



HAL
open science

Etude de la perméabilisation de la membrane plasmique par spectroscopie térahertz : thérapie photodynamique et protéolyse de la trypsine

Blandine Lordon de Bonniol Du Tremont

► **To cite this version:**

Blandine Lordon de Bonniol Du Tremont. Etude de la perméabilisation de la membrane plasmique par spectroscopie térahertz : thérapie photodynamique et protéolyse de la trypsine. Biophysique [physics.bio-ph]. Institut Polytechnique de Paris, 2024. Français. NNT : 2024IPPAX073 . tel-04817049

HAL Id: tel-04817049

<https://theses.hal.science/tel-04817049v1>

Submitted on 3 Dec 2024

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.



INSTITUT
POLYTECHNIQUE
DE PARIS

NNT : 2024IPPAX073

Thèse de doctorat



Etude de la perméabilisation de la membrane plasmique par spectroscopie térahertz : thérapie photodynamique et protéolyse de la trypsine

Thèse de doctorat de l'Institut Polytechnique de Paris
préparée à l'École Polytechnique

École doctorale n°626 Ecole doctorale de l'Institut Polytechnique de Paris (ED IP Paris)

Spécialité de doctorat : Physique

Thèse présentée et soutenue à Palaiseau, le 18/10/2024, par

BLANDINE LORDON

Composition du Jury :

Katia Grenier Directrice de recherche CNRS, LAAS, Toulouse	Présidente du jury
Alexandre Locquet Chargé de recherche CNRS, Georgia Institute of Technology	Rapporteur
Laure Gibot Chargée de recherche CNRS, Softmat, Toulouse	Examinatrice
Vincent Sol Professeur, LABCiS, Limoges	Examineur
Jérémie Torres Maître de conférence CNRS, IES, Montpellier	Examineur
Guilhem Gallot Directeur de recherche CNRS, LOB, Palaiseau	Directeur de thèse

Remerciements

On ne pourrait certainement pas qualifier ces trois années de thèse de faciles ou d'évidentes, mais les termes incroyables, enrichissantes et formatrices leur conviendraient parfaitement. Je le dois aux personnes qui m'ont entourée, tant dans mon milieu professionnel que personnel.

Tout d'abord, mes remerciements vont aux membres du jury, Katia Grenier, Alexandre Locquet, Laure Gibot, Vincent Sol et Jérémie Torres. Merci pour la lecture de mon manuscrit, pour vos retours et pour les discussions enrichissantes qui en ont découlé.

Je remercie Guilhem Gallot pour son encadrement tout au long de ces trois années de thèse. Ton accompagnement m'a permis de progresser considérablement : j'ai bénéficié d'une autonomie suffisante pour explorer mes idées, tout en ayant l'encadrement et les échanges nécessaires pour rester sur la bonne route. Merci pour ta confiance. Un grand merci à tous ceux qui contribuent à faire du LOB un lieu accueillant, où le dialogue est encouragé, en particulier François Hache, directeur du LOB. Merci à Willy Supatto pour l'organisation des lab-meetings avec le groupe de microscopie. Ces réunions m'ont permis d'élargir mes horizons sur les différents sujets abordés au labo. Un grand merci à Jean-Marc et Xavier pour leurs conseils et contributions techniques concernant le dispositif, qui ont permis de l'améliorer considérablement. Un immense merci à Laure et Christelle pour leur aide précieuse, qui m'a permis de naviguer parmi les complexités administratives liées aux missions, commandes, et autres réjouissances du quotidien. Merci à tous les membres du LOB pour leurs conseils, pour les discussions, les afterworks, etc. Merci aux membres du laboratoire Softmat, avec qui nous avons collaboré sur la PDT. Je suis ravie d'avoir travaillé sur un sujet aussi passionnant. En particulier, merci à Laure Gibot de m'avoir accueillie à Toulouse pour mieux comprendre la PDT ; voir les expériences biologiques m'a beaucoup aidée et motivée à réaliser mes propres expériences. Un grand merci à Tiffany pour tous tes excellents conseils en biologie, sur la PDT, et sur les divers aspects techniques des expériences. Ton aide m'a grandement éclairée et m'a permis de mieux comprendre les expériences.

J'ai commencé la thèse en même temps qu'un petit groupe, ma foi des plus exceptionnels : Amélie, Stella, Giulia, et Clément. Je n'aurais pas pu rêver de meilleurs compagnons de galère ; merci pour TOUT (et par TOUT, j'entends un volume de remerciements à la hauteur de la trilogie du Seigneur des Anneaux). À ce groupe incroyable se sont vite ajoutés de nouveaux arrivants : Robin, Dorian, Poncia, Solène, Elsa, Aïchata, Xue, Xiaotong et Tom. Je brise l'ordre chronologique pour ajouter Anne, Zackie, Maxime et Sophie à la liste des personnes formidables (ou "collègues") que j'ai côtoyées au quotidien, et dont la présence a fait de ces trois années un souvenir magique. Merci pour Koh-Lanta, les raclettes, fondues, verres, soirées, pauses café, Magnan, (pas pour le jap à volonté), le ski, le JDR, l'escalade, les mille projets qui nous rendront millionnaires... et la liste n'en finit pas.

La vie ne se résume pas au milieu professionnel. J'ai eu la chance d'être entourée par ma famille, merci pour vos encouragements et vos conseils avisés. Merci à mes nombreux colocataires : les officiels, les officieux, et les simples squatteurs. Merci à mes amis de Supop, de la prépa, et du lycée. Vous êtes les meilleurs, et j'ai énormément de chance de vous avoir, même si, pour des raisons inconnues, vous avez (presque) tous déménagé à Paris, ce qui a fortement impacté l'état de mon portefeuille et mon état mental (prendre le RERB en heure de pointe n'est pas quelque chose d'anodin). S'il y a une certitude que j'ai après ces trois ans, c'est que je n'y serais pas arrivée sans vous.

Je conclurai ces remerciements en reprenant les mots empreints de sagesse de Snoop Dogg :

"Last but not least, I wanna thank me
I wanna thank me for believing in me
I wanna thank me for doing all this hard work
I wanna thank me for having no days off
I wanna thank me for... for never quitting"

Table des matières

Remerciements	1
Introduction	7
1 Combinaison des ondes térahertz et d'une configuration ATR pour sonder les milieux biologiques	9
1.1 Généralités sur le domaine térahertz (THz)	10
1.1.0.1 Pont entre deux domaines très différents	10
1.1.0.2 Interaction lumière - matière	11
1.2 Recueillir des informations via les ondes THz	13
1.2.1 Spectroscopie	13
1.2.1.1 Terahertz Time Domain Spectroscopy (THz-TDS)	13
1.2.1.2 Applications	15
1.2.2 Imagerie	16
1.3 Les ondes térahertz pour étudier les milieux biologiques	18
1.3.1 Interactions ondes térahertz - liquides et biomatériaux	18
1.3.2 Source du contraste térahertz	20
1.3.3 Imagerie térahertz en milieu biologique	22
1.3.3.1 Les différents types de dispositifs d'imagerie	22
1.3.3.2 Applications d'imagerie THz en milieu biologique	24
1.4 Dispositif ATR - THz	25
1.4.1 Conception du dispositif ATR - THz	25
1.4.2 Caractérisation et amélioration de la stabilité	29
1.4.3 Propagation du faisceau THz	30
1.4.3.1 Propagation d'un faisceau sans obstacles	30
1.4.3.2 Propagation du faisceau en présence d'obstacles	31
1.4.3.3 Caractérisation de la propagation du faisceau THz après division spatiale	31
1.4.4 Comparaison de liquides d'indice	33
1.4.5 Configuration ATR (Attenuated Total Reflectance)	36
1.4.5.1 Réflexion totale	36
1.4.5.2 Réflexion totale atténuée	37
2 Perméabilisation de la membrane plasmique	41
2.1 L'intégrité de la cellule est assurée par la membrane plasmique	42
2.1.1 Les cellules épithéliales	42
2.1.1.1 Généralités	42

2.1.1.2	Lignées classiques de cellules épithéliales	42
2.1.1.3	Contenu cellulaire des cellules épithéliales	43
2.1.2	Composition et structure de la membrane plasmique	44
2.1.3	Les forces qui régissent la structure de la membrane	46
2.2	Les différents processus de perméabilisation de la membrane plasmique	47
2.2.1	Les processus de perméabilisation intrinsèques aux cellules	48
2.2.2	Intérêts et challenge du contrôle de la perméabilisation de la membrane plasmique	51
2.2.3	Processus pour induire et augmenter la perméabilisation de la membrane plasmique	52
2.2.3.1	Utilisation d'un transporteur	52
2.2.3.2	Modification de la molécule à livrer	53
2.2.3.3	Rupture de la membrane plasmique	53
2.2.4	Processus de réparation de la membrane	56
2.3	Évaluer la perméabilité d'une cellule	57
2.3.1	Quelles sont les méthodes existantes pour obtenir des informations sur la perméabilisation ?	57
2.3.2	Évaluation des outils d'étude de la perméabilisation	60
2.4	Évaluation de la perméabilité d'une cellule via le dispositif ATR - THz	61
2.4.1	Perméabilisation induite par un détergent	62
2.4.2	Perméabilisation induite par électroporation	64
3	Impact de la thérapie photodynamique sur la membrane plasmique	67
3.1	La thérapie photodynamique (PDT)	68
3.1.1	Principe de la PDT	68
3.1.1.1	Le mécanisme de la PDT	68
3.1.1.2	Les molécules photosensibilisantes s'accumulent dans les tissus cancéreux	69
3.1.1.3	Les différentes applications de la PDT	70
3.1.2	Les challenges de la PDT	70
3.1.3	Les méthodes pour améliorer l'efficacité de la PDT	70
3.1.3.1	Il existe de nombreux types de PS, selon l'effet recherché	70
3.1.3.2	Paramétrage via l'oxygène	72
3.1.3.3	Paramétrage via l'illumination	72
3.1.4	Impact de la PDT sur la membrane plasmique de la cellule	73
3.2	Effet de la fonctionnalisation du PS par des micelles	74
3.2.1	Conditions expérimentales	75
3.2.2	Méthodes statistiques utilisées pour caractériser les résultats	77
3.2.3	La viabilité cellulaire diminue avec l'encapsulation de l'agent photosensible	78
3.2.4	Perméabilisation de la membrane plasmique lors de la PDT	79
3.2.4.1	Evaluation de la perméabilisation par des méthodes biologiques	79
3.2.4.2	Le dispositif ATR -THz mesure les dynamiques de la perméabilisation induite par la PDT	82
3.3	Encapsulation du photosensibilisateur par différents types de nanovecteurs	84
3.3.1	Conditions expérimentales	85
3.3.2	Impact des nanovecteurs seuls lors de la PDT	86

3.3.2.1	Contrôle de la toxicité des nanovecteurs seuls	86
3.3.2.2	Contrôle de la perméabilité de la membrane plasmique pour les nanovecteurs seuls	87
3.3.2.3	Impact des nanovecteurs seuls étudiés par le dispositif ATR - THz	88
3.3.3	PDT avec PS encapsulé dans différents types de nanovecteurs	90
3.3.3.1	Contrôle de la toxicité	90
3.3.3.2	Contrôle de la perméabilité de la membrane plasmique	91
3.3.3.3	Etude par le dispositif ATR -THz	93
4	Impact de la trypsine sur le cytoplasme de la cellule lors du détachement des cellules	99
4.1	Protéolyse de la trypsine	100
4.1.1	Utilisation de la trypsine en culture cellulaire	100
4.1.2	Les effets secondaires de la protéolyse de la trypsine	101
4.2	Etude des dynamiques des variations cytoplasmiques induites par la protéolyse de la trypsine par le dispositif ATR - THz et la microscopie confocale	103
4.2.1	Conditions expérimentales	103
4.2.2	Détermination de la contribution morphologique via la microscopie confo- cale	103
4.2.3	Détermination de la contribution globale via le dispositif ATR - THz	105
4.2.4	Détermination de la contribution cytoplasmique via un modèle multicouche	106
4.3	Quelles types de molécules sont impliquées dans la variation du contenu cyto- plasmique induit par la trypsine ?	111
4.3.1	Influence de la masse molaire des solutés sur le signal térahertz	111
4.3.2	Les molécules impliquées dans les variations de contenu cytoplasmique	113
4.4	Quelle est la méthode la moins invasive pour les cellules : une forte concentration en trypsine pendant un temps court, ou l'inverse ?	115
	Conclusion	119
	Annexes	121
	Protocole de passage des MDCK1	121
	Protocole d'ensemencement des MDCK1 pour acquisitions THz	122
	Protocole de marquage fluorescent sur des MDCK1	124
	Protocole de fabrication de solution de pheophorbide a	126
	Protocole d'acquisition ATR - THz PDT	128
	Protocole coating fibronectine	129
	Protocole gomme gélane	130
	Protocole fabrication BaTiO ₃	131
	Nomenclature	135
	Bibliographie	150

Introduction

Ma thèse s'est déroulée au sein du Laboratoire d'Optique et Biosciences (LOB), unité mixte de recherche entre l'Institut Polytechnique de Paris, le CNRS et l'INSERM. La vision du laboratoire est de "rassembler en un lieu des compétences en biologie, en optique et en dynamique femtoseconde dans le but de favoriser l'émergence de nouveaux concepts et outils pour la compréhension du fonctionnement des molécules biologiques et de leur organisation au sein des cellules et tissus".

Ma thématique se situe à l'interface entre la physique et la biologie. Notre démarche est le développement de dispositifs basés sur les ondes térahertz pour des applications biologiques, en particulier la perméabilisation de la membrane plasmique des cellules.

L'intervalle de fréquences térahertz, situé entre les domaines des micro-ondes et de l'infrarouge, est caractérisé par une forte interaction avec l'eau liquide. Les ondes térahertz sont de plus non ionisantes et non invasives. Ces propriétés en font un outil intéressant pour l'étude de milieux biologiques. Le groupe a développé un dispositif térahertz permettant de sonder les variations de contenu cellulaire. L'intégrité de la cellule, et d'un grand nombre de ses processus de régulation est assuré par la membrane plasmique. Cette interface est régie par de nombreux mécanismes, dont la compréhension et le contrôle sont des enjeux clés pour un grand nombre d'applications : bio-fabrication, vaccins, diagnostique, etc... Le dispositif térahertz a été développé pour étudier finement ces mécanismes, de manière non invasive, précise et en temps réel. Ce manuscrit présente les outils théoriques qui ont mené à l'élaboration du dispositif et à son application aux variations de contenu cellulaire. Il introduit les améliorations technologiques effectuées pour améliorer la précision et la compréhension des mesures. Deux études principales ont été faites : l'une, en collaboration avec l'équipe IDeAS du laboratoire Sofmat de Toulouse relativement à la thérapie photodynamique. Le but est d'utiliser des mesures complémentaires térahertz et en biologie pour comprendre les mécanismes de perméabilisation induits par la thérapie photodynamique. L'autre est une étude des processus de perméabilisation de la membrane plasmique induits par la protéolyse de la trypsine, une enzyme couramment utilisée en culture cellulaire. Le manuscrit est divisé en 4 chapitres, qui reprennent thématiquement les notions mentionnées ci-dessus.

Le premier chapitre, intitulé *Combinaison des ondes térahertz et d'une configuration ATR pour sonder les milieux biologiques* fait une introduction au domaine térahertz. Les caractéristiques de ces fréquences sont exposées, ainsi que leurs applications classiques. Il est montré comment les propriétés uniques de ces fréquences permettent d'obtenir des informations sur des milieux biologiques, et en particulier des solutions. Le dispositif développé permettant de faire les mesurer est décrit et caractérisé.

Le second chapitre, intitulé *Perméabilisation de la membrane plasmique* introduit les notions de biologie utilisées. Il part de l'échelle cellulaire pour ensuite se concentrer sur la membrane plasmique de la cellule, et les processus qui régissent ses dynamiques, en particulier celles de sa perméabilisation. Enfin, l'application de notre dispositif à l'étude de ces mécanismes est présentée.

Le troisième chapitre, intitulé *Impact de la thérapie photodynamique sur la membrane plasmique* présente une application de notre dispositif à la perméabilisation de la membrane. Le dispositif térahertz a été utilisée pour faire des mesures de perméabilisation complémentaire à des mesures biologiques. L'impact de l'encapsulation de molécules photosensibles par des nanovecteurs sur la membrane plasmique est étudié.

