deux cas, l'interaction entre le monoxyde d'azote et le centre métallique Fe(II) permet la formation d'un produit détectable en spectroscopie UV, ou tout au moins entraîne un déplacement du maximum d'absorption.[59]

a-2) Ferrocytochrome c

NO[•] peut réagir avec le ferrocytochrome c (Fe(II)) avec une constante de vitesse de $200 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$, formant ainsi du ferricytochrome c (Fe(III)) et l'anion nitroxy NO[•]. Le ferricytochrome c, nous l'avons vu plus haut, peut être suivi en spectrophotométrie et l'intensité de sa bande d'absorption est indirectement proportionnelle à la concentration du NO[•] détecté.[60, 61]

b) RPE

Comme précisé plus haut, la détection de radicaux est facilitée en présence de piègeurs de radicaux. C'est donc le cas du monoxyde d'azote qui est susceptible de réagir avec des molécules de type NOCT (nitric oxide cheletropic traps),[62] carboxy-PTIO ou à centre métallique Fe(II) comme le Fer(II)-diéthylthiocarbamate (Fe-DETC).[63]

c) Fluorescence

Le monoxyde d'azote peut également être détecté par fluorescence. A titre d'exemple, on mentionnera les sondes à motif O-phénylènediamine, comme le 2,3-diaminonaphthalene (DAN), pouvant être utilisées avec une limite de détection peu élevée (10 - 20 nM).[64]

2.2.4. Anion Nitrite : la réaction de Griess

Le réactif de Griess (**Figure II-9**) prend une teinte rouge en présence d'anions nitrites. Il est composé de deux réactifs : l'acide sulfanilique avec lequel l'anion nitrite forme un cation diazonium. Le second réactif, l' α -naphtylamine, réagit avec le cation diazonium pour conduire à la formation d'un chromophore.

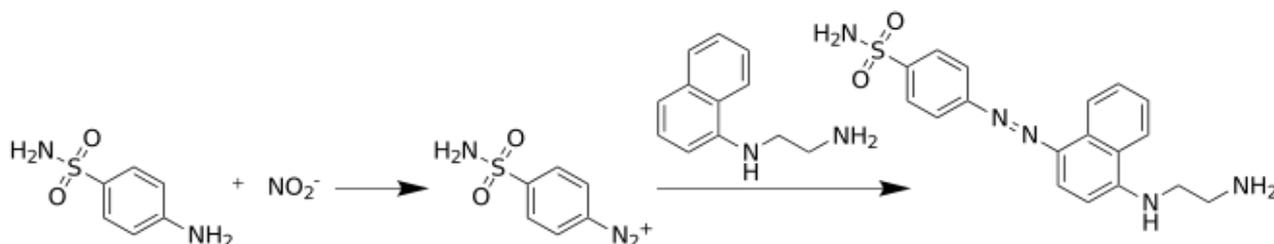


Figure II-9. La réaction de Griess

A l'heure actuelle, on utilise préférentiellement un mélange sulfanilamide/N-naphtyl-éthylènediamine, le chromophore résultant ayant un maximum d'absorbance à 543 nm.[65] Cette méthode est souvent utilisée pour caractériser l'intensité d'une phase de stress oxydant sur des populations de cellules car NO₂⁻ est le produit terminal de la plupart des RNS et ROS impliquant l'azote.

Conclusion

En conclusion, les techniques habituelles de détection des espèces issues d'une situation de stress oxydant, tout en possédant une bonne sensibilité, présentent souvent un manque de spécificité. Par ailleurs, de par leur faible durée de vie, les ROS/RNS sont difficilement détectables/quantifiables en temps réel. Enfin, l'approche indirecte conduit à utiliser des réactifs pouvant être toxiques ou capables de générer eux-mêmes des

ROS/RNS. C'est dans ce contexte que depuis deux décennies ont été mises en place des techniques plus douces et plus sélectives axées sur une détection par voie électrochimique.

3. La détection électrochimique

Les techniques électrochimiques reposent sur la possibilité d'oxyder/réduire la molécule d'intérêt, convertissant ainsi une information chimique (nature de l'espèce et concentration) en information électrique (courant à un potentiel donné). Ainsi, elles offrent la possibilité d'une détection extracellulaire sans contact et avec une résolution spatiale et cinétique en temps réel (ms), comme dans le cas de la synapse artificielle.

3.1. Génération des ROS /RNS dans un système biologique

Nous avons présenté précédemment les mécanismes de production et les caractéristiques chimiques des différentes ROS/RNS dans le domaine biologique. Les sites d'émission de ces espèces, ainsi que le lieu de leur éventuelle réaction bimoléculaire, peuvent différer. En conséquence, leur concentration, leur profil de diffusion dépendront de leurs réactivités, des coefficients de diffusion, et de leurs interactions avec leur proche environnement. Une représentation schématique de la genèse des différentes ROS/RNS est donnée sur la **Figure II-10**. Cette représentation met en jeu les différentes enzymes qui aident à la production du NO et de l'anion superoxyde (NADPHox, NOs) et celles qui contrôlent la production des ROS/RNS (GPx et SOD) citées précédemment. Sont représentées en rouge les espèces accessibles par électrochimie dans mes expériences (voir plus bas). En effet, il est nécessaire pour cela que l'espèce soit oxydable (du fait qu'une détection par réduction en milieu aérobie est impossible du fait de la vague de réduction du dioxygène) et que sa concentration soit suffisante, ce qui élimine la possibilité de détecter des espèces facilement oxydables comme $O_2^{\bullet-}$ ou NO_2^{\bullet} vu leurs concentrations stationnaires à l'état de traces.

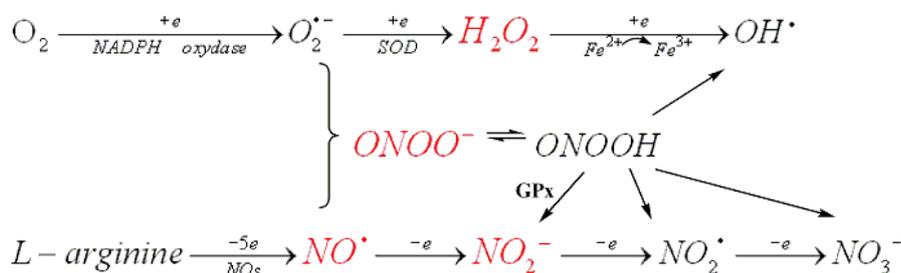


Figure II-10. Production de ROS/RNS dans les cellules.[66]

La sélectivité/sensibilité de la détection électrochimique de certaines ROS/RNS dépend de la nature de l'électrode de travail. Les potentiels standard de certaines ROS/RNS sont détaillés

dans le **Tableau II-1** et montrent que l'on peut a priori distinguer les différentes ROS/RNS par électrochimie, néanmoins les vagues sont pour la plupart lentes au sein du transfert électronique initial, les potentiels de demie-vague étant alors très déplacés anodiquement par rapport aux potentiels standard. Du fait de la présence de dioxygène dans les systèmes biologiques, la fenêtre d'analyse en potentiel est limitée en réduction [$E^{\circ'} (O_2/H_2O_2) = -0,33 \text{ V vs ENH}$], et en oxydation par l'eau [$E^{\circ'} (O_2/H_2O) = +0.81 \text{ V vs ENH}$]. Ce domaine dépend évidemment du matériau d'électrode, lequel jouera sur les surtensions d'oxydation/réduction de l'eau et de l'oxygène, mais aussi sur celles des ROS/RNS à considérer.

Couple redox	Potentiel standard apparent $E^{\circ'}$ (V vs. ENH)
$O_2/O_2^{\bullet-}$	-0.33
O_2/H_2O_2	-0.15
$ONOO^{\bullet}/ONOO^-$	+0.20
NO_3^-/NO_2^{\bullet}	+0.78
O_2/H_2O	+0.81
NO_2^{\bullet}/NO_2^-	+0.99
NO^+/NO^{\bullet}	+1.21
NO_2^+/NO_2^{\bullet}	+1.56
NO_2^{\bullet}/NO_3^-	+2.50

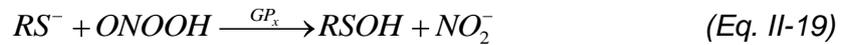
Tableau II-1. Potentiels standard apparents $E^{\circ'}$ de ROS/RNS à pH = 7 par rapport à l'ENH. [67-70]

La lecture des potentiels standard apparents à pH = 7 des couples impliquant diverses ROS/RNS laisse à penser, qu'entre la fenêtre de potentiel de l'oxygène et celle de l'eau, seulement 3 ROS/RNS peuvent être détectées électrochimiquement: H_2O_2 , $ONOO^-$, NO^{\bullet} . Comme nous l'avons suggéré plus haut, les potentiels décrits ne reflètent pas en totalité la fenêtre de détection. En pratique, sur électrode de carbone platiné, H_2O_2 , $ONOO^-$, NO^{\bullet} , mais aussi NO_2^- pourront être détectés.

Le schéma récapitulatif de la **Figure II-10** montre que l'anion superoxyde et le monoxyde d'azote sont les espèces primaires du stress oxydant et engendrent par différentes voies la formation des autres ROS/RNS.

- H_2O_2 est produit par dismutation spontanée ou induite de l'anion superoxyde (**Eq. II-1**).

- ONOO^- est produit en milieu intracellulaire par réaction rapide du monoxyde d'azote avec l'ion superoxyde $\text{O}_2^{\cdot -}$ (**Figure II-1**).
- NO_2^- est généré par la décomposition intracellulaire partielle du ONOO^- , sous l'action de diverses sélénoprotéines, principalement la glutathion peroxydase (GPx) (**Eq. II-19**).[71, 72]



3.2. Nature de l'électrode de travail pour la détection électrochimique des ROS/RNS

Les techniques électroanalytiques, comme la voltammétrie cyclique ou la voltammétrie à impulsion différentielle permettent de distinguer et de suivre plusieurs espèces en parallèle. Toutefois, l'ampérométrie à potentiel constant offre la meilleure résolution temporelle, et s'affranchit des contributions capacitives qui peuvent être la contribution dominante en voltammétrie du fait des très faibles concentrations de ROS/RNS. En contrepartie, sa sélectivité est très limitée. En effet, à un potentiel donné, l'ampérométrie permet de suivre un mélange d'espèces électroactives sans pouvoir distinguer la contribution de chacune. En conséquence, certaines stratégies visant à modifier la surface de l'électrode ont été mises en œuvre pour atteindre une sélectivité suffisante, c'est-à-dire ne rendre sensible l'électrode qu'à une espèce en particulier.

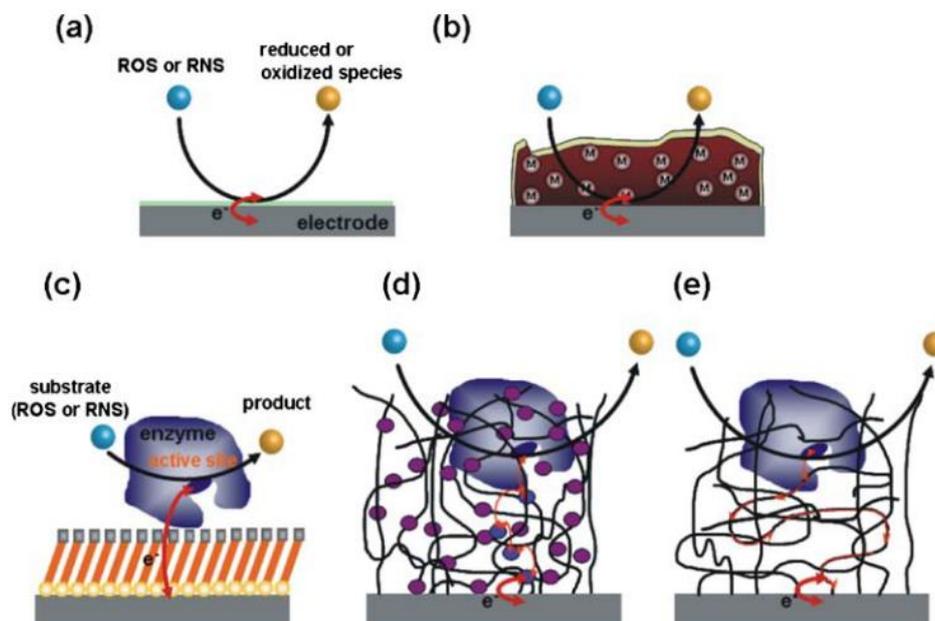


Figure II-11. Les 5 différentes architectures possibles du capteur. (a) électrode nue (b) avec une membrane contenant des ions métalliques ou un complexe (c) modifiée par une enzyme sur SAM (Self Assembled Monolayer) (d) avec un hydrogel redox et un couple redox relais (mediateur) (e) avec des polymères conducteurs.

Dans ce contexte, l'approche la plus classique consiste à utiliser des films ou des membranes qui agiront comme des barrières sélectives entre la solution et l'électrode,

offrant alors à cette dernière une sélectivité spécifique pour une espèce cible. Malheureusement, cette sélectivité se fait au détriment du temps de réponse de la mesure, lequel est évidemment crucial pour les espèces à faible durée de vie. Les principes comme l'exclusion stérique ou la répulsion des charges sont adoptés pour éliminer ou bien réduire les interférences entre les différentes espèces (électroactives ou non) du mélange et la molécule d'intérêt. Les membranes typiques employées sont le polyméthylcellulose, le Nafion, l'hydrogel, le polypyrrole, l'o-phénylènediamine, le polyeugenol, et d'autres films électrodéposables (conducteur ou non-conducteur).

Comme nous l'avons mentionné, plusieurs architectures d'électrodes peuvent être élaborées pour quantifier les ROS/RNS. Les capteurs qui en résultent sont généralement classés en 5 grands types (**Figure II-11**).[73] Plusieurs ROS et RNS peuvent être directement oxydés sur électrode nue, même si cela peut correspondre à des potentiels de détection élevés (**Figure II-11a**). La modification de la surface de l'électrode par une membrane n'est par ailleurs pas uniquement effectuée pour des questions de sélectivité ou pour réduire la pollution de l'électrode ou limiter les interférences avec le milieu extérieur (surtout s'il est biologique). Elle vise également à diminuer le potentiel redox de détection de l'espèce d'intérêt et/ou augmenter le signal pour une concentration donnée en favorisant sa partition dans la membrane. Une modification adaptée de la surface de l'électrode, par des métaux ou des complexes, peut donc augmenter la sensibilité du capteur par électrocatalyse (**Figure II-11b**) et diminuer la surtension d'oxydation vis-à-vis de l'espèce à étudier. Les biomolécules, telles que des enzymes ou de petites protéines redox, ancrées sur l'électrode par immobilisation via une monocouche auto-assemblée, peuvent faciliter le transfert électronique entre l'analyte et l'électrode et conduire au même résultat (**Figure II-11c**). D'autres conceptions de capteur emploient des hydrogels redox avec un relais d'électron (médiateur) (**Figure II-11d**) ou des polymères conducteurs (**Figure II-11e**).

3.3. Détection électrochimique des ROS/RNS

Les exemples d'électrodes (modifiées ou non) pour la détection électrochimique des ROS/RNS sont légion. Les paragraphes qui vont suivre présentent les différentes applications sous la forme de tableau en ne retenant que l'ampérométrie (sauf mention contraire), afin de faciliter la lecture.^c Des commentaires particuliers sont insérés dans les tableaux.

^c Les valeurs de potentiels de détection en ampérométrie diffèrent d'une électrode modifiée à l'autre. Afin de clarifier/simplifier la présentation, un ordre de grandeur est donné dans la légende pour une détection en oxydation, sauf mention contraire dans les commentaires.

3.3.1. Anion superoxyde $O_2^{\bullet -}$

Une liste (**Tableau II-2**) est présentée ci-dessous pour montrer les différentes méthodes électrochimiques pour la détection de $O_2^{\bullet -}$. On notera que la détection (électrochimique ou non) de l'anion superoxyde est intrinsèquement limitée par la vitesse élevée de la réaction de dismutation de $O_2^{\bullet -}$, même non catalysée ($k=2 \times 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$). Des études théoriques réalisées au laboratoire (thèse de Anne Meunier, 2011) ont notamment montré que dans ce cas, l'anion superoxyde est décomposé à 50 % à de faibles distances (0,1 μm au plus) de son point d'émission. Ceci laisse donc planer le doute sur le caractère représentatif de toute mesure extracellulaire de $O_2^{\bullet -}$, ou tout au moins sur la représentativité de la mesure vis-à-vis des flux de production initiaux.

Nature de l'électrode	Modification	Commentaire
Millimétrique d'or	Cytochrome c [74-77]	$Fe^{3+} \text{ cyt } c + O_2^{\bullet -} \rightarrow Fe^{2+} \text{ cyt } c + O_2$ Système le plus couramment utilisé pour la détection du $O_2^{\bullet -}$.
Ultramicroélectrode de platine	SOD, Film de polypyrrole contenant de la SOD [78]	$2O_2^{\bullet -} + 2H^+ \rightarrow H_2O_2 + O_2$ [78] <ul style="list-style-type: none"> • Réaction physiologique utilisée pour la détection électrochimique, même si l'oxydation directe peut également avoir lieu. • Polarisation à 0,7 V vs ECS, de nombreuses espèces peuvent également être oxydées.
Micrométriques de fibre de carbone,[79] Millimétriques de graphite,[80] Micrométriques d'or[81]	Immunoglobuline G [82]	Le courant capacitif est très faible, de seulement 0,1 pA.
Millimétriques de carbone ou d'or, Film de complexe porphyrine-fer	Porphyrine-fer	Possibles interférences avec NO.

Tableau II-2. Les techniques électrochimiques pour mesurer $O_2^{\bullet -}$

3.3.2. Peroxyde d'hydrogène H₂O₂

Une liste (**Tableau II-3**) est présentée ci-dessous pour montrer les différentes méthodes électrochimiques pour la détection du peroxyde d'hydrogène.

Nature de l'électrode	Modification	Commentaire
Micrométriques de carbone,[83, 84] ITO,[85] Nanotubes de carbone[83, 84]	Cytochrome c,[84, 85] Catalase,[83] Peroxydase de raifort[86]	<ul style="list-style-type: none"> En réduction : Potentiel (-0,2 V vs ECS) $H_2O_2 + 2H^+ + 2e^- \rightarrow 2H_2O$ En oxydation : Potentiel (de 0,2 à 0,3 V vs ECS) $H_2O_2 \rightarrow O_2 + 2H^+ + 2e^-$ Interférences : O₂, acide ascorbique, dopamine
Micrométriques de carbone	Noir de platine[87-89]	Détection sur cellule unique Sensibilité élevée (flux de l'ordre du fmol.s ⁻¹)

Tableau II-3. Techniques électrochimiques pour mesurer H₂O₂ (E ~ 0,3 vs ECS)

3.3.3. Oxyde d'azote NO[•]

Les principales méthodes électrochimiques pour la détection du monoxyde d'azote sont résumées au sein du **tableau II-4**.

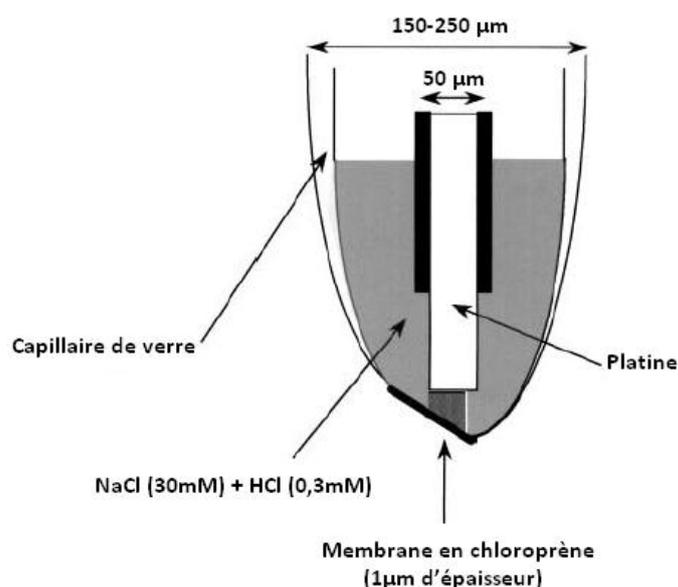


Figure II-12. Electrode spécifique au NO[•] de type Clark[90]

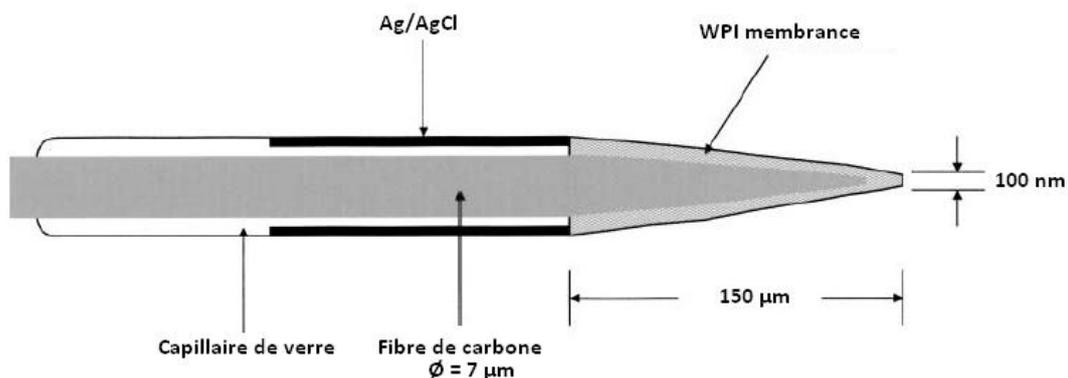


Figure II-13. Electrode intégrée spécifique au NO• fabriquée par WPI[91]

Nature de l'électrode	Modification	Commentaire
Platine, Capillaire de verre rempli de NaCl et HCl	Néoprène (Capteur de type Clark (Figure II-12)[90])	Bonne sélectivité, Limite de détection à 10nM,[92] Temps de réponse long.
Nanométriques de carbone ($\varnothing=100\text{nm}$)[91]	Membrane WPI (Figure II-13)[91]	<ul style="list-style-type: none"> • Electrode intégrée (travail + référence) • Potentiel d'oxydation : 0,86 V vs Ag/AgCl [91] • Sensible à la température : 100nM de NO/°C
Micrométriques de Carbone	Porphyrine- nickel[93]	Détection sur cellule unique.[94]
Carbone,[95 , 96, 97 , 98-100] Or, [95, 98] Platine[96 , 98 , 99 , 101]	Nafion,[95 , 97 , 99, 100] o-phenylène diamine,[73, 99 , 100] Polypyrrole,[73] Acétate de cellulose,[96] polyméthylcellulose[73]	Rôle d'exclusion stérique.
	Complexe métallique,[98] Porphyrine + centre métallique (Ni, Cu Co Mn)[96 , 97, 98 , 102]	Limite de détection : nM[102] Augmentation du courant de détection (2-3 fois).
Micrométriques de carbone	Noir de platine[87-89]	Détection sur cellule unique Sensibilité élevée (flux de l'ordre de la $\text{fmol}\cdot\text{s}^{-1}$)

Tableau II-4. Techniques électrochimiques pour mesurer NO• ($E \sim 0,7$ vs ECS)

3.3.4. Peroxynitrite ONOO⁻

Les principales méthodes électrochimiques pour la détection de l'anion peroxynitrite sont résumées au sein du **tableau II-5**.

Nature de l'électrode	Modification	Commentaire
Ultramicroélectrode de platine[103]	Phtalocyanine de manganèse[103]	Interférence de O ₂
Platine (100µm)	Complexe de manganèse (Mn-pDPB)[104]	Limite de détection : 2 nM Durée de vie de ONOO ⁻ est faible à pH=7. Temps de réponse : 15s
Carbone vitreux (4mm)	Cyanocobalamine[105]	Voltammétrie à impulsion différentielle Echelle de concentration: 2µM-300µM Limite de détection : 0,1 µM Bonne sélectivité
Fibre de carbone (30µm)	Poly (3,4 - éthylènedioxythiophène) + Porphyrine de fer[106]	Réaction de détection $ONOO^- \xrightarrow{-e} NO_2^- \xrightarrow{-2e} NO_3^-$
Micrométriques de carbone	Noir de platine[87-89]	Détection sur cellule unique Sensibilité élevée (flux de l'ordre de la fmol.s ⁻¹)

Tableau II-5. Techniques électrochimiques pour mesurer ONOO⁻ (E~ 0,6 V vs ECS)

3.3.5. Anion nitrite NO₂⁻

Les principales méthodes électrochimiques pour la détection de l'anion nitrite sont recensées au sein du **tableau II-6**.

Nature de l'électrode	Modification	Commentaire
Carbone vitreux (2mm)	Thionine - nanotube de carbone multifeuillets[107]	Diminution considérable du potentiel de réduction. Echelle de concentration: 6µM-15mM Limite de détection : 4 µM
Platine (1,6 mm)[108]	Acétate de cellulose poly(1,8-diaminonaphthalène)	
Or (2mm)[109]	Nanoparticules de platine + Réactif de Griess	<ul style="list-style-type: none"> Echelle de concentration: 10µM-1mM Limite de détection : 5 µM Détection en présence de H₂O₂ (10mM) et de nanoparticules. La réaction de Griess des anions nitrite à l'électrode provoque la fixation des nanoparticules et la capacité du capteur à réduire H₂O₂ (E = -0,3 V vs ECS). Relation entre courant de réduction de H₂O₂ et concentration en nitrite.
Micrométriques de carbone	Noir de platine[87-89]	Détection sur cellule unique Sensibilité élevée (flux de l'ordre de la fmol.s ⁻¹)

Tableau II-6. Les techniques électrochimiques pour mesurer NO₂⁻ (E~ 0,9 V vs ECS)

Conclusion

Le principe de la détection électrochimique consiste à oxyder (ou réduire en milieu anaérobie) la molécule d'intérêt, directement ou indirectement à la surface d'une électrode. Parmi les espèces générées lors d'une situation de stress oxydant, et au vu des tableaux présentés plus haut, cinq espèces (O₂⁻, H₂O₂, ONOO⁻, NO et NO₂⁻) sont principalement observables, néanmoins, comme le montre la **Figure II-10**, cela ne constitue pas une limite gênante pour la détection du stress oxydant primaire. Dans un contexte biologique, pour éviter tout risque de passivation ou d'interférences et pour faciliter la détection, des modifications de surface de l'électrode sont nécessaires afin de faciliter le transfert électronique et diminuer le potentiel de détection et/ou rendre l'électrode sélective à une espèce donnée. Il s'ensuit dans les deux cas une augmentation du temps de réponse et une impossibilité à détecter des phénomènes rapides ou des espèces à faible durée de vie.

En conséquence, il n'existe pas d'électrode parfaite et générale pour la détection électrochimique du stress oxydant. Le principe consiste à chercher un compromis en fonction des objectifs (sélectivité, quantification, cinétique, résolution spatiale et temporelle...) de l'étude. C'est le cas des électrodes et des méthodes choisies au laboratoire qui seront présentés dans le prochain paragraphe et dont le but est de mesurer en temps réel des flux de l'ordre des femtomoles par seconde au niveau de cellules uniques vivantes ou avec une résolution micrométrique dans un tissu vivant.

4. Mesures ampérométriques des espèces ROS et RNS (H_2O_2 , NO^\bullet , ONOO^- , NO_2^-)

La méthode électrochimique de mesure choisie est l'ampérométrie à potentiel constant. Le courant de détection, lié au flux d'espèces détectés, rendra compte de la dynamique de production des ROS/RNS. Notons que la voltammétrie, qui permettrait de suivre toutes les espèces en même temps, nécessiterait de travailler à haute vitesse de balayage, ce qui pour les espèces du stress oxydant, conduirait à des signaux mal définis (transfert électronique lent) et des composantes capacitives variables au cours de la détection et en tout état de cause d'intensité très supérieure à celle des signaux faradiques. Afin de disposer de bonnes propriétés (électro)analytiques (rapport signal/bruit, chute ohmique, courant capacitif négligeable) et de travailler sur cellule unique (dimension micrométrique), l'électrode de travail est une ultramicroélectrode de carbone (disque de diamètre 10 μm). Néanmoins, comme décrit précédemment, la détection des ROS/RNS nécessite une modification de surface. Ainsi, du noir de platine est électrodéposé (charge de 30 μC) à la surface de l'électrode, permettant alors de faciliter la détection des espèces en question sans trop augmenter la constante de temps de l'électrode qui reste acceptable (10-100 ms) pour des phénomènes d'émission au-delà de quelques dizaines de secondes. L'électrode de référence est placée dans le milieu où baignent les cellules. Il s'agit de l'électrode au calomel saturée en chlorure de sodium (ECSS) car une ECS normale perturberait le fonctionnement cellulaire du fait des fuites de cation potassium (KCl saturé dans le pont).

4.1. Réactions d'oxydation mises en jeu et réponses ampérométriques à différents potentiels

Comme nous l'avons vu plus haut, cinq espèces (O_2^- , H_2O_2 , ONOO^- , NO et NO_2^-) nous concernent pour la détection électrochimique du stress oxydant primaire. Le doute que l'on peut avoir sur toute mesure de flux résiduels d'anion superoxyde du fait de sa réactivité rapide lors de son trajet entre le point d'émission et la surface de l'électrode restreint la liste

à quatre espèces : H_2O_2 , $ONOO^-$, NO et NO_2^- . La présence de dioxygène empêche toute étude en réduction par ailleurs, et partant aussi celle de l'anion superoxyde.

La connaissance des potentiels standards d'oxydation des ROS/RNS considérées est totalement insuffisante pour connaître les potentiels de détection (vagues irréversibles lentes). Il est donc nécessaire de calibrer in vitro avant toute chose les voltammogrammes sur ultramicroélectrode de carbone platiné de quatre espèces séparément (**Figure II-14**).[87, 110]

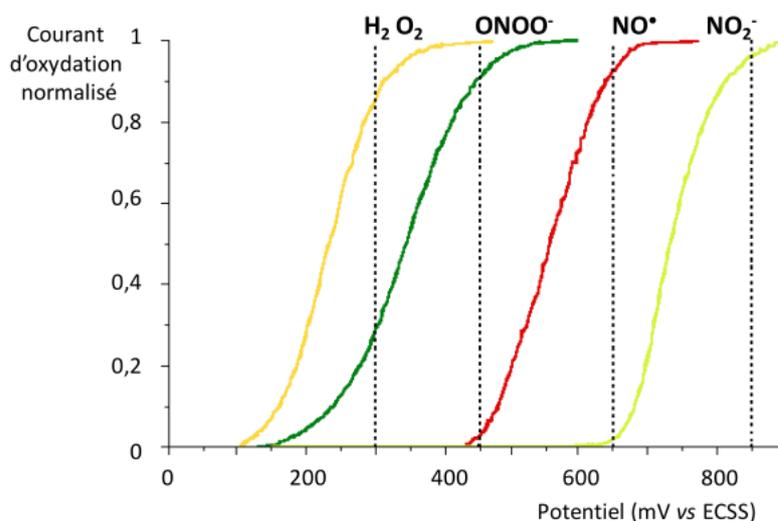
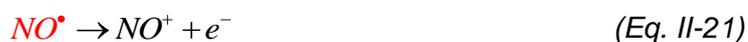
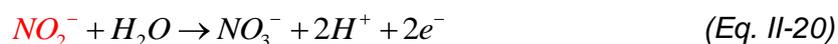


Figure II-14. Voltammogrammes stationnaires normalisés des 4 espèces électroactives (NO_2^- , NO^\bullet , H_2O_2 , $ONOO^-$) produites lors d'une réponse cellulaire de stress oxydant sur ultramicroélectrode de carbone platiné ($d = 10 \mu m$; $Q = 30 \mu C$). Les solutions sont micromolaires et dans le PBS à $pH = 7,4$ ($pH = 10,6$ pour l'anion peroxydrite). Vitesse de balayage : $20 mV.s^{-1}$

Comme attendu, on constate que les espèces s'oxydent à quatre potentiels de plateau différents et sont donc différenciables par la méthode choisie. Par ailleurs, les quatre réactions d'oxydation à l'électrode sont :



Enfin une série d'analyses in vitro réalisées au laboratoire avant ce travail a montré que ces quatre espèces n'interfèrent pas électrochimiquement lors de leur détection individuelle.

4.2. Quantification des quatre ROS/RNS libérées

Le principe de la méthode ampérométrique consiste à mesurer le courant à un potentiel donné de détection par cellule tout en répétant cette mesure aux quatre valeurs de potentiel possibles sur une série de cellules statistiquement significative afin d'en extraire les flux de chacune des espèces. Considérant les quatre signatures électrochimiques de H_2O_2 , $ONOO^-$, NO et NO_2^- , le choix des potentiels de détection est loin d'être évident. Si les vagues d'oxydation des anions nitrite et du NO sont distinctes, celles de H_2O_2 et $ONOO^-$ se superposent nettement. Il va donc être nécessaire de travailler avec des systèmes de combinaison linéaire.

Compte tenu des études antérieures réalisées au laboratoire, les quatre valeurs de potentiel optimales sont les suivantes : 300 ; 450 ; 650 et 850 mV vs SSCE, pour lesquelles la relation entre courant mesuré à chaque potentiel ampérométrique, $I^{potentiel}$, peut être exprimé comme la combinaison linéaire des contributions de chacune des quatre espèces (valable pour une électrode platinée à 30 μC) : [87, 110]

$$I^{850mV} = I_{H_2O_2} + I_{ONOO^-} + I_{NO} + I_{NO_2^-} \quad (Eq. II-24)$$

$$I^{650mV} = I_{H_2O_2} + I_{ONOO^-} + I_{NO} \quad (Eq. II-25)$$

$$I^{450mV} = I_{H_2O_2} + I_{ONOO^-} \quad (Eq. II-26)$$

$$I^{300mV} = 0.77I_{H_2O_2} + 0.32I_{ONOO^-} \quad (Eq. II-27)$$

Ces oxydations sont des processus de transfert monoélectroniques pour l'oxydation de NO et $ONOO^-$, et biélectroniques pour H_2O_2 et NO_2^- . Les contributions des composantes dues à chacune des espèces réactives ($I_{H_2O_2}$, I_{ONOO^-} , I_{NO} et $I_{NO_2^-}$) sont calculées à partir du système de quatre équations ci-dessus. Enfin, les flux d'émission ($\Phi_{H_2O_2}$, Φ_{ONOO^-} , Φ_{NO} et $\Phi_{NO_2^-}$) peuvent être calculés au moyen de la loi de Faraday :

$$\Phi = \frac{I}{nF} \quad (Eq. II-28)$$

Où F est la constante de Faraday (96500 C.mol⁻¹) et n le nombre d'électrons échangés lors de l'oxydation de l'espèce considérée. Notons que le courant peut être intégré en fonction du temps à chaque potentiel. Cette intégration correspond à la charge globale Q détectée sur un intervalle de temps donné :

$$Q = \int_t^{t+\Delta t} Idt \quad (\text{Eq. II-29})$$

On remarque que la relation charge-courant étant linéaire, le système d'équations décrit plus haut pour le courant peut être étendu à la charge Q pour chaque valeur de potentiel. Ainsi, la charge électrique Q peut être convertie par la loi de Faraday ($N = Q/nF$) en quantité de matière N globale émise pour chaque espèce. Notons que Q et $\Phi(t)$ pour une espèce contiennent toute l'information désirée puisque la concentration a peu de sens du fait qu'elle résulte de l'état stationnaire créé par la compétition très rapide entre les vitesses d'émission (cellule) et de détection (électrode). En particulier elles varient avec la distance cellule-électrode alors que Q et $\Phi(t)$ en sont indépendants pourvu que cette distance n'excède pas trop $5\mu\text{m}$.

De fait, la résolution des combinaisons linéaires en courant/charge pour les quatre valeurs de potentiel choisies permet d'accéder pour les quatre espèces détectées (H_2O_2 , ONOO^- , NO et NO_2^-):

- Au flux d'espèces émises au cours du temps
- A la quantité de matière d'espèces émises
- Et plus simplement, à la durée de l'émission elle-même

En d'autres termes, la méthodologie décrite ci-dessus permet de réaliser une quantification directe, et avec une bonne précision, de la libération de H_2O_2 , ONOO^- , NO et NO_2^- . On précisera que la variabilité cellulaire impose un nombre élevé d'expériences en nombre de cellules par potentiel (au moins 30 cellules par potentiel) pour conduire à un résultat statistiquement pertinent. A titre d'exemple, les courants moyens obtenus à 4 potentiels différents (300 ; 450 ; 650 et 850 mV vs SSCE) et correspondant à la lignée cellulaire plus particulièrement étudiée dans cette thèse (MDA-MB-231) sont représentés ci-dessous (**Figure II-14**). On remarquera que l'utilisation de l'ampérométrie à triple saut de potentiel a été récemment étudiée au laboratoire afin de mesurer trois espèces en même temps sur la même électrode et pour la même cellule. Cette technique, qui permet un gain de temps considérable, n'est cependant applicable que sur les phénomènes d'émission longs (une heure) ce qui n'est pas le cas dans ce travail (1 ou 2 minutes).[111] En effet, la mesure à chaque potentiel successif réclame un temps d'attente suffisant par rapport à la précédente afin que le courant capacitif dû au saut de potentiel soit revenu à un niveau faible par rapport au courant faradique.

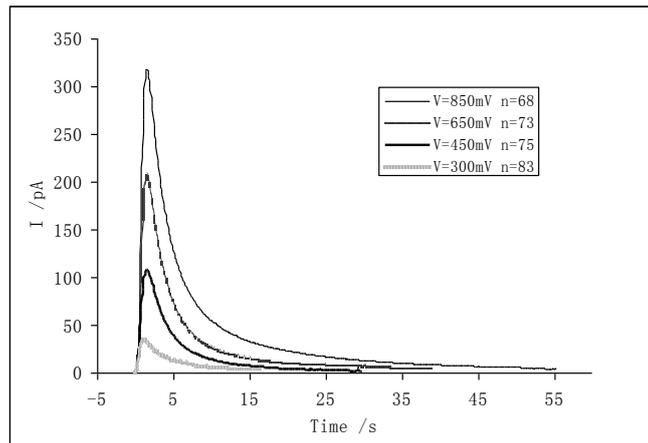


Figure II-14. *Pics moyens obtenus à 4 potentiels différents pour le stress oxydant de cellules MDA-MB-231 en présence de Fc-diOH*

Conclusion

La méthodologie décrite ci-dessus a été appliquée, lors de mon travail de thèse, à la détection/quantification des ROS/RNS libérées sur des lignées cellulaires du cancer du sein afin de tester l'impact de divers dérivés organométalliques anticancéreux potentiels sur le stress oxydant. La présentation de cette étude fera l'objet du chapitre III suivant.

Chapitre III. Détection du stress oxydant produit par une cellule du cancer du sein

1. Le cancer du sein

1.1. Situation actuelle et traitements

Le cancer du sein constitue un problème important de santé publique mondiale et représente la tumeur la plus fréquente chez les femmes et la première cause de mortalité féminine par un cancer. En France, près de 10 % des femmes développent un cancer du sein. D'après l'Institut National du Cancer et l'Institut national de la santé et de la recherche médicale, 50 000 nouveaux cas sont diagnostiqués chaque année, et environ 11000 morts sont recensées. Dans le monde, plus d'un million de nouveaux cas se développent chaque année, avec plus de 400000 décès.[112] Si la mortalité diminue sensiblement depuis les années 1990 dans les pays développés, elle continue à croître dans les autres pays.

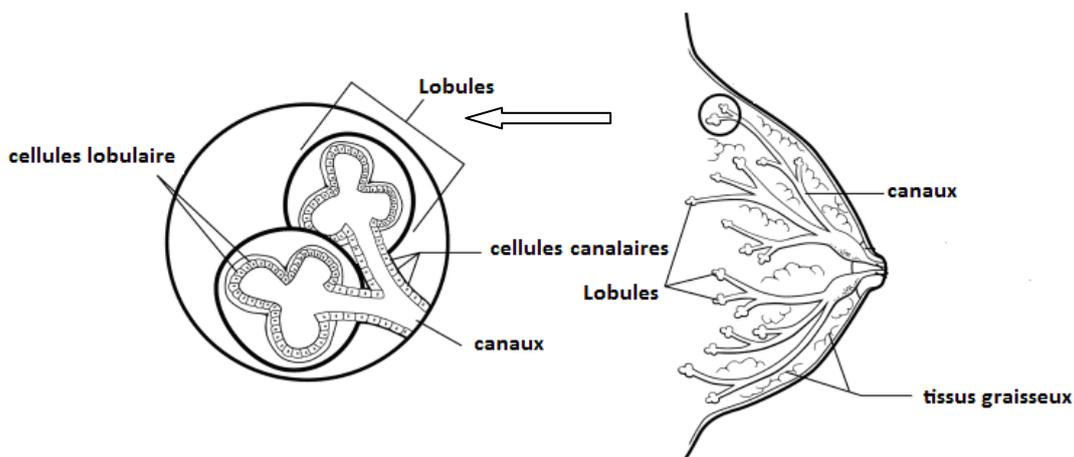


Figure III-1. Localisation des différents types de cancers du sein.

On dénombre deux grandes catégories de cancers du sein : le cancer in situ et le cancer infiltrant. Les cancers in situ, qui constituent la majorité, demeurent à l'intérieur des canaux de lactation, et sont quelquefois considérés comme des "pré-cancers". Les cancers in situ se décomposent en deux sous-catégories : le carcinome canalaire et le carcinome lobulaire, chacun d'entre eux portant le nom de la zone mammaire dans laquelle les cellules cancéreuses commencent à se développer (**Figure III-1**). Le carcinome canalaire est le type le plus fréquent. A l'opposé, les cancers infiltrants impliquent des cellules cancéreuses franchissant la paroi des canaux ou des lobules.

1.1.1. Causes du cancer du sein

Les causes réelles du cancer du sein ne sont pas connues avec précision. Certains facteurs sont néanmoins susceptibles d'augmenter le risque chez la femme : hérédité, précocité de la puberté, grossesse tardive, obésité, ou d'autres facteurs liés à l'hygiène de vie (consommation élevée d'alcool et de tabac). Le facteur de risque le plus important reste l'âge. La plupart des cancers du sein surviennent en effet chez les femmes de plus de 50 ans, et les femmes âgées de plus de 60 ans présentent un risque encore plus élevé.

1.1.2. Physiopathologie du cancer du sein

Comme la plupart des cancers, le cancer du sein demande de 6 à 10 ans pour passer de la première cellule cancéreuse "tolérée par l'organisme" à une tumeur de 2 cm de diamètre. L'extension régionale se fait par fixation des cellules "évadées" de la tumeur et "acceptées" dans les ganglions lymphatiques vers la chaîne mammaire interne, la chaîne mammaire externe et axillaire, ainsi que celle du creux sus-claviculaire. L'extension "à distance" se fait plus particulièrement en direction des os, des poumons et du foie. Ce processus métastatique est très variable et dépend à la fois des caractéristiques de la tumeur et des capacités de défense de la patiente.

Notons que le temps de doublement moyen de la tumeur est de 100 jours. Sachant que la tumeur est décelable par palpation aux alentours de 1 cm de diamètre si le sein est de taille moyenne, la définition de la stratégie thérapeutique doit être adaptée à l'urgence de la situation une fois le diagnostic posé.

1.1.3. Traitements du cancer du sein

À l'heure actuelle, les traitements du cancer du sein ont fait beaucoup de progrès, que ce soit en diversité ou en efficacité. Ils ne permettent pas néanmoins à ce jour de guérir toutes les patientes, la difficulté étant d'autant plus grande qu'elles ont atteint un stade avancé à cause d'un diagnostic tardif. Les traitements actuels possibles sont la chirurgie, la radiothérapie, la chimiothérapie et l'hormonothérapie et seront présentés ci-dessous. On notera que les deux types de cancers se traitent généralement de façon différente. Les cancers infiltrants peuvent associer des traitements locaux (chirurgie, radiothérapie) et des traitements plus généraux (chimiothérapie, hormonothérapie), alors que pour les cancers *in situ*, le traitement local peut suffire.

Intervention chirurgicale

Première méthode de traitement local, l'intervention chirurgicale consiste à retirer la ou les tumeurs du sein. L'intervention peut faire intervenir une tumorectomie ou une mastectomie. Elle peut également comprendre l'ablation de ganglions lymphatiques

axillaires. Une **tumorectomie** est l'acte chirurgical consistant à enlever une tumeur, en principe quand elle est petite (moins de 3 cm) ; elle permet de préserver la forme du sein avec tous les avantages physiques et émotionnels que cela implique. Elle enlève soit uniquement la masse tumorale soit emporte une petite partie du tissu sain entourant la tumeur.^d En principe, la tumorectomie sera suivie d'une radiothérapie évitant le risque d'une récurrence dans le même sein. Ainsi, la radiothérapie, à doses souvent modérées, réduit le risque de récurrence de 5 % à 30 %. Dans les cas où les ganglions s'avèrent envahis, la radiothérapie mammaire est complétée par une radiothérapie des aires ganglionnaires. La **masectomie**, c'est-à-dire l'ablation du sein, peut être simple ou radicale et complétée par un curage ganglionnaire. La mastectomie simple n'est en principe effectuée que dans les cas où l'intervention doit être limitée pour des raisons d'état général (femmes très âgées par exemple). La mastectomie radicale peut éventuellement être complétée, lors de la même séance opératoire, par une chirurgie de reconstruction redonnant la forme et le volume mammaire.

Radiothérapie

Appliquée sur la zone de développement du cancer, la radiothérapie constitue une autre forme de traitement local, et permet de détruire des cellules cancéreuses isolées ou en petits groupes susceptibles d'être toujours présentes, même après l'intervention chirurgicale. La patiente doit s'attendre à recevoir une radiothérapie 5 jours par semaine pendant 5 à 6 semaines, même si le traitement ne dure que quelques minutes à chaque fois. Après l'intervention chirurgicale et/ou radiothérapie, la plupart des patientes peuvent être amenées à suivre une chimiothérapie ou une hormonothérapie pour éliminer toutes les cellules cancéreuses restantes.

Chimiothérapie

La chimiothérapie est un traitement également destiné à détruire les cellules cancéreuses présentes dans l'organisme par adjonction de substances chimiques. La plupart fonctionnent par arrêt de la division cellulaire, en ciblant les cellules se divisant trop rapidement, notamment les cellules cancéreuses. Cependant, n'étant pas spécifiques, ces médicaments affectent aussi des cellules se divisant rapidement, bien que non cancéreuses. Il résulte de cette cytotoxicité des effets secondaires sérieux et parfois très handicapants (perte des cheveux, nausées, vomissements...). La chimiothérapie peut intervenir en combinaison avec d'autres traitements : en "préopératoire" (chimiothérapie dite

^d D'où l'importance d'un diagnostic précoce qui permet de pratiquer dans un même temps le curage ganglionnaire, c'est-à-dire l'exérèse des ganglions mammaires externes et axillaires.

néoadjuvante), visant à limiter le processus tumoral avant l'acte opératoire, ou en complément de la chirurgie ou de la radiothérapie, c'est la chimiothérapie adjuvante.

Hormonothérapie

La thérapie hormonale, à la différence de la chimiothérapie, repose sur le fait que les cellules tumorales de certains cancers ont des récepteurs spécifiques à des hormones qui favorisent leur croissance. Le principe consiste ainsi à supprimer l'interaction entre hormones et récepteurs et ainsi freiner la prolifération des cellules cancéreuses. Dans le cas du cancer du sein, les hormones en question appartiennent à la famille des œstrogènes. L'hormonothérapie représente donc un traitement médical visant à réduire le taux d'œstrogènes d'une patiente ou d'empêcher les œstrogènes d'atteindre la tumeur, en d'autres termes, à priver les cellules cancéreuses des œstrogènes nécessaires à leur développement. En effet, ce sont ces hormones qui alimentent les tumeurs et leur permettent de grossir et de se propager ; on parle alors de cancers du sein **hormono-dépendant**, œstrogéno-dépendant ou de cancer avec récepteurs positifs aux œstrogènes. On distingue à ce jour trois types de traitement :

- i) Elimination de la sécrétion endogène des œstrogènes par suppression ovarienne chirurgicale ou médicale par traitement avec des agonistes de la gonadolibérine (LH-RH). Chez les femmes pré-ménopausées, les ovaires sont en effet la principale source d'œstrogènes.
- ii) Elimination de la sécrétion endogène des œstrogènes (chez les femmes ménopausées, les ovaires ne produisent plus d'œstrogènes. Sous l'action d'une enzyme nommée aromatase, l'organisme produit cependant des œstrogènes) par traitement anti-aromatase, c'est-à-dire de molécules inhibant l'aromatase.
- iii) Adjonction de molécules jouant un rôle de « leurre » en bloquant les récepteurs à œstrogènes et empêchant la prolifération des cellules cancéreuses. La famille des SERMs (Selective Estrogen Receptor Modulators) correspond en partie à ce type de molécules,^e l'exemple le plus connu étant le **tamoxifène** et plus particulièrement son métabolite actif, l'hydroxytamoxifène (OH-TAM).

Les inconvénients de l'hormonothérapie sont évidemment liés à son action limitée aux cancers hormono-dépendants. On notera donc d'une part son inefficacité face aux cancers hormono-indépendant (1/3 des cancers du sein) mais aussi d'autre part le fait que les

^e Les SERMs contiennent deux catégories de molécules : les agonistes (qui miment l'action des œstrogènes) et les antagonistes (qui bloquent l'action des œstrogènes). Le comportement d'un SERM dépend des récepteurs et du type cellulaire. Ainsi, les SERMs ont un effet agoniste dans les tissus des os ou le système cardiovasculaire et antagoniste dans les seins ou le cerveau. L'idéal est bien sûr le cas où le SERM présente un effet antagoniste dans les cellules cancéreuses et agoniste dans les zones non infectées qui auraient besoin d'œstrogènes.

cellules tumorales ER+ (désignation de cellules de cancer du sein possédant un taux élevé de récepteurs aux oestrogènes) peuvent devenir résistantes aux traitements en devenant hormono-indépendantes (soit ER-). Pourtant, l'hormonothérapie présente de bons résultats et a l'avantage de ne pas présenter les mêmes effets secondaires que la chimiothérapie. A cet égard, il existe un intérêt réel à développer cette thérapie, et plus particulièrement la troisième voie. Dans ce contexte, deux lignées de cellules cancéreuses « témoins » sont couramment utilisées pour évaluer l'efficacité de certains traitements. Ce sont les cellules MDA-MB-231 et MCF-7 qui sont présentées dans le paragraphe suivant.

1.2. Lignée de cellules cancéreuses mammaires : les cellules MDA-MB-231 et MCF-7

1.2.1. Les cellules MCF-7

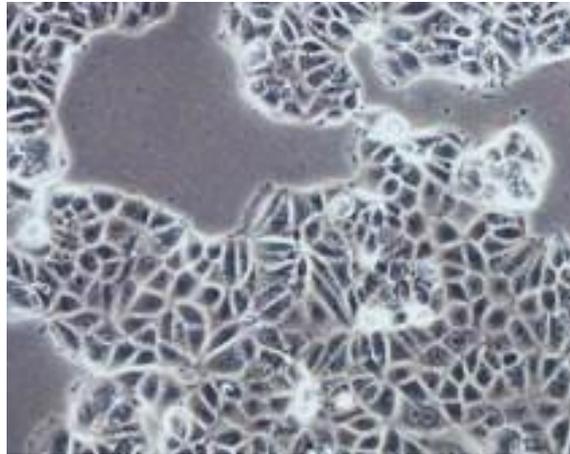


Figure III-2. Morphologie de la lignée MCF-7 de cellules de cancer du sein.

Cette lignée de cellules tumorales mammaires a été établie à partir d'un cancer du sein humain en 1973. Son nom, MCF-7, signifie Michigan Cancer Foundation (**Figure III-2**). Elle constitue le modèle le plus utilisé pour comprendre les mécanismes d'action des hormones sur les cellules tumorales et tester de nouveaux traitements anti-cancéreux, notamment l'hormonothérapie puisque présentant des récepteurs avec une réponse proliférative aux œstrogènes (ER+). Ce sont des cellules relativement plates, alignées en pavés qui adhèrent facilement au plastique des boîtes de culture : on parle d'épithélium pavimenteux. Leur surface est recouverte de courtes microvillosités.

1.2.2. Les cellules MDA-MB-231

La lignée MDA-MB-231 (pour M. D. Anderson – Metastatic Breast, **Figure III-3**) est une autre lignée cellulaire du cancer du sein, obtenue à partir d'une patiente de 51 ans en 1973 au Centre Médical M.D. Anderson. Contrairement aux cellules MCF-7, elles sont

négatives aux récepteurs des œstrogènes (ER-). Les cellules MDA-MB-231 sont hautement invasives et métastatiques, avec une morphologie épithélioïde qui entraîne une forme en fuseau.

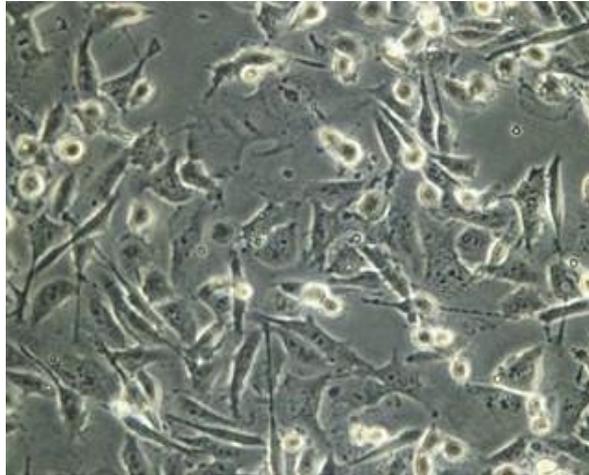


Figure III-3. Morphologie de la ligne de cellule de cancer du sein MDA-MB-231

2. Intérêt du traitement avec les ferrocifènes

2.1. Mécanisme global de la prolifération de cellules cancéreuses par les œstrogènes

Pour simplifier les grandes lignes d'une réalité complexe, la prolifération cellulaire initiée par les œstrogènes peut être décrite comme suit. Il existe ainsi trois principaux œstrogènes naturels chez la femme : l'estrone (E1), l'estradiol (E2), et l'estriol (E3). Ils constituent respectivement 10-20%, 10-30%, et 60-80% des œstrogènes circulants. Bien que l'estriol soit le plus abondant, c'est l'estradiol qui est le plus puissant et le plus actif. Deux classes de récepteurs des œstrogènes existent: les récepteurs alpha ($RE\alpha$) et bêta ($RE\beta$). Ces récepteurs sont localisés dans le cytosol et accessibles à l'estradiol qui peut traverser la membrane cellulaire. La reconnaissance de ce dernier provoque un changement conformationnel de ces récepteurs et leur migration vers le noyau où ils subissent une dimérisation et peuvent former des homodimères, $RE\alpha(\alpha\alpha)$ ou $RE\beta(\beta\beta)$, ou un hétérodimère $RE\alpha\beta(\alpha\beta)$. [113] Ces derniers s'associent ensuite à des séquences spécifiques de l'ADN. C'est à partir de ce complexe ADN-récepteur que s'opère la transcription de l'ADN en ARN, et en aval la prolifération cellulaire.

Comme nous l'avons mentionné plus haut, un axe de recherche prometteur de l'hormonothérapie consiste à chercher et utiliser des antagonistes contre l'action des œstrogènes. Les traitements actuels font souvent appel au tamoxifène, qui sera présenté dans le paragraphe suivant.

2.2. Le tamoxifène

Le tamoxifène (**Figure III-4**), catalogué comme un modulateur sélectif des récepteurs des œstrogènes (SERM), est un antiœstrogène de la classe des triphényléthylènes, utilisé sous forme orale dans le cancer du sein.[114, 115] Il est pour l'instant le traitement le plus vendu dans le cadre du traitement de ce cancer. C'est sa forme hydroxylée, OH-TAM, qui agit comme un antagoniste œstrogénique, en particulier de l'estradiol.

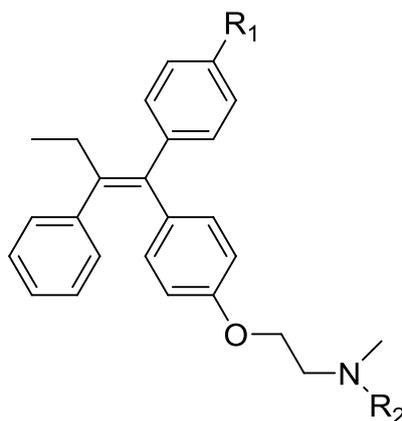
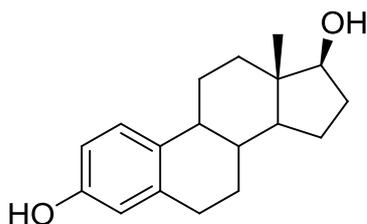


Figure III-4. Structure du Tamoxifène (TAM avec $R_1 = H$; $R_2 = CH_3$) et de ses métabolites actifs, l'hydroxytamoxifène (OH-TAM avec $R_1 = OH$; $R_2 = CH_3$) ou l'endoxifène ($R_1 = OH$; $R_2 = H$).

Comme suggéré plus haut, le tamoxifène (TAM) est un promédicament, c'est-à-dire une substance médicamenteuse dont le principe actif a besoin d'être transformé par les enzymes situées dans les cellules (du foie, essentiellement) pour avoir une action thérapeutique efficace. Avec une affinité relativement faible pour les récepteurs à œstrogènes, il est métabolisé en métabolites actifs tels que le OH-TAM (4-hydroxytamoxifène) ou en endoxifène par le cytochrome P450, [116] ces derniers ayant une affinité 30 à 100 fois plus élevée avec les récepteurs à œstrogènes que le tamoxifène.

Les structures, chimiques et tridimensionnelles, de TAM et OH-TAM, présentent des similarités avec celle de l'estradiol (**Figures III-5 et III-6**). On note ainsi la présence du groupement phénol normalement requis pour être reconnu comme ligand par les récepteurs des œstrogènes des cellules concernées.^f



^f TAM et OH-TAM présentent également des ressemblances structurales avec le cholestérol, molécule présente dans les membranes cellulaires et contribuant à la stabilité de la bicouche lipidique.

Figure III-5. Structure de l'estradiol (E2).

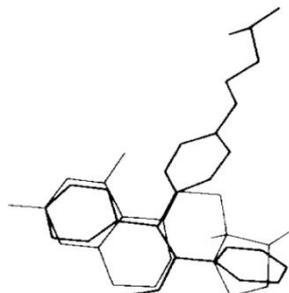
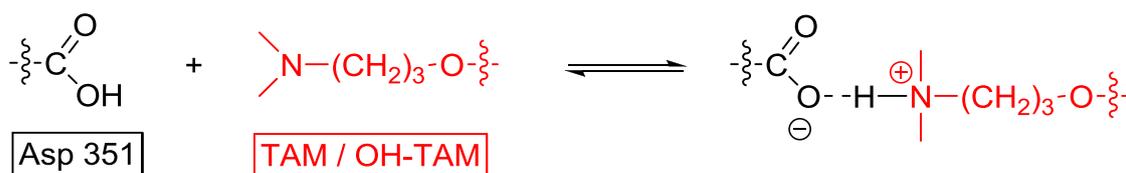


Figure III-6. Modélisation et recouvrement de TAM et E2.[117]

On notera que, dans le cas de OH-TAM, la chaîne diméthylaminoalkoxy est également déterminante. Ainsi, les interactions de TAM ou de OH-TAM avec le récepteur ER α , exigent des conformations particulières vis-à-vis de ce dernier.[118] Le 1er point d'ancrage du ligand est une interaction entre l'atome d'azote de la chaîne diméthylaminoalkoxy et l'acide aspartique Asp 351 du récepteur. Il s'agit d'une liaison hydrogène entre la fonction acide et l'azote terminal de la chaîne, comme indiqué dans l'équation suivante : [118]



Toujours dans le cas de OH-TAM, un second point d'ancrage est composé de deux autres liaisons hydrogène avec les acides aminés Arg 394 et Glu 353 (**Figure III-7**).[118] Dans le cas de TAM, en l'absence de groupement phénol, seule subsiste une liaison entre l'oxygène de la fonction éther de la chaîne aminée et Arg 394.[118] Quoi qu'il en soit, TAM et OH-TAM interagissent plus fortement avec ces sites d'ancrage que l'estradiol avec qui ils sont en compétition.

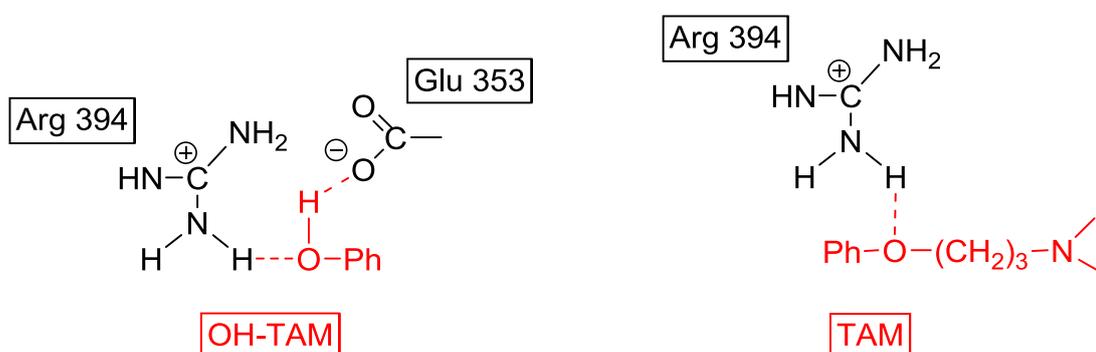


Figure III-7. Liaisons entre TAM/OH-TAM et les acides aminés Arg 394 et/ou Glu 353.

Cette forte interaction de TAM ou OH-TAM avec le récepteur induit un changement conformationnel différent de celui provoqué par l'estradiol et empêche alors *in fine* la séquence de prolifération (recrutement de co-activateurs, dimérisation du récepteur, séquences d'ADN, transcription...).[119]

Au-delà de son efficacité reconnue, le tamoxifène, de par son caractère anti-œstrogène, reste à ce jour limité aux cancers hormono-dépendants. C'est pourquoi est apparue au milieu des années 1990 une nouvelle catégorie de molécules, les ferrocifènes, associant le tamoxifène à une structure organométallique : le ferrocène.

2.3. Les ferrocifènes

2.3.1. Le ferrocène

Le ferrocène (noté Fc), de formule $\text{Fe}(\text{C}_5\text{H}_5)_2$, est une représentation classique de la chimie organométallique, appartenant à la famille des métallocènes (**Figure III-8**). A la température ordinaire, il se présente sous la forme d'un solide de couleur orange.



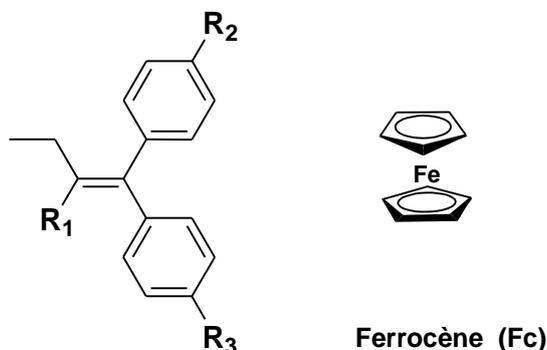
Figure III-8. Représentation du ferrocène.

Il s'agit d'une structure de type « sandwich » dans laquelle un atome de fer au degré d'oxydation +2 est complexé par deux anions cyclopentadiényles. De par la présence de ces derniers, le ferrocène est une molécule aromatique. On notera que le ferrocène peut être facilement oxydé en cation ferricinium Fc^+ ($E^\circ = 0,8 \text{ V} / \text{ESH}$). La fonctionnalisation des ligands cyclopentadiényles altère le potentiel redox : les groupements attracteurs d'électrons comme les acides carboxyliques défavorisent l'oxydation du dérivé ferrocénique (déplacement vers les potentiels plus anodiques), alors que les groupements donneurs (comme le méthyle) la facilitent (déplacement vers les potentiels plus cathodiques). Ainsi, la décaméthylferrocène est beaucoup plus facile à oxyder que le ferrocène. Notons enfin que ce dernier est souvent utilisé en électrochimie comme étalon interne pour calibrer les potentiels rédox en milieu non-aqueux car la charge positive centrée sur le Fe(III) est en grande partie écrantée par les deux ligands cyclopentadiènes. Bien que le potentiel anticancéreux des dérivés ferrocéniques ait été détecté à la fin des années 1970, le domaine de recherche a réellement émergé à partir du milieu des années 1980, notamment avec la mise en évidence de l'activité anti-tumorale de sel de ferricinium.[120, 121] Le mécanisme d'action des dérivés ferrocéniques est supposé passer par la formation des cations ferricinium correspondants, lesquels jouent un rôle de catalyseur en présence de dioxygène

et d'eau, conduisant à la formation de l'anion superoxyde et du radical hydroxyle (rôle similaire à celui du tandem Fe^{3+}/Fe^{2+} dans les réactions de Fenton et de Haber-Weiss). C'est cette situation de stress oxydant qui endommagerait l'ADN et conduirait à une mort cellulaire par apoptose.[122 , 123 , 124 , 125 , 126] C'est dans ce contexte que G. Jaouen et collaborateurs ont introduit en 1996-1997 le couplage du ferrocène avec l'hydroxytamoxifène,[127, 128] donnant alors naissance à une nouvelle famille : les (hydroxy)ferrocifènes.