Le quatrième chapitre, intitulé *Impact de la trypsine sur le contenu cytoplasmique lors du détachement des cellules* présente une autre application de notre dispositif à la perméabilisation de la membrane. Le dispositif térahertz est utilisé pour étudier la protéolyse de la trypsine, une procédure utilisée très régulièrement en culture cellulaire pour détacher les cellules de leur substrat. La combinaison du dispositif avec de microscopie confocale, de fluorescence et d'un modèle multicouche permet d'identifier des dynamiques de perméabilisation de la membrane plasmique en parallèle du détachement des cellules.

Chapitre 1

Combinaison des ondes térahertz et d'une configuration ATR pour sonder les milieux biologiques

Le but du dispositif térahertz ATR est de sonder les modifications de contenu cellulaire à l'aide d'un faisceau térahertz. Ce chapitre introduit les concepts impliqués dans l'élaboration du dispositif. Nous traiterons dans un premier temps des ondes térahertz et de leurs propriétés ; dans un second temps, des types d'interactions existantes entre les ondes térahertz et la matière, ainsi que des applications qui en découlent. L'origine du contraste observé par le dispositif lors de la modification du contenu cellulaire sera ensuite expliquée. Enfin, dans un dernier temps, ce chapitre explicite les caractéristiques du dispositif térahertz ATR, et montre quelques résultats sur l'étude de changement de contenu cellulaire.

1.1 Généralités sur le domaine térahertz (THz)

Cette partie introduit les ondes térahertz, la place de ces ondes dans le spectre électromagnétique et les liens avec les autres domaines de fréquences. Puis, on s'intéresse aux différentes interactions entre les ondes térahertz et la matière, et les applications qui en découlent.

Le domaine de fréquence térahertz fait référence aux fréquences de l'ordre de 10^{12} Hz. Il inclut l'intervalle spectral situé entre 100 GHz et 10 THz soit entre les micro-ondes et les ondes infrarouges (voir figure 1.1). Il est caractérisé par ses faibles énergies entre 0.42 et 41.5 meV.

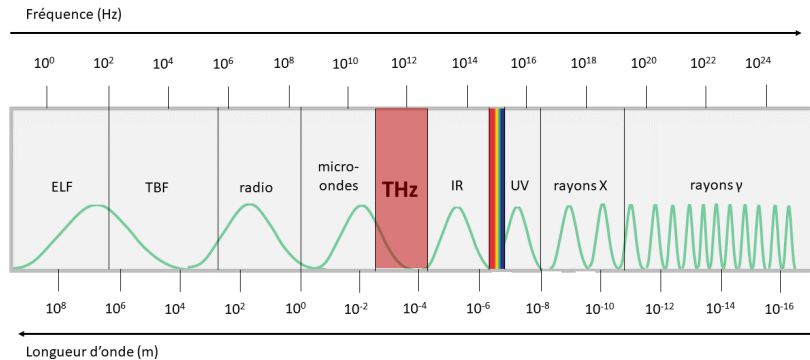


FIGURE 1.1 – Spectre électromagnétique. L'intervalle de fréquence térahertz est surligné en rouge. Il se situe entre les intervalles micro-ondes et infrarouge (IR).

1.1.0.1 Pont entre deux domaines très différents

Le domaine du THz se situe à l'interface entre deux domaines : les micro-ondes et l'IR. Cette configuration est intéressante car ces deux domaines ont des caractéristiques, des applications ainsi que des approches très différentes. Les micro-ondes vont être davantage utilisées pour des applications de télécommunication à distance (WiFi, radio), d'électronique ultra-rapide et pour la détection à distance (ondes radio). Le domaine des ondes IR penche plus vers des applications de type détection, étude de la matière et imagerie. Travailler dans le domaine THz permet d'utiliser les propriétés de ces différents domaines : utiliser la forte capacité de pénétration à travers des matériaux **diélectriques**, ou encore tirer parti des longueur d'onde encore assez faibles combinées à une diffusion plus limitée que dans l'IR.

L'énergie des photons dans la région THz permet d'étudier l'activité des **modes vibratoires** qui apparaît en dehors du champ de la **spectroscopie** IR. Ce sont des modes qui vont impliquer le mouvement de grandes sous-unités dans des molécules, en particulier les biomolécules (protéines, ADN, lipides etc...). Dans la région à basse fréquence du spectre THz, on peut observer des **modes de rotation et de torsion** des molécules gazeuses, d'une énergie supérieure à celle détectée par la spectroscopie micro-ondes [1]. Les différents modes excités selon le domaine de fréquence sont affichés figure 1.2. Les modes spécifiques dans la gamme THz incluent les déformations moléculaires à l'échelle de la molécule entière et les vibrations

des liaisons faibles. Ces liaisons faibles englobent des interactions électrostatiques telles que les liaisons de Van der Waals et les liaisons hydrogène.

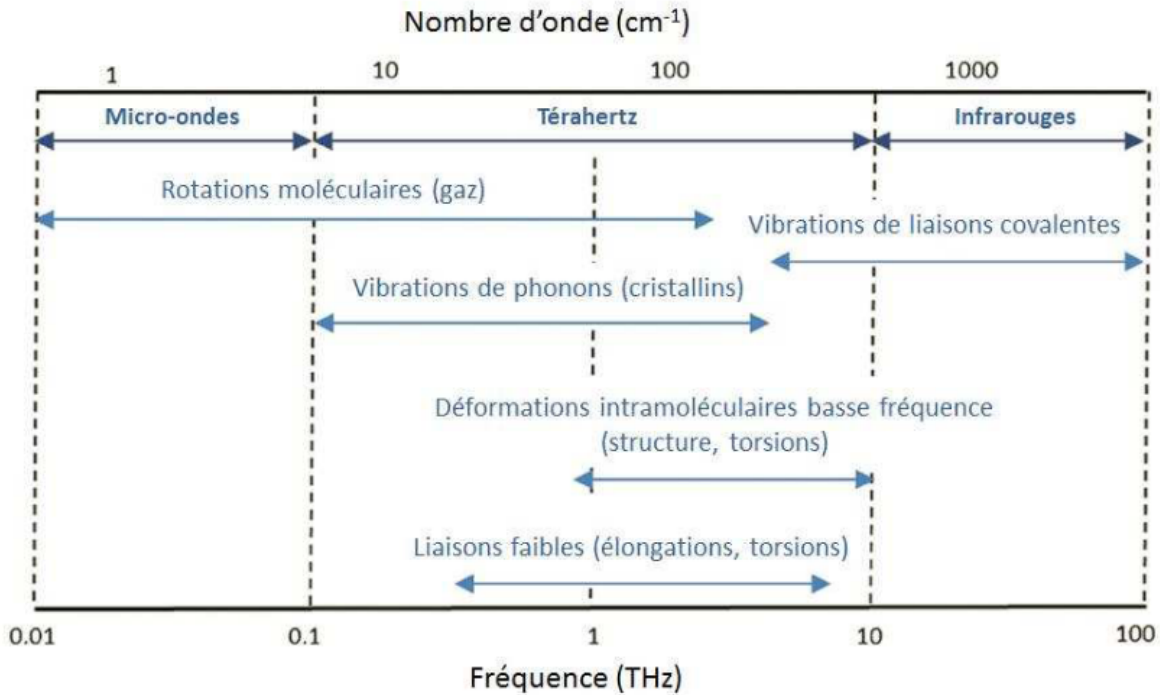


FIGURE 1.2 – Modes moléculaires selon le domaine de fréquence. Adapté de [1].

Les photons THz vont aussi exciter des porteurs libres dans des métaux et des semi conducteurs dopés, ainsi que provoquer l’alignement des dipôles dans les liquides formés de molécules polaires comme l’eau [2].

1.1.0.2 Interaction lumière - matière

Les interactions entre rayonnement THz et matière conduisent souvent à une forte absorption pour des matériaux humides ou des conducteurs électriques, tandis que les milieux diélectriques et secs seront généralement transparents. L’air sec est très transparent pour le rayonnement THz, mais la vapeur d’eau, qui montre des raies d’absorption très intenses dans l’intervalle THz perturbe cette transparence. La figure 1.3 recense les ordres de grandeur typique de l’indice de réfraction et du coefficient d’absorption de quelques familles de matériaux.

Les matériaux transparents dans le THz comme le téflon, le polyéthylène haute densité ou encore le silicium haute résistivité vont être beaucoup utilisés pour mettre en forme les faisceau THz. Le silicium haute résistivité (Si-HR) est particulièrement utilisé, du fait de sa très faible absorption. Les métaux, étant donné leur forte réflectivité en THz peuvent être utilisés comme miroirs, tout comme en optique du visible.

Le tableau suivant présente quelques caractéristiques de matériaux à une fréquence de 1 THz : l’indice de réfraction, ainsi que la longueur caractéristique d’absorption L_{abs} définie comme l’inverse du coefficient d’absorption α :

$$L_{abs} = \frac{1}{\alpha}. \quad (1.1)$$

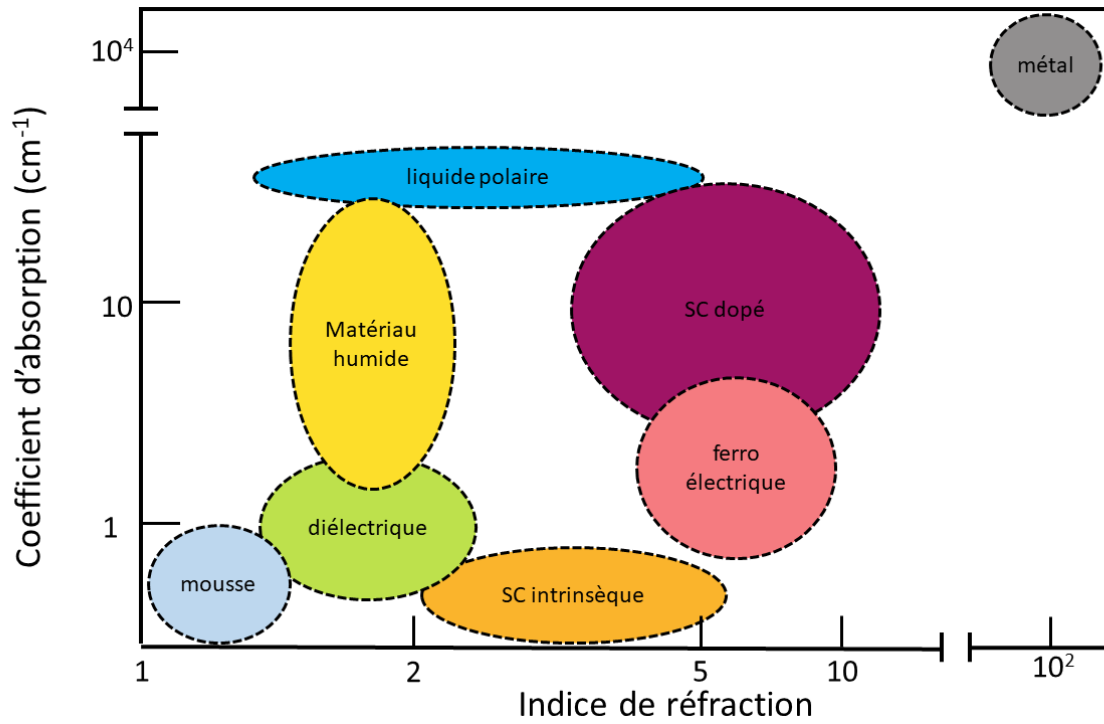


FIGURE 1.3 – Indices de réfraction et coefficients d’absorption typiques de grandes familles de matériaux dans le domaine THz. Les couleurs des catégories servent de repère pour le tableau suivant. Adaptée de [2].

Matériau	indice de réfraction moyen	L_{abs} (mm)	Référence
Eau distillée	2.2	< 0.1	[3]
Ethanol	1.5	0.1	[4]
Mousse de soie	1.06	0.9	[5]
Mousse de polystyrène	1.02	> 20	[6]
Polyéthylène haute-densité (HDPE)	1.528	18	[7]
Téflon (PTFE)	1.44	13	[7]
Papier	1.5	0.2	[8]
Silicium HR	3.41	> > 30	[7]
Germanium	4	> 10	[7]
Titanate de baryum (BaTiO ₃)	2.5	0.06	[9]
Tantalate de lithium (LiTaO ₃)	6.6	0.3	[7]
Telluride de zinc (ZnTe)	3.2	1.5	[7]
Arseniure de gallium (GaAs)	3.6	> 10	[7]
Or	447	<< 0.01	[10]
Plomb	331	<< 0.01	[10]
Essence	1.41	2.5	[7]
Benzène	1.5	1.2	[7]

TABLE 1.1 – Propriétés optiques de certains matériaux à 1 THz selon les catégories définie dans la figure 1.3.

Cette première sous-partie a permis de mettre en lumière des caractéristiques générales du rayonnement THz ainsi que certains types d’interaction avec la matière. Ces interactions sont

à la base du développement des applications dans le domaine THz.

1.2 Recueillir des informations via les ondes THz

Cette partie présente les informations qu'on peut recueillir grâce au rayonnement THz, via deux approches différentes : la spectroscopie et l'imagerie, puis introduit quelques applications qui en découlent.

1.2.1 Spectroscopie

1.2.1.1 Terahertz Time Domain Spectroscopy (THz-TDS)

La spectroscopie THz s'effectue classiquement avec un système THz-TDS. Cette technique permet de récupérer les informations de phase et d'amplitude d'une onde THz. Un laser génère une impulsion femtoseconde qui est ensuite focalisée sur une antenne photoconductrice (PCA). La PCA est polarisée avec une différence de potentiel constante. L'excitation de la PCA induit un courant transitoire de l'ordre de la picoseconde. Un champ électromagnétique térahertz E_{THz} proportionnel à la dérivée temporelle du courant transitoire $i(t)$ est généré :

$$E_{THz}(t) = \frac{\delta i}{\delta t}(t). \quad (1.2)$$

Le champ généré se propage dans l'espace jusqu'à atteindre une seconde antenne qui agit comme un récepteur. Cette seconde antenne est activée par le même laser femtoseconde, grâce à une ligne à retard qui décale les impulsions femtoseconde entre l'émission et la réception d'un temps Δt . Le signal mesuré par l'antenne réceptrice s'écrit :

$$S_{THz}(\Delta t) = \int_{-\infty}^{+\infty} E_{THz}(t)R(\Delta t - t)dt. \quad (1.3)$$

Ici, $R(t)$ est la réponse du détecteur, elle correspond au produit de convolution entre l'impulsion femtoseconde $P(t)$ et la réponse de la PCA, $D(t)$:

$$R(t) = P(t) * D(t). \quad (1.4)$$

La transformée de Fourier du signal mesuré de l'équation 1.3 est donc :

$$\tilde{S}_{THz}(w) = \tilde{E}_{THz}(w) \times \tilde{R}_{THz}(w). \quad (1.5)$$

Une acquisition via le système THz-TDS consiste concrètement à prendre deux mesures, l'une de référence sans échantillon $\tilde{S}_{ref}(w) = \tilde{E}_0(w) \times \tilde{R}_{THz}(w)$. L'autre est effectuée après passage du champ THz par un échantillon et s'écrit en fonction du coefficient de transmission complexe de l'échantillon \tilde{T}_{THz} (si le montage est en transmission) :

$$\tilde{S}_{echantillon}(w) = \tilde{T}_{THz}(w) \times \tilde{E}_{THz}(w) \times \tilde{R}_{THz}(w). \quad (1.6)$$

On a donc accès au coefficient de transmission complexe de l'échantillon en prenant le ratio des deux mesures, et donc aux informations d'amplitude et de phase. A l'interface entre deux milieux d'indices \tilde{n}_1 et \tilde{n}_2 , les coefficients de transmission et de réflexion du champ électrique sont donnée par les équations de Fresnel :

$$t_{1-2} = \frac{2\tilde{n}_1}{\tilde{n}_1 + \tilde{n}_2} \qquad r_{1-2} = \frac{\tilde{n}_1 - \tilde{n}_2}{\tilde{n}_1 + \tilde{n}_2}$$

et tels que :

$$\tilde{n}_2(\omega) = n_2(\omega) - i\kappa_2(\omega) \qquad \text{avec} \qquad \kappa_2(\omega) = \frac{\alpha(\omega)c}{2\omega}$$

Par exemple, si on estime que le faisceau THz se propage dans un milieu d'indice n_1 et traverse un échantillon d'épaisseur L et d'indice complexe \tilde{n}_2 , les équations de Fresnel à incidence normale donnent, pour une propagation du signal selon un axe z :

$$\begin{aligned} \tilde{T}(\omega) &= t_{1-2} e^{-i\omega(n_2-1)L/c} e^{-\alpha L/2} t_{2-1} \\ &= \frac{4\tilde{n}_2}{(1 + \tilde{n}_2)^2} e^{-i\omega(n_2-1)L/c} e^{-\alpha L/2}. \end{aligned} \tag{1.7}$$

Le principe de fonctionnement d'un système THz - TDS est représenté sur la figure 1.4.