2.3.2. Structure et propriété des ferrocifènes

Comme mentionné plus haut, les ferrocifènes sont des composés associant les structures du tamoxifène et du ferrocène, afin de combiner les propriétés antiostrogéniques du tamoxifène et cytotoxiques du ferrocène.



Numérotation et éventuelle abbréviation	R ₁	R ₂	R ₃
1 (TAM)	Ph	H	O(CH ₂) ₂ N(CH ₃) ₂
2 (OH-TAM)	Ph	OH	O(CH ₂) ₂ N(CH ₃) ₂
3 (Fc-OH-TAM)	Fc	OH	O(CH ₂) ₃ N(CH ₃) ₂
4 (Fc-diOH)	Fc	OH	OH
5	Fc	OH	H
6	Fc	H	H
7	Fc	O(CH ₂) ₃ N(CH ₃) ₂	O(CH ₂) ₃ N(CH ₃) ₂

Tableau III-1. Structures de dérivés du tamoxifène.

Formellement, un groupement phényle du tamoxifène est substitué par un groupement ferrocène. Le ferrocène étant lipophile et exposant vers l'extérieur une surface aromatique, sa présence en lieu et place d'un groupement phényle n'est pas censée altérer significativement sa reconnaissance vis-à-vis des récepteurs ostrogéniques. A titre

d'exemple, sont listés au sein du **Tableau III-1** sept dérivés du tamoxifène, dont cinq (de 3 à 7) appartiennent donc à la famille des ferrocifènes.

Contrairement à TAM et OH-TAM, qui ne sont actifs que vis-à-vis des cancers du sein hormonodépendants, les ferrocifènes montrent un effet antiprolifératif remarquable non seulement sur des lignées de cultures cellulaires hormono-dépendantes (MCF7), mais aussi sur des lignées de cultures cellulaires hormono-indépendantes (MDA-MB231).[129, 130, 131, 132, 133, 134, 135] L'un des composés les plus prometteurs est Fc-diOH, qui ne possède pas de chaîne alkylamine ($R_3 = OH$) mais présente néanmoins un effet antiprolifératif sur la lignée MCF-7 et surtout sur la lignée hormono-indépendante MDA-MB-231 avec un IC_{50} (concentration d'un médicament qui est requise pour une inhibition à 50 %) remarquable de 0,44 μM . [130, 136] De nombreuses questions se posent sur son mécanisme d'action et sur le rôle de la structure ferrocénique à la fois sur les cellules hormono-indépendantes MDA-MB-231 et les cellules MCF-7 puisque dans ce dernier cas, en absence de chaîne aminoalkyle, l'action peut difficilement être apparentée à un rôle antioestrogénique.

Son mécanisme d'action peut impliquer la génération in situ d'une espèce de type quinone méthide, entité électrophile et hautement toxique puisque capable d'interagir avec des macromolécules comme GSH, l'ADN ou certaines protéines pour aboutir à une mort cellulaire.[137, 138, 139, 140] Ce mécanisme suppose l'oxydation monoélectronique préalable du groupement ferrocène en cation ferricinium. La charge positive peut être formellement considérée comme délocalisée le long du système π sur le groupement phénol situé à l'opposé du ferricinium, rendant alors le proton phénolique plus acide et susceptible d'être piégé par une base. Bien que cette délocalisation soit cruciale (voir plus bas en **Figure III-9**), elle reste très faible comme le montre son peu d'influence sur le potentiel du ferrocène. Le radical phénoxy ainsi généré est stabilisé par mésomérie pouvant donner lieu à l'existence d'une structure de type quinoïde dans laquelle l'électron célibataire est localisé sur le carbone en α de la structure ferrocénique. Cette entité peut à nouveau subir une oxydation monoélectronique couplée à un transfert de proton pour aboutir à la structure de type quinone méthide (**Figure III-9**). Dans ce mécanisme, le groupement ferrocène joue un rôle de médiateur d'oxydation intramoléculaire. L'avantage est qu'en absence d'une base susceptible de se lier par une liaison hydrogène au groupe hydroxyle phénolique, la charge positive reste centrée sur le Fe(III), c'est-à-dire que le cation du ferrocifène reste chimiquement inerte tant qu'il ne rencontre pas une cible adéquate.

Ce mécanisme d'activation des ferrocifènes a été confirmé en étudiant le comportement électrochimique et RPE de différentes structures de ferrocifènes et en mettant en évidence la quinone méthide finale. La formation de ce composé semble déterminante dans le mécanisme d'action biologique des hydroxyferrocifènes dans la mesure où il s'agit

d'un électrophile particulièrement puissant (quinone conjuguée) susceptible de réagir avec les protéines, l'ADN... L'importance fondamentale de la structure « ferrocène-espaceur conjugué-phénol » pour une formation irréversible rapide de la quinone méthide a pu être mise en évidence.[130, 137] Ainsi, on remarque que, en accord avec le mécanisme précédent, l'addition de pyridine altère la morphologie du voltammogramme de **Fc-diOH** (**Figure III-10**).

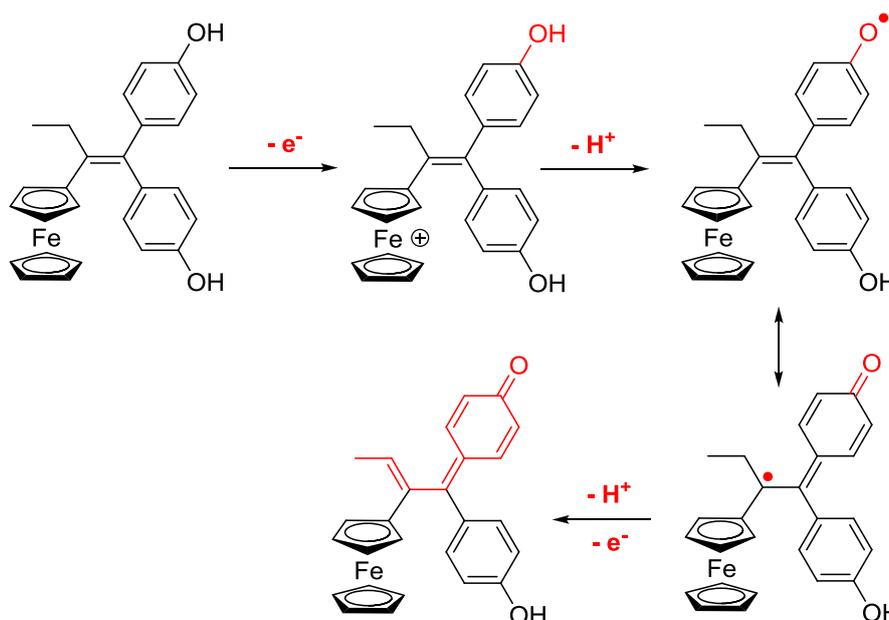


Figure III-9. Mécanisme de formation de la quinone méthide.[137]

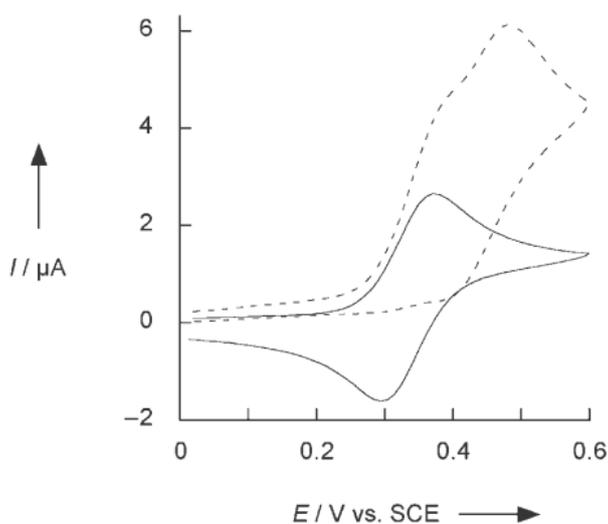
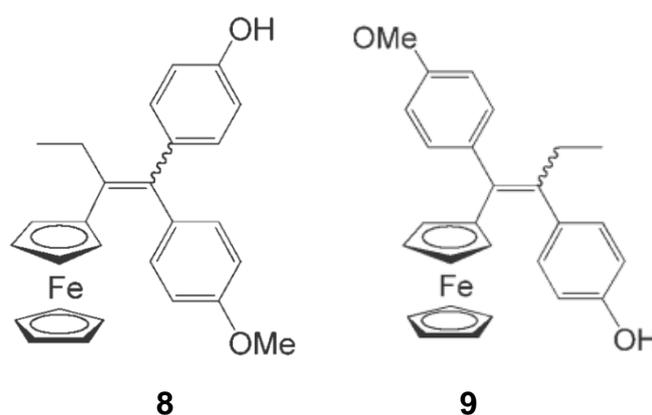


Figure III-10. Voltampérommes cycliques de **Fc-diOH** (2mM dans 0.1M $Bu_4NBF_4/MeOH$) sur électrode de Pt en absence (traits pleins) et la présence (pointillés) de pyridine.[137]

L'oxydation du ferrocène devient irréversible en effet à faible vitesse de balayage, ce qui indique la décomposition du cation ferricinium généré à l'électrode. Cette perte de réversibilité s'accompagne d'une augmentation de la vague d'oxydation de Fc, signalant un second transfert électronique à la suite de l'oxydation de Fc en Fc⁺. Enfin, une seconde vague est détectée, due à l'oxydation du groupement ferrocène au sein de la quinone méthide générée à l'électrode.[141]⁹

Ce comportement n'est pas observé pour une structure n'ayant pas de phénol possédant un hydroxyle en para et non situé à l'opposé du ferrocène, comme la molécule **6** par exemple. La présence d'une base n'altère alors pas le système réversible habituel du couple Fc/ Fc⁺.

Des résultats similaires sont obtenus sur les deux isomères **8** et **9**. Ainsi, toujours en accord avec le mécanisme de formation de la quinone méthide, **8** présente un comportement comparable à celui de **Fc-diOH** tandis que les propriétés électrochimiques de **9** ne subissent pas d'influence de la présence de pyridine. Cela démontre qu'un couplage électronique potentiel par délocalisation π n'est pas suffisant.



La structure "ferrocène-espaceur conjugué-phénol" semble donc absolument nécessaire mais pas suffisante à la formation de la quinone méthide. Dans le cadre de cette étude, on notera que les structures présentant une activité cytotoxique significative (**Tableau III-2**) présentent globalement un comportement électrochimique en accord avec la formation de la quinone méthide. Au-delà de la présence d'un groupement phénol à l'opposé du ferrocène, il apparaît également comme nécessaire la présence d'une chaîne alkyle sur le carbone géminale de celui portant le ferrocène.[142] Les structures ne respectant pas ces deux conditions n'ont pas d'effet antiprolifératif marqué (**Figure III-11**).

⁹ Le groupe ferrocène est régénéré lors du processus ECEC conduisant à la quinone méthide bien que l'ensemble de la cascade ECEC soit déclenchée par la formation du cation ferricinium.

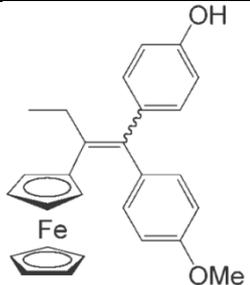
Structure	IC50	Viabilité cellulaire
3 (Fc-OH-TAM)	0,5 μM	23 %
4 (Fc-diOH)	0,44 μM	28 %
 8	-	84 %
5	1,54 μM	65 %

Tableau III-2. Effets cytotoxiques (cellules MDA-MB-231) des produits conduisant à la formation électrochimique d'une quinone méthide. La quantification de l'effet antiprolifératif est effectuée sous la forme de la viabilité cellulaire, c'est-à-dire en pourcentage de cellules vivantes restantes (incubation sur 5 jours à $C = 1 \mu\text{M}$).[143 , 144]

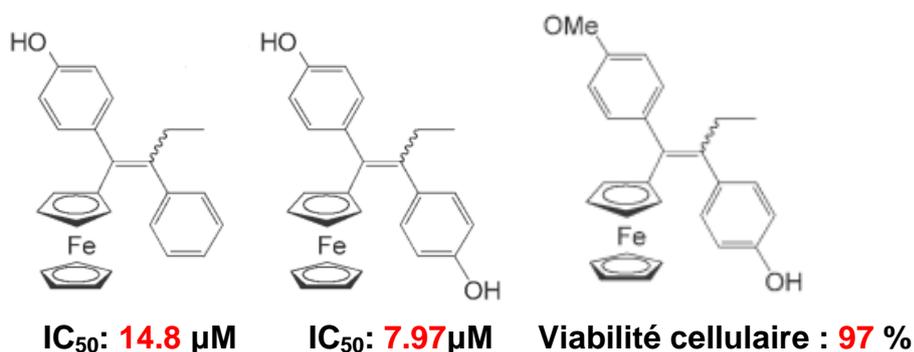


Figure III-11. Produits ne présentant pas les caractères électrochimiques d'une quinone méthide. Les IC_{50} ou viabilités cellulaires (en % de cellules restantes; incubation sur 5 jours à $C = 1 \mu\text{M}$) ont été obtenus sur cellules MDA-MB-231.[143 , 144]

Il n'est pas exclu que le tamoxifène puisse suivre un mécanisme d'action similaire à celui des ferrocifènes, à savoir former également une espèce de type quinone méthide [138 , 139 , 140, 145 , 146, 147] La structure de ces derniers serait plus avantageuse et efficace puisque facilitant, via le médiateur redox intramoléculaire (ferrocène), l'oxydation du phénol.

2.3.3. Le cas des ferrocénophanes

Si les propriétés électroniques (nécessité d'un système conjugué entre phénol et Fc) sont fondamentales pour l'activité anticancéreuse des molécules de type ferrocifène, l'aspect stérique joue un rôle déterminant. Ainsi, pourvu que sa géométrie soit correcte, une structure rigide interagira potentiellement mieux avec un éventuel récepteur que son analogue flexible.

C'est dans ce contexte que se présentent les ferrocénophanes, ferrocifènes particuliers pour lesquels les deux cycles cyclopentadiényles du ferrocène sont liés par une chaîne carbonée. A cet égard, la rigidité structurale due au motif ferrocénophane augmente fortement l'activité anticancéreuse vis-à-vis des cellules MDA-MB-231 (**Tableau III-3**).

On remarque que le composé de type ferrocénophane OH/ O-(CH₂)₃-N(CH₃)₂, en alliant toutes les propriétés requises (structure conjuguée, rigidité, interaction avec d'éventuels récepteurs) donne la meilleure activité antiproliférative, même si à ce jour les raisons biologiques exactes de cette excellente activité ne sont pas encore élucidées.

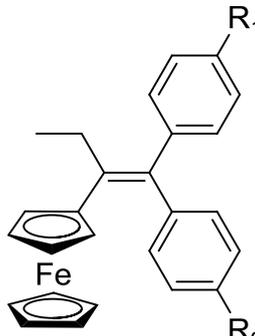
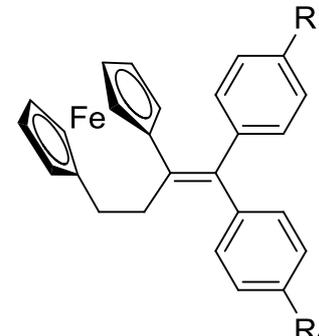
R ₁	R ₂	Ferrocifènes	Ferrocénophanes
		 IC ₅₀ (μM)	 IC ₅₀ (μM)
H	H	7,54	0,92
H	OH	1,54	0,47
H	NH ₂	0,86	0,21
H	NHAc	0,65	0,47
OH	OH	0,64	0,09
OH	NH ₂	0,55	0,06
OH	NHAc	0,56	0,09
OH	O(CH ₂) ₃ N(CH ₃) ₂	0,5	0,015
O(CH ₂) ₃ N(CH ₃) ₂	O(CH ₂) ₃ N(CH ₃) ₂	0,45	0,4

Tableau III-3. IC₅₀ de ferrocifènes et ferrocénophanes sur les cellules MDA-MB-231.[118, 148]

3. Conclusion

Les ferrocifènes offrent à ce jour une nouvelle stratégie de traitement par hormonothérapie à fort potentiel puisque l'association ferrocène-tamoxifène les rend à la fois efficaces sur cellules hormono-dépendantes et hormono-indépendantes. Leur mécanisme d'action biologique semble corrélé avec la facilité de formation d'une espèce quinone

méthide, favorisée et assistée par l'oxydation métabolique facile du ferrocène en cation ferricinium.

Cependant, une seconde voie active peut être envisagée, laquelle repose sur d'autres mécanismes d'action du tamoxifène, à savoir un déclenchement des systèmes enzymatiques de type NADPH-oxydase et/ou NO-synthase et la production consécutive d'un excès d'espèces réactives de l'oxygène et de l'azote. En effet, une étude relativement récente suggère que le tamoxifène peut induire une augmentation de la concentration en Ca^{2+} intramitochondrial dans les cellules MCF-7. Cette élévation stimule alors les NOSynthases mitochondriales, déclenchant par là-même une situation de stress oxydant et la mort par apoptose de la cellule traitée.[149] Par ailleurs, toujours sur le même modèle cellulaire, la présence de DPI (diphénylène ionodium), un inhibiteur de la NADPH-oxydase, limite considérablement les effets anti-prolifératifs du tamoxifène.[150] Le DPI, en empêchant le déclenchement de la production en cascade des espèces réactives de l'azote et de l'oxygène induite par le tamoxifène, maintiendrait indirectement la prolifération des cellules cancéreuses.

Quoi qu'il en soit, l'effet anti-prolifératif des ferrocifènes peut donc être potentiellement attribué à une situation de stress oxydant qui entrainerait de fait la mort des cellules cancéreuses, ou tout au moins leur affaiblissement, que cela constitue une voie indépendante de la quinone méthide ou déclenchée via une cascade biologique par la réactivité de cette dernière sur des cibles protéiques restant à identifier. Néanmoins, les manifestations biologiques déclenchées sur les cellules soumises à un traitement par les hydroxyferrocifènes évoquent un rôle important des ROS et RNS.

Nous avons voulu examiner en premier lieu si un traitement par hydroxyferrocifènes conduit ou non à un accroissement de la concentration de ROS et RNS par les cellules traitées, que cela soit dû à une augmentation de leur production ou une réduction de leurs mécanismes de détoxification. C'est donc la recherche et la mise en évidence de la production de ROS/RNS et de son éventuelle relation avec la présence de ferrocifène et qui seront l'objet de notre étude et présentées dans le chapitre suivant. En effet, cela peut être résolu en mettant à profit l'outil électrochimique développé antérieurement au laboratoire pour quantifier et identifier à l'échelle de la cellule unique les espèces produites par la situation de stress oxydant.

Chapitre IV. Etude de la production de ROS induites par différents ferrocifènes sur les cellules cancéreuses du sein

1. Etudes antérieures / choix des modèles cellulaires et des ferrocifènes

1.1. Choix du modèle cellulaire

Comme cela a été mentionné dans le chapitre précédent, l'objectif de cette thèse est de mettre en évidence la production de ROS/RNS par des cellules cancéreuses du sein, en particulier hormono-indépendantes, consécutive à la présence de ferrocifène. Dans ce contexte, l'essentiel de nos études sera effectué sur le modèle des MDA-MB-231. Afin de rendre l'étude exhaustive, les cellules MCF-7, hormono-dépendantes, seront également considérées dans un second temps.

1.2. Choix des ferrocifènes testés

Compte tenu de la diversité des ferrocifènes et de variabilité de leur effet anti-prolifératif, ce choix est loin d'être évident. Nous avons donc choisi de nous baser sur des études antérieures réalisées dans le laboratoire d'Anne Vessières-Jaouen avec laquelle nous avons collaboré tout au long de cette thèse.^h Ces dernières faisaient l'objet, à travers une méthode de fluorescence, de la détection de ROS produites par une population de cellules MDA-MB-231 en présence d'une large gamme de ferrocifènes (**Figure IV-1**). Il s'agit de la méthode de détection du peroxyde d'hydrogène à partir de la DCFH-DA, décrite dans le chapitre traitant des méthodes de détection du stress oxydant. On précisera que cette étude a été réalisée pour de relativement faibles concentrations en ferrocifènes (1 μM), *aux temps courts* (10 minutes) et qu'il s'agit d'une détection *intracellulaire* de la sonde qui fluoresce en réagissant avec H_2O_2 à partir du moment où elle se trouve *dans* la cellule.

Les résultats expérimentaux suggèrent que l'intensité de la production de ROS (pour l'essentiel de H_2O_2 si on considère la méthode de détection spécifique) est inversement proportionnelle à l'activité du ferrocifène concerné. Par exemple, la molécule de Fc-metaOH, qui conduit à la plus forte production de ROS (900 %), a un IC_{50} de seulement 2,7 μM . Fc-paraOH, conduit également à une production de ROS significative, mais avec un IC_{50} modéré de 1,13 μM . Enfin, Fc-OH-TAM et Fc-diOH, qui présentent tous deux une excellente activité anti-proliférative (IC_{50} de 0,5 et 0,44 μM respectivement) semblent conduire à une production de ROS moindre (450 % et 210 %). Le ferrocénophane DP1 (**Figure IV-2**), quant

^h Ces études n'ont été que partiellement publiées et nous la remercions de son autorisation à les mentionner dans ce manuscrit.

à lui, présente également une production de ROS modérée (198 %) alors que son activité cancéreuse est l'une des meilleures ($IC_{50} = 0,09 \mu M$).

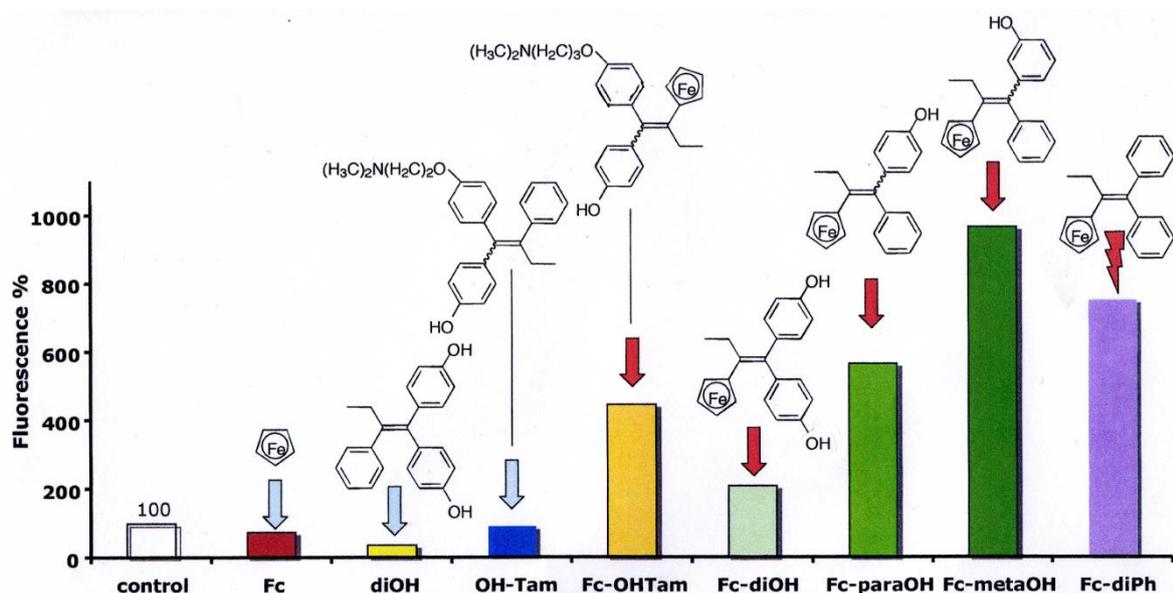


Figure IV-1. Mesures de la production de ROS par fluorescence sur une population de cellules MDA-MB-231 en présence de différents ferrocifènes. Ces mesures sont effectuées aux temps courts (10 minutes) et à faible concentration (1 μM). Le symbole Fe représente le fragment ferrocénique.

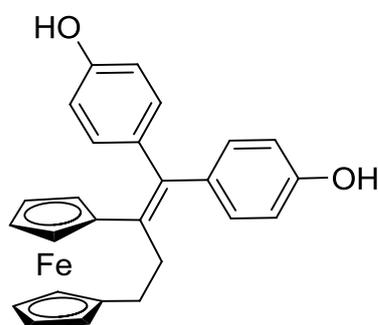


Figure IV-2. Structure du ferrocénophane DP1.

Ces études antérieures suggèrent donc que les ferrocifènes déclenchent bel et bien une production de ROS, au moins pour ce qui concerne H_2O_2 , aux temps courts. Le constat expérimental, à savoir une production de H_2O_2 inversement proportionnelle à l'activité du ferrocifène, est en accord avec un mécanisme de formation de la quinone méthide qui serait auto-entretenu, en tout cas au début de l'activation, par la production de ROS (**Figure IV-3**). Dans cette hypothèse, le ferrocifène déclencherait la production de H_2O_2 . Ce dernier contribuerait ensuite à l'oxydation du ferrocifène, laquelle est responsable de la formation ultime de la quinone méthide.[151] Cet effet est dit « kronatropique ».

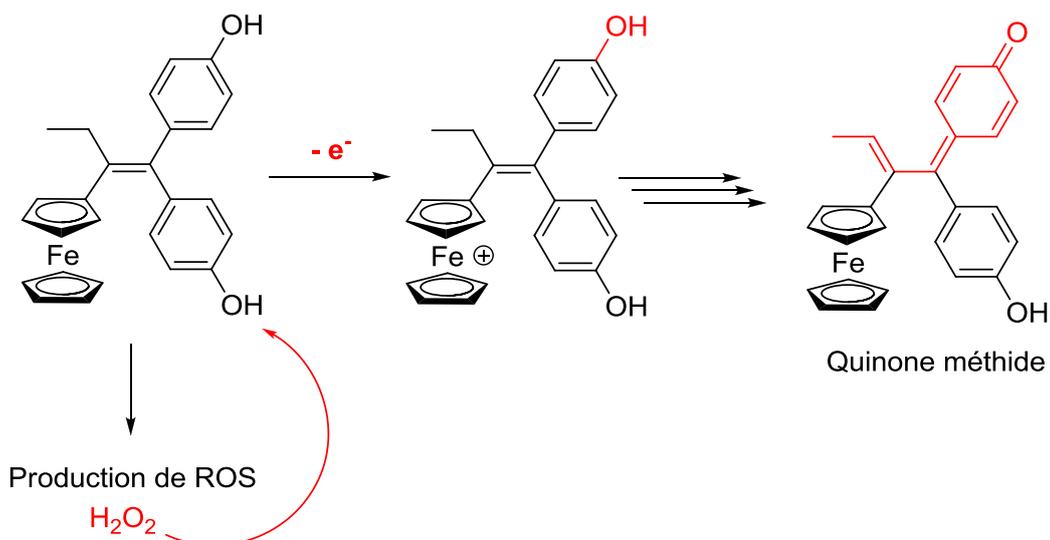


Figure IV-3. Mécanisme de formation de la quinone méthide auto-entretenu par H_2O_2 .

On notera que la production de ROS induite par les ferrocifènes peut également être suspectée sur le modèle cellulaire MCF-7. Au sein du laboratoire d'Anne Vessières-Jaouen, l'effet de la N-acetyl cysteine (NAC) a été étudié aux temps courts ou aux temps longs (21 jours) sur des populations de MDA-MB-231 ou de MCF-7 en présence de différents ferrocifènes, à une concentration de $1 \mu M$. Ainsi, la production de ROS par les MDA-MB-231 et/ou MCF-7 aux temps courts (30 minutes), significative en présence de Fc-OH-TAM, est limitée par l'ajout de NAC (1 mM), molécule antioxydante.[129]

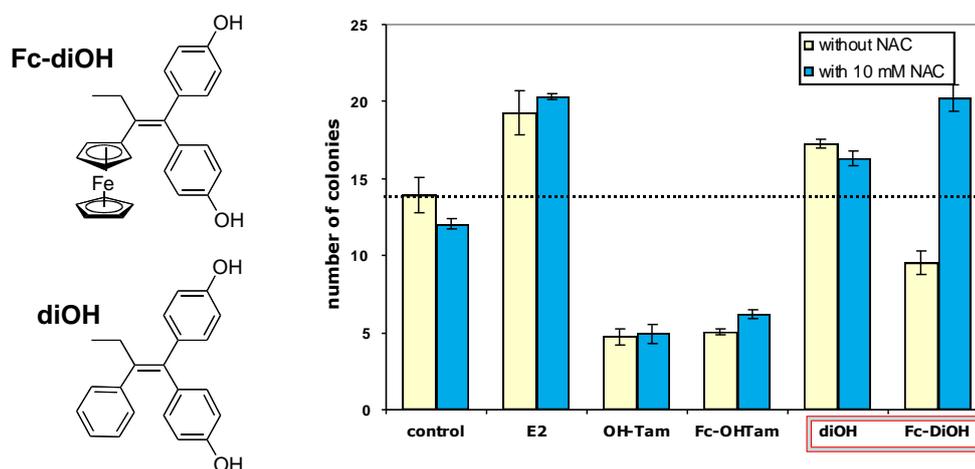


Figure IV-4. Etude de l'effet de NAC (10 mM) sur la prolifération de cellules MCF-7 sur 21 jours en présence de dérivés du tamoxifène et de ferrocifènes ($1 \mu M$).

Par ailleurs, l'effet cytotoxique de Fc-diOH sur une colonie de MCF-7 est rendu réversible (**Figure IV-4**) aux temps longs (21 jours) par la présence de NAC (10 mM). Ce résultat est cohérent avec la double nature de Fc-diOH vis-à-vis des MCF-7 (qui possèdent

des récepteurs à œstrogènes), à savoir agoniste ou cytotoxique. En présence de l'antioxydant NAC, les ROS produites dans un premier temps ne peuvent oxyder le ferrocifène, qui conserve alors son caractère agoniste et facilite la prolifération. Il est à noter que l'effet anti-prolifératif du composé Fc-OH-TAM est peu impacté par la présence de NAC, ce qui suggère que *Fc-OH-TAM* et *Fc-diOH* ne semblent pas avoir, tout au moins pour ce qui concerne la production de ROS, la même voie d'action aux temps longs.

Tout en conservant en tête que ces études par fluorescence ne permettent que de visualiser la production de H₂O₂ si l'on admet leur spécificité et sont donc « aveugles » à une production d'autres ROS/RNS (NO, ONOO⁻...), sur la base de toutes ces études menées précédemment par le laboratoire d'Anne Vessières-Jaouen, nous avons choisi d'axer les études par microélectrochimie sur trois ferrocifènes particuliers (**Figure IV-5**):

- Fc-diOH qui présente une bonne activité anti-proliférative et une structure compatible avec la formation d'une quinone méthide.
- Fc-OH-TAM, qui présente des propriétés similaires à Fc-diOH, mais semble avoir un mécanisme d'action particulier.
- DP1, qui appartient à la catégorie des ferrocénophanes, et présente une activité anti-proliférative particulière dans la série des ferrocifènes.

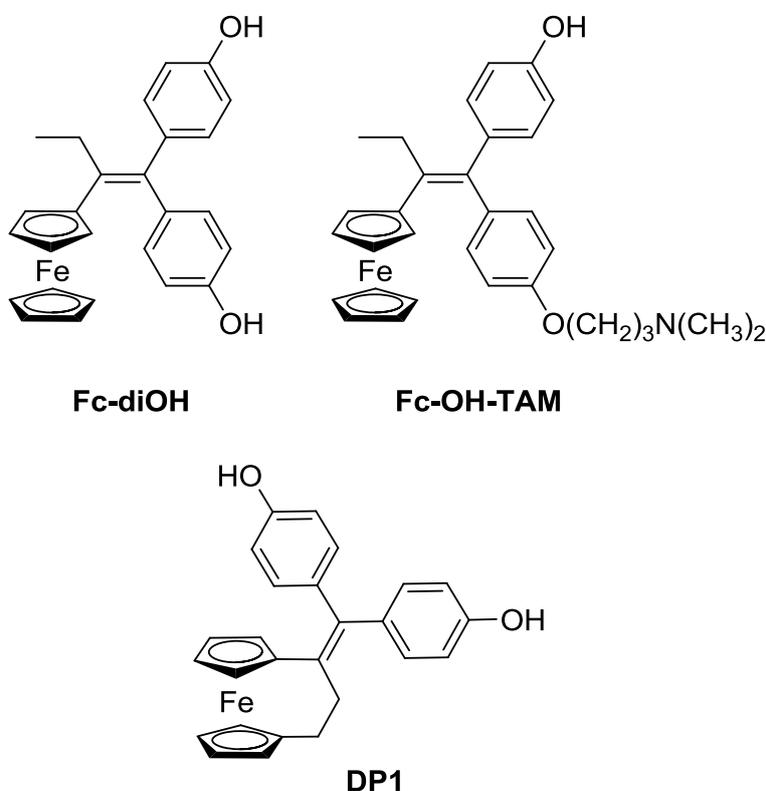


Figure IV-5. Structure et nom générique des trois ferrocifènes considérés dans cette étude électrochimique

Les performances anti-prolifératives vis-à-vis des cellules MDA-MB-231 et les intensités de fluorescence consécutives à la détection de H₂O₂ sont résumées dans le **tableau IV-1**.

	Fc-diOH	Fc-OH-TAM	DP1
IC ₅₀ (μM)	0,5	0,44	0,09
I _{Fluo} (%)	450	210	198

Tableau IV-1. IC₅₀ (en μM) des trois ferrocifènes considérés dans ce manuscrit et intensités de fluorescence (par comparaison à 100 % mesuré pour des cellules « contrôle » non soumises au traitement indiqué) mesurées par le test de la DFCH-DA en présence du ferrocifène considéré (C = 1 μM ; 10 minutes d'incubation).

2. Configuration expérimentale choisie pour l'électrochimie

La configuration expérimentale pour l'étude électrochimique de l'effet d'un ferrocifène donné sur la production de ROS/RNS par une cellule isolée ne va pas forcément de soi. Idéalement, il s'agit de positionner l'ultramicroélectrode détectrice au voisinage de la cellule d'intérêt dans un milieu physiologique (PBS) supplémenté en ferrocifène (**Figure IV-6A**). Cette disposition idéale, qui associe détection ampérométrique en temps réel en présence du ferrocifène, permet notamment de contrôler concentration en ferrocifène et durée d'incubation. En pratique, ce mode opératoire est inapproprié et impossible à réaliser puisque la fenêtre de potentiel appliquée pour le suivi des ROS/RNS produites (de 300 mV à 850 mV par rapport à l'ECSS) comprend en partie ou en totalité le domaine d'oxydation du groupement ferrocénique des ferrocifènes (de 150 à 460 mV par rapport à l'ECS).[137] Dans ce contexte, l'électrode de travail induira nécessairement et localement la formation de cations ferricinium qui altéreront le métabolisme de la cellule étudiée et/ou risquent de réagir avec les molécules libérées par la cellule étudiée. Au-delà de cette considération sur la réactivité cellulaire altérée avec cette configuration expérimentale « idéale », l'analyse elle-même sera affectée puisque deux courants, l'un provenant de la détection des ROS/RNS et l'autre de l'oxydation du ferrocifène, s'additionneront lors du suivi électrochimique en ampérométrie.ⁱ

La seconde configuration possible consiste à incuber les cellules cancéreuses dans un milieu physiologique (PBS) supplémenté en ferrocifène à une concentration donnée et pendant un temps donné, puis à changer la solution d'incubation par du milieu physiologique seul puis à positionner l'ultramicroélectrode au voisinage de la cellule d'intérêt (**Figure IV-**

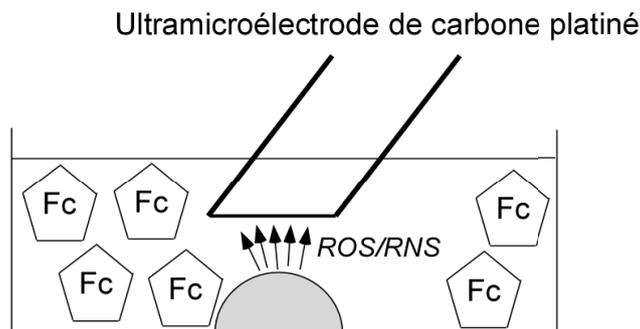
ⁱ Une étude voltamétrique permettrait de distinguer les deux processus de détection. Néanmoins, les très fortes capacités électrochimiques de nos ultramicroélectrodes de carbone platiné ne permettent pas une utilisation pertinente de la voltamétrie.

6B). Ce mode opératoire, qui empêche l'oxydation parasite du ferrocifène lors de l'étude, présente deux inconvénients notables. Le premier, impossible à contourner à cause de l'électroactivité des ferrocifènes, est lié à l'absence de ferrocifène pendant la détection et implique donc que la détection ne concernera alors que l'état final de la réponse induite lors de l'incubation, en supposant une certaine *inertie* de cette réponse dans du milieu exempt de ferrocifène. Ceci reste une contrainte acceptable et ce type de protocole existe dans la littérature, notamment pour l'étude du stress oxydant de macrophages stimulés par voie biochimique (IFN γ / LPS).[110] Dans ce cas, et il s'agit du second inconvénient, les intensités de courant résultantes sont extrêmement faibles (0,5-1 pA), si bien qu'une stimulation parallèle par du PMA au sein du nouveau milieu physiologique est nécessaire.[152] Les mêmes types de réponse, faibles même pour des potentiels de détection élevés, sont obtenus dans d'autres études, que ce soit par exemple pour l'effet de calcium ionophore ou de dérivés à base de plomb.[153, 154] La capacité de la méthode électrochimique à détecter de faibles flux d'espèces est évidemment un atout lié à cette technique et milite donc pour le choix de cette configuration. Malheureusement, dans le cas précis du stress oxydant, ces faibles intensités constituent aussi une limitation sérieuse. En effet, en l'absence de dispositif combinatoire, toute recherche prospective (notamment des conditions idéales de détection, d'incubation...) pour les quatre potentiels de détection devient particulièrement laborieuse et peut prendre un temps considérable pour ne tester l'effet que d'un seul composé. (A titre d'exemple, l'étude de l'effet de mimes de la SOD sur la production de ROS/RNS de macrophages activés par voie biochimique a nécessité au laboratoire 4 mois pour l'étude d'un premier mime et deux ans pour un second). Ce mode opératoire n'est pas à écarter et constituera évidemment la prochaine configuration à tester. Cependant, dans un premier temps, nous avons choisi de faire preuve d'une certaine prudence dans le cadre de cette thèse, et opté pour une troisième voie.

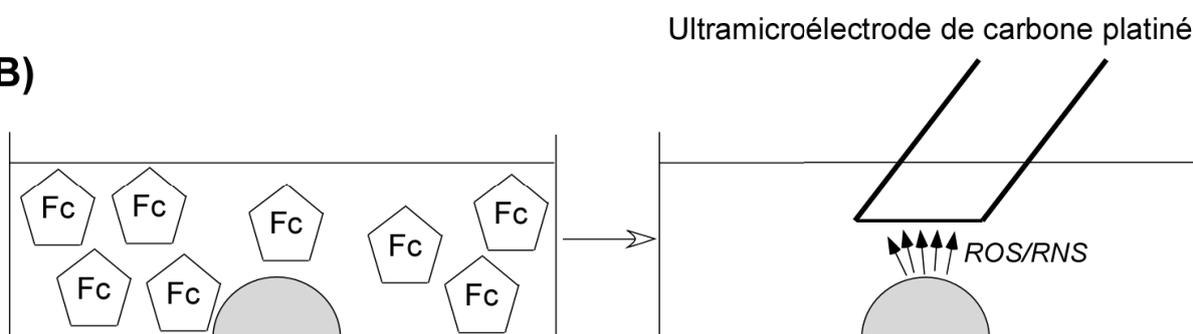
Cette dernière, également utilisée dans le cadre des études de l'effet de dérivés du plomb sur les macrophages,[154] revient à incuber les cellules cibles avec la molécule choisie à une concentration donnée et pendant un temps donné, puis à changer le milieu par un sérum physiologique exempt de la molécule en question. Une situation de stress oxydant est alors volontairement déclenchée par un stimulus mécanique, les ROS/RNS produites étant alors détectées par voie électrochimique (cf partie expérimentale et chapitre I). Il s'agit donc ensuite de comparer les flux et quantités de ROS/RNS produites par des cellules incubées avec les flux et quantités détectés pour le même type cellulaire dans les mêmes conditions de culture mais en absence de traitement. En d'autres termes, ce mode opératoire consiste à pré-activer les cellules d'intérêt avec la molécule d'intérêt et à étudier comment cette pré-activation modifie ou altère la réaction des cellules vis-à-vis d'une

situation de stress oxydant (**Figure IV-6C**). C'est cette configuration, plus simple et qui conduit à des réponses plus intenses, qui sera systématiquement utilisé dans ce manuscrit.

A)



B)



C)

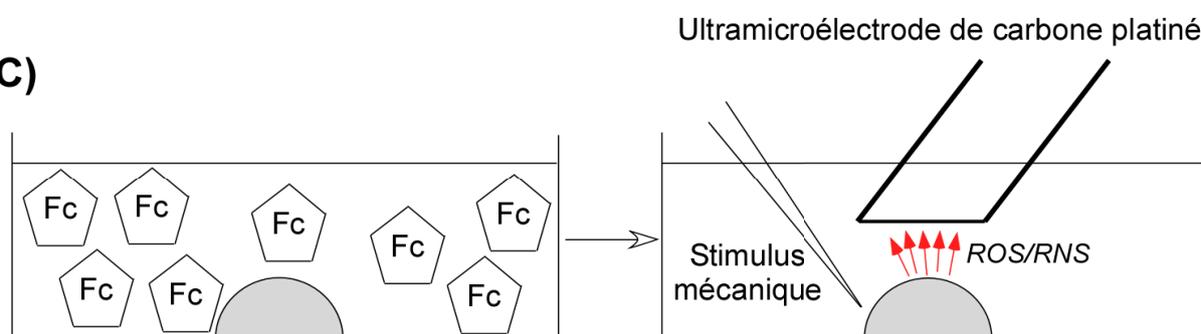


Figure IV-6. Protocoles expérimentaux envisageables pour l'étude électrochimique de l'effet de ferrocifènes sur une cellule isolée et cancéreuse du sein, le protocole C) étant celui retenu dans le cadre de ce travail car il élimine les interférences avec une oxydation des ferrocifènes (A) et permet une production plus intenses (cellules « contrôle » ou incubées) de ROS/RNS en « concentrant » temporellement les flux produits (B).

Nous allons donc présenter dans les paragraphes suivants nos résultats concernant l'effet de trois ferrocifènes (Fc-diOH, Fc-OH-TAM et DP1) sur les cellules hormono-indépendantes MB-MDA-231 pour ce qui est de la capacité des cellules traitées à produire des ROS/RNS.

3. Etude électrochimique de l'effet de ferrocifènes sur les cellules MDA-MB-231

3.1. Comportement vis-à-vis d'une stimulation mécanique

Comme précisé dans la partie expérimentale et les chapitres précédents, l'analyse consiste à recueillir indépendamment à quatre potentiels différents imposés à l'électrode de travail (300 ; 450 ; 650 et 850 mV par rapport à l'ECSS), le courant en fonction du temps, consécutivement à la stimulation mécanique de la cellule isolée et choisie, en l'occurrence une cellule MDA-MB-231 incubée ou non (contrôle) par le composé testé. A l'instar d'autres modèles cellulaires étudiés au laboratoire (macrophages, fibroblastes, keratinocytes...), chaque réponse donne lieu à un pic de courant (**Figure IV-7**) dont l'aire et le maximum, à partir du système d'équations approprié, renseigne quantitativement sur la quantité de matière émise et du flux maximal pour les quatre espèces ainsi détectées sélectivement, à savoir H_2O_2 , $ONOO^-$, NO et NO_2^- .

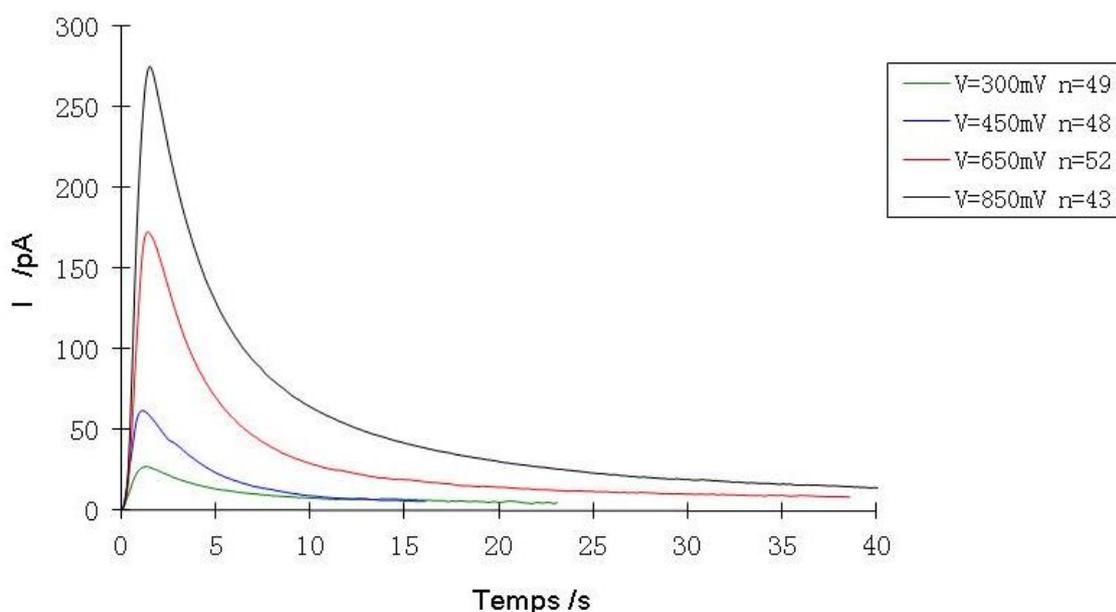


Figure IV-7. Exemples de pics de courant obtenus par stimulation mécanique d'une cellule MDA-MB-231 (non traitée) à quatre valeurs de potentiel de l'électrode de travail (ultramicroélectrode de carbone platiné à 30 μC , par rapport à l'ECSS).

Les résultats obtenus en conditions « contrôle » (c'est-à-dire avec stimulation mécanique sans incubation préalable) sur plus de 800 cellules au total sont recensés dans le **tableau IV-2**. Les valeurs obtenues, notamment pour les quantités de matière, sont globalement du même ordre de grandeur que celles obtenues sur l'un des modèles classiques du stress oxydant et étudié au laboratoire : les macrophages de souris RAW 264.7 (**Tableau IV-3**). Au-delà de la signification exacte de la valeur de ce facteur global, son

intérêt est de suggérer une certaine résilience des systèmes enzymatiques (NADPH-oxydases, NO-Synthases) entre les deux types cellulaires.

	H ₂ O ₂	ONOO ⁻	NO	NO ₂ ⁻
Quantité relarguée (fmol)	0,6 ± 0,2	3,4 ± 0,6	5,7 ± 0,3	4,7 ± 0,3
Courant maximal (pA)	21 ± 9	37 ± 9	145 ± 15	122 ± 9
Flux maximal (fmol.s ⁻¹)	0,11 ± 0,02	0,38 ± 0,10	1,50 ± 0,39	0,64 ± 0,2

Tableau IV-2. Données quantitatives extraites de la stimulation mécanique de cellules isolées (contrôles) MDA-MB-231 (chaque cycle d'expérience correspond à un nombre moyen de 55 cellules étudiées à chaque potentiel permettant de reconstituer les flux de chaque espèce. Les données de ce tableau recensent quatre cycles soit donc 220 cellules au total).

	H ₂ O ₂	ONOO ⁻	NO	NO ₂ ⁻
MDA-MB-231	0,6 ± 0,2	3,4 ± 0,6	5,7 ± 0,3	4,7 ± 0,3
Macrophage RAW 264.7	5 ± 1	9 ± 1	14 ± 3	6 ± 1

Tableau IV-3. Comparaison des quantités de matière émises (en fmol) par les MDA-MB-231 (contrôles) et les macrophages de souris RAW 264.7, tous deux soumis à une situation de stress oxydant induite mécaniquement.

Il est à noter cependant un écart significatif (facteur 8,3) pour ce qui est du peroxyde d'hydrogène (qui, on le notera, est l'espèce supposée être détectée spécifiquement par les expériences fondées sur l'utilisation de sondes fluorescentes résumées plus haut). Néanmoins, la comparaison directe des quantités de matière n'est pas aisée puisque, contrairement aux macrophages, le stress oxydant des cellules MDA-MB-231 est probablement mitochondrial.[149, 155] En conséquence, les sites d'émission du monoxyde d'azote et de l'anion superoxyde seraient différents (et peut être éloignés d'une distance non négligeable) au sein des cellules MDA-MB-231. La décomposition des ROS/RNS entre le site d'émission et le capteur électrochimique est probablement plus marquée que pour les macrophages. Ceci peut se vérifier si l'on compare le rapport peroxydite/nitrite qui est de 0,7 et de 1,5 pour les MDA-MB-231 et les macrophages respectivement. Ces deux valeurs sont cohérentes puisque dans nos conditions, le principal produit de décomposition de l'anion peroxydite est l'anion nitrite. Au sein des cellules MDA-MB-231, le rapport est plus

faible en accord avec une décomposition marquée de ONOO^- entre les sites d'émission et la surface de l'électrode.

3.2. Effet de l'incubation des ferrocifènes

3.2.1. Suivi électrochimique : résultats pour $C = 1$ ou $10 \mu\text{M}$ et $t = 10$ minutes

Le protocole d'étude étant choisi, il reste désormais à déterminer les deux autres paramètres expérimentaux : la concentration en ferrocifène et la durée d'incubation. Nous avons ainsi choisi de fixer la valeur de ces paramètres autour de celles utilisées lors de l'étude en fluorescence par le DFCH-DA résumée plus haut. Nous avons donc opté pour un temps d'incubation de 10 minutes et une concentration variable de 1 ou $10 \mu\text{M}$. L'analyse des charges à chaque potentiel est reportée sous forme d'histogrammes sur la **figure IV-8** pour Fc-diOH à $10 \mu\text{M}$, le même résultat étant obtenu pour $1 \mu\text{M}$.

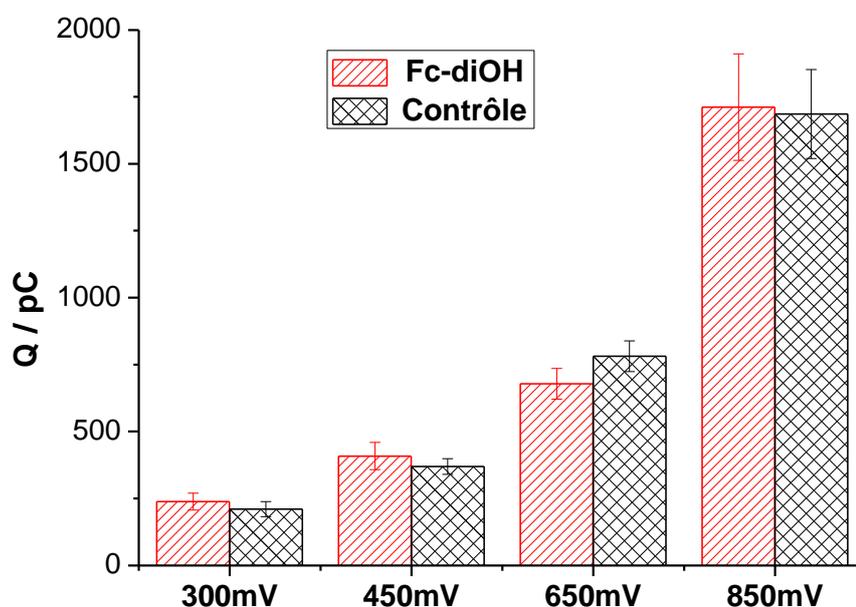


Figure IV-8. Comparaison des charges obtenues aux quatre valeurs de potentiels (environ 50 cellules par potentiel) sur cellules MDA-MB-231 avec ou sans Fc-diOH ($10 \mu\text{M}$ pendant 10 minutes). Les conditions « contrôle » consistent à laisser les cellules dans le même tampon pendant 10 minutes mais en absence de Fc-diOH.

D'autres expériences ont également été conduites pour un temps d'incubation de 30 minutes et une concentration de $10 \mu\text{M}$ pour Fc-diOH. Dans ces conditions, un léger effet semble se manifester, mais il reste cependant à la limite de la significativité statistique (**Figure IV-9**). Cependant, compte tenu des barres d'erreurs, l'exploitation des valeurs des charges aux quatre potentiels ne génère pas de différence marquée entre les quantités de matières des quatre ROS/RNS après et sans incubation avec le composé Fc-diOH.

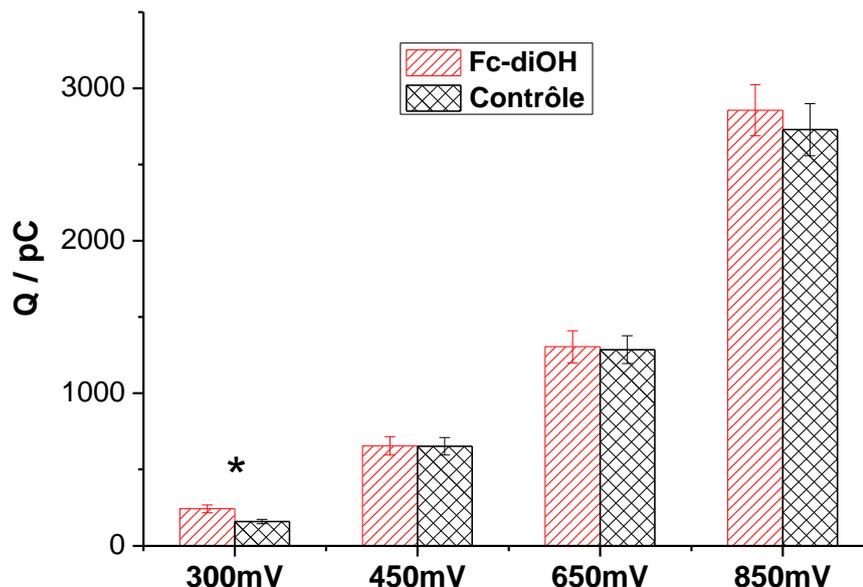


Figure IV-9. Comparaison des charges obtenues aux quatre valeurs de potentiels (environ 50 cellules par potentiel) sur cellules MDA-MB-231 avec ou sans Fc-diOH (10 μ M pendant 30 minutes). Les conditions « contrôle » consistent à laisser les cellules dans le même tampon pendant 30 minutes mais en absence de Fc-diOH.

Ainsi il apparaît que dans les conditions de notre étude, Fc-diOH n'impacte pas la production des ROS/RNS alors qu'il induit une forte augmentation de la production de H₂O₂ dans des conditions similaires, détectée par fluorescence. Ces deux résultats indépendants (fluorescence et électrochimie) ne sont en aucun cas contradictoires. En effet, la détection du peroxyde d'hydrogène par le biais de la DFCH-DA est *intracellulaire* et plus ou moins thermodynamiques quant la détection par le biais de l'ultramicroélectrode est *extracellulaire* et fortement dynamique. En conséquence, les ROS/RNS émises au niveau des mitochondries réagissent pendant leur parcours diffusionnel (avec de potentiels régulateurs de ROS/RNS comme les catalases par exemple) et arrivent en quantités trop faibles au niveau de la surface de l'électrode pour aboutir, dans nos conditions à une détection significative.^j

3.2.2. Modification du protocole : mise en relation avec les temps longs

Les études mentionnées dans les paragraphes précédents, quelle que soit la technique (fluorescence ou électrochimie) avaient pour but la détection de ROS/RNS aux

^j Les différences observées peuvent être rationalisées à travers d'autres explications. Ainsi, la fluorescence détecte « directement » la production de ROS par une cellule *suite à la présence* du ferrocifène. L'électrochimie concerne la détection d'une réponse oxydative de la cellule suite à une stimulation mécanique *après* incubation avec le ferrocifène. On compare alors deux protocoles radicalement différents, à savoir une induction directe et une pré-activation. Enfin, on a vu précédemment (paragraphe 2.2.2.) que la détection en fluorescence de H₂O₂ par la DCFCH-DA implique une catalyse par Fe²⁺. Les ferrocifènes correspondent à un atome de Fe au degré d'oxydation +II et peuvent donc potentiellement fausser la détection.

temps courts, c'est-à-dire à un stade où l'activité antiproliférative du ferrocifène n'est pas encore visible. Nous avons donc opté dans un second temps pour une étude à des temps plus longs, c'est-à-dire au moment où la prolifération cellulaire est effectivement limitée par la présence du ferrocifène.

Ainsi, nous avons suivi par microscopie l'évolution de populations de cellules MDA-MB-231 en boîtes de Petri en présence de 10 μM de Fc-diOH. L'effet antiprolifératif apparaît sur une gamme de temps de la dizaine d'heures (**Figure IV-10**).

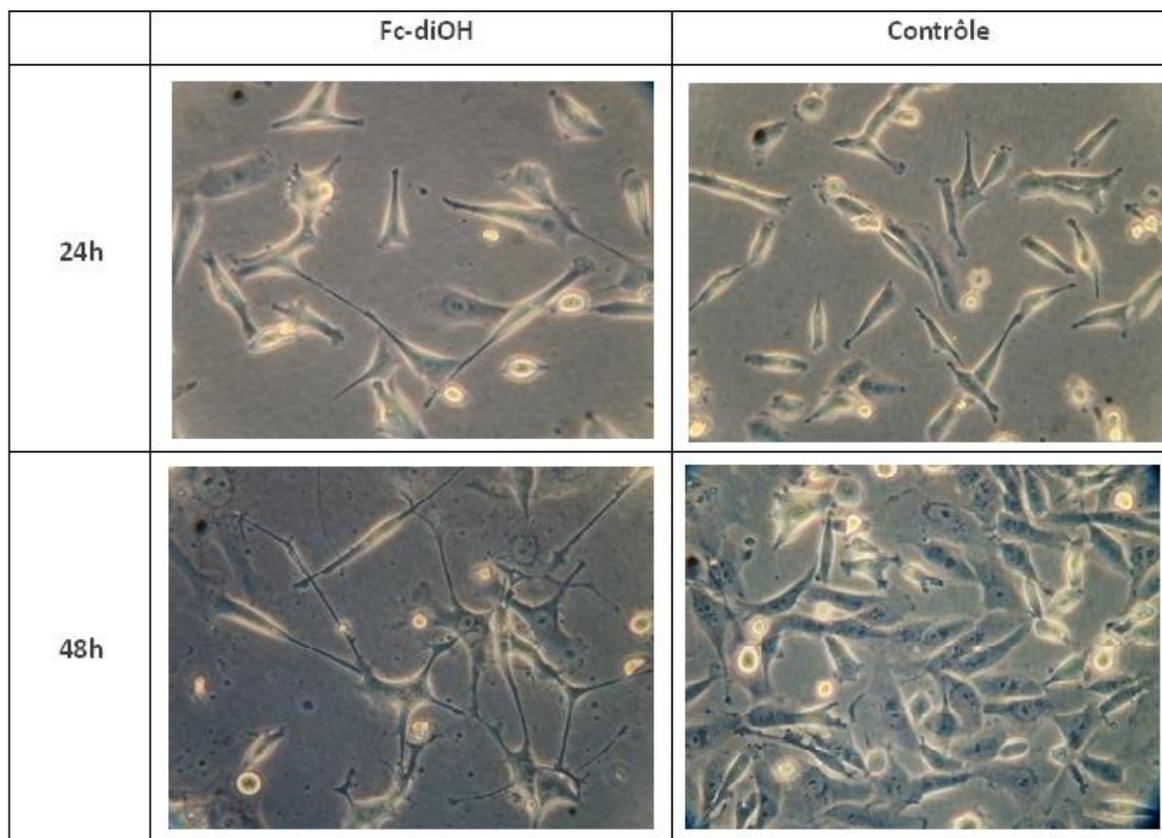


Figure IV-10. Etude par microscopie optique de l'effet antiprolifératif de Fc-diOH (10 μM) sur des cellules MDA-MB-231.

Les études par microscopie montrent qu'une concentration en Fc-diOH de 10 μM provoque un effet antiprolifératif bien visible dès après 17h d'incubation mais que le développement de cet effet stagne ensuite pour atteindre un plateau après 24 h d'incubation et un changement morphologique au delà. Dans ce contexte, il n'est alors pas exclu que les cellules restantes soient des cellules résistantes au traitement ou différenciées. De ce point de vue, l'étude de leur production de ROS/RNS risque de ne pas forcément refléter le comportement des cellules qui ont subi l'action du ferrocifène.

A ce stade, il nous a donc semblé plus pertinent d'étudier des cellules au cours de l'activité antiproliférative elle-même afin d'éviter au maximum cet effet de plateau. Deux

options ont alors été envisagées : travailler sur des durées d'incubation de 24 h et augmenter la concentration de 10 à 25 μM .

A travers un suivi comparé en microscopie à 10 et 25 μM en Fc-diOH, on constate que l'activité de Fc-diOH pour la seconde concentration se poursuit sans plateau jusqu'à 48h, ce qui valide *in fine* le choix des paramètres expérimentaux : *concentration de 25 μM et temps d'incubation de 24 h*, ce qui correspond à des paramètres voisins de ceux utilisés en pharmacologie pour tester l'effet de ce même type de molécules en cancérologie tout au moins lors de tests de « screening », les mesures d'IC₅₀ étant réalisées ensuite pour les molécules actives.

3.2.3. Antiprolifération : résultats pour C = 25 μM et t = 24 h pour les cellules MDA-MB231

Dans un premier temps, et parce que nos conditions d'étude sont loin de leurs valeurs d'IC₅₀, il est nécessaire de déterminer, au moins qualitativement, l'activité antiproliférative des trois ferrocifènes (Fc-diOH, Fc-OH-TAM et DP1) pour 24 h d'incubation à 25 μM . De plus, et même si son IC₅₀ reste élevé (de l'ordre de 160 μM), il est également nécessaire de vérifier si dans ces conditions, le ferrocène seul a ou non un effet sur la prolifération cellulaire. Les **figures IV-11, 12 et 13** recensent les résultats obtenus par microscopie pour le ferrocène (Fc), Fc-diOH et DP1 respectivement.

On constate ainsi que le ferrocène seul n'a aucune activité antiproliférative manifeste dans nos conditions d'étude. Pour ce qui est de Fc-diOH et DP1, on observe des activités antiprolifératives significatives. On remarque qu'aucun effet de plateau ne semble se manifester, même après des temps d'incubation largement supérieurs à 24h.

L'analyse comparée (**Figures IV-14 et 15**) entre Fc-diOH et DP1 montre une activité antiproliférative sensiblement identique à 24 h, avec un pourcentage de cellules restantes d'environ 25 % après 24 h d'incubation. Notons néanmoins que sur des gammes de temps plus élevées, l'action antiproliférative de Fc-diOH semble meilleure que celle de DP1.

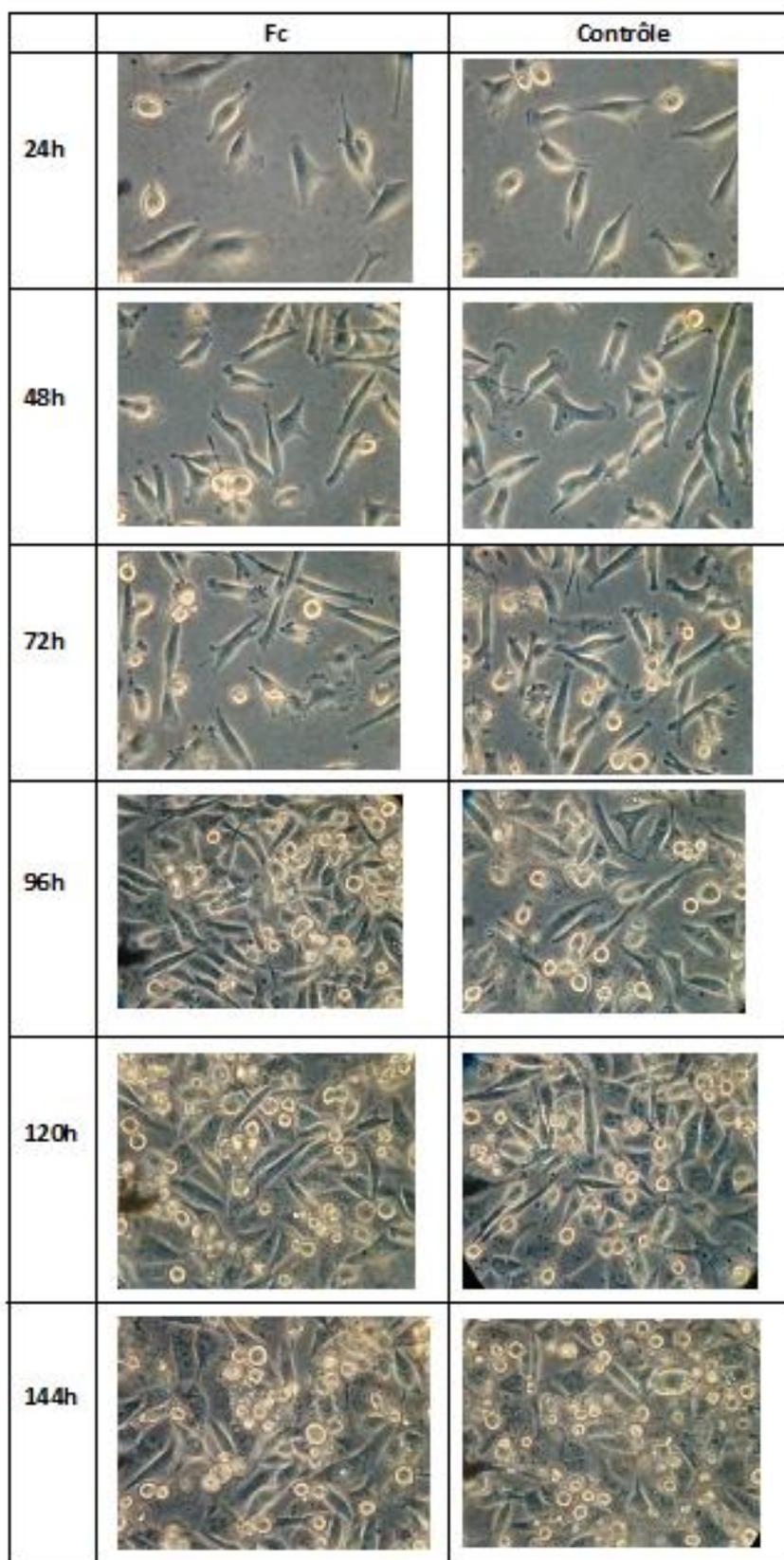


Figure IV-11. Etude par microscopie optique de l'effet antiprolifératif de Fc (25 μ M) sur des cellules MDA-MB-231 pendant 24h, 48h, 72h, 96h, 120h et 144h.