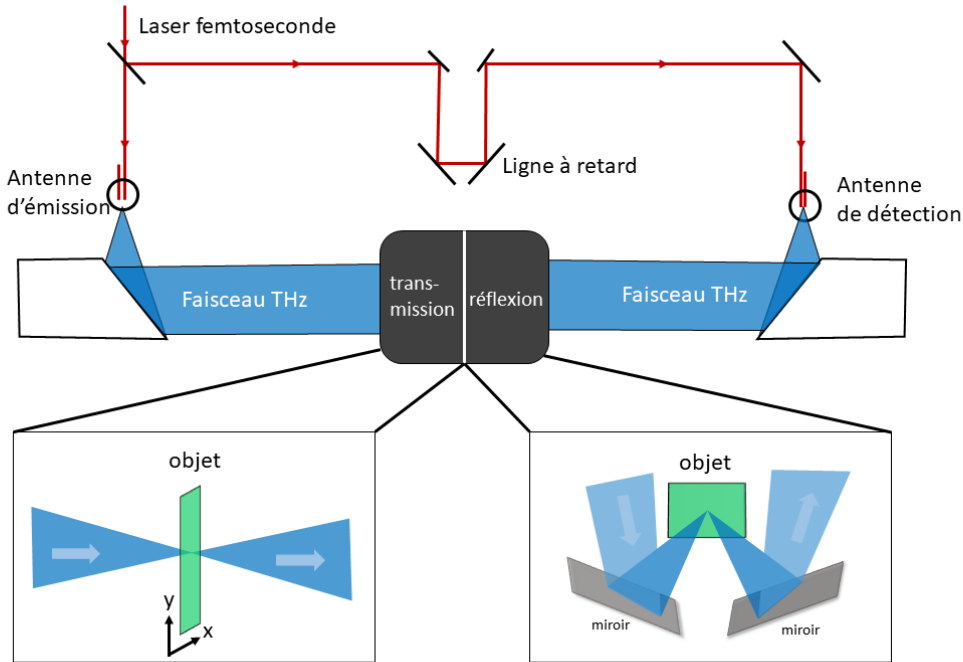


FIGURE 1.4 – Schéma simplifié d'un montage d'imagerie THz-TDS en transmission (en bas à gauche) et en réflexion (en bas à droite).

Il est possible via l'équation 1.7 de récupérer n_2 et α , l'indice de réfraction et l'absorption de l'échantillon pour un grande plage de fréquences. Ce calcul, effectué pour une configuration en transmission, peut s'effectuer de manière presque similaire pour une configuration en réflexion.

1.2.1.2 Applications

La spectroscopie émerge comme l'un des premiers domaines d'application des ondes THz. Le domaine THz est caractérisé par de nombreuses raies spectrales qui permettent d'identifier et d'analyser les matériaux. Les applications en spectroscopie THz reposent souvent sur des sources pulsées (lasers femtoseconde). D'autres sources utilisées sont notamment les diodes Gunn, les multiplicateurs de fréquence ou encore des sources basées sur les synchrotrons. L'avantage de la spectroscopie temporelle THz est qu'il est possible de récupérer à la fois l'absorption et l'indice de réfraction de l'échantillon sur l'ensemble du spectre.

Dès le début des années 90, il a été démontré que l'utilisation de sources pulsées permettait de sonder les dynamiques des porteurs de charge dans les **semi-conducteurs** [11]. Cela est dû aux signatures spectrales spécifiques des particules chargées en THz. Ce domaine s'est étendu à l'étude des supraconducteurs, mais aussi aux structures et nanostructures semi-conductrices. Les secteurs de la défense utilise ces spécificités, par exemple pour la détection d'explosifs et de drogues [12]. L'industrie pharmaceutique aussi : la spectroscopie térahertz a été utilisée pour calibrer le niveau de puissance dans des comprimés de paracétamol et d'aspirine [13].

On l'a vu, les matériaux **diélectriques** sont souvent caractérisés par une faible absorption en THz. Cette caractéristique est exploitée pour des applications notamment dans le domaine de l'art, pour des contrôles non destructifs. Fukunga et. al ont ainsi pu analyser les différents pigments composant une fresque murale historique d'Asie de l'Est [14]. Manceau et. al ont eux pu utiliser la spectroscopie THz pour différencier des vernis et des pigments [15].

L'un des grands champs d'application de la spectroscopie THz est celui des **biomolécules** et des **tissus biologiques**, développé dès les années 2000. La spectroscopie THz permet d'identifier les modes collectifs vibrationnels des molécules [16], mais aussi de différencier des conformations de protéines [17]. De plus, la forte interaction du rayonnement THz avec l'eau induit que le rayonnement va être sensible aux variations de taux d'hydratation d'un tissu par exemple.

L'une des applications est l'étude de différents tissus, et l'identification d'anomalies comme une hydratation anormale [18] ou la présence de tumeur [19]. Fitzgerald et al. ont obtenu différents spectres pour plusieurs types de tissus (peau, muscle, tissu adipeux) [20].

Une des applications principales est l'étude des biomolécules en solution. Les sucres et les amino acides vont avoir une absorption particulière dans le domaine THz [21]. Markelz et al. ont observé les modes vibrationnels de biomolécules (ADN, BSA, albumine) via la spectroscopie THz dès les années 2000 [22]. Il a été montré que le spectre THz est sensible aux différentes configurations des protéines [23] ainsi qu'à des phénomènes comme l' **hydrolyse d'une protéine** [24].

Marianne Grognot, qui a précédemment travaillé sur l'élaboration du dispositif ATR - THz, avait ainsi pu obtenir, via de la spectroscopie THz, différents contrastes de nombreux acides aminés, peptides et protéines en fonction de leur concentration (voir figure 1.5) [25].

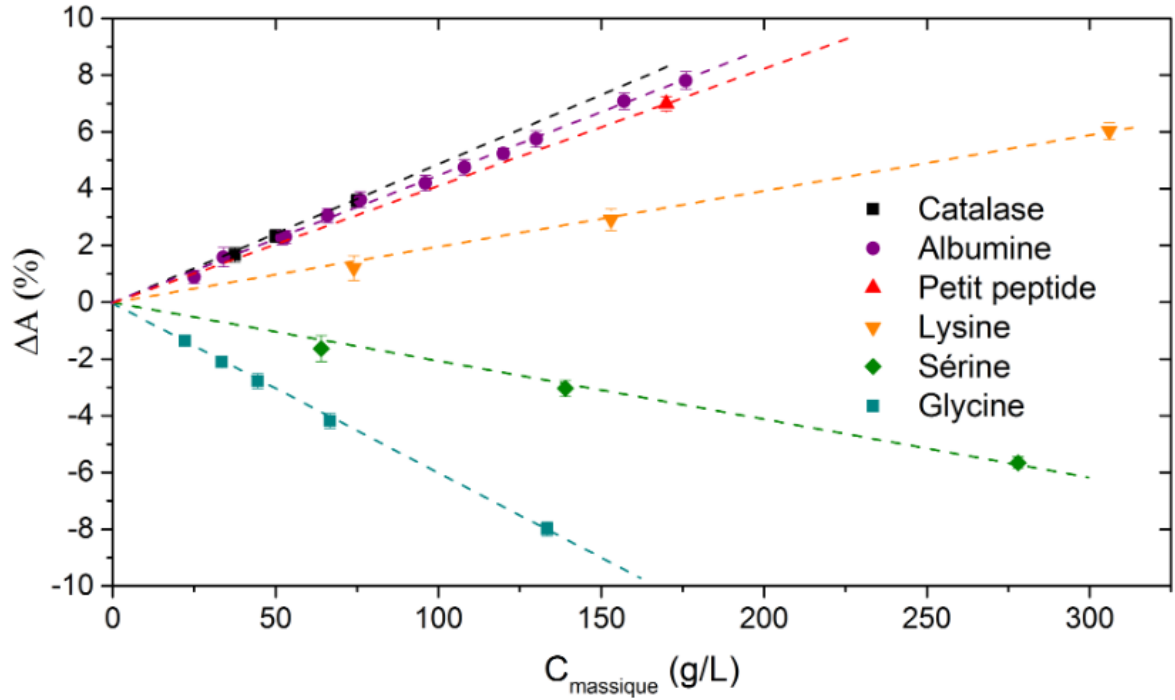


FIGURE 1.5 – Contraste en amplitude ATR pour différents acides aminés, peptides et protéines sur une gamme de concentration. Tiré de [25].

Dans le même ordre d’idée, la spectroscopie THz permet d’obtenir des informations sur les produits chimiques contenus dans les aliments [26] mais aussi de détecter les polluants présents dans l’environnement [27].

1.2.2 Imagerie

Les longueurs d’onde caractéristiques du domaine THz se situent autour de 300 μm (1 THz). En tant qu’ondes électromagnétiques, leur focalisation est limitée par la diffraction. La limite de diffraction r est définie [28], pour un faisceau de convergence θ dans un milieu d’indice n par :

$$r = 1.22 \frac{\lambda}{n \sin(\theta)}. \quad (1.8)$$

Cette résolution correspond au même ordre de grandeur que la résolution de l’œil humain. Les techniques d’imagerie THz se sont donc d’abord développées dans des contextes où des matériaux opaques dans le visible vont être transparents dans le THz. Cela concerne par exemple l’inspection de différents contenants fermés comme des enveloppes, des colis ou des bagages. La figure 1.6 montre un exemple d’imagerie dans ce contexte là.

La transparence relative de matériaux comme les fibres, les polymères ou les semi-conducteurs a entraîné le développement de nombreuses applications :

- inspection industrielle d’appareils électroniques : Kiwa et. al ont ainsi développé un microscope THz permettant de détecter des défauts dans des circuits électroniques [29].
- Sécurité (comme montré figure 1.6).

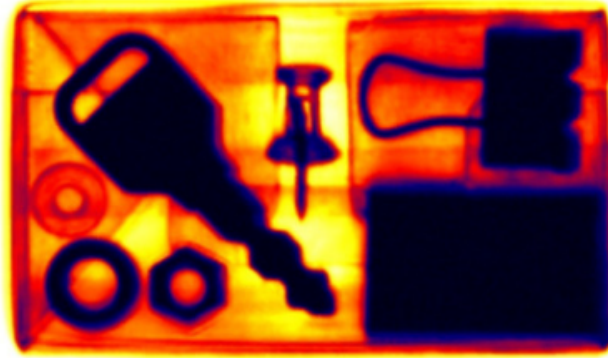


FIGURE 1.6 – Imagerie THz d’une boîte opaque dans le visible contenant plusieurs objets en métal et en plastique. On peut observer une épingle, une clé par exemple. Figure tirée de [30].

- Agro-alimentaire : Shen et al. ont mené une étude pour la détection d’impuretés dans le blé via de l’imagerie THz [31].
- Télécommunication : le THz est considéré dans le développement de la 6G, du fait de sa vitesse de transmission supérieure à 100 Gbps. Le THz permet de plus d’utiliser une bande de fréquence bien supérieure à celle de la 5G [32].
- L’astronomie : L’exploration spatiale a été un des catalyseurs initiaux du progrès dans le domaine des technologies térahertz. En effet, les ondes THz offrent la possibilité d’avoir une haute capacité de transmission. De plus, elles sont très sensibles à de nombreux composés pertinents à l’étude de l’espace. On va retrouver des signatures spectrales indicatrices de la formation des étoiles et des planètes, de l’évolution des galaxies [33]. Le rayonnement THz va en effet être plus sensible que les autres aux basses températures et aux faibles énergies, qui caractérisent par exemple les gaz des nuages interstellaires ou bien des zones dans lesquelles naissent de nouvelles étoiles massives. Ainsi, le télescope Herschel développé par l’ESA, dont le but est d’étudier la naissance d’étoiles, la formation et l’évolution des galaxies utilise des fréquences entre 0.4 THz et 5 THz [34]. La figure 1.7 montre une même image d’une région dans la Voie Lactée à 6000 années lumières de la Terre acquise à deux longueurs d’ondes différentes : l’une dans le proche IR, l’autre en THz. L’image THz donne des informations sur des zones identifiées comme des condensats de gaz et de poussières : [35]. Les images obtenues par Herschel ont de plus permis d’observer le fond diffus cosmologique (CMB), un rayonnement datant du début de l’univers et donnant des informations sur la formation et l’évolution de l’univers. Ce fond diffus a été observé entre les micro-ondes et les ondes térahertz (1 THz) [36].

L’avantage de l’imagerie THz par rapport aux ultrasons ou bien aux UV est la capacité à effectuer une mesure sans contact, ainsi que le caractère non ionisant des ondes.

Les techniques présentées ci-dessus sont inspirées des techniques d’imagerie classiques en optique. Il est donc également possible de dépasser la résolution limitée par la diffraction via notamment l’imagerie en champ proche.

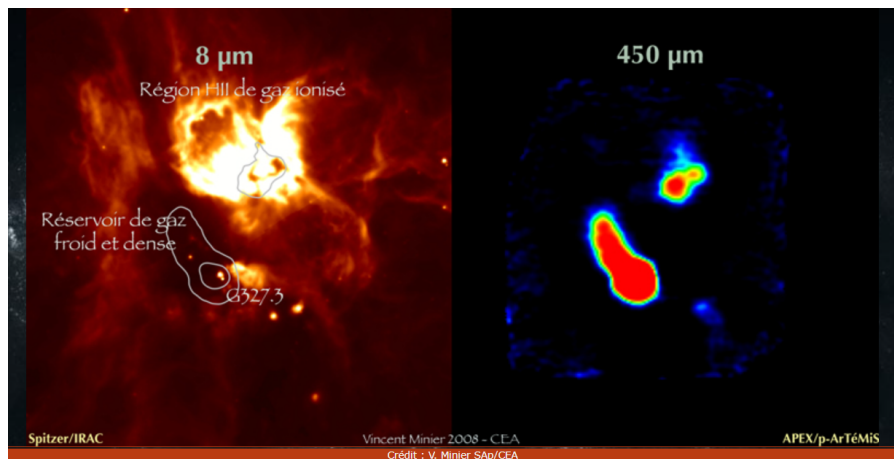


FIGURE 1.7 – À gauche : L’émission des grains de poussière du nuage moléculaire vu par le télescope spatial Spitzer dans l’infrarouge proche ($8\ \mu\text{m}$). On peut distinguer une zone sombre. Elle n’est pas vide, mais elle contient des poussières beaucoup plus froides (-260°C). À droite : la même région observée à $450\ \mu\text{m}$ ($0.7\ \text{THz}$), le domaine dans lequel les objets les plus froids sont détectés. Les zones sombres sont bien des condensations opaques de gaz et de poussière. Figure tirée de [35].

1.3 Les ondes térahertz pour étudier les milieux biologiques

Cette partie se focalise sur l’étude des milieux biologiques par les ondes térahertz, dans le but de comprendre comment ces ondes pourront étudier le contenu cellulaire. En premier lieu, nous nous intéresserons aux interactions entre les ondes térahertz et les milieux biologiques. Nous étudierons ensuite les différentes techniques d’imagerie qui ont été développées pour ce genre d’étude. Enfin, la source du contraste térahertz induit par des molécules en solution sera explicitée.

1.3.1 Interactions ondes térahertz - liquides et biomatériaux

Les milieux biologiques sont composés en majorité d’eau. Il faut donc comprendre l’interaction entre l’eau liquide et les ondes térahertz pour voir l’efficacité des ondes térahertz comme outil d’analyse des milieux biologiques.

Les molécules polaires possèdent des moments dipolaires permanents. Lorsqu’elles sont exposées à un champ électrique, elles tendent à s’aligner dans la direction du champ. Les moments dipolaires s’alignent alors dans cette direction. Les moments dipolaires se couplent avec le champ oscillant, entraînant des transitions rotationnelles et vibrationnelles des molécules. Cela induit une absorption de l’énergie du champ. Dans le domaine de fréquence THz, les liquides polaires présentent des forts coefficients d’absorption, de l’ordre de $10^4\ \text{cm}^{-1}$ (voir figure 1.3). Il est intéressant d’observer les propriétés spectroscopiques THz du liquide polaire par excellence : l’eau liquide. Son spectre électromagnétique est affiché figure 1.8.