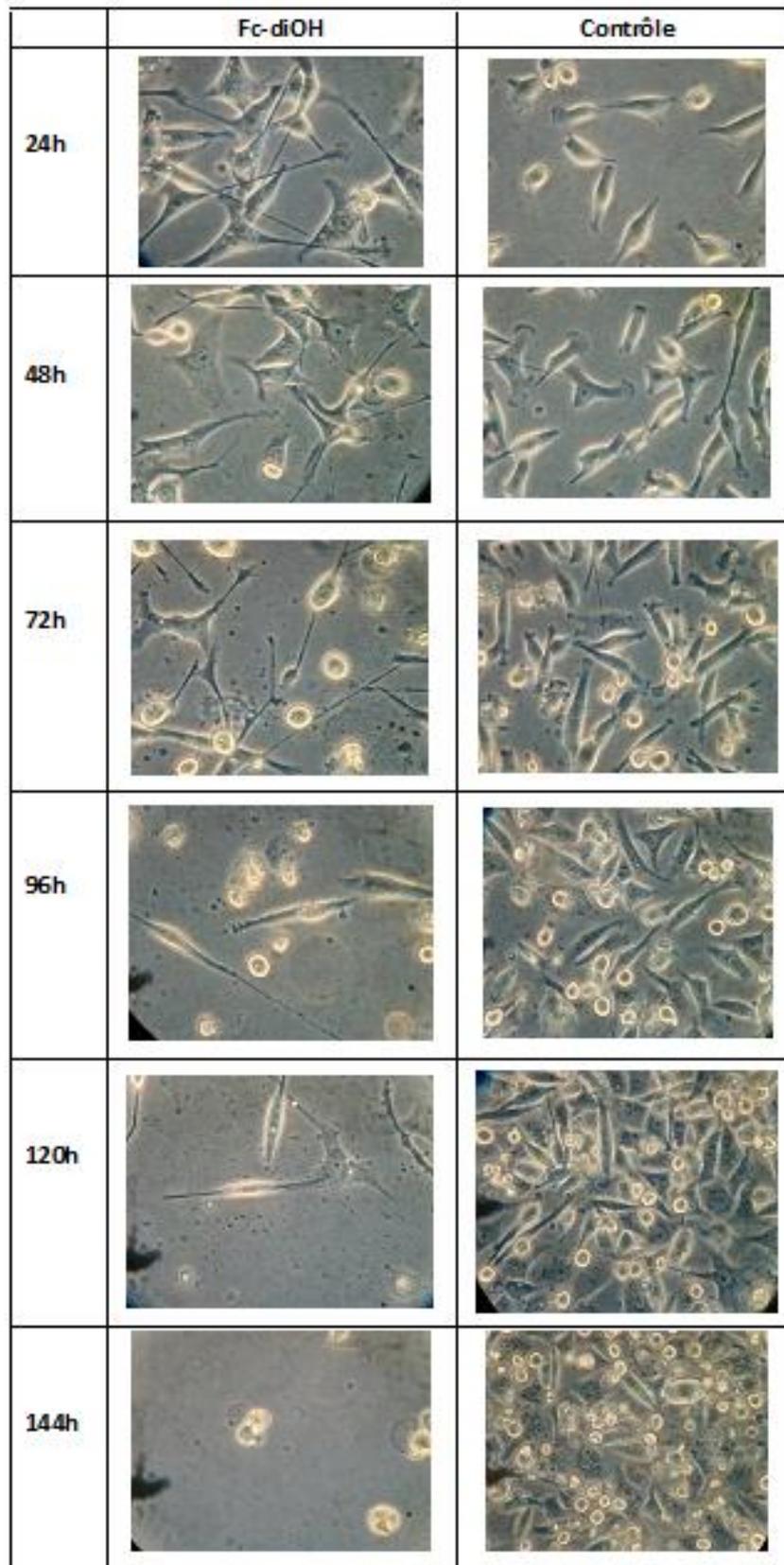


Figure IV-12. Etude par microscopie optique de l'effet antiprolifératif de Fc-diOH (25 μM) sur des cellules MDA-MB-231 pendant 24h, 48h, 72h, 96h, 120h et 144h.

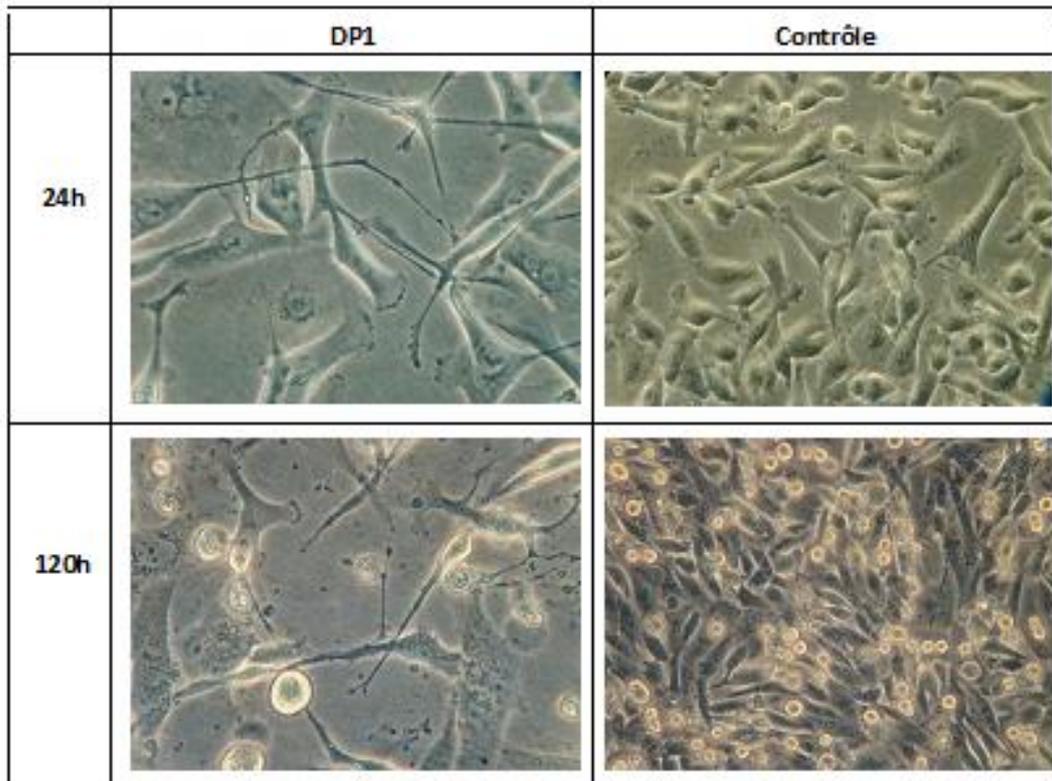


Figure IV-13. Etude par microscopie optique de l'effet antiprolifératif de DP1 (25 μ M) sur des cellules MDA-MB-231 pendant 24 et 120 h.

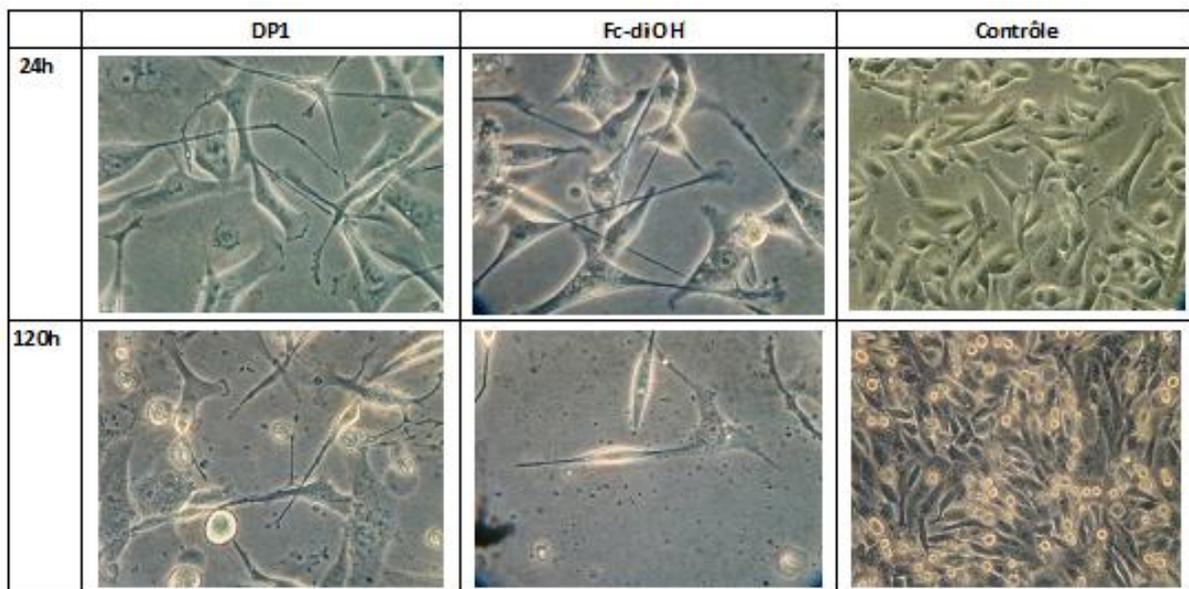


Figure IV-14. Etude comparée de l'effet de DP1 ou de Fc-diOH à 25 μ M pour des temps d'incubation de 24 et 120 h.

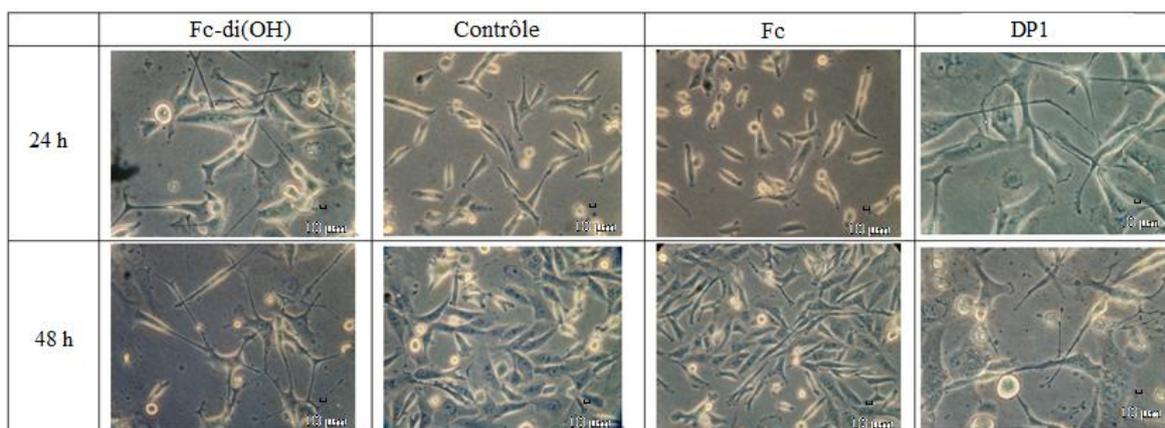


Figure IV-15. Etude comparée de l'effet de DP1, de Fc-diOH ou de Fc à 25 μM pour des temps d'incubation de 24 et 48 h.

Le cas de Fc-OH-TAM est nettement différent de ceux de Fc-diOH et DP1 (**Figure IV-16**). Dans nos conditions d'étude, aucune cellule ne subsiste après 24 h d'incubation avec Fc-OH-TAM. On retrouve une activité sensiblement similaire à ce qui avait été observé pour Fc-diOH ou DP1, non pas au bout de 24 h mais de seulement une demi-heure. Cette observation semble faire de Fc-OH-TAM un cas à part et c'est pourquoi contrairement à Fc-diOH, DP1 ou même le ferrocène (qui seront étudiés à 25 μM et 24h), le temps d'incubation sera considérablement réduit (30 minutes) pour Fc-OH-TAM dans le cadre de nos études par voie électrochimique. Les résultats sont résumés au sein du **tableau IV-4**.

	IC ₅₀ (μM) et/ou % antiprolifération à 1 μM /5 jours	Estimation de la viabilité cellulaire à 25 μM
Fc-diOH	0.44 μM / 28 %	25 % à 24 h
Fc-OH-TAM	0.5 μM / 23 %	25 % à 30 minutes ; 1 % à 24 h
DP1	0.09 μM / 4.1%	25 % à 24 h

Tableau IV-4. Résumé des résultats pour les cellules MDA-MB-231. Le pourcentage donné est celui de cellules restantes.

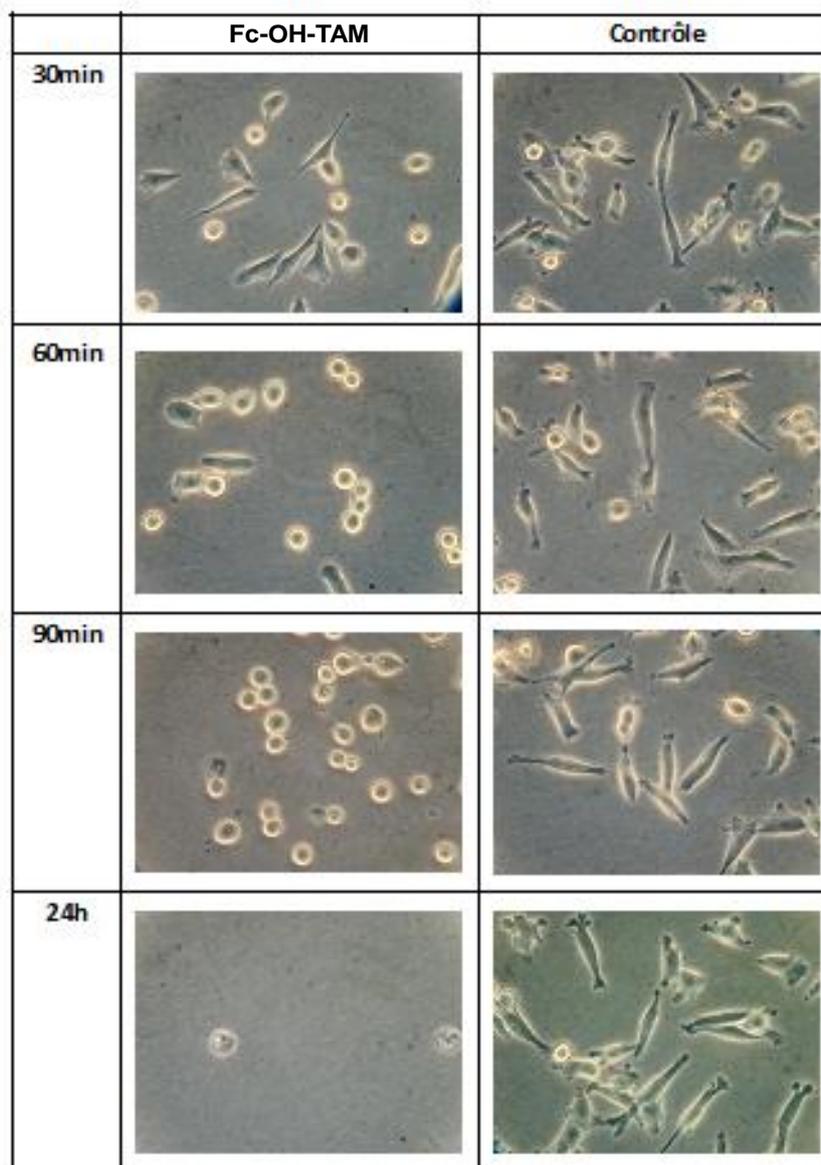


Figure IV-16. Etude par microscopie optique de l'effet antiprolifératif de Fc-OH-TAM (25 μ M) sur des cellules MDA-MB-231 pendant 30 minutes, 1 h, 1h30 et 24 h.

3.2.4. Suivi électrochimique : résultats pour C = 25 μ M et t = 24 h pour les cellules MDA-MB231

Suivant le protocole de suivi et d'analyse déjà décrit plus haut dans ce manuscrit, cette section sera dévolue à la présentation des résultats obtenus par détection électrochimique pour Fc-diOH, DP1 (C = 25 μ M et 24 h d'incubation) et Fc-OH-TAM (C = 25 μ M et 30 minutes d'incubation).

Cas de Fc-diOH

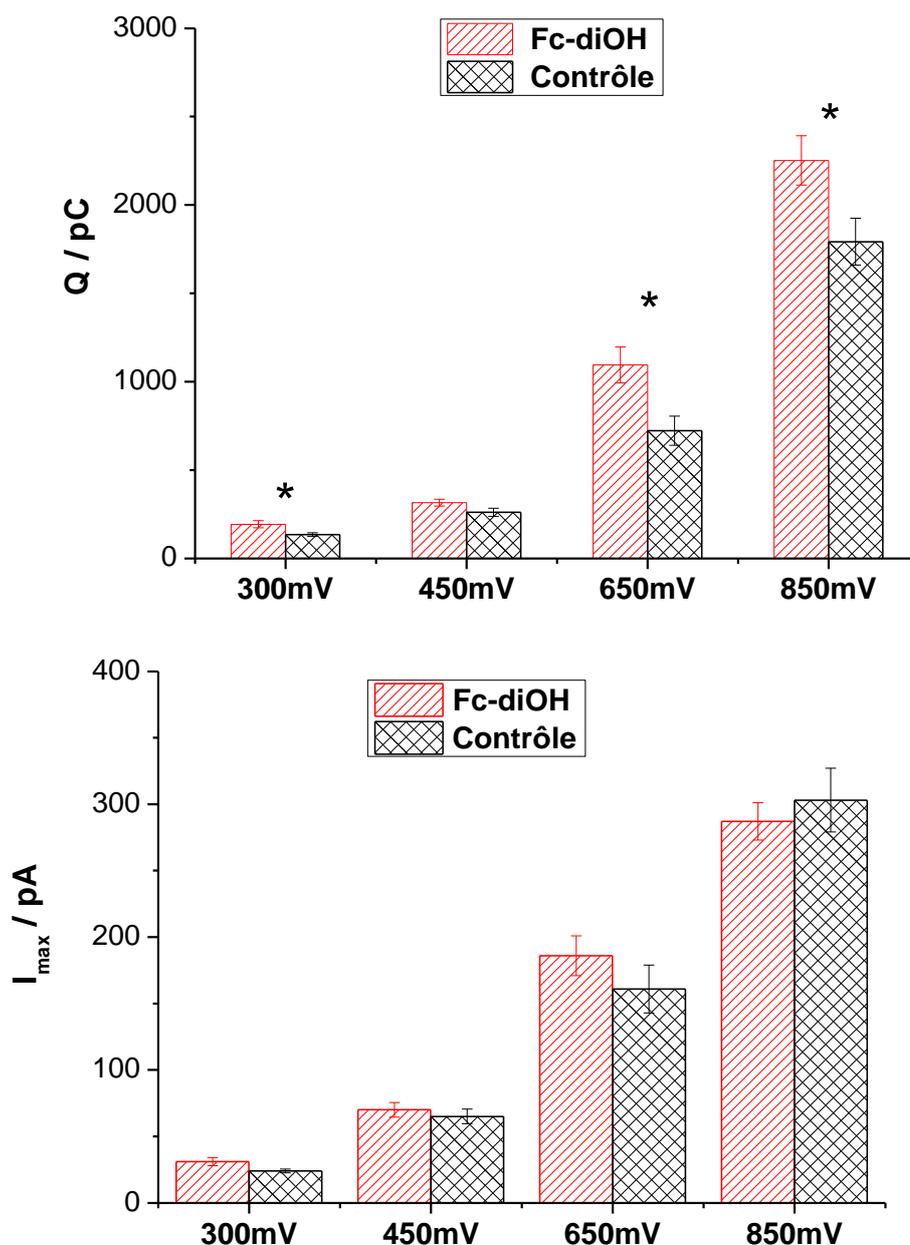


Figure IV-17. Effet de Fc-diOH (concentration: 25 μ M, temps d'incubation : 24h) sur le processus oxydant des cellules MDA-MB-231 et les caractéristiques des pics aux 4 potentiels. Haut : charges. Bas : maximums de courant. Données obtenues sur 50 cellules par potentiel.

L'analyse des charges et des courants maximum met en évidence un effet notable de l'incubation avec Fc-diOH dans ces conditions (**Figure IV-17**). L'extraction des quantités de matières des quatre ROS/RNS est représentée sur la **figure IV-18**. On constate que Fc-diOH induit une surproduction globale (N) de H₂O₂ et de NO, par un facteur 1,8 et 1,7 respectivement. Par contre, Fc-diOH n'a pas d'influence significative sur la cinétique de libération (I_{max}).

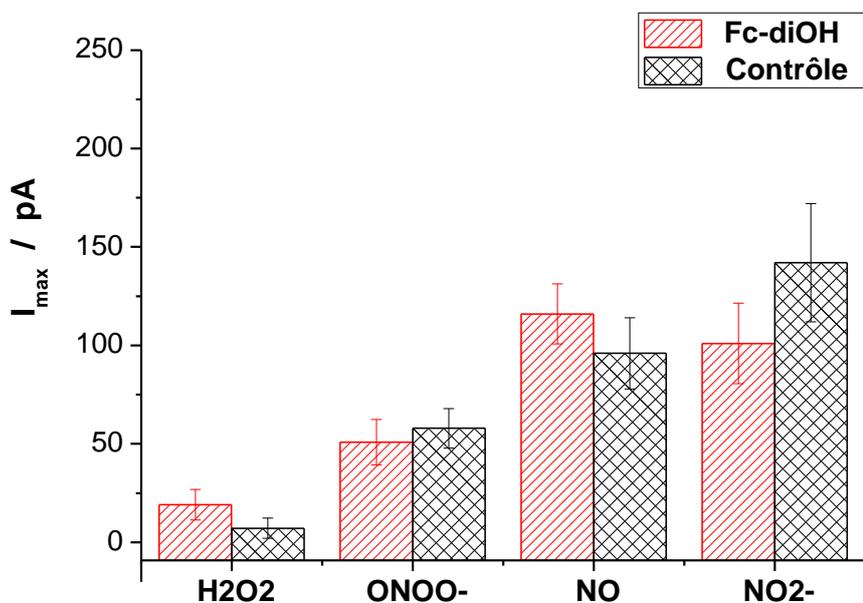
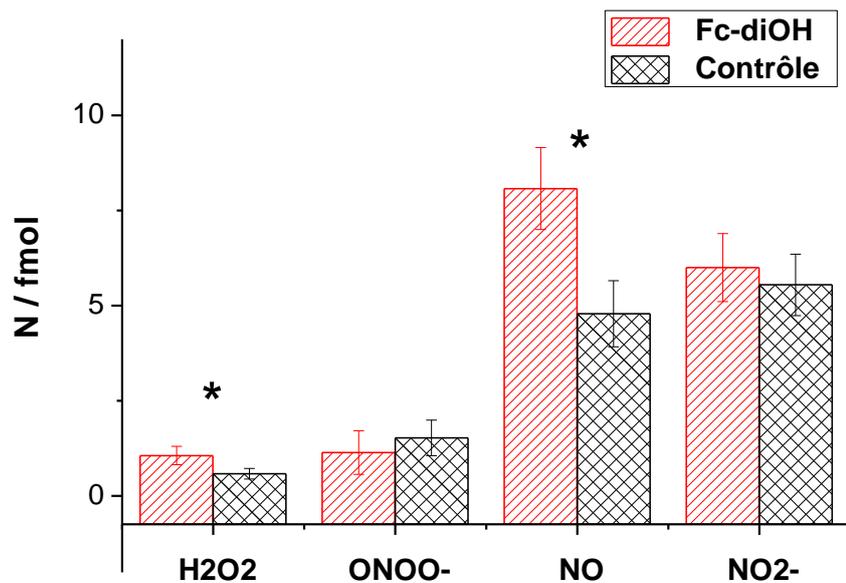


Figure IV-18. Effet de Fc-diOH (concentration: 25 μ M, temps d'incubation : 24h) sur le processus oxydant des cellules MDA-MB-231 et les espèces électroactives libérées aux 4 potentiels. Haut : quantités de matière. Bas : maximums de courant.

Cas de DP1

L'analyse des charges et des courants maximum met également en évidence un effet significatif de DP1 (**Figure IV-19**).

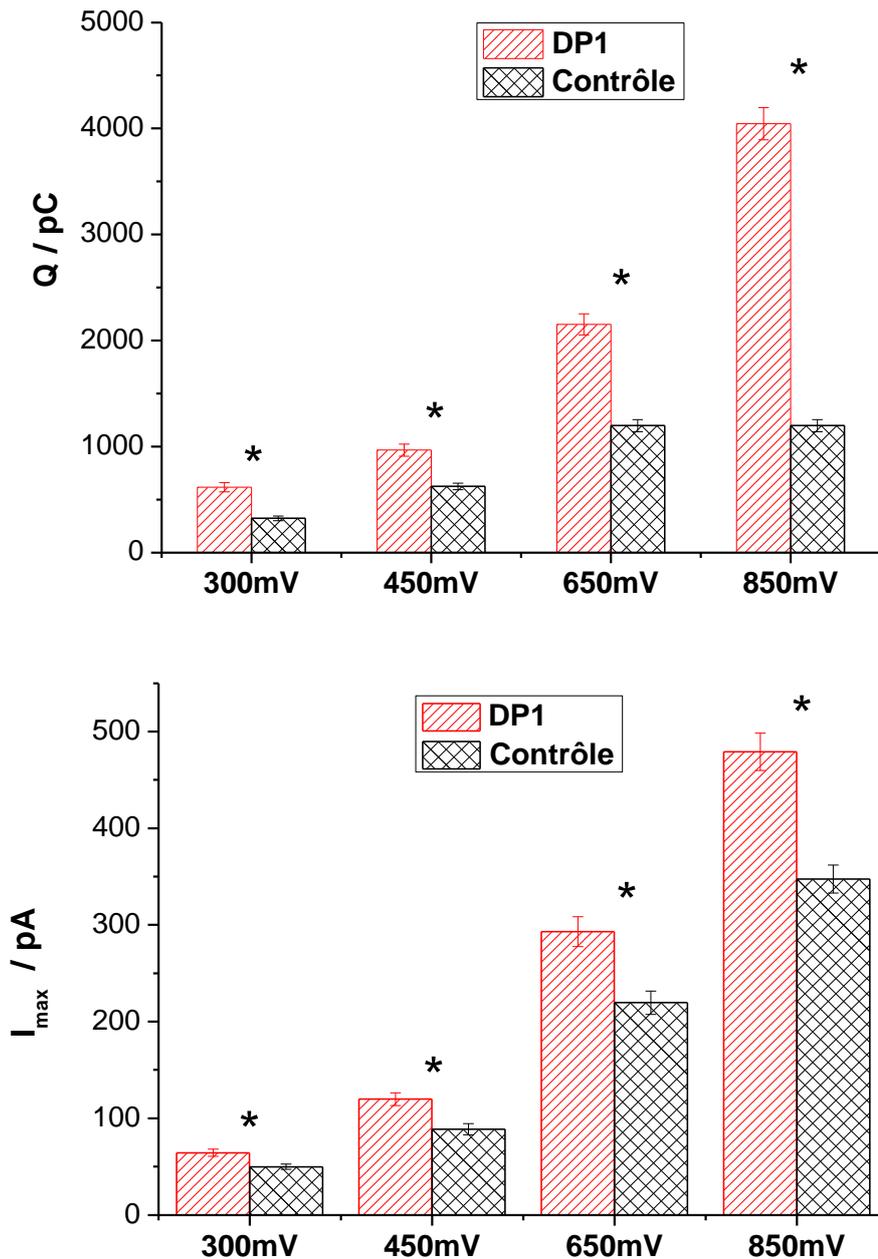


Figure IV-19. Effet de DP1 (concentration: 25 μ M, temps d'incubation : 24h) sur le processus oxydant des cellules MDA-MB-231 et les caractéristiques des pics aux 4 potentiels. Haut : charges. Bas : maximums de courant. Données obtenues sur 50 cellules par potentiel.

A nouveau, l'extraction des quantités de matières/flux des quatre ROS/RNS conduit aux graphiques représentés sur la **figure IV-20**. On constate que comme Fc-diOH, DP1 induit une surproduction globale (N) de H₂O₂ (par un facteur 2,5) et de NO (par un facteur 2,1) mais également de NO₂⁻ (par un facteur 2). Contrairement à Fc-diOH, DP1 joue un rôle sur la cinétique de libération (I_{max}), à savoir une accélération des flux de NO et de NO₂⁻, par un facteur de 1,3 et 1,5 respectivement.

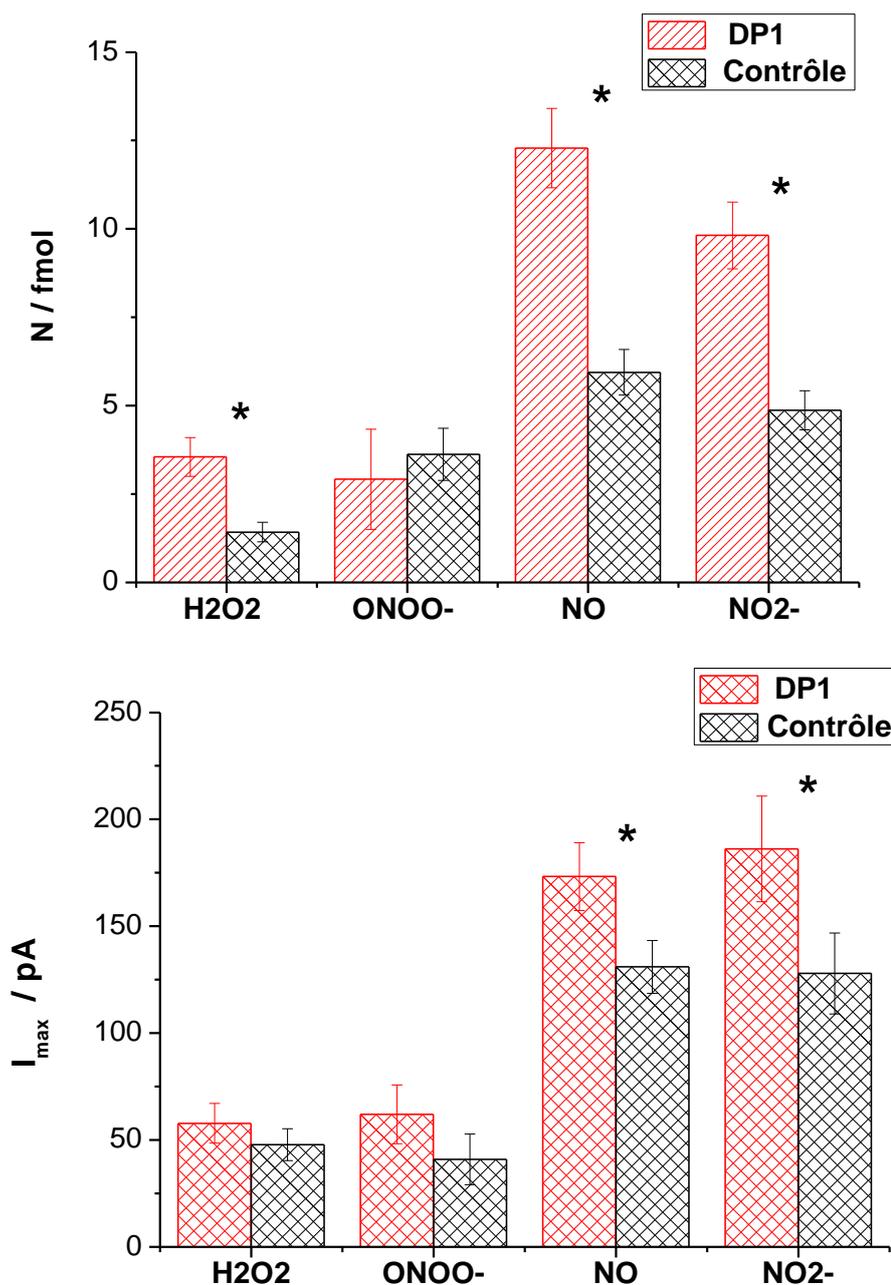


Figure IV-20. Effet de DP1 (concentration: 25 μ M, temps d'incubation : 24h) sur le processus oxydant des cellules MDA-MB-231 et les espèces électroactives libérées aux 4 potentiels. Haut : quantités de matière. Bas : maximums de courant.

Cas de Fc-OH-TAM

L'analyse des courants maximum laisse à penser que la production de ROS/RNS peut être affectée par Fc-OH-TAM dans la gamme de temps étudiée, à savoir 30 minutes (**Figure IV-21**). Pour ce qui est des charges, un effet est observé, à la limite de la significativité.

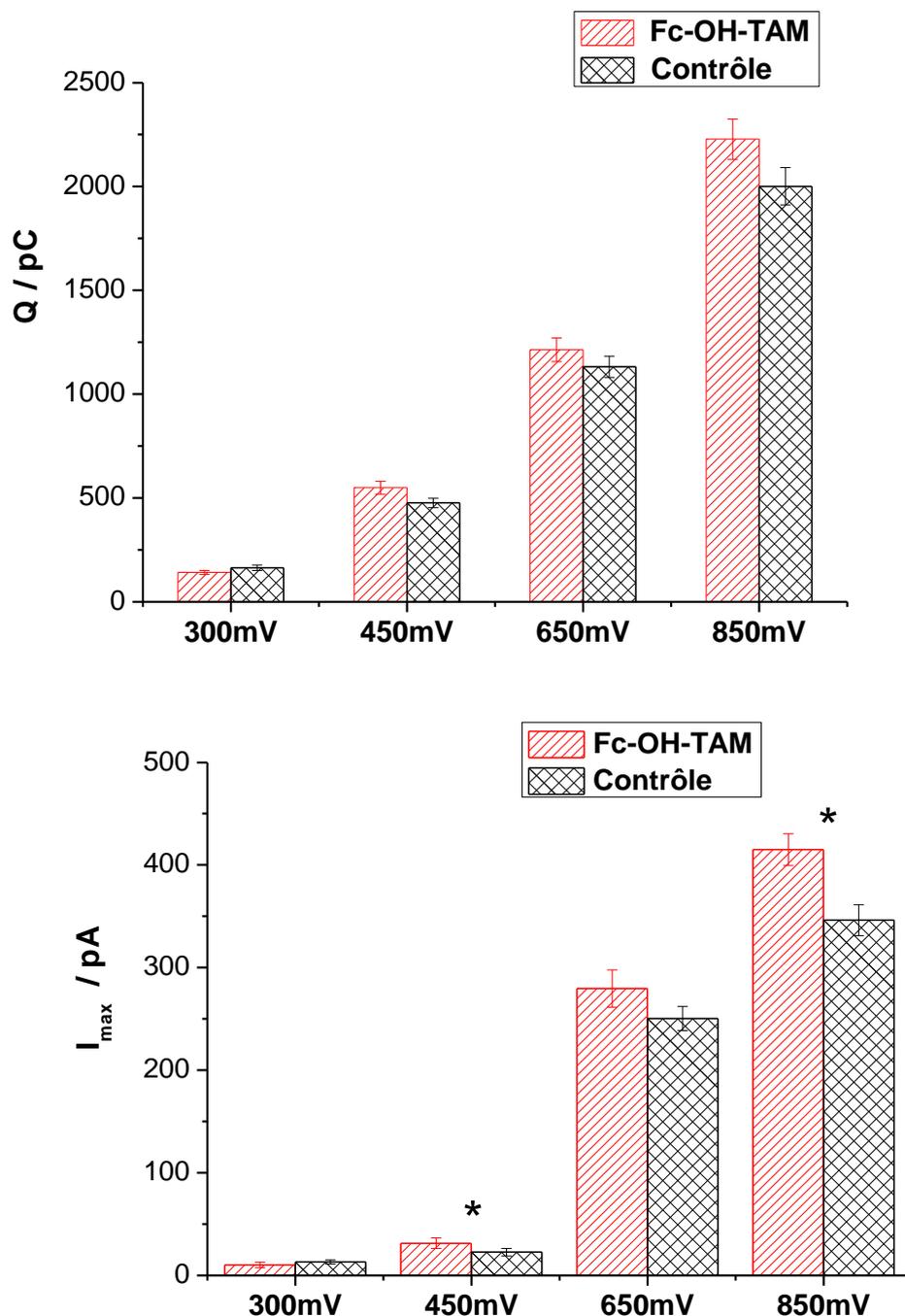


Figure IV-21. Etude de l'effet de Fc-OH-TAM (concentration: 25 μ M, temps d'incubation : 0,5 h) sur le processus oxydant des cellules MDA-MB-231 et les caractéristiques des pics aux 4 potentiels. Haut : charges. Bas : maximums de courant. Données obtenues sur 50 cellules par potentiel.

L'extraction des quantités de matières/flux des quatre ROS/RNS conduit aux graphiques représentés sur la **figure IV-22** et montre Fc-OH-TAM fait disparaître la production d'eau oxygénée et augmente, à la limite de la significativité statistique la quantité de matière et la cinétique de libération pour ONOO⁻. Il est cependant notable que, comme pour les autres ferrocifènes et les contrôles, H₂O₂ apparaît comme la ROS/RNS produite aux plus faibles doses. Cela est une observation importante à prendre en compte lors de

l'interprétation des expériences de détection par fluorescence tout au moins si la méthode est bien spécifique à H_2O_2 comme décrit.

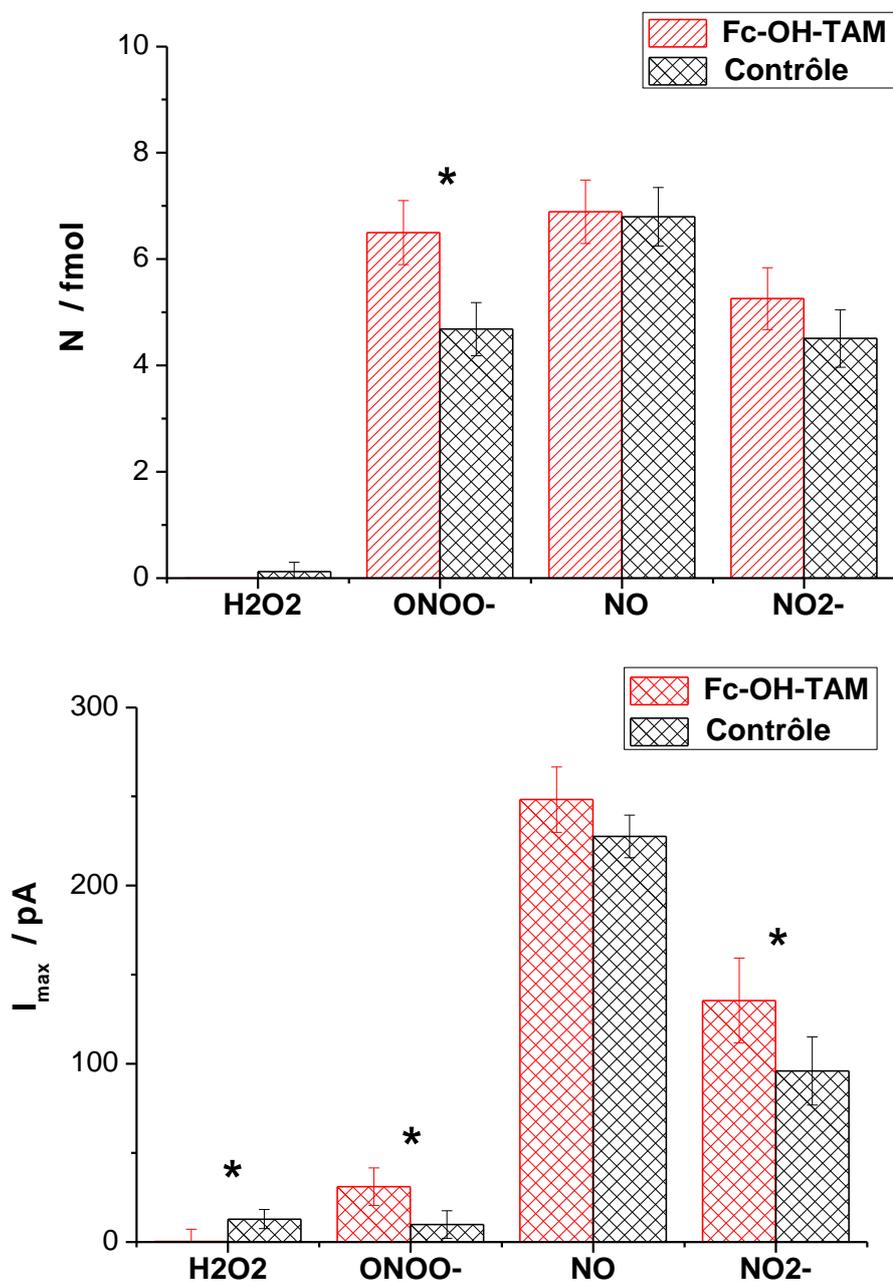


Figure IV-22. Effet de Fc-OH-TAM (concentration: $25\mu\text{M}$, temps d'incubation : 0,5 h) sur le processus oxydant des cellules MDA-MB231 et les espèces électroactives libérées aux 4 potentiels. Haut : quantités de matière. Bas : maximums de courant.

En particulier, les fortes productions relatives à H_2O_2 de ONOO^- , NO et NO_2^- démontrent tant la forte production de NO que celle de O_2^- mais aussi que l'essentiel de ce dernier est intercepté par couplage avec NO . En effet, H_2O_2 est avec NO_2^- le composé a priori le plus stable des quatre ROS/RNS détectés, donc sa faible quantité détectée (cellules contrôles ou incubées) constitue un argument qui milite plutôt pour une réactivité peu

marquée lors du transit diffusionnel sauf si ces types cellulaires ont une concentration intracellulaire en catalase très forte.

Bilan

Tous les résultats obtenus dans cette étude (sur l'antiprolifération des cellules cancéreuses MDA-MB 231 au moyen de suivis microscopiques et sa corrélation éventuelle avec une activité de stress oxydant mesurée par détection électrochimique) peuvent être résumés au sein du **tableau IV-5**.

	IC ₅₀ (μM) et/ou % antiprolifération à 1 μM/5 jours	Estimation viabilité cellulaire à 25 μM	Mesure H ₂ O ₂ en fluorescence par rapport au contrôle	Mesure quantité ROS par électrochimie	Mesure flux ROS par électrochimie
Fc-diOH	0.44 μM / 28 %	25 % à 24 h	X 2.1	Production de H ₂ O ₂ et NO	Pas d'effet
Fc-OH- TAM	0.5 μM / 23 %	25 % à 30 minutes ; 1 % à 24 h	X 4.5	Légère production de ONOO ⁻ , disparition de H ₂ O ₂	Léger effet sur ONOO ⁻
DP1	0.09 μM / 4.1%	25 % à 24 h	X 1.98	Production marquée de H ₂ O ₂ , NO et NO ₂ ⁻	Effets sur NO et NO ₂ ⁻

Tableau IV-5. Résumé des résultats pour les cellules MDA-MB-231. Le pourcentage donné est celui de cellules **restantes**. Il faut cependant remarquer que dans les trois cas et pour les contrôles les quantités de RNS excèdent largement celle de H₂O₂.

On remarque que les activités antiprolifératives mesurées pour des concentrations assez faibles (de l'ordre du μM) ne sont pas toutes comparables avec celles que nous avons obtenues dans des gammes de concentrations plus élevées (25 μM). Ainsi, Fc-OH-TAM se différencie très nettement de Fc-diOH et DP1. On remarquera que ce comportement particulier est également présent pour ce qui est de la production de ROS/RNS détectée par électrochimie. Ainsi, Fc-diOH et DP1 présentent un effet marqué et une surproduction de peroxyde d'hydrogène, de monoxyde d'azote et éventuellement d'anions nitrite par rapport

aux contrôles, tout en gardant présent à l'esprit que H₂O₂ représente une composante mineure des flux de ROS/RNS détectées.

4. Etude électrochimique de l'effet de ferrocifènes sur les cellules MCF-7

Nous avons également étudié les cellules MCF-7 qui, à la différence de la lignée MDA-MB-231, est hormono-dépendante. Ceci complexifie d'autant l'étude puisque dans le cas de ce modèle, les ferrocifènes ont un comportement double. Ils peuvent être en effet agonistes/antagonistes à faible concentration et cytotoxiques à concentration plus élevée. Ce double effet peut donc potentiellement se manifester avec ce modèle cellulaire. Nous avons appliqué exactement le même protocole expérimental que celui décrit précédemment dans le cas des cellules MDA-MB-231. De ce fait, la présentation des résultats se fera de manière plus concise.

4.1. Antiprolifération : résultats pour C = 25 µM et t = 24 h pour les cellules MCF-7

Les **figures IV-23, 24 et 25** montrent l'évolution de la culture cellulaire en présence et en absence de ferrocifène au bout de 24h. Ainsi, pour ce qui est de Fc-diOH (56 % de cellules restantes) et DP1 (80 % de cellules restantes), on observe une activité antiproliférative qui semble moindre que celle observée sur la lignée MDA-MB-231. Fc-OH-TAM, quant à lui, présente à nouveau une singularité puisque des performances similaires à celles de DP1 et Fc-diOH sont atteintes en moins de 3 h.

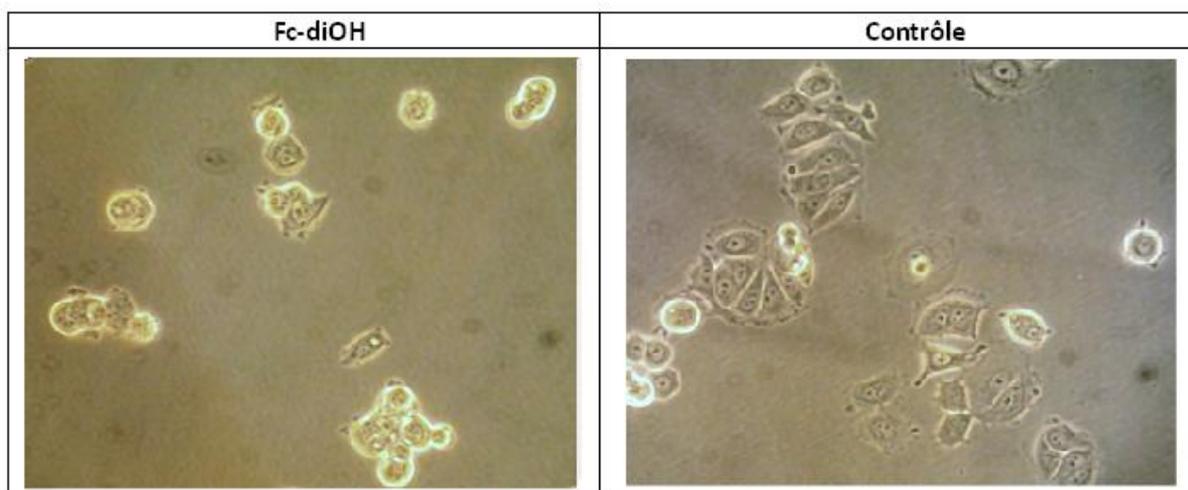


Figure IV-23. Etude par microscopie optique de l'effet antiprolifératif de Fc-di-OH (25 µM) sur des cellules MCF-7 pendant 24 h.

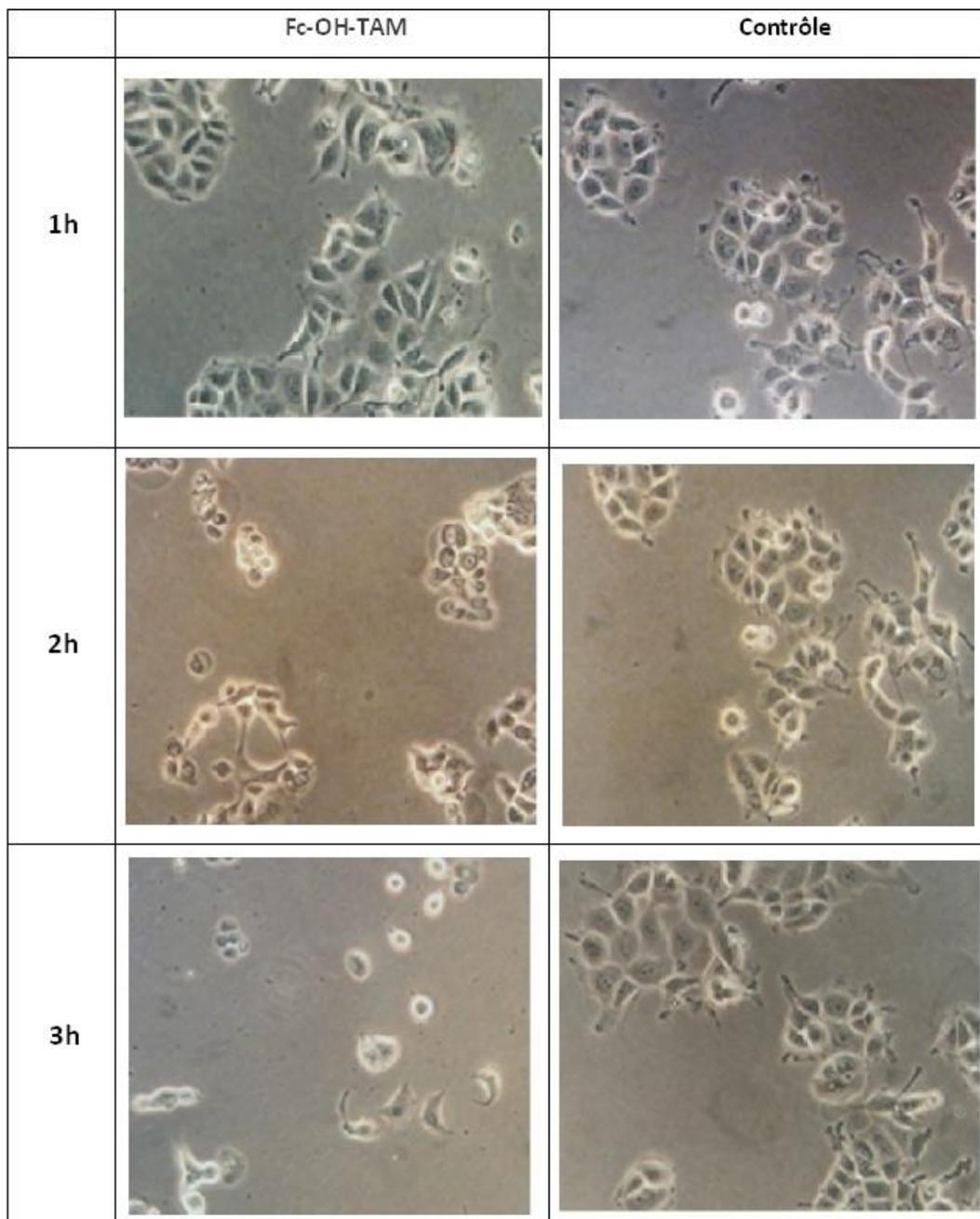


Figure IV-24. Etude par microscopie optique de l'effet antiprolifératif de Fc-OH-TAM (25 μ M) sur des cellules MCF-7 pendant 1 ; 2 et 3 h.

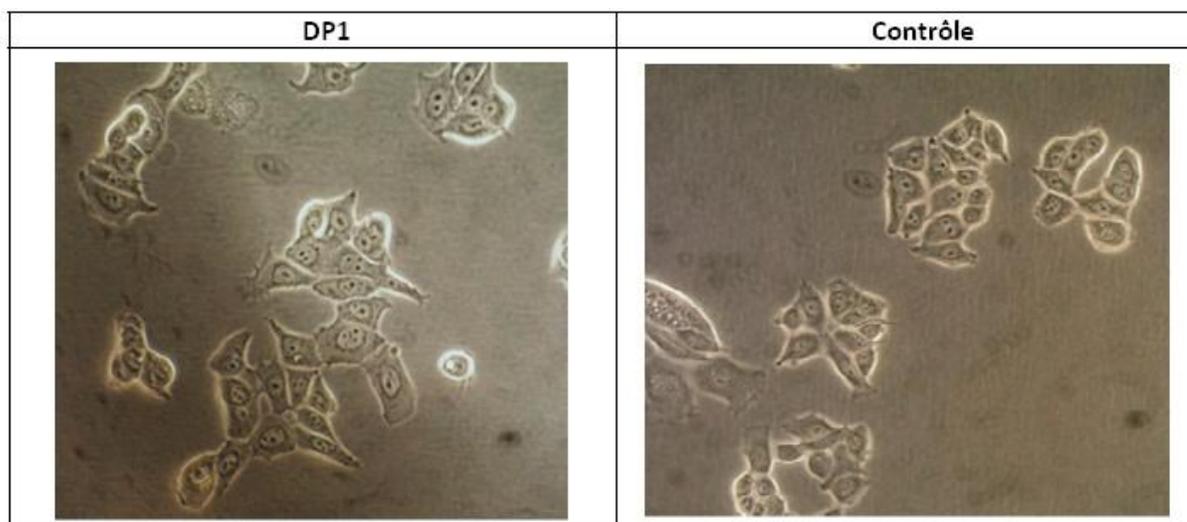


Figure IV-25. Etude par microscopie optique de l'effet antiprolifératif de DP1 (25 μ M) sur des cellules MCF-7 pendant 24 h.

4.2. Suivi électrochimique : résultats pour C = 25 μ M et t = 24 h pour les cellules MCF-7

Les mêmes suivis par électrochimie que ceux présentés pour les cellules MDA-MB-231 ont été effectués pour la lignée cellulaire MCF-7. Afin de ne pas surcharger le manuscrit en histogrammes, ces résultats seront présentés sous forme de tableaux. Ainsi, les **tableaux IV-6 et IV-7** recensent les résultats pour les charges et courants aux quatre potentiels. Si une différence statistique est observée, les **tableaux IV-8 et IV-9** en font état pour chacune des quatre espèces du stress oxydant détectées par notre méthode électrochimique.

	Charge à 300 mV (pC)	Charge à 450 mV (pC)	Charge à 650 mV (pC)	Charge à 850 mV (pC)	Effet du ferrocifène
Fc-diOH	374 \pm 36	1602 \pm 65	2497 \pm 170	4957 \pm 255	Oui
Contrôle	274 \pm 24	1350 \pm 80	2476 \pm 171	4050 \pm 278	
DP1	495 \pm 36	1095 \pm 77	2364 \pm 119	4989 \pm 284	Oui
Contrôle	476 \pm 51	921 \pm 72	2160 \pm 92	3932 \pm 277	
Fc-OH-TAM	112 \pm 15	577 \pm 45	1300 \pm 99	2460 \pm 185	Non
Contrôle	90 \pm 6	885 \pm 200	1225 \pm 70	2343 \pm 112	

Tableau IV-6. Charges aux quatre potentiels pour chaque ferrocifène et son contrôle. La concentration du ferrocifène est de 25 μ M et le temps d'incubation est de 24h (sauf pour Fc-OH-TAM qui est de 2 h).

	Courant à 300 mV (pA)	Courant à 450 mV (pA)	Courant à 650 mV (pC)	Courant à 850 mV (pC)	Effet du ferrocifène
Fc-diOH	36 ± 2	115 ± 5	177 ± 12	265 ± 15	Oui
Contrôle	24 ± 1	98 ± 6	168 ± 12	270 ± 17	
DP1	36 ± 2	59 ± 4	163 ± 13	318 ± 21	Oui
Contrôle	24 ± 2	98 ± 7	169 ± 12	270 ± 18	
Fc-OH-TAM	16 ± 2	65 ± 6	130 ± 11	201 ± 12	Non
Contrôle	11 ± 3	62 ± 4	130 ± 7	270 ± 62	

Tableau IV-7. Courants aux quatre potentiels pour chaque ferrocifène et son contrôle. La concentration du ferrocifène est de 25 µM et le temps d'incubation est de 24h (sauf pour Fc-OH-TAM qui est de 2 h).

	H ₂ O ₂ (fmol)	ONOO ⁻ (fmol)	NO (fmol)	NO ₂ ⁻ (fmol)	Effet du ferrocifène
Fc-diOH	0	19,8 ± 1,4	9,3 ± 1,8	12,8 ± 1,6	NO₂⁻ multiplié par 1,6
Contrôle	0	17,6 ± 1,5	11,7 ± 1,8	8,2 ± 1,7	
DP1	1,7 ± 0,5	18,0 ± 1,6	13,1 ± 1,3	13,6 ± 1,6	NO₂⁻ multiplié par 1,5 / Apparition de H₂O₂
Contrôle	0	15,4 ± 1,8	12,8 ± 1,1	9,2 ± 1,2	

Tableau IV-8. Quantités de matière de chaque espèce pour chaque ferrocifène et son contrôle. La concentration du ferrocifène est de 25 µM et le temps d'incubation est de 24h (sauf pour Fc-OH-TAM qui est de 2 h).

	H ₂ O ₂ (pA)	ONOO ⁻ (pA)	NO (pA)	NO ₂ ⁻ (pA)	Effet du ferrocifène
Fc-diOH	0	115 ± 10	61 ± 12	88 ± 19	Non
Contrôle	0	113 ± 11	71 ± 12	101 ± 20	
DP1	38 ± 4	21 ± 8	104 ± 13	156 ± 25	NO et NO₂⁻ multipliés par 1,5 et 1,6 / ONOO⁻ divisé par 5,4
Contrôle	0	114 ± 11	71 ± 12	101 ± 21	

Tableau IV-9. Courants provenant des quatre espèces pour chaque ferrocifène et son contrôle. La concentration du ferrocifène est de 25 µM et le temps d'incubation est de 24h (sauf pour Fc-OH-TAM qui est de 2 h).

A nouveau, on constate une différence majeure de comportement entre Fc-OH-TAM et les deux autres ferrocifènes, Fc-OH-TAM et DP1. L'ensemble des résultats est consigné au sein du **tableau IV-10**. On remarque que contrairement aux cellules MDA-MB-231, les activités antiprolifératives observées à 25 µM pour la lignée MCF-7 peuvent être corrélées à celles mesurées classiquement par détection intracellulaire de la fluorescence de la sonde DFCH-DA pour 1 µM et sur 5 jours.[151] Par ailleurs, il est notable que, contrairement aux cellules MDA-MB-231, les cellules MCF-7 ne produisent pas, dans nos conditions et en absence de pré-incubation avec un ferrocifène, de peroxyde d'hydrogène quand elles sont en situation de stress oxydant. De nouveau, cela suggère que l'essentiel de l'anion superoxyde produit (nécessaire pour justifier une production de peroxyde de nitrite et de nitrite) est quasiment éliminé par sa réaction avec NO et qu'une fraction négligeable peut se dismuter en H₂O₂.

	% antiprolifération 1 µM/5 jours	Estimation viabilité cellulaire à 25 µM	Mesure quantité ROS par électrochimie	Mesure flux ROS par électrochimie
Fc-diOH	34 %	56 % sur 24 h	Production de NO ₂ ⁻	Pas d'effet
Fc-OH-TAM	14 %	40 % sur 3 h	Pas d'effet	Pas d'effet
DP1	88%	80 % sur 24 h	Production de NO ₂ ⁻ / Apparition de H ₂ O ₂	Cinétique accélérée pour NO et NO ₂ ⁻ , ralentie pour ONOO-

Tableau IV-10. Résumé des résultats pour les cellules MCF-7. Le pourcentage donné est celui de cellules restantes. Nota Bene : une production de nitrite suggère une production initiale équivalente de peroxyde de nitrite et a fortiori de NO mais que ces derniers sont rapidement dégradés pendant leur transit diffusionnel.

5. Bilan des résultats et discussion

Au cours de ce travail, nous avons étudié par voie électrochimique la production de ROS/RNS par l'intermédiaire de cellules cancéreuses du sein en présence et en absence de trois ferrocifènes, molécules cytotoxiques conduisant à un effet antiprolifératif marqué des cellules cibles (lignées cellulaires MDA-MB-231 et MCF-7). L'ensemble des résultats est résumé au sein du **tableau IV-11**.

Modèle cellulaire		Fc-diOH	Fc-OH-TAM	DP1
MDA-MB-231	Effet antiprolifératif	++	+++++	++
	Effet sur ROS/RNS	NO ↑ H ₂ O ₂ ↑	ONOO ⁻ ↑ H ₂ O ₂ ↓	NO ↑ H ₂ O ₂ ↑ NO ₂ ⁻ ↑
MCF-7	Effet antiprolifératif	++	++++	+
	Effet sur ROS/RNS	NO ₂ ⁻ ↑	Pas d'effet	NO ₂ ⁻ ↑ H ₂ O ₂ ↑

Tableau IV-11. Récapitulatif de ce travail de thèse, effet antiprolifératif mesuré par suivi vidéomicroscopique à 24h (sauf Fc-OH-TAM : 0,5 h pour MDA-MB-231 et 2 h pour MCF-7) ; effet sur les flux de ROS/RNS détectés par ultramicroélectrode.

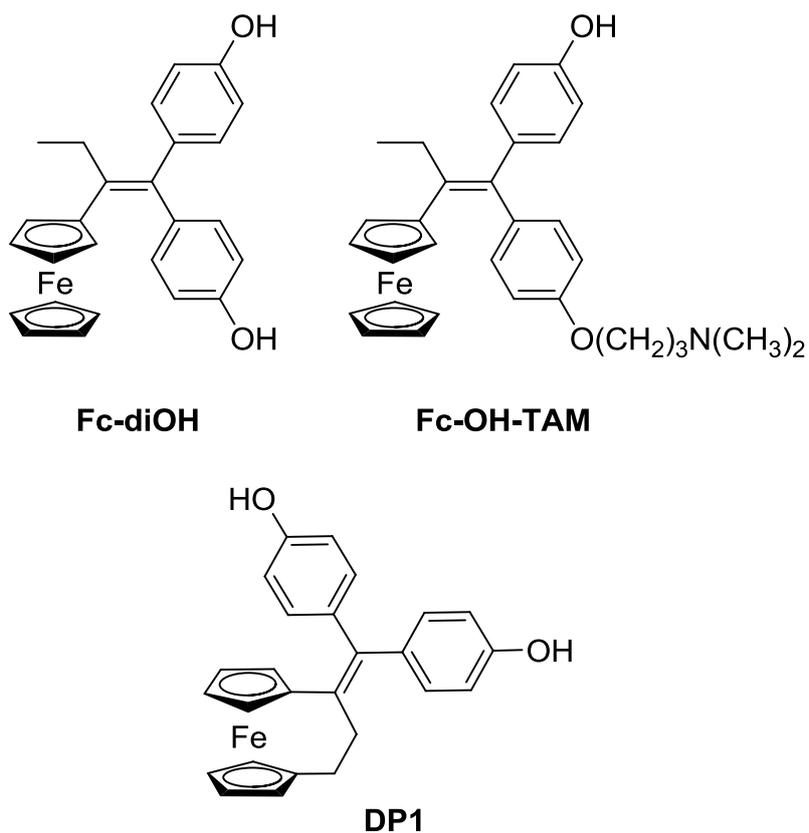


Figure IV-26. Rappel des structures et nom des trois ferrocènes considérés dans l'étude électrochimique.

Quel que soit le modèle cellulaire, Fc-OH-TAM semble avoir un mécanisme d'action différent de celui impliqué pour Fc-diOH ou DP1. Si l'on s'en tient à une logique uniquement

structurale, seule la chaîne aminoalkyle distingue Fc-OH-TAM des deux autres ferrocifènes mis en jeu.