Les propriétés électromagnétiques de l’eau dans le domaine THz sont très intéressantes. En premier lieu, la radiation térahertz correspond à la réponse diélectrique du réseau de liaisons hydrogène et aux modes de vibration basse fréquence des molécules d’eau liquides. De plus, la vue d’ensemble du spectre électromagnétique figure 1.8 nous permet d’observer que l’absorption dans cette gamme est inférieure à celle dans l’infrarouge ; que la dispersion de l’indice de réfrac-

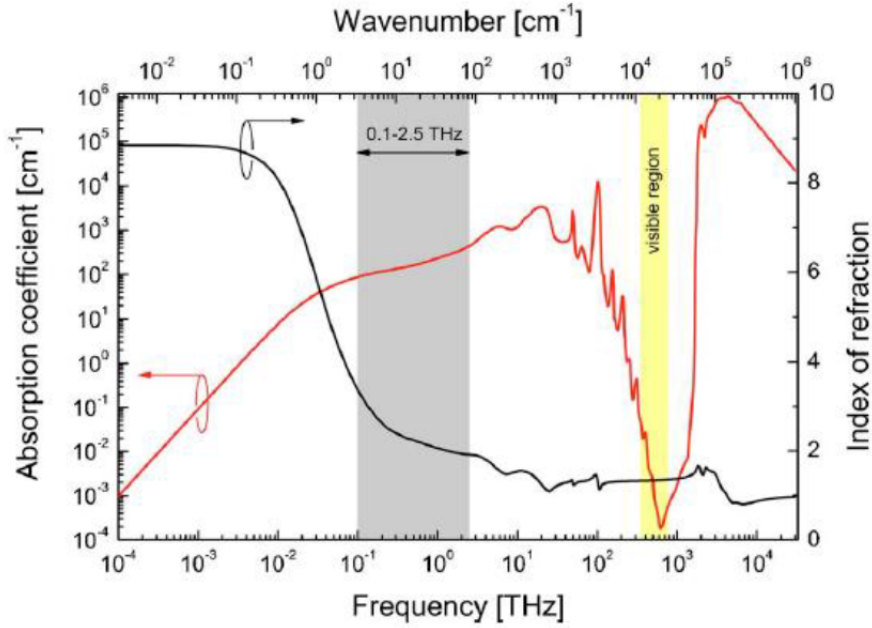


FIGURE 1.8 – Spectre de l’eau liquide : coefficient d’absorption (en cm^{-1}) sur l’axe de gauche, indice de réfraction à droite, en fonction de la fréquence. La zone en gris délimite le domaine THz. Tirée de [1].

tion reste forte (surtout comparée à celle dans la région du visible) ; et que la longueur d’onde est suffisamment petite pour permettre de faire de l’imagerie (contrairement aux micro-ondes). Ces caractéristiques, combinées à la forte interaction de la radiation THz à l’eau, est un point majeur pour le développement d’applications biologique.

Dans le cas d’un liquide polaire comme l’eau, l’interaction avec un champ électromagnétique va induire un alignement des dipôles des molécules, une polarisation. Après la disparition du champ, les molécules vont revenir dans leur état initial. Le temps requis pour ce retour est appelé le temps de relaxation. La fonction diélectrique décrit la **polarisabilité** d’un milieu. Elle est caractérisée par la permittivité diélectrique. Le **modèle de Debye** lie la permittivité ϵ d’un milieu avec les temps de relaxations τ à la fréquence ω . Il permet de modéliser l’interaction d’un champ avec un liquide polaire.

$$\epsilon(\omega) = \epsilon_{\infty} + \sum \frac{\epsilon_j - \epsilon_{j+1}}{1 + i\omega\tau_j}. \quad (1.9)$$

Dans cette équation, l’indice j fait référence à différents processus de relaxation. ϵ_{∞} fait référence à la réponse instantanée du système.

L’application du modèle de Debye de l’eau liquide dans le domaine THz montre 3 **processus de relaxation** principaux. On trouve les modes de vibration d’étirement intramoléculaires, les modes de relaxation lente et les modes de relaxation rapide. Plus précisément, les modes lents font référence aux rotations ou translation des molécules d’eau qui sont impliquées dans les liaisons hydrogènes. Les modes rapides font eux références à ces dynamiques, mais qui ne sont pas impliquées dans les liaisons hydrogènes.

Dans le cas de l’étude de l’eau liquide dans le domaine THz, les études se limitent souvent à un modèle double de Debye, en limitant les fréquences à environ 2 THz. Les temps de relaxation des modes lents et rapides sont respectivement 180.5 ± 0.6 ps et 8.6 ± 1 ps (moyenne

effectuée en utilisant les résultats de 4 études : [4, 37–39]).

Les milieux biologiques sont composés en majorité d’eau. La forte absorption observée en THz va rendre impossible la pénétration en profondeur dans les milieux biologiques. Cependant, elle se traduit aussi par de **forts contrastes** pour des milieux dont les dynamiques des molécules d’eau sont différentes.

Lorsque les molécules d’eau sont soumises à des modifications induites par exemple par l’introduction d’un soluté ou une modification de leur environnement, elles se réorganisent pour s’adapter. Cette réorganisation influence la structure des liaisons, ce qui va aussi modifier les propriétés diélectriques THz. Le modèle de Debye est souvent utilisé pour décrire ce processus. Shiraga et al. ont par exemple utilisé le modèle de Debye pour caractériser la réponse diélectrique de cellules cancéreuses (modification du mode de relaxation lent observée par rapport à de l’eau distillée) [3]. En utilisant le modèle de Debye, Tielrooij et al. ont observé que le taux d’hydratation d’une bicouche lipidique induit des modifications dans les dynamiques des molécules d’eau [40]. Ca et al. ont eux observé une modification des dynamiques d’une solution de BSA (Bovine Serum Albumin) après une protéolyse par de la pepsine [24].

1.3.2 Source du contraste térahertz

On va investiguer ici l’origine du contraste THz pour l’étude de molécules en solution. Le modèle a été développé précédemment et est décrit en détail dans l’article *Relative contributions of core protein and solvation shell in the terahertz dielectric properties of protein solutions* [41].

On peut décrire les propriétés diélectriques d’une solution par sa constante diélectrique $\tilde{\epsilon}_s = (n_s - i\kappa_s)^2$ avec n_s l’indice de réfraction et κ_s le coefficient d’extinction de la solution. Le spectre d’une solution dans le domaine THz est supposé, en première approximation, homothétique à celui de l’eau [17]. On peut donc considérer que les variations de n et κ (respectivement Δn et $\Delta\kappa$) dans une solution ont une relation de linéarité avec l’indice de réfraction et le coefficient d’extinction de l’eau brute, respectivement notés n_w et κ_w :

$$\Delta n = \delta_n C n_w \qquad \Delta\kappa = \delta_w C \kappa_w$$

où C correspond à la concentration du soluté et où δ_n et δ_w sont des coefficient relatifs d’indice de réfraction et de coefficient d’extinction. On considère qu’un soluté en solution peut être modélisé par un système à 3 couches : le soluté, une couche de solvatation qui l’entoure, et de l’eau brute (voir figure 1.9). La couche de solvatation est définie comme une épaisseur d’eau liquide dont les propriétés sont modifiées par la présence du soluté.

Pour un volume total de la solution noté V , chaque couche a un volume associé, respectivement V_p , V_s et V_w . Leurs paramètres diélectriques effectifs (n ou κ), noté x vérifient, selon [41] :

$$x_{eff} = \frac{V_p}{V} x_p + \frac{V_s}{V} x_s + \frac{V_w}{V} x_w. \qquad (1.10)$$

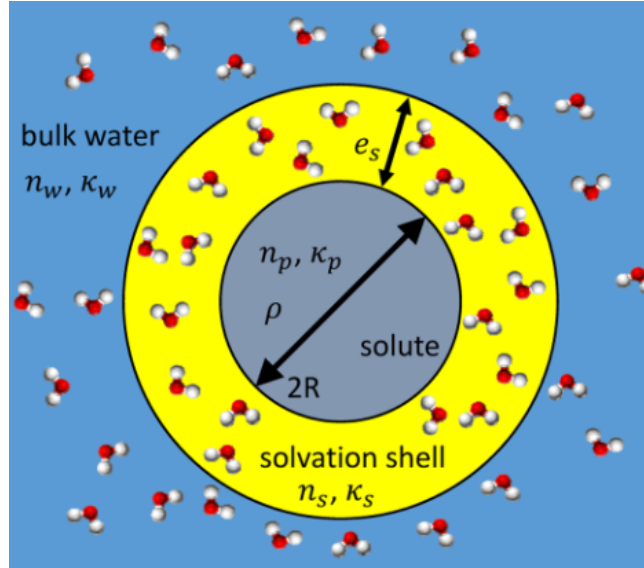


FIGURE 1.9 – Modèle à 3 couches pour une molécule dans une solution aqueuse. Toutes les couches sont caractérisées par leur indice de réfraction et leur coefficient d’extinction. Le soluté (en gris) est entouré d’une couche de solvation (en jaune). L’eau brute (en bleu) n’est pas affectée par la présence du soluté. Tirée de [41].

Les paramètres du modèle sont le rayon du soluté R , la densité de molécules ρ et l’épaisseur de la couche de solvation $e_s = 1 \pm 0.2$ nm. Ces paramètres permettent d’arriver à une expression pour les variations relatives de n et de κ :

$$\delta_x = \frac{1}{C} \frac{\Delta x}{x_w} = \frac{1}{\rho} \left(\frac{x_p}{x_w} - 1 \right) + [A_1 e_s M^{2/3} + A_2 e_s^2 M^{1/3} + A_3 e_s^3] \frac{N_A}{M} \left(\frac{x_s}{x_w} - 1 \right), \quad (1.11)$$

avec N_A le nombre d’Avogadro, M la masse molaire de la molécule, A_1 , A_2 et A_3 sont des constantes qui dépendent de ρ et de N_A . On obtient donc une relation directe entre les propriétés diélectriques et la masse molaire du soluté.

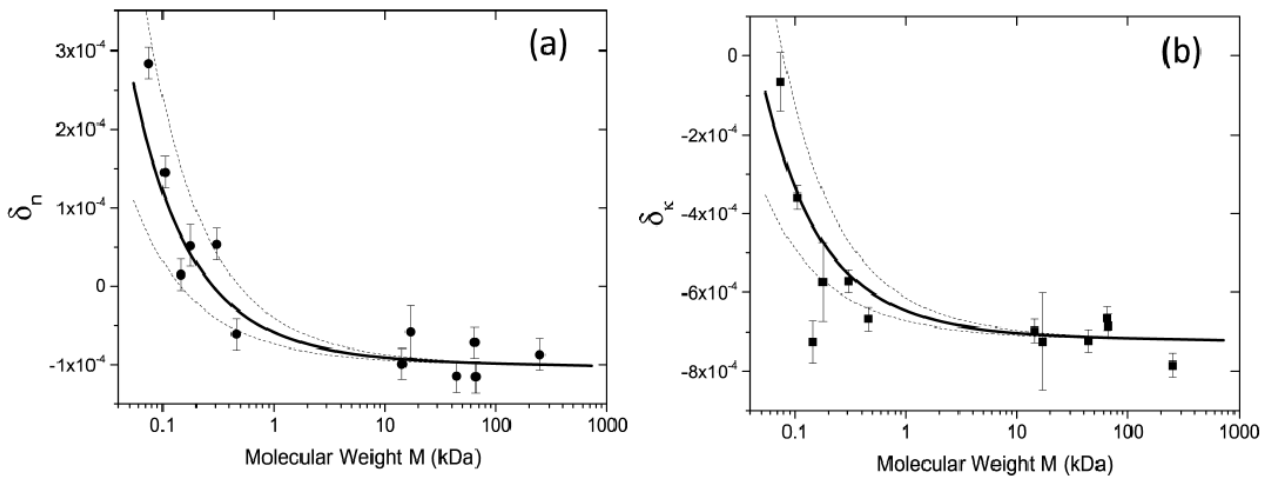


FIGURE 1.10 – Variations relatives des paramètres diélectriques de molécules en solution : δ_n (a) et δ_κ (b) en fonction du poids moléculaire du soluté. La courbe pleine correspond au modèle à 3 couches. Les courbes en pointillées correspondent à la modélisation pour les valeurs limites de e_s . Les points correspondent aux données expérimentales. Tirée de [41].

Ce modèle a été comparé à des données expérimentales obtenues via de spectroscopie THz. Pour cela, les propriétés diélectriques de plusieurs acides aminés, protéines et peptides ont été obtenues, cela pour différentes concentrations en solution [41]. La masse molaire de ces molécules étant connues, le modèle peut être utilisé. La figure 1.10 montre ainsi la combinaison des résultats expérimentaux sur l'étude de solutions de molécules de différents poids moléculaires avec les données du modèle à 3 couches.

Le contraste observé lors de l'étude d'un échantillon biologique en solution va donc principalement découler des variations de concentration de molécules en solution, ainsi que de leur poids moléculaire. C'est ce modèle que l'on va utiliser pour expliquer le contraste THz observé lors du changement de contenu cellulaire.

1.3.3 Imagerie térahertz en milieu biologique

Le térahertz, par sa forte interaction avec l'eau, et sa sensibilité aux changements de configuration de l'eau, devient un outil idéal pour les applications biologiques. L'imagerie THz en milieu biologique a donc de nombreuses applications. Différentes techniques d'imagerie ont été développées pour s'adapter aux différentes contraintes des ondes THz, comme la forte absorption de l'eau. Quelques dispositifs d'imagerie THz sont présentés dans cette sous-partie.

1.3.3.1 Les différents types de dispositifs d'imagerie

L'optimisation du contraste résultant de l'interaction entre l'onde et la matière est un critère majeur en imagerie. On l'a vu, selon le type de matière, le rayonnement THz est plus ou moins absorbé ou réfléchi. Différentes techniques ont donc été développées pour s'adapter au type d'étude.

- Imagerie en transmission

Le principe de l'imagerie en transmission est de faire traverser un échantillon par un faisceau THz focalisé. Il s'agit ensuite de déplacer l'échantillon ou le système d'imagerie afin d'obtenir une image complète de l'échantillon. Une technique courante pour l'obtention d'images THz en transmission est la TDS-THz (Time Domain Spectroscopy THz). Elle permet en effet de mesurer le coefficient d'absorption et l'indice de réfraction de l'échantillon. La figure 1.11 montre deux images obtenues pour un objet diélectrique (a) et un objet métallique (b). Dans ce cas, le contraste a été obtenu en mesurant l'amplitude maximale du signal transmis (du rouge au bleu dans le sens des amplitudes décroissantes). L'objet métallique, dont le coefficient d'absorption est très élevé dans le domaine THz, a donc une amplitude très faible.

L'imagerie THz a également été utilisée pour l'étude de milieux biologiques. Les techniques d'imagerie en transmission vont être limitées par la forte absorption de l'eau dans le domaine THz. La figure 1.12 illustre cela : la figure 1.12 (a) montre un lézard acquis par imagerie THz en transmission. Le signal est absorbé, l'imagerie ne permet pas d'obtenir des détails sur l'intérieur du lézard, juste ses contours. Cependant, la figure 1.12 (b) montre que l'imagerie d'une feuille fraîche, et donc encore hydratée, est possible. L'objet étant assez fin, le rayonnement est partiellement transmis. Les géométries de transmission sont adaptées pour l'étude d'échantillons de moins de 500 μm [42], bien que cette épaisseur dépend fortement de la longueur d'onde utilisée.

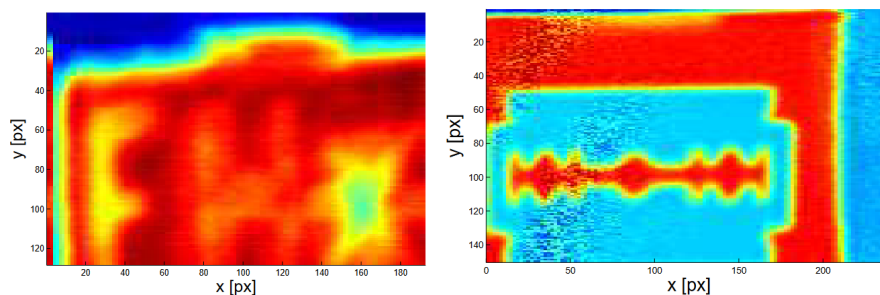


FIGURE 1.11 – Imagerie THz en transmission. (a) Feuille de papier sur laquelle est inscrit F H X. (b) Lame de rasoir dans une enveloppe opaque. Images tirées de [7].

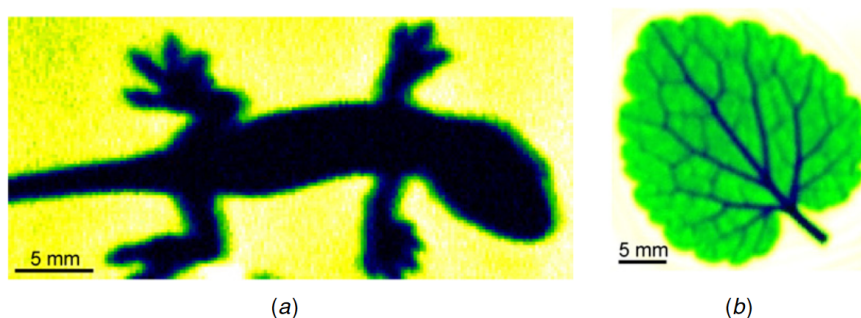


FIGURE 1.12 – Imagerie THz en transmission. (a) Lézard vivant ; (b) Feuille fraîche. Tirée de [30].

Il est aussi possible de faire des études THz en transmission sur des échantillons biologiques déshydratés ou sur des échantillons très fins, ou encore sur des échantillons congelés.

- Imagerie en réflexion

Dans ce type de configuration, nous n'analysons pas un échantillon en le faisant traverser par un faisceau THz, mais en récupérant le signal qui est réfléchi. Cela concerne des échantillons épais. Le faisceau incident est dirigé vers l'échantillon. Chaque interface de l'échantillon induit une réflexion différente. Le type d'application pour ce genre d'imagerie est l'étude de milieux biologiques en surface, comme les tissus de la peau. Cette fois, l'eau n'est pas un facteur limitant l'obtention d'un signal. Cela permet d'effectuer des mesures in vivo.

Les principes d'imagerie en transmission et en réflexion ont été illustrés figure 1.4, respectivement en bas à gauche et à droite. Le système d'imagerie représenté utilise un THz-TDS, mais le principe d'imagerie est similaire pour la plupart des systèmes.

Un facteur limitant de l'imagerie THz reste la limite de résolution définie par la tâche d'Airy. La résolution des dispositifs d'imagerie limités par la diffraction ne peut pas dépasser 100 μm environ (pour une longueur d'onde autour de 200 μm). Pour contourner la limite de diffraction, on peut utiliser des méthodes de champ proche.

- Imagerie en champ proche

Le principe d'imagerie en champ proche consiste à placer une ouverture ou un objet de

dimension inférieure à la longueur d'onde sur le trajet du faisceau, à proximité de l'objet à imager. Cette méthode permet de dépasser la limite de diffraction et d'atteindre des résolutions en dessous de la longueur d'onde. En effet, lorsqu'un rayonnement interagit avec un objet, cela va générer deux "composantes" de champ : le champ lointain va se propager, c'est ce champ qui est utilisé pour les méthodes d'imagerie classiques. L'autre "composante", le champ proche, ou évanescent, est un champ non propagatif qui existe à la surface de l'objet (sur une largeur inférieure à la longueur d'onde), et dont l'amplitude est importante à la surface de l'objet. Ce champ contient des informations de haute-fréquences.

La technique THz-SNOM (Near field scanning optical microscopy) consiste à focaliser un faisceau THz (continu ou pulsé) sur une pointe de rayon quelques dizaines de nanomètres placée près d'un échantillon. Le champ évanescent induit interagit avec l'échantillon puis avec la pointe. C'est cette interaction qui est mesurée via un détecteur placé en champ lointain. Cette détection peut s'effectuer en transmission ou en réflexion. Wang et al. ont réussi à faire de l'imagerie THz en champ proche en combinant le rayonnement THz à la technique SNOM . Ils ont pu imager des bactéries avec des résolutions de l'ordre de $0.5 \mu\text{m}$ [43]. Le point clé de ces techniques est de générer un champ évanescent au niveau de l'échantillon. D'autres techniques existent, comme le TIRF (Total internal reflection fluorescence) et l'ATR (Attenuated total reflectance). L'ATR sera décrit en détail dans la prochaine sous-partie, puisque c'est la technique utilisée pour mon dispositif expérimental.

1.3.3.2 Applications d'imagerie THz en milieu biologique

L'une des premières applications des techniques d'imagerie THz en milieu biologique est la différenciation de tissus humains [44–48]. Le contraste THz observé est en effet important. Par exemple, il a été montré que le THz est sensible à la différenciation de tissus sains et de tissus cancéreux qui sont caractérisés par une augmentation de la liberté de mouvement des molécules d'eau intracellulaire [3].

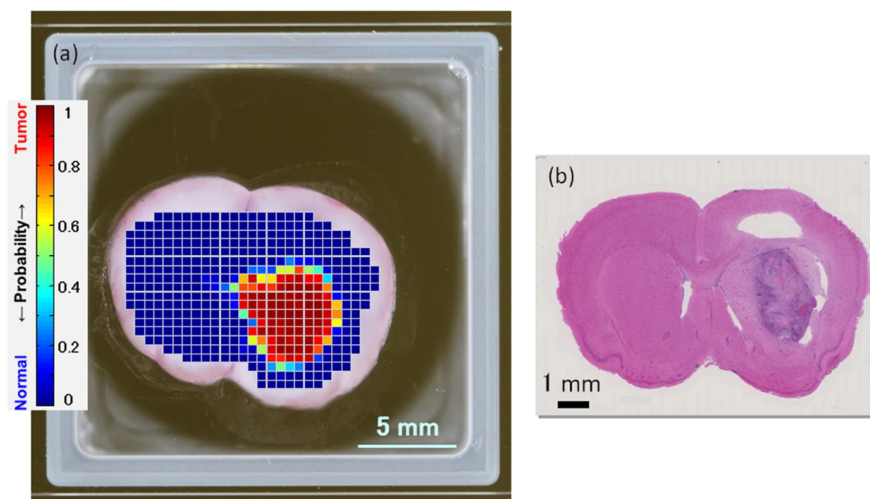


FIGURE 1.13 – Tumeur au cerveau d'un rat ; tissu frais ; images obtenues via différentes techniques. (a) Spectroscopie THz (b) marquage HE (hematoxyline et eosine). Les deux images correspondent à la même section de tissu. Sur l'image (a), la zone en rouge correspond à la présence d'une tumeur. La zone correspond à celle obtenue via le marquage (la zone violette sur la figure (b)). Tirée de [49].

La figure 1.13 montre des images obtenues via de la spectroscopie THz (a) combinée à un marquage HE (hematoxyline et eosine) (b) pour identifier une zone tumorale sur un cerveau de rat [49].

Les tissus cancéreux sont beaucoup étudiés en imagerie THz, notamment les cancers du rein [50], du cerveau [51], du sein [52], de l'intestin [53] et de la peau [54]. Ce sont principalement des cancers atteignant des tissus épithéliaux, donc en surface, ce qui permet de contourner le problème d'absorption par l'eau.

Une autre application d'imagerie THz en biologie est l'imagerie de dents. L'apparition de caries dans une dent serait liée à une déminéralisation de la zone, auquel le signal THz est sensible. Kamburoglu et al. ont par exemple utilisé une approche TPI (THz pulse imaging) pour détecter la présence de caries dans une dent. Ils ont comparé leurs résultats avec des techniques classiques de radiologie. Ils ont conclu que la TPI montre de bonnes performances comparée aux autres techniques, en terme d'identification des caries [55].

1.4 Dispositif ATR - THz

Cette partie présente le dispositif utilisé ATR - THz. Son but est d'étudier les changements de contenus cellulaires. On a montré que les ondes THz avaient un fort contraste induit par les modifications de concentration de molécules en solution. De plus, on sait qu'on peut étudier des objets de taille inférieure à la longueur d'onde THz grâce à des techniques de champ proche. Cette partie explique comment le dispositif ATR - THz a été conçu [56], de manière à exploiter les avantages et les contraintes du rayonnement THz dans le but d'optimiser le contraste résultant de modifications du contenu cellulaire. En premier lieu, la géométrie et les composants du dispositif sont introduit. Puis, on décrit comment un faisceau THz se propage. On explique ensuite les principes de configuration ATR et d'onde évanescente, qui sont des points clés du dispositif. Enfin, on montre comment ce dispositif peut être utilisé pour étudier les dynamiques de perméabilisation des cellules avec quelques résultats clés du groupe.

1.4.1 Conception du dispositif ATR - THz

Le dispositif global

Le dispositif ATR-THz repose sur une géométrie ATR (Attenuated Total Reflectance) combinée à une source QCL (Laser à cascade quantique – Quantum Cascade Laser) continue (TeraCascade 1000, Lytid) à 2.5 THz et quelques mW de puissance continue. La figure 1.14 présente le fonctionnement global du montage. L'ensemble de la propagation du faisceau THz, dès la sortie du QCL, s'effectue dans une enceinte isolée de l'extérieure et thermalisée, connectée à une entrée d'air sec. Cela permet de limiter le taux d'humidité à moins de 0.1% pendant la propagation, et donc les interactions avec la vapeur d'eau présente dans l'air. De plus, cela limite l'influence des fluctuations de température de la pièce sur le faisceau. Le rayonnement THz est émis du QCL de manière très divergente, puis collimaté par une lentille en silicium HR de diamètre et de focale 38.1 mm. Il se propage jusqu'à un hacheur mécanique dual. Ce hacheur mécanique a deux intérêts : une modulation en fréquence nécessaire pour obtenir une mesure du signal via le capteur pyroélectrique. De plus, nous utilisons un hacheur à deux "étages" qui module différemment les deux moitiés du faisceau. L'un des faisceaux sert à sonder un échantillon, l'autre à sonder un espace de référence. Nous utilisons l'espace de référence pour normaliser

notre signal réfléchi. Le faisceau THz est ainsi "divisé" spatialement en deux faisceaux modulés selon des fréquences différentes : une à 165 Hz, l'autre à 135 Hz. Ces deux faisceaux se propagent et atteignent un prisme orienté à 54° selon l'axe de propagation du faisceau. Le prisme est maintenu en permanence à 37°C grâce à un module Peltier. Le prisme est en silicium à haute résistivité (HR-Si), un matériau d'indice de réfraction $n = 3.41$ à 2.5 THz. Nous sommes en configuration ATR, donc si aucun élément absorbant n'est posé à la surface supérieure du prisme, le faisceau THz va y être entièrement réfléchi. Une onde évanescente, décrite en détail dans la sous-section 1.4.5, se forme néanmoins à l'interface supérieure du prisme avec le milieu extérieur. L'énergie du signal réfléchi dépend de l'énergie de cette onde évanescente qui dépend elle-même de la permittivité relative du milieu extérieur. Les signaux THz sont donc réfléchis et se propagent jusqu'à une lentille en silicium HR de diamètre et de focale 25 mm qui focalise le faisceau sur un capteur pyroélectrique placé en sortie. Ce capteur est connecté à deux amplificateurs à détection synchrone (Lock-in) dont les fréquences de références sont celles utilisées pour la modulation via le hacheur mécanique. On récupère donc le signal réfléchi pour chacun des deux signaux et les données sont récupérées sur l'ordinateur, avec un temps d'acquisition de 300 ms. Les lentilles utilisées dans le système ont un revêtement anti-reflet à 2.5 THz.

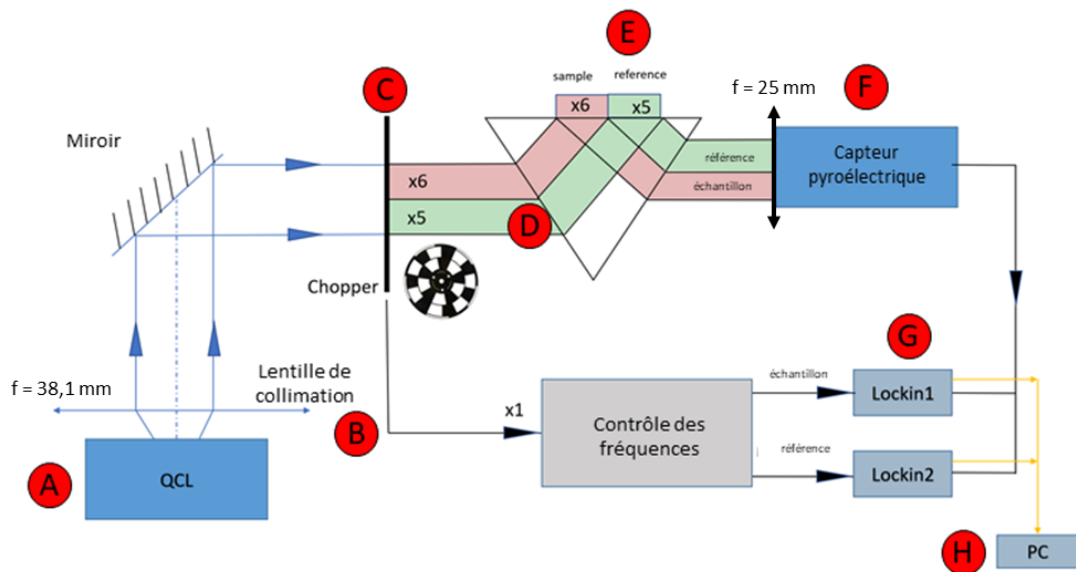


FIGURE 1.14 – Dispositif ATR - THz. Une source THz de type QCL émet un faisceau à 2.5 THz (A). Il est collimaté par une lentille en silicium placée à la sortie du QCL (B). Le faisceau se propage jusqu'à un hacheur mécanique à double fréquence. Le disque est une vue de face (C). Les deux faisceaux différemment modulés en fréquence se propagent et atteignent le prisme (D). Du fait de la configuration ATR, l'onde évanescente se forme à l'interface supérieure du prisme avec le milieu extérieur (E). Les faisceaux THz réfléchis atteignent le capteur pyroélectrique placé en sortie (F). Le capteur est connecté aux Lock-ins (G), le signal est ensuite transmis à l'ordinateur (H).

Les échantillons, des cellules épithéliales, sont cultivées sur des lames de silicium. Une lame de silicium est donc placée au dessus de la surface du prisme. La lame et le prisme sont liés par un liquide d'indice, le α - pinène (P45702, Sigma-Aldrich), de coefficient d'absorption $1,5 \text{ cm}^{-1}$ et d'indice 1,66 [57]. Il n'y a donc pas d'air entre la lame et le prisme. Ainsi, l'onde évanescente induite par la configuration ATR se forme à la surface de la lame, au niveau des cellules. Lorsque le contenu cellulaire est modifié, la permittivité du milieu varie, et, comme vu précédemment, le signal THz fluctue. La mesure finale est le ratio entre le signal de référence et le signal de la zone avec les cellules. On obtient donc une mesure relative. L'objet d'étude du dispositif THz - ATR est un tapis cellulaire à confluence cultivé sur la lame. La zone sondée au niveau des cellules correspond à une surface d'environ 80 mm^2 . Les mesures sont donc une moyenne des dynamiques de dizaines de milliers de cellules.

Le laser à cascade quantique (QCL)

Le laser utilisé est un TeraCascade 1000 de Lytid qui émet à 2.5 THz. Dans le cas d'une laser semi-conducteur (SC), la structure de base est un semi-conducteur comprenant deux bandes d'énergie : la bande de valence et la bande de conduction. Un photon est émis lorsque un électron se désexcite de la bande de conduction à la bande de valence. La longueur d'onde du photon émis dépend directement de l'énergie de gap entre les deux bandes, et donc du semi-conducteur utilisé. Les longueurs d'onde émises classiques vont de 405 nm (InGaN) à 1550 nm (InGaAsP). Plus on veut émettre vers des longueurs d'onde élevées, plus le gap d'énergie entre les bandes doit être étroit. Cela limite l'application de cette méthode pour l'émission en THz.