Ce comportement « marginal » de Fc-OH-TAM n'est cependant pas sans précédent. Par exemple, comme cela avait été discuté plus haut, vis-à-vis de la lignée cellulaire MCF-7, Fc-OH-TAM ne voit pas son comportement double prolifératif/antiprolifératif inversé en présence ou en absence d'antioxydant comme la N-acétyl cystéine. Dans un autre contexte, et dans des conditions d'incubation qui se rapprochent des nôtres, Fc-OH-TAM présente à nouveau une activité antiproliférative non comparable avec Fc-diOH vis-à-vis de cellules de mélanomes. En particulier, l'activité de Fc-OH-TAM se manifeste à des seuils de concentration bien plus faibles que pour Fc-diOH. Comme cela a été mentionné plus haut, cette activité particulière de Fc-OH-TAM semble ne tenir, structurellement parlant, qu'à la présence de sa chaîne aminoalkyle. On notera par ailleurs, et cela a été décrit dans le chapitre précédent, que « l'ajout » de cette chaîne aminoalkyle sur le ferrocénophane DP1 provoque une diminution de l'IC₅₀ de 0,09 µM à 150 nM. Dans ce cas, une structure rigide et la présence de cette chaîne aminoalkoxy milite en faveur d'une interaction avec un récepteur, et cela même pour une lignée dite hormono-indépendante. On pourrait ainsi envisager, mais cela n'est qu'une hypothèse à confirmer par des travaux ultérieurs, que l'activité de Fc-OH-TAM n'implique donc pas uniquement le chemin quinone méthide / ROS mais suggère que ce tamoxifène puisse interagir avec les récepteurs REβ, qui sont présents, bien qu'à faible niveau, dans les cellules hormono-indépendantes MDA-MB-231.[156]

Une autre hypothèse afin de mieux cerner le comportement de Fc-OH-TAM consiste à évoquer une interaction limitée pour Fc-OH-TAM vis-à-vis des sites réactionnels de la NADPH Oxydase et/ou des NOSynthases. Une manière de confirmer ou infirmer cette hypothèse consiste à reconstruire à partir des données expérimentales les flux ou quantités de matière initiaux en anion superoxyde et monoxyde d'azote. Le mécanisme réactionnel classiquement utilisé au laboratoire est le suivant (**Schéma 1**):

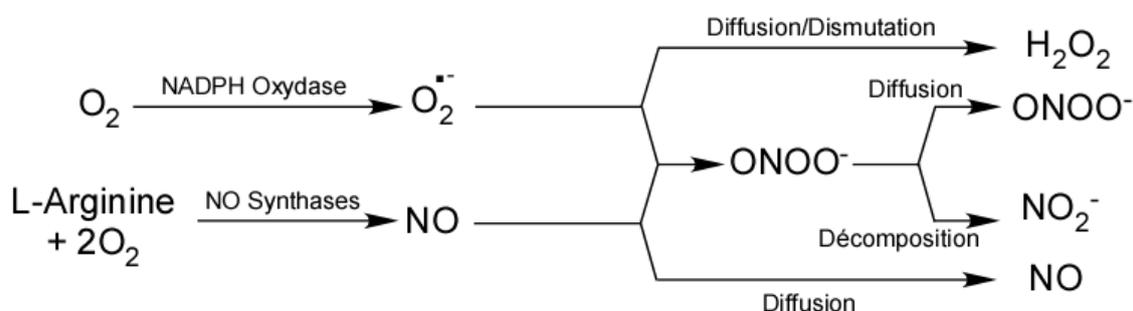


Schéma 1

Sur la base de ce schéma, et en admettant une perte négligeable des quatre espèces lors de leur transit diffusionnel, il est donc possible de reconstituer les flux ou quantités de matière initiaux en anion superoxyde et monoxyde d'azote. En effet, ceux-ci obéissent aux équations suivantes :

$$N_{O_2^-} = 2N_{H_2O_2} + N_{ONOO^-} + N_{NO_2^-}$$

$$N_{NO} = N_{ONOO^-} + N_{NO} + N_{NO_2^-}$$

$$I_{O_2^-} = I_{H_2O_2} + I_{ONOO^-} + I_{NO_2^-}$$

$$I_{NO} = I_{ONOO^-} + I_{NO} + I_{NO_2^-}$$

Les résultats (effet ou non sur les quantités et flux d'anion superoxyde et de monoxyde d'azote conduisant aux ROS et RNS détectés) sont résumés dans le **tableau IV-12**.

Modèle cellulaire	Ferrocifène	Effet sur la production d'anion superoxyde	Effet sur la production de monoxyde d'azote
MDA-MB-231	Fc-diOH	Quantité : Non Flux : Non	Quantité : Non Flux : Non
	Fc-OH-TAM	Quantité : Non Flux : Non	Quantité : Non Flux : Oui ↑
	DP1	Quantité : Oui ↑ Flux : Oui ↑	Quantité : Oui ↑ Flux : Oui ↑
MCF-7	Fc-diOH	Quantité : Oui ↑ Flux : Non	Quantité : Non Flux : Non
	Fc-OH-TAM	Quantité : Non Flux : Oui ↓	Quantité : Non Flux : Non
	DP1	Quantité : Oui ↑ Flux : Oui ↑	Quantité : Oui ↑ Flux : Non

Tableau IV-12. Comparaison des flux/quantités de matière de l'anion superoxyde et du monoxyde d'azote par reconstitution d'après le schéma 1.

A nouveau, il est délicat d'en extraire une tendance, même si DP1 semble activer préférentiellement les deux systèmes enzymatiques mentionnés plus haut. En réalité, le mécanisme de reconstitution décrit ici a été élaboré pour le modèle des cellules macrophages, lignée RAW 264.7, dont le stress oxydant est pour l'essentiel localisé dans leur phagolysosomes où, en absence de corps étranger à digérer comme c'est le cas dans les expériences en question, les quatre ROS/RNS détectées sont stables ou conduisent à une simple interconversion ne changeant pas le système d'équations ci-dessus. Néanmoins,

il n'est pas exclu que le mécanisme de reconstitution soit sans doute plus complexe pour un stress oxydant mitochondrial ainsi localisé dans le cytoplasme, [155] car des voies d'évolution différentes peuvent se produire, ne respectant pas le système d'équations précédents (par exemple dismutation de H_2O_2 en O_2 et H_2O par les catalases et peroxydases).

6. Perspectives

Les résultats obtenus dans cette thèse sont très intéressants puisqu'ils ouvrent un domaine d'étude du stress oxydant mitochondrial et non plus issu d'enzymes NO synthases et/ou NADPH oxydases membranaires. Cependant, afin de valider cette hypothèse, différentes expériences sont à envisager. La première consisterait en l'ajout d'inhibiteurs des systèmes enzymatiques : i) des NO synthases par le L-NAME, ou Nitro-L-arginine Méthyl Ester, analogue non réactif de l'arginine -substrat des NO synthases- ; ii) et/ou des NADPH oxydases par l'apocynine (qui empêche l'assemblage des sous-unités de l'enzyme) ou le DPI (diphénylène iodonium) bien que ce dernier ne soit sans doute pas spécifique. De telles séries d'expériences ont été en partie menées par le passé au laboratoire sur d'autres types cellulaires et ont permis de confirmer ou non l'implication des enzymes sus-citées, et ce, en particulier pour la NO synthase sur le stress oxydant cellulaire de neurones du cervelet[157] ou de macrophages murins de la lignée RAW 264.7.[87] La deuxième voie possible serait la modification génétique de cellules MCF-7 et MDA-MB-231 pour obtenir des cellules knock-out^k pour les enzymes considérées et permettrait de quantifier l'implication de ces enzymes dans les mesures du stress oxydant sur microélectrodes effectuées lors de cette thèse. Enfin, afin de détecter au plus près la détection d'espèces du stress oxydant et en quantifier précisément leur origine spatiale (sub-membranaire ou cytosolique), l'utilisation de nanoélectrodes pourrait permettre d'apporter de précieux éléments sur l'origine du flux détecté. L'insertion d'une nanoélectrode dans une membrane cellulaire est envisageable si le corps de l'électrode reste nanométrique (nanoélectrodes cylindriques). Dans ce cas, il a été montré par le groupe de M. Mirkin que ce type d'électrodes pouvait traverser la membrane cellulaire de cellules MCF-10A, cellules épithéliales du sein, sans affecter l'activité de la cellule en question, la membrane se re-scillant autour du fût de l'électrode.[158] Plus récemment, en collaboration avec notre équipe, il a pu être mis en évidence la possibilité d'insérer ces nanoélectrodes dans des macrophages isolés, ces dernières étant suffisamment sensibles pour détecter les fuites extrêmement minimales (en valeur relative) de ROS/RNS au dehors de leurs phagolysosomes lors de la stimulation d'un stress oxydant consécutif à cette insertion.[159]

^k Terme utilisé en biologie moléculaire que l'on peut traduire par « invalidation génétique » et qui désigne l'inactivation d'un ou plusieurs gènes dans une lignée cellulaire.

Conclusion et Perspectives

Pour le traitement du cancer du sein, l'utilisation de la famille des ferrocifènes, dérivés de l'association entre une molécule dérivée du tamoxifène et une molécule de ferrocène, constitue un traitement prometteur et d'avenir. Ces molécules permettent en effet de traiter les lignées cancéreuses hormono-dépendantes via une interaction préférentielle entre le ferrocifène et les récepteurs à œstrogènes mais montrent également, contrairement au tamoxifène seul, un effet cytotoxique sur les lignées hormono-indépendantes.

Au-delà de l'évaluation de l'effet antiprolifératif des ferrocifènes sur une lignée cellulaire cancéreuse donnée, ce travail apporte un nouvel éclairage sur le mécanisme d'action de ces derniers. Ce mécanisme d'action semble d'autant plus complexe et subtil qu'une simple fonctionnalisation/modification de la structure de base d'un ferrocifène peut altérer son activité de manière significative (par exemple d'un facteur 10 à la hausse ou à la baisse si on ajoute/enlève la chaîne aminoalkyle). Récemment, un mécanisme a été proposé mettant en jeu la production intracellulaire, par oxydation biélectronique du ferrocifène moléculaire, d'une espèce de type quinone méthide, entité à même de provoquer la mort cellulaire à travers des interactions avec la GSH (glutathion réduit) ou l'ADN. Ce mode d'action ne doit pas être nécessairement découplé d'une situation de stress oxydant, c'est-à-dire de production d'espèces réactives de l'oxygène et/ou de l'azote (dites ROS et RNS pour Reactive Oxygen Species et Reactive Nitrogen Species), espèces suffisamment instables pour détruire les membranes cellulaires ou dégrader l'ADN.

C'est dans le contexte de ce mécanisme d'action des ferrocifènes, qui reste à préciser et à comprendre, que s'insèrent les travaux présentés dans ce manuscrit, et plus particulièrement la mise en évidence de la production de ROS/RNS par les cellules cancéreuses mises en présence d'un ferrocifène donné. Nous avons donc choisi de mettre à profit les techniques électrochimiques mises au point au laboratoire, et fondées sur l'utilisation d'ultramicroélectrodes, afin de détecter l'éventuel effet des ferrocifènes sur le stress oxydant de deux lignées cancéreuses du sein, hormono-dépendantes (MCF-7) et hormono-indépendantes (MDA-MB-231).

Dans le premier chapitre de ce manuscrit, nous avons présenté les propriétés physicochimiques des ultramicroélectrodes et les avantages qu'elles présentent pour la détection de flux cellulaires infinitésimaux à l'échelle de la cellule unique isolée. Au sein du second chapitre, nous avons décrit de manière générale les mécanismes du stress oxydant mais plus encore les techniques analytiques actuellement mises en jeu pour détecter qualitativement et quantitativement la production de ROS/RNS, de l'échelle de la population

cellulaire à la cellule unique. A cet égard, les techniques électrochimiques sur ultramicroélectrodes fournissent des entrées nouvelles. Le troisième chapitre fait quant à lui état des propriétés/structures des ferrocifènes et de l'intérêt de leur utilisation pour le traitement du cancer du sein. Les problématiques mécanistiques et l'incertitude/difficulté à rationaliser les effets des ferrocifènes sur la base des méthodes classiques sont mentionnés. Le quatrième chapitre concerne les études proprement dites. La mise au point d'un protocole expérimental adapté (choix des ferrocifènes témoins, temps et concentration d'incubation, type de stimulation) précède les résultats des études, lesquels sont ensuite analysés et discutés (comparaison entre étude morphologique de l'antiprolifération cellulaire et étude électrochimique).

Les investigations réalisées dans le cadre de ce travail mettent en évidence que parmi les trois ferrocifènes testés (Fc-diOH, Fc-OH-TAM, DP1), activités antiprolifératives et productions de ROS/RNS mesurées par électrochimie, peuvent difficilement être mises en regard. En particulier, l'un des ferrocifènes, le Fc-OH-TAM, présente un comportement singulier, à savoir une forte activité antiproliférative mais ne provoque pas une production accrue de ROS/RNS, quand les deux autres (Fc-diOH et DP1) dénotent une activité antiproliférative réelle mais moins forte, laquelle peut être associée avec une production de ROS/RNS. La rationalisation de ces résultats semble d'autant plus délicate que les ferrocifènes impliqués dans notre étude ont tous trois une structure globalement comparable et surtout compatible avec la formation d'une quinone méthide. Il ressort néanmoins que le Fc-OH-TAM, et cela a déjà été observé dans la littérature et au sein du laboratoire d'Anne Vessières-Jaouen, présente un comportement et un mécanisme d'action marginal par rapport aux autres ferrocifènes. On notera également que les résultats obtenus par analyse électrochimique diffèrent de ceux mis en évidence par fluorescence, particulièrement pour ce qui concerne H_2O_2 , dont la présence est révélée par la méthode de la DFCH-DA mais manifestement absent si l'on se fie à la détection ampérométrique. Ceci n'est en aucun cas contradictoire puisque les deux méthodes de détection diffèrent, que ce soient en termes de temps d'incubation et/ou de la zone d'analyse et/ou de stimulation. En l'occurrence, l'analyse par fluorescence, intracellulaire recense la production d'eau oxygénée au voisinage de son site d'émission, la mitochondrie. L'électrochimie, détection extracellulaire, sonde le voisinage extérieur de la membrane cellulaire et il est donc envisageable, par exemple, qu'entre la mitochondrie et l'électrode, des systèmes enzymatiques comme la catalase, aient pu décomposer l'eau oxygénée. Ce n'est cependant pas la seule explication et la divergence de résultats entre électrochimie et fluorescence est probablement liée au fait que l'on compare deux protocoles radicalement différents : détection directe par fluorescence de la production de ROS induite par un ferrocifène sur une cellule vs détection électrochimique de l'effet de la préactivation par un ferrocifène sur la réponse oxidative d'une cellule déclenchée

mécaniquement. Dans ce cas, ce n'est pas l'électrochimie elle-même qui est en cause mais les protocoles expérimentaux très différents (*vide infra*).

Sur la base de nos résultats actuels, il n'est pas aisé d'expliquer cette action singulière sans tomber dans l'écueil de propos purement spéculatifs. Par contre, on peut chercher, et cela représente la suite à venir de ces études, compléter nos résultats par plusieurs autres investigations. Ainsi, il apparaît dans la littérature que le stress oxydant qui a lieu au sein des lignées MDA-MB-231 et MCF-7 serait mitochondrial, il sera donc nécessaire d'évaluer l'effet des ferrocifènes sur la production de ROS/RNS en présence et en absence de l'un des deux systèmes enzymatiques (NADPH Oxydase et NO Synthases), soit par l'utilisation d'inhibiteurs de ces enzymes connus (L-NAME...) soit à travers l'utilisation de lignées cellulaires (Knocked-Out) au sein desquelles le système concerné sera inhibé. Cette première perspective sera alors à même de mettre en évidence le site d'action des ferrocifènes. Une deuxième perspective de recherche concerne la méthodologie expérimentale, et ce, sous plusieurs axes. En effet, le protocole utilisé ici repose sur une incubation des cellules en présence du ferrocifène étudié et un déclenchement d'une situation de stress oxydant. On pourrait envisager une détection de la production de ROS/RNS, sans déclenchement, ce qui permettrait de suivre non pas l'effet d'une préactivation par le ferrocène mais l'émission de ROS/RNS suite à l'incubation. Cependant, cette configuration correspondra à des flux moins intenses, sur une période de temps plus élevée, et donc une détection difficile. Cette configuration imposera l'utilisation de dispositifs microfluidiques adaptés qui offriront la possibilité de réduire significativement les temps d'expérience et de traiter simultanément des populations de quelques dizaines de cellules, et donc d'observer directement des résultats statistiquement significatifs. Dans un autre cadre, on notera que la configuration expérimentale actuelle permet la détection de flux de ROS/RNS extracellulaires alors que le mécanisme d'action des ferrocifènes est intracellulaire. Une évolution récente au laboratoire permet d'envisager l'utilisation, non plus d'une électrode micrométrique, mais d'une nanoélectrode qui peut être insérée dans une cellule unique et qui, tout en préservant son intégrité, est à même de détecter les ROS/RNS produites dans le cytoplasme.

Partie Expérimentale

1. Fabrication et préparation d'une ultramicroélectrode de carbone platiné.

1.1 Microélectrode avec une fibre de carbone.

Les ultramicroélectrodes que nous utilisons sont fabriquées à partir d'une fibre de carbone de 10 μ m (Cytac, Thorne[®], référence P-55S, Blacksburg, Etats-Unis). Elles sont intégralement fabriquées au laboratoire.

1.1.1 Isolation d'une fibre de carbone unique



Figure PE-1 : Bobine de fibres de carbone de diamètre 10 μ m.

Les fibres commerciales que nous utilisons (**Figure PE-1**), sont composées de 99 % de carbone et de 1% de résine époxy, et sont vendues sous forme de bobine dont le brin contient environ 10 000 fibres.

Afin de procéder à la sélection d'une fibre unique, un brin d'environ 15 cm est coupé de la bobine et est placé sur une feuille blanche qui permet de le distinguer plus facilement à l'œil nu. Etant donné qu'une fibre unique est très fine et fragile mécaniquement, il faut la séparer sur la feuille, dans le sens de la longueur, très doucement. Un éclairage fort est utilisé, et il est recommandé de porter un masque évitant de respirer les fibres.

1.1.2 Insertion de la fibre isolée dans un capillaire de verre

Le corps d'électrode est un capillaire creux en verre, de diamètre externe 1,2 mm et de diamètre interne 0,7 mm (Clark Electromedical Instruments, référence GC-120F-10, Pangbourne, Royaume Uni). Il possède un filament de verre interne, afin de favoriser l'écoulement de l'air à l'intérieur du capillaire même s'il est rempli avec du mercure (voir protocole ci-après). Ce filament de verre facilite l'injection et la vidange du mercure.

La fibre de carbone précédemment isolée est insérée dans un capillaire par aspiration. Pour ce faire, l'une des extrémités du capillaire est connectée à une trompe à eau qui y crée une dépression. L'autre extrémité est approchée au bout de la fibre de carbone qui est aspirée dans le capillaire. Pour éviter que la fibre soit complètement aspirée dans la trompe

à eau, il faut tenir son autre extrémité par le doigt, et déconnecter le capillaire de la trompe à eau avant de lâcher la fibre. Enfin, il faut couper les parties de la fibre de carbone dépassant du capillaire en les pressant sur les bords de capillaire avec le doigt.

1.1.3 Scellement de l'électrode.

Pour sceller la fibre de carbone au capillaire afin de former une électrode, le capillaire contenant la fibre est placé verticalement dans une microétireuse (**Figure PE-2**, Narishige, référence PB-7, New York, Etats Unis), et ses deux extrémités sont fixées sur celle-ci. La partie supérieure est immobilisée, tandis que la partie inférieure est fixée à un contrepois.

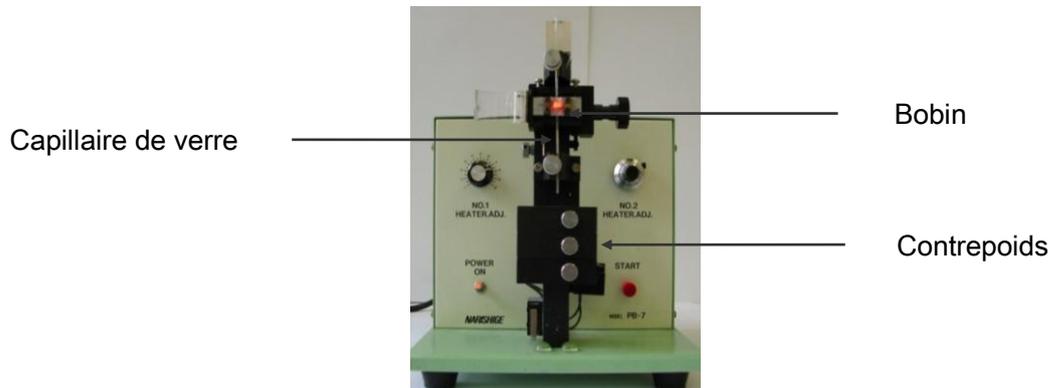


Figure PE-2 : Microétireuse en étirant d'un capillaire de verre.

De plus, la partie centrale du capillaire passe au milieu d'une spire métallique, dans laquelle circule un courant en vue de faire fondre le verre par effet joule. Dans le même temps, le contrepois tire alors l'extrémité inférieure vers le bas conduisant la rupture du verre au centre, de manière à ce que la fibre soit scellée au verre pour former deux électrodes. Il faut ensuite séparer les deux électrodes en coupant la fibre de carbone (qui est mise à nu en son centre) à l'aide d'un ciseau (**Figure PE-3**).

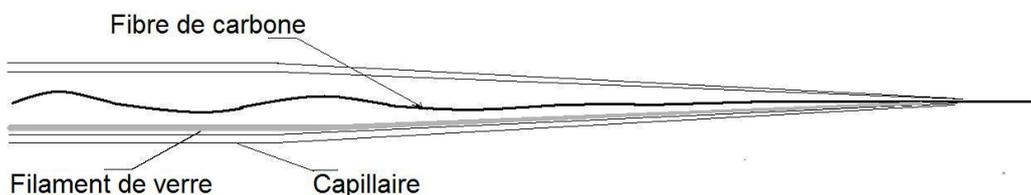


Figure PE-3 : Microélectrode avec une fibre de carbone.

1.2 Isolation électrique des fibres de carbone par électropolymérisation.

Vu que la surface active de l'électrode est pour l'instant la fibre de carbone dépassant du capillaire, soit la forme d'un cylindre, sa longueur est incertaine. Afin de préciser la surface, et de l'identifier chaque fois dans la manipulation, on limite la surface conductrice à la base cylindrique de l'électrode. Pour ce faire, un film de polyoxyphénylène est déposé électrochimiquement sur la fibre de carbone nue. Cette technique est décrite par Wightman[160] et coll. et consiste en l'oxydation de monomères (2-allylphénol, allylamine) à la surface de la fibre de carbone.

En pratique, initialement, un peu de mercure est injecté dans le corps d'électrode à l'aide d'une seringue, pour établir la connexion entre la fibre de carbone et le fil conducteur employé pour la polymérisation. Comme précisé précédemment, le filament de verre dans le corps d'électrode facilite ce remplissage en faisant circuler l'air à l'intérieur du capillaire, et dirige ainsi le mercure vers la pointe de l'électrode.

La solution d'électropolymérisation est préparée à partir de 3 réactifs: 2-allylphénol (0,23 mol.L⁻¹, monomère), allylamine (0,4 mol.L⁻¹, co-monomère), et 2-butoxyéthanol (0,23 mol.L⁻¹, agent de surface et solubilisant), dans une base eau/méthanol (1/1). (Sigma-Aldrich)

	Volumes (mL)
2-allylphénol	3
allylamine	3
2-butoxyéthanol	3

Tableau PE-1. Volumes des composants de la solution de polymérisation qui sont ajustés à un mélange eau/méthanol (1:1) de 100ml.

L'ordre de la préparation doit être strictement suivi : D'abord, environ 10 mL du mélange eau/méthanol sont déversés dans un bécher de 100 mL. Ensuite, le 2-allylphénol puis, l'allylamine (prélevée avec une pipette en verre), et enfin, le 2 butoxyéthanol. A la fin, le reste du mélange eau/méthanol est ajouté.

Cette électropolymérisation se développe à un potentiel de +4V, pendant 3 minutes. Ce potentiel capte les monomères et libère ses radicaux en déclenchant l'électropolymérisation. Le résultat est un fin film de polymère couvrant la surface de la fibre de carbone d'une épaisseur de l'ordre du micron. Un fil de platine est utilisé à la fois comme la contre électrode et comme l'électrode de référence pendant cette polymérisation.

Dans la pratique, un groupe de 5-7 électrodes sont fabriquées simultanément. Notons que les trois réactifs sont toxiques et se dégradent rapidement, il est donc nécessaire d'effectuer

cette polymérisation sous une hotte, et la solution de polymérisation n'est valable qu'une heure.

Ensuite, chaque électrode est rincée à l'eau distillée, et est vérifiée à la loupe binoculaire. S'il y a des bulles de polymères au long de la fibre, c'est le signe que cette étape s'est bien déroulée.

Pour s'assurer d'obtenir un film bien isolant électriquement, il faut réticuler suffisamment le polymère. Un traitement thermique est alors employé en plaçant les électrodes à l'étuve à 150°C pendant 3 heures, le solvant est évaporé, et la rigidité du polymère est ainsi améliorée. Il faut bien faire attention de vider le mercure avant cette étape de chauffage, et de les reempli après leur refroidissement.

1.3 Polissage de la fibre de carbone.

Il est nécessaire d'exposer une surface active (carbone nu) sur la fibre de carbone entièrement isolée par le polymère. Cette surface doit être identique entre toutes les électrodes et elle doit être plate. Par conséquent, un polissage à 45° par rapport à la direction de la fibre de carbone est effectué à l'aide d'une micro-polisseuse (*Narishige, référence EG-4, New York, Etats Unis*).

Il faut d'abord couper la fibre de carbone avec un scalpel sous une loupe binoculaire en contrôlant sa longueur (pour éviter d'avoir une fibre trop longue qui entraîne la vibration en mesure dans la solution de détection). Il faut également prendre garde de choisir la position de la coupe entre deux bulles de polymère. La vitesse de rotation est à 80 tours.min⁻¹, pendant 5 minutes.

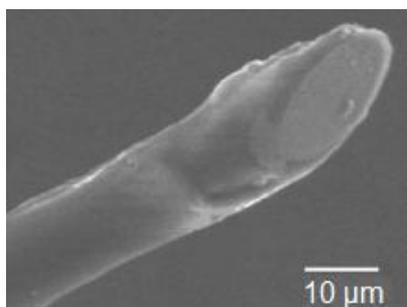


Figure PE-4. Photo d'une pointe biseautée de 45° d'une fibre de carbone de diamètre 10 µm d'une ultramicroélectrode (en microscopie électronique à balayage).

Une microélectrode de carbone (**Figure PE-4**) est faite en suivant les étapes précédentes. La surface active de l'électrode est repérée par un trait de marqueur sur la face du capillaire. Ensuite, celles-ci sont fixées et conservées dans une boîte.

1.4 Platination de la fibre de carbone.

Un dépôt de noir de platine est généré sur la surface de la fibre de carbone afin d'augmenter sa sensibilité au moment de la détection électrochimique des espèces réactives de l'oxygène (ROS) et de l'azote (RNS). La **Figure PE-5** montre ce dépôt de platine, il est dendritique, et de ce fait, augmente la surface active de l'électrode.

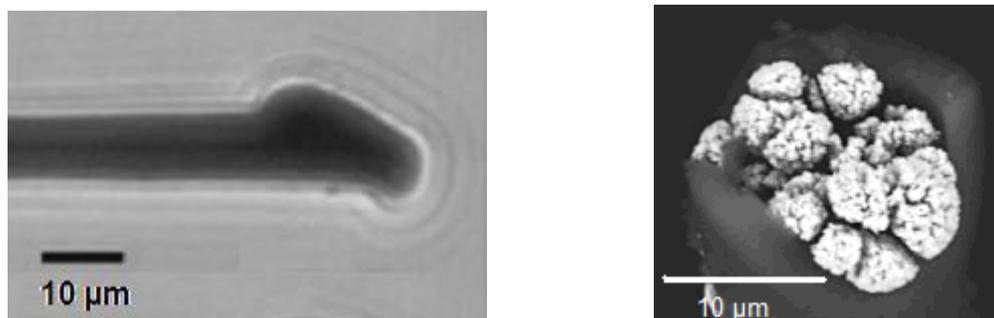


Figure PE-5. Photo d'une fibre de carbone platiné (ultramicroélectrode de diamètre 10 µm. Gauche: sous microscope. Droite: en microscopie électronique à balayage).

Le procédé de platination s'appuie sur les œuvres de Ikariyama et coll.[161] La solution d'électrodéposition contient 1mL d'acide hexachloroplatinique (H_2PtCl_6 , 8% en masse dans l'eau, Sigma), 1,6 mg d'acétate de plomb ($(CH_3CO_2)_2Pb \cdot 3H_2O$, 99,9%, Sigma) dissous dans 6,4mL de tampon phosphate PBS (Pastilles, Invitrogen). Une petite quantité de l'ion plomb dans la solution favorise la formation des germes de cristallisation.

L'acide hexachloroplatinique subit une réduction à quatre électrons :



Un potentiel constant de -60mV (vs. ECSS, une Electrode au Calomel Saturé en chlorure de Sodium) est imposé à l'électrode de travail (l'ultramicroélectrode) et la quantité d'électricité est strictement contrôlée à 30µC (Radiometer analytical, Tacussel PRG-DEL). Une fois l'électrode préparée, elle est conservée dans un réfrigérateur à 4°C.

2. Méthodes de mesure électrochimique.

2.1 Ampérométrie stationnaire

Dans le cadre de ce travail, l'ampérométrie stationnaire est employée en tant que méthode d'analyse principale pour la détection du stress oxydant sur cellule vivante. Elle consiste à imposer un potentiel constant à l'électrode de travail, c'est-à-dire la microélectrode. C'est une technique relativement simple mais qui possède une excellente sensibilité. Les

potentiels (par rapport à l'ECSS; voir §2.3) ont été choisis sur la base d'études voltamétriques *in vitro* réalisées précédemment au laboratoire avec des solutions indépendantes de H_2O_2 , ONOO^- , NO^\cdot et NO_2^- ($C = 1\mu\text{M}$, $v = 20\text{mV}\cdot\text{s}^{-1}$).

Une polarisation de la microélectrode pour un potentiel donné est nécessaire avant toute manipulation. En effet, contrairement aux ultramicroélectrodes de carbone habituelles ($d = 10\mu\text{m}$), les ultramicroélectrodes de carbone platiné possèdent une surface spécifique élevée. La constante de temps du processus de charge de la double couche électrochimique est donc plus élevée, ce qui nécessite une durée de polarisation de 30 à 60 minutes (suivant le potentiel appliqué) pour que le courant revienne à la ligne de base.

Par ailleurs, de par la dimension micrométrique de l'électrode de travail, le courant reste faible, de l'ordre de quelques pA. Néanmoins, les propriétés particulières des ultramicroélectrodes assurent un excellent rapport signal/bruit et une résolution temporelle élevée, de l'ordre de la milliseconde, ce qui fait de l'ampérométrie stationnaire une technique bien adaptée à la détection du stress oxydant en temps réel.

2.2 Capillaire de stimulation

Le capillaire de stimulation est un capillaire plein en verre, de diamètre 1,0 mm (*Harvard Apparatus, référence GR-100-10*). Sa pointe de stimulation est réalisée par étirement. Le capillaire est ainsi placé verticalement dans une microétireuse (*Narishige, référence PB-7, New York, Etats Unis*). La partie centrale du capillaire est fixée au milieu d'une spire métallique (résistance chauffante, température = 85 °C) qui fond ce dernier. On obtient alors deux capillaires de stimulation.

2.3 Electrode de référence

Les mesures de libération d'espèces réactives de l'oxygène par ampérométrie lors de la stimulation d'une cellule vivante sont déduites d'expériences réalisées à quatre potentiels. Dans ce contexte, le potentiel appliqué doit être strictement contrôlé pour éviter toute erreur sur les flux des espèces libérées. Afin de respecter ce principe, essentiel aux expériences d'électrochimie en général, l'utilisation d'électrode au calomel saturé (ECS) semble convenir aux études du stress oxydant sur cellule unique.

La solution saturée de chlorure de potassium (KCl) est néanmoins remplacée par une solution saturée de chlorure de sodium (NaCl). En effet, le risque de diffusion de KCl dans le milieu d'étude n'est pas négligeable et peut être préjudiciable à la survie des cellules (effet dépolarisant). Cette nouvelle électrode de référence (ECSS = Electrode au Calomel Saturée en chlorure de Sodium, Tacussel Radiometer, TR 100, Villeurbanne, France) possède une différence de potentiel de +5 mV par rapport à l'électrode au calomel saturée au KCl .

2.4 Détection du stress oxydant

4 valeurs de potentiel (+ 300, + 450, + 650 and + 850 mV vs ECSS) sont choisies pour la détection de 4 espèces électroactives de type ROS/RNS : H_2O_2 , ONOO^- , NO^\cdot et NO_2^- . Ces valeurs ont été déterminées d'après des études voltamétriques réalisées précédemment au laboratoire. Les acquisitions sont réalisées avec un potentiostat (Tacussel Radiometer, PRG-DEL) qui est relié un ordinateur à l'aide d'un convertisseur analogique/digital (ADInstrument, Powerlab 4SP, Colorado Springs, Etats Unis). Le signal ampérométrique est enregistré par le logiciel ADInstrument, Chart version 4.2 (Colorado Springs, Etats Unis).

La solution dans laquelle baignent les cellules étudiées est un tampon phosphate PBS (vendu sous forme de pastilles, Invitrogen). Il se prépare via la dissolution d'une pastille de PBS dans 500 mL d'eau stérile à l'aide d'un agitateur magnétique (Serlabo, Gerhardt Bonn, Type MAG-H). Ce milieu doit être filtré avant toute utilisation (filtre Minisart, 0,22 μm).