Le fonctionnement d'un QCL repose sur les transitions inter-sous-bandes d'une structure de semi-conducteurs. Il est possible de structurer des matériaux en puits quantiques. Si on place 3 semi-conducteurs successivement tels que le semi-conducteur du milieu a une énergie de gap très faible, et les deux semi-conducteurs qui l'entourent ont une énergie de gap très importante, on se retrouve dans une configuration de puit quantique pour le semi-conducteur du milieu (de taille entre 1 et 10 nm typiquement). Dans ce cas, plusieurs niveaux d'énergie peuvent être quantifiés dans une même bande (valence ou conduction). Ce sont les sous-bandes. Le principe du QCL repose sur des transition d'énergie radiatives d'électrons entre ces sous-bandes. En effet, l'énergie du photon émis sera bien inférieure à celle d'une transition inter-bande d'un laser classique. Un QCL peut être divisé en deux zones principales : la zone active et la zone d'injection. Ces zones se succèdent. Elles sont représentées sur la figure 1.15. Le processus d'émission radiative se produit dans la zone active, entre les niveaux 3 et 2. Les électrons se propagent par effet tunnel entre les zones actives et les zones d'injection. Les zones d'injection sont faites telles que l'énergie à laquelle les électrons sont "tunnellisés" correspond à celle de la sous-bande maximale de la prochaine zone active. Le terme "cascade" utilisé dans la dénomination du laser fait référence au passage des électrons de zone active en zone d'injection (et donc d'émission d'un photon) qui se répète de nombreuses fois. Plus le nombre de cascade est élevé, plus le nombre de photons émis est important [58].

Les QCLs peuvent couvrir des larges gammes de fréquences, du domaine de l'infrarouge moyen (4 à 10 μm) jusqu'au domaine THz (50 à 250 μm). Les énergies nécessaires pour atteindre un rayonnement THz sont extrêmement basses (de l'ordre de la dizaine de meV). L'une des caractéristiques importantes des QCLs va donc être la température des composants, qui va devoir être minimale afin de limiter l'énergie d'agitation thermique.

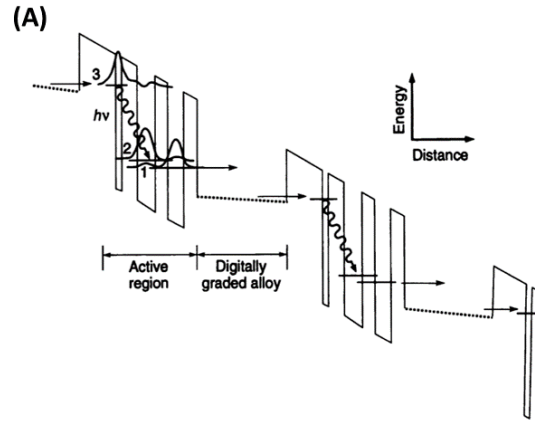


FIGURE 1.15 – Diagramme de la structure énergétique des bandes de conduction d'un QCL, en deux zones : la région active et l'injecteur. Figure tirée de [58].

Les challenge actuels du développement des QCLs sont la puissance de sortie, la plage de fréquence, ainsi que la remontée de la température, dans le but à long terme de pouvoir travailler à température ambiante [59].

Le capteur pyroélectrique

Le capteur pyroélectrique utilisé est le TeraPyro de Lytid. Le fonctionnement d'un capteur pyroélectrique repose sur la propriété de certains cristaux à générer une tension électrique en réponse à un changement de température. Un faisceau incident va induire une variation de température sur le cristal. Cela provoque un réarrangement transitoire de la structure du réseau cristallin et donc une modification de sa polarisation. En plaçant deux électrodes de chaque côté du cristal, on peut mesurer un courant électrique directement liée à l'intensité du faisceau incident. La mesure dépend donc directement d'une variation de température du signal incident. Pour l'obtenir, une modulation du signal est effectuée en amont, grâce à un hacheur mécanique. La figure 1.16 montre le schéma d'un capteur pyroélectrique. Un revêtement est placé autour du cristal. Le but est de maximiser l'absorption du signal incident par le revêtement. Cela va permettre d'augmenter la sensibilité du capteur par rapport à des variations de température faibles et donc d'obtenir une meilleure précision de mesure.

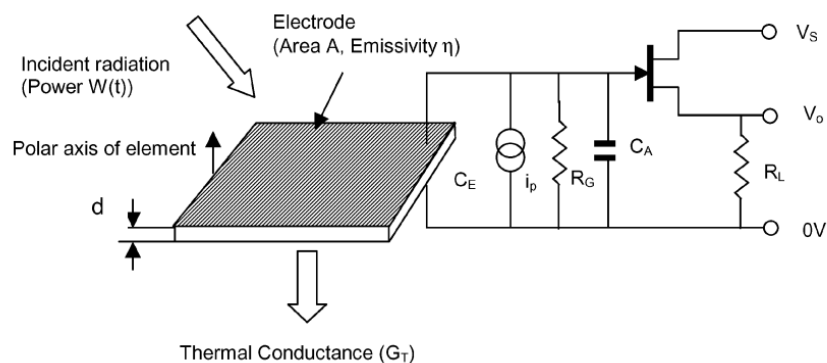


FIGURE 1.16 – Schéma d'un capteur pyroélectrique [60].

Cette sous-partie a permis de comprendre le fonctionnement global du dispositif, ainsi que de la source et du détecteur utilisés. Nous allons nous intéresser dans la sous-partie suivante à la propagation du faisceau térahertz et aux propriétés de la configuration ATR plus en détail.

1.4.2 Caractérisation et amélioration de la stabilité

Lors de sa propagation, le faisceau THz parcourt une distance d'environ 300 mm dans l'air libre. On a en effet vu précédemment que l'absorption des ondes THz par les molécules d'eau est forte. L'humidité présente dans l'atmosphère impacte donc fortement le signal. De plus, les variations de température de l'atmosphère ont une influence directe sur le taux d'humidité ambiant. La limitation des variations de température et d'humidité est nécessaire pour une propagation stable du faisceau THz. L'ensemble du système a d'abord été placé dans une enceinte thermalisée. La corrélation entre le signal THz et les variations de température est affichée sur la figure 1.17 (A). L'ajout d'une arrivée d'air sec dans l'enceinte permet de limiter le taux d'humidité à 0.1% sur l'ensemble de la propagation du faisceau. La figure 1.17 (B) montre la corrélation entre le signal THz et la température ambiante après avoir limité le taux d'humidité. Les différentes courbes correspondent à 11 acquisitions différentes de 30 minutes chacune. La corrélation reste similaire sur le long terme.

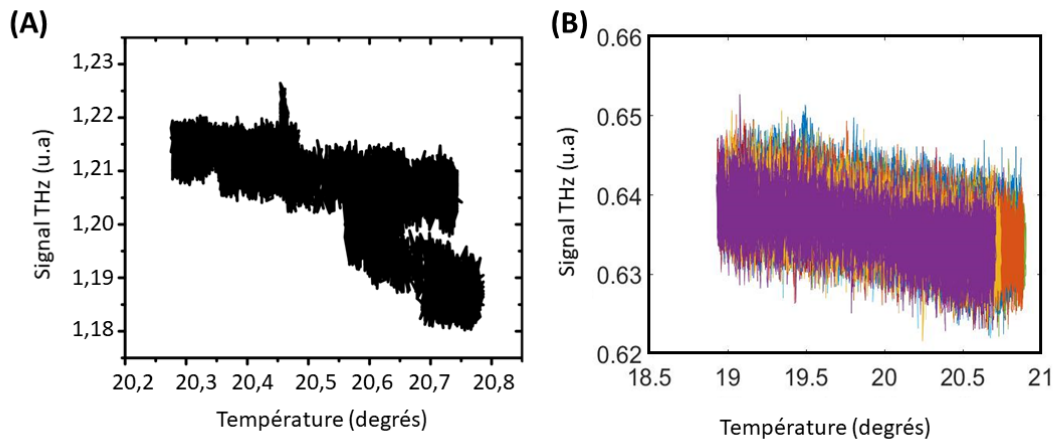


FIGURE 1.17 – Corrélation entre le signal THz et la température ambiante : (A) pour une propagation du faisceau dans une enceinte thermalisée ; (B) pour une propagation du faisceau dans une enceinte thermalisée où le taux d'humidité est inférieur à 0.1%.

Simultanément, le dispositif a été modifié : le trajet optique a été raccourci en retirant des composants optiques. De plus, l'accès à l'échantillon a été modifié : le dispositif précédent nécessitait l'ouverture de l'enceinte thermalisée lors des expériences. Désormais, la surface du prisme n'est plus incluse dans l'enceinte (voir figure 1.18).

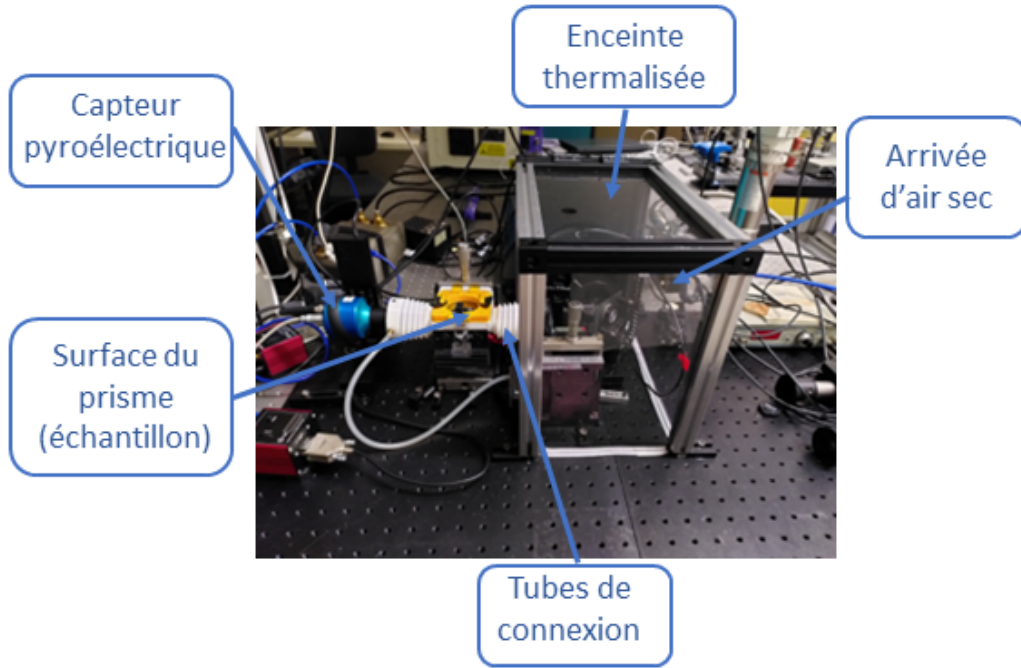


FIGURE 1.18 – Dispositif permettant de limiter les variations de température et d’humidité sur le trajet optique du faisceau THz.

1.4.3 Propagation du faisceau THz

Les ondes térahertz sont caractérisées par de grandes longueurs d’ondes et donc par une forte diffraction à l’échelle millimétrique. On peut, selon l’environnement de la propagation, modéliser son comportement différemment. Cette sous-partie montre comment on peut modéliser un faisceau THz qui se propage dans l’air selon une approche gaussienne. Puis, on montre comment nous avons dû caractériser notre faisceau avec les contraintes du dispositif ATR - THz.

1.4.3.1 Propagation d’un faisceau sans obstacles

Le faisceau THz émis par la source QCL est cohérent. Du fait de la diffraction importante, il est difficile d’estimer comment il se propage. On fait l’approximation que le faisceau se propage de manière quasi-gaussienne. Un faisceau parfaitement gaussien se propage avec une distribution en intensité qui suit l’équation suivante :

$$I(r) = I_0(z)e^{-\frac{r^2}{w^2(z)}}, \quad (1.12)$$

avec w le rayon du faisceau qui suit l’équation suivante :

$$w(z) = w_0 \sqrt{1 + \left(\frac{z}{z_R}\right)^2}, \quad (1.13)$$

avec w_0 la valeur minimale du rayon du faisceau. z_R est défini comme la distance de Rayleigh, la distance pour laquelle w_0 a été multiplié par un facteur $\sqrt{2}$. Il donne un ordre de grandeur sur la distance pour laquelle on peut considérer le diamètre du faisceau comme à peu près constant. La distance de Rayleigh et la divergence du faisceau θ s’expriment respectivement par :

$$z_R = \frac{\pi w_0^2}{\lambda} \quad \text{et} \quad \tan(\theta) = \frac{\lambda}{\pi w_0}. \quad (1.14)$$

Ces différents paramètres sont représentés sur la figure 1.19.

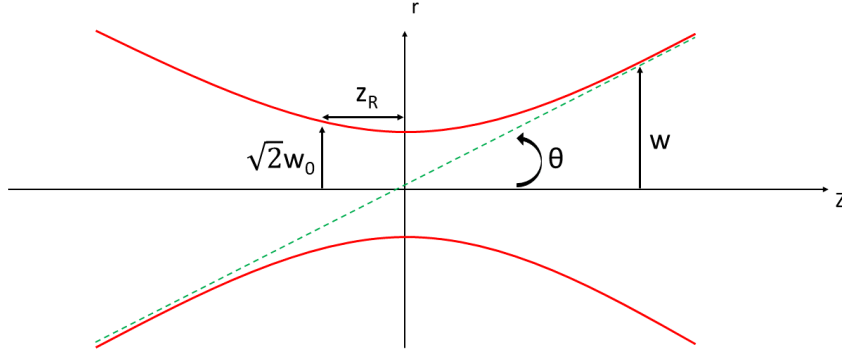


FIGURE 1.19 – Propagation et largeur d'un faisceau gaussien.

1.4.3.2 Propagation du faisceau en présence d'obstacles

Pour caractériser la propagation du faisceau en présence d'obstacles, on peut déterminer le nombre de Fresnel F relatif au dispositif. Ce nombre va en effet renseigner si on se situe dans le régime de champ lointain (Fraunhofer et $F \ll 1$) ou de champ proche (Fresnel et $F \geq 1$). Ces deux régimes décrivent les différentes manières dont la diffraction agit, en fonction des paramètres du système comme la taille de l'objet diffractant, la distance entre la source et l'objet diffractant, et le plan image. Le régime de Fresnel caractérise les systèmes où les distances mentionnées sont courtes par rapport à la longueur d'onde, ou bien que la longueur d'onde est du même ordre de grandeur que l'objet diffractant. Dans ce régime, on peut considérer que chaque élément du plan du front d'onde se comporte comme source d'une onde parabolique. Le régime de Fraunhofer caractérise les systèmes pour lesquels la longueur d'onde est petite par rapport à la taille de l'objet diffractant et des distances mentionnées. Dans ce régime, aussi appelé diffraction à l'infini, les ondes peuvent être considérées comme planes. Le nombre de Fresnel F est sans dimension et s'exprime par :

$$F = \frac{a^2}{L\lambda}, \quad (1.15)$$

avec a la taille caractéristique de l'ouverture, L la distance de l'ouverture jusqu'au plan image et λ la longueur d'onde. Dans notre cas, $a = 25 \text{ mm}^2$, $L = 40 \text{ cm}$ et $\lambda = 120 \text{ }\mu\text{m}$, et $F \simeq 11,5$. Le faisceau est donc en diffraction de Fresnel. La modélisation du faisceau est compliquée dans ce régime, car il y a beaucoup de diffraction, ce qui entraîne une forte modification de la forme du faisceau au cours de la propagation.

1.4.3.3 Caractérisation de la propagation du faisceau THz après division spatiale

L'une des particularités du dispositif est la division spatiale du faisceau en deux parties à l'aide du hacheur mécanique. Il y a deux critères à prendre en compte lors de la propagation

des faisceaux générés : la répartition spatiale et l'intensité. On s'émancipe de l'intensité via la normalisation. La répartition spatiale doit, elle, être contrôlée. On doit notamment s'assurer que les deux faisceaux débordent le moins possible l'un sur l'autre, ce qui nuirait au contraste lors des mesures. De plus, il faut s'assurer de la compatibilité entre la taille du faisceau avec la taille de la lame de silicium sur laquelle sont posés les échantillons. La propagation du faisceau THz a donc été caractérisée après le hacheur mécanique, sur 250 mm. En effet, le trajet optique entre le chopper mécanique et la surface du prisme est d'environ 185 mm. Pour caractériser le faisceau, le capteur pyroélectrique a été placé derrière le chopper. Un diaphragme de diamètre 2 mm est placé devant le capteur. Le capteur est placé sur deux platines de translation (MTS50-Z8 Thorlabs) de répétabilité bidirectionnelle $1.6 \mu\text{m}$ qui permettent d'effectuer un scan du faisceau via un déplacement dans le plan XY selon les axes définis sur la figure 1.20. Le scan d'un profil de $14 \times 14 \text{ mm}^2$ s'effectue en ≈ 2 minutes.

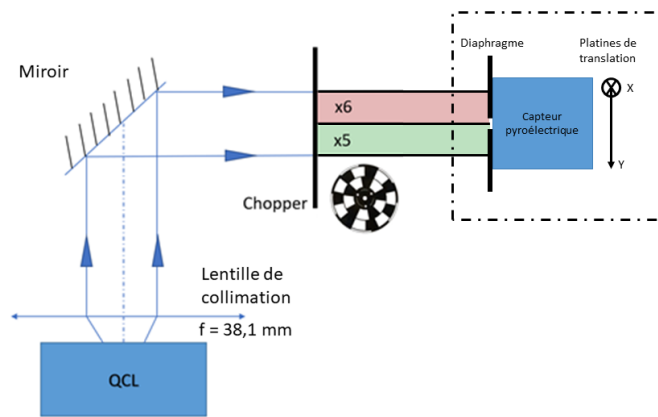


FIGURE 1.20 – Schéma simplifié du dispositif utilisé pour la caractérisation du faisceau dans un plan XY en plaçant un diaphragme devant le capteur pyroélectrique. Le rectangle en pointillé désigne l'ensemble des composants qui sont déplacés via les platines de translation.

Via ce système de balayage, on obtient les profils successifs du faisceau THz en fonction de la distance au hacheur mécanique. Un exemple de profils est affiché sur la figure 1.21 B. Grâce à une interpolation des différents profils, on obtient la propagation du faisceau sur environ 250 mm (voir figure 1.21 A). On observe que les deux faisceaux formés par le hacheur sont bien séparés physiquement sur l'ensemble du trajet. Leurs centroïdes sont espacés de presque 10 mm. Les premiers profils, proches du chopper, montrent une forme elliptique du faisceau THz, due à la diffraction des bords. Ce profil elliptique tend, au bout d'environ 150 mm vers une forme circulaire pour laquelle les demis grand et petit axes se stabilisent autour de 5 mm (voir figure 1.21 C). On en déduit que quand il atteint le prisme, le faisceau est de forme circulaire avec un diamètre de 10 mm. Lorsque le prisme est ajouté au dispositif, un facteur de projection entre en compte, et la surface sondée atteint 201 mm^2 par faisceau. La lame de silicium sur laquelle reposent les échantillons fait une surface de 700 mm^2 . Les deux faisceaux peuvent donc sonder chacun une partie de moitié de lame.

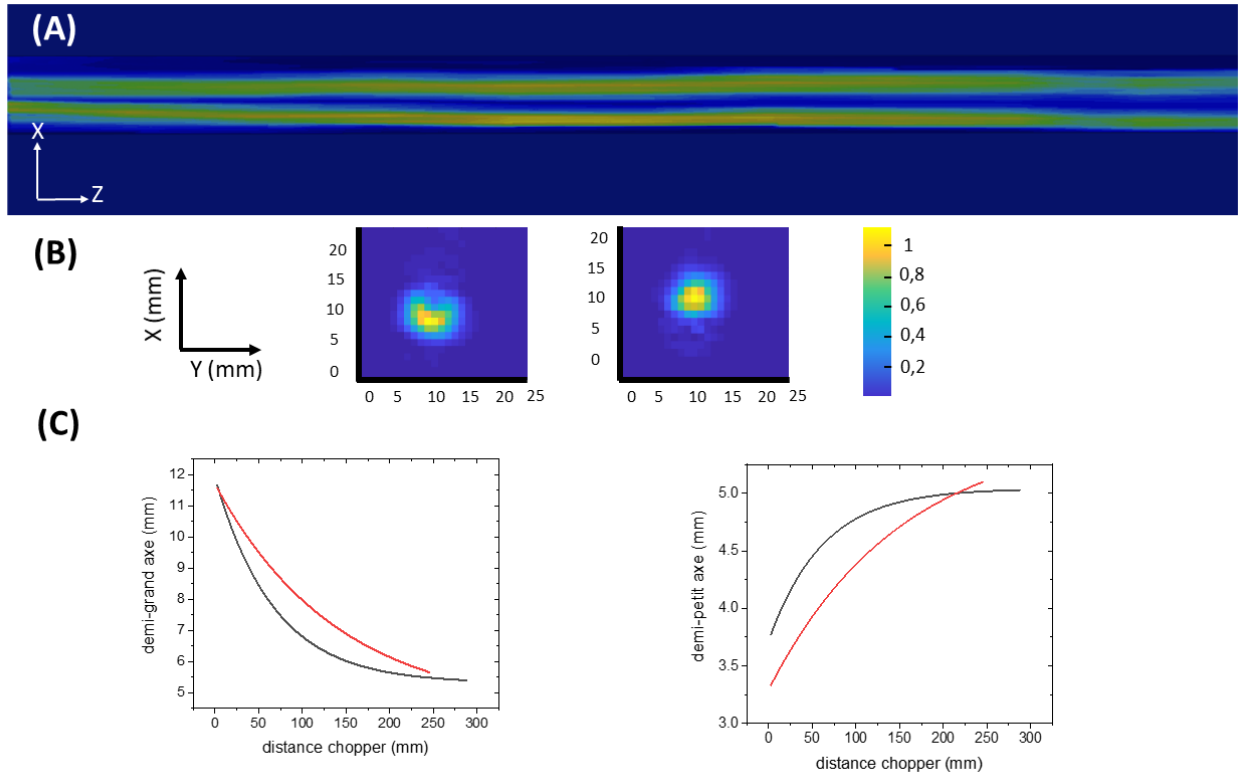


FIGURE 1.21 – Caractérisation de la propagation du faisceau THz après le chopper mécanique sur environ 250 mm. (A) : Vue latérale dans le plan XZ de la propagation du faisceau. Le faisceau en sortie du QCL est divisé en deux parties via la modulation du hacheur. Les deux faisceaux se propagent parallèlement et restent bien séparés. (B) Vue transversale dans le plan XY des deux faisceaux. Les profils sont acquis selon un balayage XY. Le capteur pyroélectrique ainsi que le diaphragme placé devant sont déplacés selon l’axe Z après chaque balayage. (C) Evolution de respectivement le demi-grand axe selon X et le demi-petit axe selon Y (mm) du faisceau THz en fonction de la distance du capteur pyroélectrique par rapport au chopper mécanique. En rouge, le faisceau modulé x5 ; en noir le faisceau modulé x6.

La caractérisation de la propagation du faisceau THz montre de forts effets induits par la diffraction. Elle montre aussi que le dispositif est adapté pour l’étude d’échantillons placés sur le prisme.

1.4.4 Comparaison de liquides d’indice

Lorsque le faisceau atteint la surface de la lame, il a précédemment traversé l’interface prisme - lame. Si le contact optique entre ces deux surfaces n’est pas parfait, des réflexions parasites auront lieu, induisant des pertes d’énergie. Le liquide d’indice est placé entre la surface supérieure du prisme et la surface inférieure de la lame, pour assurer un contact optimal. La figure 1.22 montre la configuration au niveau du prisme, avec un faisceau THz réfléchi avant d’atteindre la lame (en bleu), un faisceau réfléchi après avoir atteint la surface de la lame (en vert), et enfin, un faisceau réfléchi à l’interface prisme-lame après avoir atteint la surface de la lame (en orange). La première et la dernière réflexion sont des réflexions parasites à éviter et limiter.

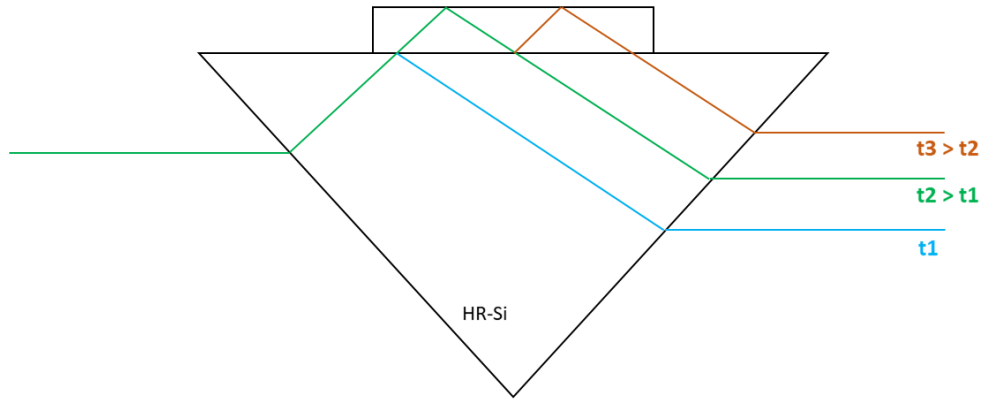


FIGURE 1.22 – Propagation du faisceau THz dans le prisme HR-Si lorsque la lame de HR-Si est posée dessus. 3 réflexions sont représentées : en bleu le faisceau est réfléchi à l’interface prisme-lame ; en vert, le faisceau est réfléchi après avoir atteint la surface de la lame ; en rouge, le faisceau est la continuité du faisceau vert, mais subit une réflexion à l’interface prisme-lame.

Le contact optique est optimal lorsque le liquide d’indice a les mêmes propriétés (indice de réfraction et coefficient d’absorption) que les matériaux adjacents, sachant que le Si-HR est caractérisé par un indice de réfraction de 3.41 et un coefficient d’absorption $\approx 0.05 \text{ cm}^{-1}$. Nous utilisons du α - pinène comme liquide d’indice entre la lame de Si-HR et le prisme de Si-HR. C’est un liquide caractérisé par un coefficient d’absorption 1.5 cm^{-1} et un indice de réfraction de 1.66 à 2.5 THz.

Nous avons testé d’autres liquides d’indices avec de meilleures caractéristiques, comme éviter les pertes d’énergie et les réflexions indésirables. Mavrona et al. [61] ont élaboré un liquide d’indice à partir de titanate de baryum (BaTiO_3) et de benzocyclobutène (BCB) (voir annexe). En modifiant la teneur de chaque élément, il est possible d’obtenir un liquide d’indice de réfraction entre 1.8 et 5.

Nous avons comparé les liquides indices α - pinène et BaTiO_3 en utilisant un dispositif de spectroscopie THz-TDS. Le faisceau THz est émis, il arrive en configuration ATR sur un prisme en Si-HR. A la surface du prisme, une lame de Si-HR est placée, dans 3 configurations différentes :

- sans liquide d’indice,
- avec du α - pinène comme liquide d’indice,
- avec du BaTiO_3 à 25% comme liquide d’indice.

Le signal mesuré est le signal réfléchi. Avec le système THz-TDS, on obtient les réponses dans le domaine temporel, et fréquentiel. Les réponses obtenues selon les différentes configurations sont affichées sur la figure 1.23.

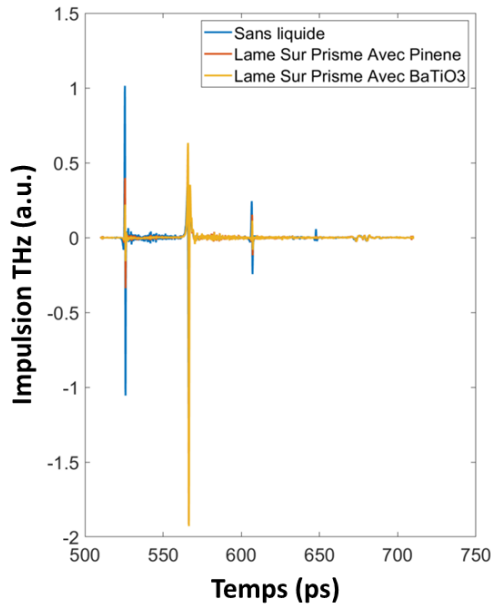


FIGURE 1.23 – Signal THz temporel après réflexion à travers le prisme et la lame de Si-HR pour différents types de liquides d'indice.

On observe plusieurs pics de grande amplitude sur la figure 1.23. Il y en a trois principaux, qui correspondent aux trois réflexions décrites sur la figure 1.22. Ils arrivent dans l'ordre chronologique : le premier pic correspond à la réflexion à l'interface prisme-lame et atteint le capteur à un temps t_1 . Le second pic correspond à la réflexion sur la surface de la lame. le trajet optique emprunté est plus long, le faisceau arrive donc sur le capteur à un temps $t_2 > t_1$. Le troisième pic subit deux réflexions de plus, et atteint le capteur au temps $t_3 > t_2$.

Le pic d'amplitude maximal correspond à l'écho de réflexion principal sur la surface supérieure de la lame de Si-HR. Les autres échos sont des artefacts, dus à des réflexions parasites. On observe que lorsqu'il n'y a pas de liquide d'indice (courbe bleue), la majorité de l'énergie du signal THz est réfléchi à la surface supérieure du prisme, et n'atteint pas la surface de la lame. La présence d'un liquide d'indice améliore considérablement la transmission du signal jusqu'à la surface de la lame. Ces données peuvent être quantifiées en mesurant l'énergie contenue dans les deux premiers pics. Il est de plus possible d'observer la répartition de l'énergie du signal en fonction de la fréquence. On découpe la plage de fréquence totale en plusieurs intervalles : $[0.1 \rightarrow 2]$ THz (basses fréquences) et $[2 \rightarrow 3]$ THz (hautes fréquences). Le tableau 1.2 présente les énergies ($\propto \text{mV}^2$) calculées pour les deux premiers pics dans chacune des configurations.

	Énergie totale		Énergie basses fréquences		Énergie hautes fréquences	
	pic 1	pic 2	pic 1	pic 2	pic 1	pic 2
sans liquide d'indice	$1.18 \cdot 10^4$	$1.48 \cdot 10^4$	$1.16 \cdot 10^4$	$1.48 \cdot 10^4$	185	5.68
α -pinène	$0.13 \cdot 10^4$	$2.88 \cdot 10^4$	$0.12 \cdot 10^4$	$2.87 \cdot 10^4$	49.87	55.24
BaTiO ₃ 25%	$0.36 \cdot 10^4$	$1.96 \cdot 10^4$	$0.34 \cdot 10^4$	$2.95 \cdot 10^4$	9.81	45.67

TABLE 1.2 – Répartition en énergie des différents pics d'amplitude pour plusieurs liquides d'indice.

Il faut maximiser l'énergie du second pic, celui qui arrive sur la surface supérieure de la lame. Entre les deux liquides d'indice, le pinène est un peu plus efficace. On trouve que l'énergie est optimalement répartie pour le BaTiO₃ en basse fréquence, tandis que les hautes fréquences sont plus adaptées au pinène. D'autres liquides d'indice doivent être testés, notamment le BaTiO₃ à 30 % et plus.

Le liquide d'indice utilisé dans le dispositif ATR - THz est le α -pinène, qui à 2.5 THz permet de limiter les pertes d'énergies dues aux réflexions indésirables lors de la propagation du faisceau THz.

1.4.5 Configuration ATR (Attenuated Total Reflectance)

Le but du dispositif est l'étude du contenu cellulaire. L'ordre de grandeur de la taille d'une cellule épithéliale est de quelques μm à quelques dizaines de μm . Une fréquence de 2.5 THz correspond à une longueur d'onde de 120 μm . Il est donc nécessaire d'utiliser une technique de champ proche pour améliorer la résolution du système. Cette sous-partie présente la configuration ATR utilisée dans le dispositif.

1.4.5.1 Réflexion totale

La réflexion totale fait référence au phénomène de réflexion totale d'un faisceau lumineux lorsque, se propageant dans un milieu d'un indice n_1 , il arrive selon un angle θ_1 à l'interface avec un milieu d'indice n_2 tel que $n_1 > n_2$. La démonstration du principe se fait via la loi de Snell-Descartes :

$$n_1 \sin(\theta_1) = n_2 \sin(\theta_2).$$

Les notations utilisées sont les mêmes que sur la figure 1.24 .