3. Culture et préparation des cellules

3.1 Culture cellulaire (MDA-MB 231)

3.1.1 Passage

Préparation du milieu complet

Le milieu de culture est composé de :

+ 45 mL de DMEM (*Dulbecco's modified Eagle's medium*, Sigma-Aldrich, GIBCO cat. no. 21885-025)

+ 4,5 mL de FBS (*Sérum de veau foetal*, Invitrogen, Cergy Pontoise, France)

+ 0,45 mL de Kanamycine (*Invitrogen*, GIBCO cat. no. 15160-047, France)

Le milieu est ensuite filtré avec un filtre de 0,22 μm (*Minisart NML*, Sartorius Stedim, Göttingen, Allemagne).

Passage des cellules (à partir d'une flasque remplie de cellules à confluence) :

Éliminer le milieu de culture à l'aide d'une pipette.

Rincer les cellules qui sont au fond de la flasque deux fois avec 6ml de PBS.

Ajouter 2 mL de trypsine (*Invitrogen*, GIBCO cat. no. 25300-054), en s'assurant que le fond de la flasque est totalement recouvert avec la solution. Incuber à 37°C pendant 4 à 5 minutes.

Ensuite, contrôler à l'œil nu le décollement des cellules. Pour des cellules difficiles à décoller, ou qui s'attachent ensemble, formant alors de gros amas, tapoter les côtés des flacons pour améliorer l'efficacité de la dissociation.

Lorsque les cellules sont totalement dissociées, ajouter 10 mL de milieu complet pour

neutraliser l'effet de la trypsine. Disperser les cellules avec la pipette au sein de la flasque afin d'obtenir un mélange homogène de cellules en suspension.

Aspirer 2 mL de solution et la verser dans une nouvelle flasque.

Ajouter 10 mL de milieu complet, puis déposer la flasque dans l'incubateur (*Jouan, IG150 incubator*) à 37°C (5% de CO₂).

Le passage s'effectue quand les cellules sont à confluence, c'est-à-dire en général deux fois par semaine.

3.1.2 Changement du milieu

Jeter le surnageant cellulaire

Rincer les cellules deux fois avec 6 mL de milieu complet en l'ajoutant le long d'une paroi du flacon. Jeter la solution de lavage.

Ajouter environ 12ml milieu complet.

Les changements de milieu s'effectuent, en général, une fois par semaine.

3.2 Préparation des cellules pour la mesure ampérométrique

Ce protocole suit l'étape de passage, au moment où l'on obtient une solution homogène de cellules en suspension.

Préparer autant de boîtes de Petri (35x10mm) que souhaité. Ajouter 0,2 mL-0,4 mL de solution cellulaire en suspension dans chaque boîte. Rajouter environ 2 mL du milieu complet dans chaque boîte. On notera que le volume de solution cellulaire en suspension à utiliser dépend de l'écart entre le jour de préparation des boîtes et celui de manipulation. Ce volume est d'autant plus faible que l'écart est grand. Recouvrir les boîtes de Petri et les placer dans une grande boîte (144x20mm). Cultiver dans l'incubateur entre 24 et 48h.

Pour ce qui est de l'étude de l'effet des ferrocifènes, il est nécessaire de réaliser le protocole suivant. *Les ferrocifènes ne sont pas des molécules commerciales et ont été aimablement fournis par l'équipe d'Anne Vessières.* Diluer respectivement 30 µL de produit (soit Fc-di(OH), Fc-TAM-OH ou DP1, solutions mères de concentration 10 mM) dans 12 mL de milieu complet dans un tube flacon pour obtenir une concentration finale de 25µM. Sortir les boîtes de Petri contenant les cellules, puis remplacer le milieu par celui supplémenté en ferrocifène (2 mL) pour chaque boîte de Petri. Remettre les boîtes dans l'incubateur.

Le temps d'incubation du produit diffère selon l'étude (de 30 minutes à 24h). Il est indispensable de préparer des boites « contrôle » en parallèle, c'est-à-dire avec un mélange DMSO/milieu complet (préparation du mélange: 30 µL DMSO + 12 mL de milieu complet).

3.3 Congélation / décongélation des cellules.

Congélation

La confluence des cellules dans la flasque de culture doit être à 80-90%, pour garantir une quantité de cellules vivantes élevée.

Jeter le surnageant de culture.

Rincer la flasque deux fois avec 10 mL de PBS.

Ajouter 2 mL de trypsine. Incuber à 37°C pendant 4 à 5 minutes..

Ajouter 10 mL de milieu complet pour neutraliser la dissociation.

Transférer dans un flacon de 15mL, centrifuger à 1500 tr.min⁻¹ pendant 5 minutes à température ambiante.

Aspirer le surnageant prudemment.

Ajouter 2 mL d'un milieu contenant 1,8 mL de milieu complet, et 0,2 mL de DMSO (*diméthylsulfoxyde, Sigma-Aldrich, Saint-Quentin Fallavier, France*), et mélanger à l'aide d'une pipette.

Verser rapidement dans un cryotube (Nunc, Roskilde, Danemark) et congeler à -20°C pendant la nuit, et ensuite le conserver - 80°C.

Le déplacement dans le congélateur de -20°C et le - 80°C suivant doit être rapide en raison de la cytotoxicité du DMSO.

Décongélation

Mettre les cryotubes au bain-marie à 37°C jusqu'à ils sont décongelés seulement.

Une fois les cellules décongelées, les placer dans un flacon de 15mL, et ajouter immédiatement 10 mL de milieu complet pour neutraliser le DMSO.

Centrifuger à 1500 tr.min⁻¹ pendant 5 minutes à température ambiante.

Aspirer le surnageant prudemment.

Rajouter 2 mL de milieu complet, et homogénéiser.

Transvaser la solution dans une flasque de culture, et rajouter lentement 10 mL de milieu complet. Conserver dans l'incubateur.

Changer le milieu le lendemain pour enlever les cellules mortes et les fragments cellulaires. Poursuivre la culture cellulaire (passage, changement de milieu) comme indiqué dans les paragraphes précédents.

4. Processus de mesure du stress oxydant

Sortir une microélectrode du réfrigérateur, l'installer dans un bras du microscope dessus sa plate-forme. La brancher au potentiostat à l'aide d'un fil métallique en tant qu'électrode de

travail et une électrode référence ECSS est fixée à l'aide d'un support de fer. Immerger les deux électrodes dans la boîte de Petri contenant du tampon phosphate PBS.

Appliquer le potentiel choisi pour la mesure de stress oxydant, jusqu'à ce que le courant atteigne la ligne de base.

Préparer la boîte de Petri qui contient les cellules à mesure d'incubateur (suite du §3.2). Jeter le surnageant cellulaire, et le remplacer par le tampon phosphate PBS.

Installer un capillaire de stimulation dans un autre bras du microscope. Remplacer la boîte de Petri précédente par la boîte contenant les cellules. Immerger l'électrode de travail et l'électrode de référence.

Choisir une cellule pour la mesure. Ajuster la position de la microélectrode de carbone et du capillaire de stimulation aux alentours de la cellule choisie.

Ajuster la hauteur de la microélectrode environ $5\mu\text{m}$ du fond de la boîte de Petri. Déplacer le capillaire dessus la cellule, puis le descendre jusqu'à toucher légèrement la membrane de la cellule. Déplacer la microélectrode au dessus du capillaire.

Appliquer à nouveau le potentiel de mesure.

Quand le courant est stable, descendre rapidement le capillaire 5-10 μm , et le relever tout de suite à l'aide d'un micromanipulateur.

Consécutivement à cette stimulation mécanique, un signal ampérométrique sous la forme d'un pic de courant doit apparaître.

Afin d'éviter toute erreur expérimentale liée à d'éventuelles différences entre les électrodes, on utilise la même électrode pour la détection de l'effet du ferrocifène considéré et le contrôle au même potentiel. Les expériences effet du ferrocifène/ contrôle sont effectuées sur deux jours, l'ordre produit/contrôle étant renversé d'un jour à l'autre, pour équilibrer l'effet de la diminution de la sensibilité de l'électrode et l'évolution des cellules au cœur du temps.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- (1) Bard, A. J.; Faulkner, L. R. *Electrochemical Methods: Fundamentals and Applications*; John Wiley and Sons, Inc.: New York, 2001.
- (2) Girault, H. H. *Electrochimie physique et analytique* Presses Polytechniques et Universitaires Romandes, 2001.
- (3) Crank, J. *The mathematics of diffusion*; Clarendon: Oxford, 1976.
- (4) Amatore, C.; Arbault, S.; Guille, M.; Lemaître, F. *Chem. Rev.* **2008**, *108*, 2585-2621.
- (5) Saminathan, K.; Kamavaram, V.; Veedu, V.; Kannan, A. *Int. J. Hydrogen Energy* **2009**, *34*, 3838-3844.
- (6) Saitou, M. *Surf. Coat. Technol.* **2006**, *201*, 3611-3614.
- (7) Favier, A. *L'actualité chimique* **2003**, 108-115.
- (8) Anderson, T. J. *Cardiologia* **1997**, *42*, 701-714.
- (9) Genestra, M. *Cell Signal* **2007**, *19*, 1807-1819.
- (10) Radi, R.; Beckman, J. S.; Bush, K. M.; A., F. B. *Arch. Biochem. Biophys.* **1991**, *288*, 481-487.
- (11) Belkheiri, N., Université Paul Sabatier, Toulouse, 2010.
- (12) Tsai, J. H. M.; Harrison, J. G.; Martin, J. C.; Hamilton, T. P.; Vanderwoerd, M.; Jablonsky, M. J.; Beckman, J. S. *J. Am. Chem. Soc.* **1994**, *116*, 4115-4116.
- (13) Buxton, G. U.; Greenstock, C. L.; Helman, W. P.; Ross, A. B. *J. Phys. Chem. Ref. Data* **1988**, *17*, 513-759.
- (14) Land, E. J.; Ebert, M. *Trans. Faraday Soc* **1967**, *63*, 1181-1190.
- (15) Ross, A. B.; Farhataziz, A. *Natl. Stand. Ref. Data Ser., USA Natl. Bur. Stand.* **1977**, *59*, 1-22.
- (16) Blokhina, O.; Virolainen, E.; Fagerstedt, K. V. *Annals Botany* **2003**, *91*, 179-194.
- (17) Hou, Y. C.; Janczuk, A.; Wang, P. G. *Curr. Pharm. Des.* **1999**, *5*, 417-441.
- (18) Moncada, S.; Higgs, A. *N. Engl. J. Med.* **1993**, *329*, 2002-2012.
- (19) Galen, F.-X. *Comptes Rendus de l'Académie des Sciences - Series III - Sciences de la Vie* **1999**, *322*, 871-877.
- (20) Nisoli, E.; Clementi, E. *Cell Biology* **2003**, *299*, 838-839.
- (21) Koppenol, W. H. *Quim. Nova* **1998**, *21*.
- (22) Delbosc, S.; Morena, M. *Médecine thérapeutique Cardiologie* **2003**, *1*, 147-155.
- (23) Valko, M.; Izakovic, M. *Mol. Cell. Biochem.* **2004**, *266*, 37-56.
- (24) Valko, M.; Leibfritz, D. *Int. J. Biochem. Cell. Biol.* **2007**, *39*, 44-84.
- (25) Droge, W. *Physiol. Rev.* **2002**, *82*, 47-95.

- (26) Willcox, J. K.; Ash, S. L.; Catignani, G. L. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **2004**, *44*, 275-295.
- (27) DeFranco, A.; Robertson, M.; Locksley, R.; Cunin, R. *Immunité : La réponse immunitaire dans les maladies infectieuses et inflammatoires.*, De Boeck ed., 2009.
- (28) Frei, B. *Am. J. Med.* **1994**, *97*, S5-S13.
- (29) Halliwell, B.; Whiteman, M. *Br. J. Pharmacol.* **2004**, *142*, 231-255.
- (30) Tarpey, M. M.; Wink, D. A.; Grisham, M. B. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* **2004**, *286*, R431-R444.
- (31) Ji, L. L.; Fu, R. G. *J. Appl. Physiol.* **1992** *72*, 549-554
- (32) Jones, D. *Methods Enzymology* **2002**, *348*, 93-112.
- (33) Camera, E.; Picardo, M. *J. Chrom. B* **2002**, *781*, 181-206.
- (34) Baker, M. A.; Cerniglia, G. J.; Zaman, A. *Anal. Biochem.* **1990**, *190*, 360-365.
- (35) Scherer, C.; Christofanon, S.; Dicato, M. *Cell Notes* **2008**, *22*, 7-9.
- (36) Terashima, C.; Rao, T. N.; Sarada, B. V. *Anal. Chem.* **2003**, *75*, 1564-1572.
- (37) Smitha, I. K.; Vierheller, T. L. *Anal. Biochem.* **1988**, *175*, 408-413.
- (38) Held, P.; Biotek Instruments, 2010.
- (39) Pryor, W. A.; Stanley, J. P.; Blair, E. *Lipids* **1976**, *11*, 370-379.
- (40) Misra, H. P.; Fridovich, I. *J. Biol. Chem.* **1972** *247*.
- (41) Azzi, A.; Montecucco, C. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1975**, *65*, 597-603.
- (42) Gardner, P. R. *Methods Enzymol.* **2002**, *349*, 9-23.
- (43) Kundu, K.; Knight, S.; Willett, N. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, *48*, 299-303.
- (44) Lin, P.; Myers, L.; Ray, L.; Song, S. *Free Radical Biol. Med.* **2009**, *47*, 1205-1211.
- (45) Tarpley, M. M.; Fridovich, I. *Circul. Res.* **2001**, *89*, 224-236.
- (46) Tarpley, M. M.; White, C. R.; Suarez, E.; Richardson, G. *Circul. Res.* **1999**, *84*, 1203-1211.
- (47) Schweiger, A.; Jeschke, G. *Principles of Pulse Electron Paramagnetic Resonance*, 2001.
- (48) Khan, N.; Swartz, H. *Mol. Cell. Biochem.* **2002**, *234-235*, 341-357.
- (49) Jackson, S. K.; Thomas, M. P. *Faraday Discuss.* **2004**, *126*, 103-117.
- (50) Khan, N.; Wilmot, C. M. *Free Radic. Biol. Med.* **2003**, *34*, 1473-1481.
- (51) Hinkle, P. C.; Butow, R. A.; Racker, E.; Chance, B. *J. Biol. Chem.* **1967**, *242*.
- (52) Ruch, W.; H., C. P.; Baggiolini, M. *J. Immunol Methods* **1983**, *63*, 347-357.
- (53) Zhou, M.; Diwu, Z.; Panchuk-Voloshina, N. *Anal. Biochem* **1997**, *253*, 162-168.
- (54) Hoffman, A.; Spetner, L. M.; Burke, M. *Free Radical Biol. Med.* **2008**, *45*, 265-268.
- (55) Ignarro, L. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **1990**, *30*, 535-560.
- (56) Liu, X.; Miller, M.; Joshi, H.; Sadowska-Krowicka, H.; Clark, D.; Lancaster, J. *J. Biol. Chem.* **1998**, *273*, 18709-18713.

- (57) Gladwin, M. T.; Ognibene, F. P.; Pannell, L. K.; Nichols, J. S.; Pease-Fye, M. E.; Shelhamer, J. H.; Schechter, A. N. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2000**, *97*, 9943-9948.
- (58) Kelm, M.; Dahmann, R.; Wink, D.; Feelisch, M. *J. Biol. Chem.* **1997**, *272*, 9922-9932.
- (59) Taha, Z. H. *Talanta* **2003**, *61*, 3-10.
- (60) Collman, J. P.; Dey, A.; Decreau, R. A.; Yang, Y.; Hosseini, A.; Solomon, E. I.; Eberspacher, T. A. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2008**, *105*, 9892-9896.
- (61) Sharpe, M. A.; Cooper, C. E. *Biochem. J.* **1998**, *332*, 9-19.
- (62) Kotake, Y. *Nitric Oxide* **1999**, *3*, 114-122.
- (63) Lecour, S.; Maupoil, V.; Siri, O.; Tabard, A.; Rochette, L. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* **1999**, *33*, 78-85.
- (64) Misko, T. P.; Schilling, R. J.; Salvemini, D.; Moore, W. M.; Currie, M. G. *Anal. Biochem.* **1993**, *214*, 11-16.
- (65) Granger, D. L.; Taintor, R. R. *Methods Enzymol.* **1996**, *268*, 142-151.
- (66) Xu, J. *Circulation* **2009**, *120*, 1266-1286.
- (67) Lee, K. Y.; Amatore, C.; Kochi, J. K. *J. Phys. Chem.* **1991**, *95*, 1285-1294.
- (68) Koppenol, W. H.; Moreno, J. J.; Pryor, W. A.; Ischiropoulos, H.; Beckman, J. S. *Chem. Res. Toxicol.* **1992**, *5*, 834-842.
- (69) Koppenol, W. H. *Nitric oxide, part A-sources and detection of NO; NO synthase*; Academic Press, 1996.
- (70) Koppenol, W. H. *Free Radic. Biol. Med.* **1998**, *25*, 385-391.
- (71) Pacher, P.; Beckman, J. S.; Liaudet, L. *Physiol Rev.* **2007**, *87*.
- (72) Quijano, C.; Alvarez, B. *Biochem. J.* **1997**, *322*, 167-173.
- (73) Borgmann, S. *Anal. Bioanal. Chem.* **2009**, *394*, 95-105.
- (74) McNeil, C. J.; Smith, K. A.; Bellavite, P.; Bannister, J. V. *Free Radical Res. Commun.* **1989**, *7*, 89-96.
- (75) Cooper, J. M.; Greenough, K. R.; McNeil, C. J. *J. Electroanal. Chem.* **1993**, *347*, 267-275.
- (76) Manning, P.; McNeil, C. J.; Cooper, J. M. *Free Radical Biol. Med.* **1998**, *24*, 1304-1309.
- (77) Tammeveski, K.; Tenno, T. T.; Mashirin, A. A. *Free Radical Biol. Med.* **1998**, *25*, 973-978.
- (78) Mesaros, S.; Vankova, Z.; Grunfeld, S. *Anal. Chim. Acta* **1998**, *358*, 27-33.
- (79) Isogai, Y.; Tsuyama, T.; Osada, H. *FEBS Lett.* **1996**, *380*, 263-266.
- (80) Green, M. J.; Hill, H. A.; Tew, D. G. *FEBS Lett.* **1984**, *170*, 69-72.
- (81) Hill, H. A. O.; Tew, D. G.; Walton, N. J. *FEBS Lett.* **1985**, *191*, 257-263.
- (82) Kazuko, T.; Fumiaki, K. *Bioelectrochem. Bioenerg.* **1991**, *26* 413-421.

- (83) Salimi, A.; Noorbakhsh, A. *Anal. Biochem.* **2005**, *344*, 16-24.
- (84) Zhao, G. C.; Yin, Z. Z.; Zhang, L. *Electrochem. Commun.* **2005**, *7*, 256-260.
- (85) Lee, K. P.; Gopalana, A. I.; Komathi, S. *Sensor Actuat. B - Chem.* **2009**, *141*, 518-525.
- (86) Ledru, S.; Ruillé, N.; Boujtita, M. *Biosens. Bioelectron.* **2006**, *21*, 1591-1598.
- (87) Amatore, C.; Arbault, S.; Bouton, C.; Coffi, K.; Drapier, J. C.; Ghandour, H.; Tong, Y. H. *ChemBioChem* **2006**, *7*, 653-661.
- (88) Amatore, C.; Arbault, S.; Bruce, D.; de Oliveira, P.; Erard, M.; Vuillaume, M. *Faraday Discuss.* **2000**, *116*, 319-333.
- (89) Amatore, C.; Arbault, S.; Bruce, D.; de Oliveira, P.; Erard, M.; Vuillaume, M. *Chem. Eur. J.* **2001**, *7* 4171-4179.
- (90) Shibuki, K. *Neuroscience Res.* **1990**, *9*, 69-76.
- (91) Zhang, X.; Kilyak, Y. *J. Electrochem. Commun.* **2002**, *4*, 11.
- (92) Taha, Z. H. *Talanta* **2003**, *61*, 3-10.
- (93) Malinski, T.; Taha, Z. *Nature* **1992**, *358*, 676-678.
- (94) Brovkovich, V.; Stolarczyk, E.; Oman, J. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **1999**, *19*, 135-143.
- (95) Mitchell, K. M.; Michaelis, E. K. *Electroanalysis* **1998**, *10*, 81-88.
- (96) Lantoiné, F.; Trevin, S.; Bedioui, F.; Devynck, J. *J. Electroanal. Chem.* **1995**, *392*, 85-89.
- (97) Malinski, T. Z.; Taha, Z.; Grunfeld, S. *Anal. Chim. Acta* **1993**, *279*, 135-140.
- (98) Bedioui, F.; Quinton, D.; Griveau, S.; Nyokong, T. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2010**, *12*, 9976-9988.
- (99) Pontie, M.; Gobin, C.; Pauporte, T.; Bedioui, F.; Devynck, J. *Anal. Chim. Acta* **2000**, *411*, 175-185.
- (100) Friedemann, M. N.; Robinson, S. W.; Gerhardt, G. A. *Anal. Chem.* **1996**, *68*, 2621-2628.
- (101) Shim, J. H.; Do, H.; Lee, Y. *Electroanalysis* **2010**, *22*, 359-366.
- (102) Privat, C.; Trevin, S.; Bedioui, F.; Devynck, J. *J. Electroanal. Chem.* **1997**, *436*, 261-265.
- (103) Sandoval, J.; Gutierrez, S.; Alatorre, A. *Electroanalysis* **2007**, *19*, 61-64.
- (104) Koh, W. C. A.; Son, J. I.; Choe, E. S.; Shim, Y. B. *Anal. Chem.* **2010**, *82*, 10075-10082.
- (105) Ye, X.; Yang, Q.; Wang, Y. *Talanta* **2010**, *47*, 534-539.
- (106) Peteu, S. F.; Peiris, P.; Gebremichael, E. *Biosens. Bioelectron.* **2010**, *25*, 1914-1921.
- (107) Abdollah, S.; Abdollah, N.; Fatemeh, S. K. *Int. J. Electrochem. Sci.* **2006**, *1*, 435-446.
- (108) Badea, M.; Aziz, A.; Palleschi, G. *J. Electroanal. Chem.* **2001**, *509*, 66-72.

- (109) Miao, P.; Shen, M.; Ning, L. M.; Chen, G. F.; Yin, Y. M. *Anal. Bioanal. Chem.* **2011**, *399*, 2407-2411.
- (110) Amatore, C.; Arbault, S.; Bouton, C.; Drapier, J. C.; Ghandour, H.; Koh, A. C. W. *ChemBioChem* **2008**, *9*, 1472-1480.
- (111) Amatore, C.; Arbault, S.; Koh, A. C. W. *Anal. Chem.* **2010**, *82*, 1411-1419.
- (112) Forouzanfar, M. H.; Foreman, K. J.; Delossantos, A. M.; Lozano, R.; Lopez, A. D.; Murray, C. J. L.; Naghavi, M. *Lancet* **2011**, *378*, 1461-1484.
- (113) Li, X. D.; Huang, J.; Yi, P.; Bambara, R. A.; Hilf, R.; Muyan, M. *Mol. Cell Biol.* **2004**, *24*, 7681-7694.
- (114) Buckley, M. M. T.; Goa, K. L. *Drugs* **1989**, *37*, 451-490.
- (115) Mouridsen, H.; Giobbie-Hurder, A.; Goldhirsch, A.; Thurlimann, B.; Paridaens, R.; Smith, I.; Mauriac, L.; Forbes, J. F.; Price, K. N.; Regan, M. M.; Gelber, R. D.; Coates, A. S. *New Engl. J. Med.* **2009**, *361*, 766-776.
- (116) Desta, Z.; Ward, B. A.; Soukhova, N. V.; Flockhart, D. A. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **2004**, *310*, 1062-1075.
- (117) Wiseman, H.; Cannon, M.; Arnstein, H. R. V.; Barlow, D. J. *Biochim. Biophys. Acta* **1992**, *1138*, 197-202.
- (118) Pigeon, P.; Top, S.; Vessieres, A.; Huche, M.; Gormen, M.; El Arbi, M.; Plamont, M. A.; McGlinchey, M. J.; Jaouen, G. *New J. Chem.* **2011**, *35*, 2212-2218.
- (119) Osborne, C. K.; Fuqua, S. A. W. *Journal of Clinical Oncology* **2000**, *18*, 3172-3186.
- (120) Kopfmaier, P.; Kopf, H.; Neuse, E. W. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* **1984**, *108*, 336-340.
- (121) Neuse, E. W.; Kanzawa, F. *Appl. Organomet. Chem.* **1990**, *4*, 19-26.
- (122) Joy, A. M.; Goodgame, D. M. L.; Stratford, I. J. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* **1989**, *16*, 1053-1056.
- (123) Osella, D.; Ferrali, M.; Zanello, P.; Laschi, F.; Fontani, M.; Nervi, C.; Cavigliolo, G. *Inorg. Chim. Acta* **2000**, *306*, 42-48.
- (124) Tabbi, G.; Cassino, C.; Cavigliolo, G.; Colangelo, D.; Ghiglia, A.; Viano, I.; Osella, D. *J. Med. Chem.* **2002**, *45*, 5786-5796.
- (125) Tamura, H.; Miwa, M. *Chem. Lett.* **1997**, 1177-1178.
- (126) Kehrer, J. P. *Toxicology* **2000**, *149*, 43-50.
- (127) Top, S.; Dauer, B.; Vaissermann, J.; Jaouen, G. *J. Organomet. Chem.* **1997**, *541*, 355-361.
- (128) Top, S.; Tang, J.; Vessieres, A.; Carrez, D.; Provot, C.; Jaouen, G. *Chem. Commun.* **1996**, 955-956.
- (129) Vessieres, A.; Corbet, C.; Heldt, J. M.; Lories, N.; Jouy, N.; Laios, I.; Leclercq, G.; Jaouen, G.; Toillon, R. A. *J. Inorg. Biochem.* **2010**, *104*, 503-511.

- (130) Vessieres, A.; Top, S.; Pigeon, P.; Hillard, E.; Boubeker, L.; Spera, D.; Jaouen, G. *J. Med. Chem.* **2005**, *48*, 3937-3940.
- (131) Mertins, O.; Buriez, O.; Labbe, E.; Fang, P. P.; Hillard, E.; Vessieres, A.; Jaouen, G.; Tian, Z. Q.; Amatore, C. *J. Electroanal. Chem.* **2009**, *635*, 13-19.
- (132) Pigeon, P.; Top, S.; Zekri, O.; Hillard, E. A.; Vessieres, A.; Plamont, M. A.; Buriez, O.; Labbe, E.; Huche, M.; Boutamine, S.; Amatore, C.; Jaouen, G. *J. Organomet. Chem.* **2009**, *694*, 895-901.
- (133) Hamels, D.; Dansette, P. M.; Hillard, E. A.; Top, S.; Vessieres, A.; Herson, P.; Jaouen, G.; Mansuy, D. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, *48*, 9124-9126.
- (134) Michard, Q.; Jaouen, G.; Vessieres, A.; Bernard, B. A. *J. Inorg. Biochem.* **2008**, *102*, 1980-1985.
- (135) Tan, Y. L. K.; Pigeon, P.; Hillard, E. A.; Top, S.; Plamont, M. A.; Vessieres, A.; McGlinchey, M. J.; Muller-Bunz, H.; Jaouen, G. *Dalton Trans.* **2009**, 10871-10881.
- (136) Hillard, E. A.; Pigeon, P.; Vessieres, A.; Amatore, C.; Jaouen, G. *Dalton Trans.* **2007**, 5073-5081.
- (137) Hillard, E.; Vessieres, A.; Thouin, L.; Jaouen, G.; Amatore, C. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2006**, *45*, 285-290.
- (138) Fan, P. W.; Zhang, F. G.; Bolton, J. L. *Chem. Res. Toxicol.* **2000**, *13*, 45-52.
- (139) Shibusani, S.; Dasaradhi, L.; Terashima, I.; Banoglu, E.; Duffel, M. W. *Cancer Res.* **1998**, *58*, 647-653.
- (140) Zhang, F. G.; Fan, P. W.; Liu, X. M.; Shen, L. X.; van Breemen, R. B.; Bolton, J. L. *Chem. Res. Toxicol.* **2000**, *13*, 53-62.
- (141) Messina, P.; Labbe, E.; Buriez, O.; Hillard, E. A.; Vessieres, A.; Hamels, D.; Top, S.; Jaouen, G.; Frapart, Y. M.; Mansuy, D.; Amatore, C. *Chem. Eur. J.* **2012**, *18*, 6581-6587.
- (142) Tan, Y. L. K.; Pigeon, P.; Top, S.; Labbe, E.; Buriez, O.; Hillard, E. A.; Vessieres, A.; Amatore, C.; Leong, W. K.; Jaouen, G. *Dalton Trans.* **2012**, *41*, 7537-7549.
- (143) Gormen, M.; Pigeon, P.; Top, S.; Vessieres, A.; Plamont, M. A.; Hillard, E. A.; Jaouen, G. *MedChemComm* **2010**, *1*, 149-151.
- (144) El Arbi, M.; Pigeon, P.; Top, S.; Rhouma, A.; Aifa, S.; Rebai, A.; Vessieres, A.; Plamont, M. A.; Jaouen, G. *J. Organomet. Chem.* **2011**, *696*, 1038-1048.
- (145) Dasaradhi, L.; Shibusani, S. *Chem. Res. Toxicol.* **1997**, *10*, 189-196.
- (146) Dehal, S. S.; Kupfer, D. *Cancer Res.* **1996**, *56*, 1283-1290.
- (147) Hardcastle, I. R.; Horton, M. N.; Osborne, M. R.; Hower, A.; Jarman, M.; Phillips, D. H. *Chem. Res. Toxicol.* **1998**, *11*, 369-374.

- (148) Gormen, M.; Pigeon, P.; Top, S.; Hillard, E. A.; Huche, M.; Hartinger, C. G.; de Montigny, F.; Plamont, M. A.; Vessieres, A.; Jaouen, G. *ChemMedChem* **2010**, *5*, 2039-2050.
- (149) Nazarewicz, R. R.; Zenebe, W. J.; Parihar, A.; Larson, S. K.; Alidema, E.; Choi, J.; Ghafourifar, P. *Cancer Res.* **2007**, *67*, 1282-1290.
- (150) Kallio, A.; Zheng, A.; Dahllund, J.; Heiskanen, K. M.; Harkonen, P. *Apoptosis* **2005**, *10*, 1395-1410.
- (151) Hillard, E. A.; Vessieres, A.; Jaouen, G. *Topics in Organometallic Chemistry* **2010**, *32*, 81-117.
- (152) Bernard, A. S.; Giroud, C.; Ching, H. Y. V.; Meunier, A.; Ambike, V.; Amatore, C.; Guille Collignon, M.; Lemaître, F.; Policar, C. *Dalton Trans.* **2012**, *41*, 6399-6403.
- (153) Amatore, C.; Arbault, S.; Chen, Y.; Crozatier, C.; Tapsoba, I. *Lab on a Chip* **2007**, *7*, 233-238.
- (154) Tapsoba, I.; Arbault, S.; Walter, P.; Amatore, C. *Anal. Chem.* **2010**, *82*, 457-460.
- (155) Ahmad, I. M.; Aykin-Burns, N.; Sim, J. E.; Walsh, S. A.; Higashikubo, R.; Buettner, G. R.; Venkataraman, S.; Mackey, M. A.; Flanagan, S. W.; Oberley, L. W.; Spitz, D. R. *J. Biol. Chem.* **2005**, *280*, 4254-4263.
- (156) Vladusic, E. A.; Hornby, A. E.; Guerra-Vladusic, F. K.; Lakins, J.; Lupu, R. *Oncol. Rep.* **2000**, *7*, 157-167.
- (157) Rancillac, A.; Rossier, J.; Guille, M.; Tong, X. K.; Geoffroy, H.; Amatore, C.; Arbault, S.; Hamel, E.; Cauli, B. *J. Neurosci.* **2006**, *26*, 6997-7006.
- (158) Sun, P.; Laforge, F. O.; Abeyweera, T. P.; Rotenberg, S. A.; Carpino, J.; Mirkin, M. V. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2008**, *105*, 443-448.
- (159) Wang, Y.; Noël, J. M.; Velmurugan, J.; Nogala, W.; Mirkin, M. V.; Lu, C.; Guille Collignon, M.; Lemaître, F.; Amatore, C. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2012**, *109*, 11534-11539.
- (160) Kawagoe, K. T.; Jankowski, J. A.; Wightman, R. M. *Anal. Chem.* **1991**, *63*, 1589-1594.
- (161) Ikariyama, Y.; Yamauchi, S.; Yukiashi, T.; Ushioda, H. *J. Electrochem. Soc.* **1989**, *136*, 702-706.