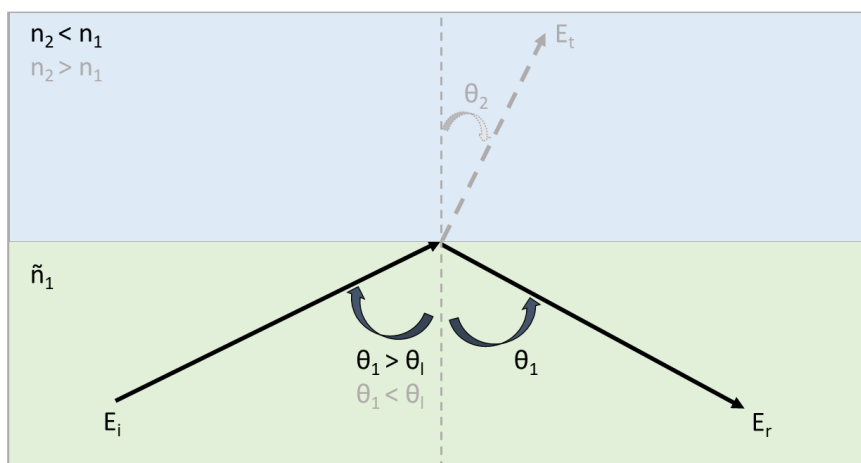


FIGURE 1.24 – Réfraction et réflexion totale : un rayon incident (E_i) arrive à l'interface entre deux milieux. Les paramètres en noir correspondent à la configuration de réflexion totale avec E_r le rayon réfléchi. Les paramètres en gris correspondent à la configuration de réfraction avec E_t le rayon transmis.

En reprenant l'équation de Snell-Descartes, on obtient :

$$\sin(\theta_2) = \frac{n_1}{n_2} \sin(\theta_1). \quad (1.16)$$

θ_2 existe pour $\frac{n_1}{n_2} \sin(\theta_1) \in [-1; 1]$ soit $n_1 < n_2$.

Dans le cas où $n_1 > n_2$, θ_2 n'admet de solution que pour $\frac{n_1}{n_2} \sin(\theta_1) < 1$ soit :

$$\theta_1 < \text{asin}\left(\frac{n_1}{n_2}\right) = \theta_l. \quad (1.17)$$

θ_l est défini comme l'angle d'incidence limite. Pour $\theta_1 > \theta_l$, on est en configuration de **réflexion totale**. Toute la lumière incidente est réfléchi dans le premier milieu. Cependant, le champ électromagnétique dans le second milieu ne disparaît pas.

En effet, pour un champ incident E_i arrivant à l'interface d'un milieu d'indice \tilde{n}_1 vers un milieu d'indice \tilde{n}_2 comme sur la figure 1.24, on peut calculer le vecteur d'onde de l'onde réfractée :

$$k = \frac{\omega}{c} \sqrt{n_2^2 - n_1^2 \sin(\theta_1)^2}. \quad (1.18)$$

Lorsque $\theta_1 > \theta_l$, le vecteur d'onde devient complexe :

$$k = \pm i \frac{\omega}{c} \sqrt{n_1^2 \sin(\theta_1)^2 - n_2^2} \in \mathbb{C}. \quad (1.19)$$

Donc, si la normale à l'interface est orientée selon l'axe z, alors la seule solution physique pour le champ transmis est,

$$E_z = E_0 e^{i\omega t} e^{-\frac{\omega}{c} \sqrt{n_1^2 \sin(\theta_1)^2 - n_2^2} z}. \quad (1.20)$$

L'équation 1.20 représente une onde évanescente : non propagative, elle décroît exponentiellement avec la distance à l'interface. L'énergie de l'onde réfléchie n'est pas modifiée par la présence de cette onde [28].

1.4.5.2 Réflexion totale atténuée

Lorsque le milieu 2 est absorbant, on redéfinit l'indice du milieu 2 comme un indice complexe :

$$\tilde{n}_2 = n_2 - i\kappa_2 \in \mathbb{C}, \quad (1.21)$$

où $\kappa_2 = \frac{\alpha c}{2\omega}$ avec α le coefficient d'absorption en intensité, n_2 la partie réelle de l'indice de réfraction, c la vitesse de la lumière et ω la fréquence. On est plus en configuration de réflexion totale puisqu'une partie de l'onde réfléchie est absorbée. C'est la **réflexion totale atténuée** (ATR). Dans ce cas, la définition de l'angle limite est moins nette. Le coefficient de réflexion en polarisation p s'écrit, d'après [28] :

$$r_p(\theta_1) = \frac{\tilde{n}_2 \cos(\theta_1) - n_1^2 \sqrt{1 - \left(\frac{\tilde{n}_1}{\tilde{n}_2} \sin(\theta_1)\right)^2}}{\tilde{n}_2 \cos(\theta_1) + n_1^2 \sqrt{1 - \left(\frac{\tilde{n}_1}{\tilde{n}_2} \sin(\theta_1)\right)^2}}. \quad (1.22)$$

La figure 1.25 montre l'évolution de $|r_p|$ dans le cas d'un milieu absorbant (en rouge) et du même milieu mais pour lequel l'absorption a été négligée (courbe noire).

On observe clairement le passage du régime classique à la réflexion totale pour le milieu non absorbant : $|r_p|$ augmente nettement jusque 1. L'augmentation est plus lente dans le cas d'un milieu absorbant. De plus, on vérifie bien que la réflexion n'est pas entièrement totale.

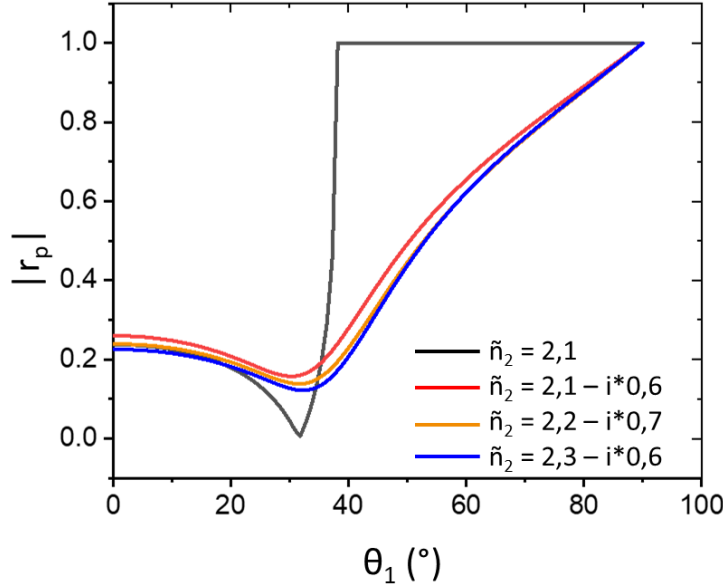


FIGURE 1.25 – Coefficient de réflexion de Fresnel en polarisation p en fonction de l'angle d'incidence pour du silicium haute résistivité en milieu 1 et des liquides en milieu 2. La courbe rouge correspond au cas où le milieu 2 est de l'eau. La courbe noire au cas où l'absorbance de l'eau est négligée. Dans ce cas, l'angle critique est bien défini, vers 40°. Les courbes orange et bleues correspondent respectivement à un milieu 2 composé de solutions de Kl à 570 mM et de $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ à 991 mM. Dans ces cas, les valeurs de n_2 et κ_2 ont été obtenues par spectroscopie [25].

En modifiant le milieu 2 par des solutions ioniques, on remarque que l'évolution de $|r_p|$ est presque homothétique à celle de l'eau. Ainsi, les propriétés spectroscopiques du milieu 2 influent sur la mesure du signal réfléchi. C'est le principe de la mesure du dispositif ATR - THz.

Le dispositif est appliqué à l'étude de cellules de hauteur $\approx 7 \mu\text{m}$ (voir chapitre 2). On peut vérifier que l'onde évanescente permet de sonder le contenu cellulaire en calculant sa longueur caractéristique d_e :

$$d_e = \text{Re} \left[\frac{c}{\omega \sqrt{n_1^2 \sin^2(\theta_1) - \tilde{n}_2^2}} \right].$$

Appliqué à notre dispositif, $n_1 = 3.41$, $\tilde{n}_2 \approx 2.1 - 0.6i$ pour de l'eau, $\theta = 42^\circ$ et $\lambda = 120 \mu\text{m}$, on mesure $d_e \approx 16 \mu\text{m}$.

La longueur caractéristique de l'onde évanescente formée à l'interface entre le prisme et les cellules épithéliales est de $16 \mu\text{m}$. Cela correspond à l'ordre de grandeur de la hauteur des cellules MDCK. Le dispositif ATR - THz permet donc la formation d'une onde évanescente qui vient sonder le contenu cytoplasmique d'une mono-couche de cellules. Il est adapté pour l'étude des variations de contenu des cellules.

Conclusion du chapitre

Ce premier chapitre a permis de décrire les ondes térahertz et quelques-unes de leurs caractéristiques principales, surtout liées à l'étude des milieux biologiques. La démarche conduisant à la conception du dispositif ATR - THz a été expliquée, ainsi que les éléments théoriques permettant de comprendre comment un tel dispositif est capable de sonder les dynamiques de contenu cellulaire. Le prochain chapitre approfondira davantage les processus biologiques étudiés et montrera les applications possibles du dispositif ATR - THz pour l'étude de la perméabilisation de la membrane plasmique.

Chapitre 2

Perméabilisation de la membrane plasmique

Le chapitre précédent a introduit le dispositif ATR - THz, et comment il permet de mesurer des variations de contenu cellulaire. Ce chapitre introduit le principe de perméabilisation de la membrane plasmique et des variations de contenu cellulaire associées. Nous traiterons dans un premier temps de la structure de la cellule et de la membrane plasmique. Dans un second temps, nous verrons les différents processus de perméabilisation, qu'ils soient naturels ou provoqués. Enfin, les techniques existantes pour étudier la perméabilisation seront décrites et comparées. L'étude de la perméabilisation via le capteur ATR - THz sera détaillée, via des résultats précédents.

2.1 L'intégrité de la cellule est assurée par la membrane plasmique

Cette partie introduit la structure de la cellule, sa composition et en particulier la membrane plasmique. Cette dernière sépare le contenu cellulaire du milieu extra-cellulaire. Elle assure l'homéostasie de la cellule via son caractère semi-perméable.

2.1.1 Les cellules épithéliales

*Le dispositif ATR - THz décrit dans le chapitre 1 dépend de l'interaction entre une onde évanescente de longueur caractéristique $10\ \mu\text{m}$ avec une cellule. Les variations de signal térahertz dépendent des entrées et des sorties de molécules dans la zone sondée par l'onde évanescente. Il faut donc utiliser des cellules qui ont une taille du même ordre de grandeur. De plus, il faut que ces cellules forment un tapis uniforme et que sa **confluence** soit très élevée. Ainsi, si les cellules sont perméabilisées, les échanges de molécules se font avec le milieu extra-cellulaire qui n'est pas dans la zone sondée par l'onde évanescente. C'est pourquoi les cellules utilisées et présentées sont des cellules épithéliales.*

2.1.1.1 Généralités

On se limite au cas des cellules eucaryotes, caractérisées par la présence d'un noyau. Plus précisément, aux cellules adhérentes, dites épithéliales. Leur taille se situe typiquement entre $5\ \mu\text{m}$ et $50\ \mu\text{m}$. Les cellules épithéliales tapissent les surfaces externes et internes des organismes, comme la peau, les intestins ou encore les alvéoles pulmonaires. Elles ont des **caractéristiques** bien spécifiques. Ce sont des cellules **polarisées**, elles ont une face apicale orientée vers l'extérieur, ainsi qu'une face basale en contact avec la membrane basale. Cette membrane est une matrice extra-cellulaire qui sépare les cellules des tissus sous-jacents et leur fournit un soutien structural. Des jonctions cellulaires induisent de l'**adhérence cellulaire** entre les cellules épithéliales. On retrouve des jonctions d'ancrage et des jonctions communicantes notamment. Leur **morphologie** est de plus très caractéristique : elle s'apparente à une forme cubique ou cylindrique, plus ou moins aplatie. Cela est principalement dû aux fortes interactions entre les cellules ainsi qu'entre les cellules et la membrane basale [62].

2.1.1.2 Lignées classiques de cellules épithéliales

Il existe certaines lignées classiquement cultivées dans les laboratoires, on va notamment trouver :

— **Les cellules MDCK (Madin-Darby Canine Kidney)**

Cette lignée dérive du rein d'un cocker spaniel, elle a été isolée par Madin et Darby en 1958. Elle est principalement utilisée pour la recherche sur les transports ioniques, la polarité cellulaire, et la formation de jonctions entre les cellulaires. Les caractéristiques géométriques des cellules MDCK ont été étudiées, elles ont une épaisseur de $7.1 \pm 0.7\ \mu\text{m}$ et un diamètre d'environ $30\ \mu\text{m}$ [63] à confluence. Elles servent de modèle dans de nombreuses études pour ce qui concerne les tissus épithéliaux de l'organisme [64–66]. Ce

sont ces cellules qui sont utilisées dans les expériences présentées dans ce manuscrit.

— **Les cellules HCT 116**

Ce sont des cellules humaines issues d'un cancer du côlon [Cellosaurus]. Elle est utilisée dans le cadre des recherches sur la prolifération du cancer du colon [67] ainsi que l'étude des traitements anti-cancer [68].

— **Les cellules SH-SY5Y**

Lignée cellulaire humaine dérivée de la lignée SK-N-SH elle même obtenue via une biopsie de moelle osseuse présentant un neuroblastome. Elle est utilisée comme modèle de la fonction et de la différenciation neuronale [69].

— **Les cellules HeLa**

Cette lignée dérive d'un carcinome du col de l'utérus prélevé sur Henrietta Lacks en 1951. Elle est principalement utilisée dans les études sur le cancer [70]. Cette lignée est aussi très utilisée pour modéliser les cellules épithéliales [71].

2.1.1.3 Contenu cellulaire des cellules épithéliales

Certaines des caractéristiques des cellules HeLa ont été regroupées dans le tableau suivant :

Propriété	Lignée HeLa
Volume de la cellule	1000 - 10 000 μm^3
Protéines/ μm^3 de volume cellulaire	2-4 x 10^6
Concentration d'une protéine / cellule	0.1 - 1 pM
Temps de diffusion d'une protéine à travers la cellule	1 - 10 s
Temps de diffusion d'une petite molécule à travers la cellule	0.1 - 1 s
nombre de protéines / cellule	10^{10}

TABLE 2.1 – Quelques propriétés de cellules épithéliales (lignée HeLa). Les données sont tirées de [72].

L'organisation d'une cellule épithéliale repose sur son noyau, contenant l'ADN, sur les organites, sur le cytosquelette qui structure et forme la cellule, sur la membrane plasmique qui sépare la cellule de son environnement extérieur, sur les fonctions cellulaires et sur la matrice extra-cellulaire. L'intérieur de la cellule est rempli d'un liquide composé à majorité d'eau et de protéines, le cytosol qui représente environ 50% du volume cellulaire. Il contient en outre des protéines, des glucides, des lipides, et d'autres petites molécules. La figure montre quelques composants et leur ordre de grandeur pour des cellules HeLa :

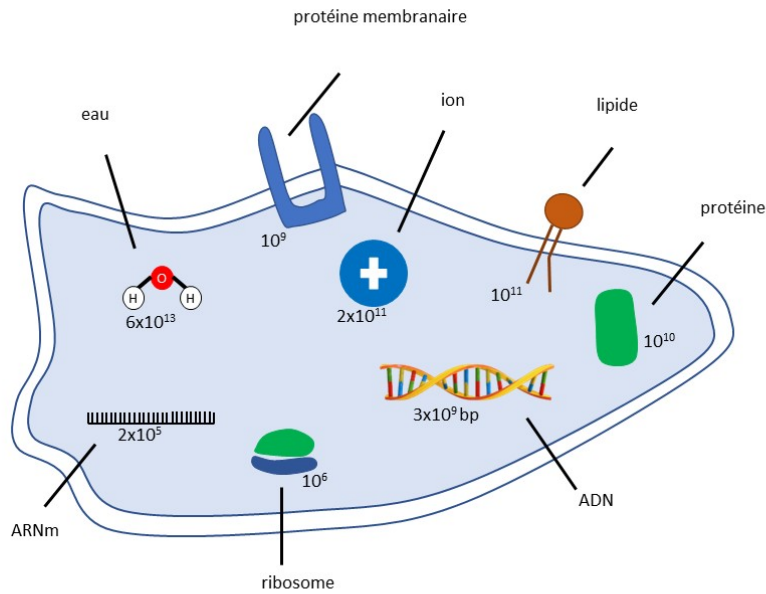


FIGURE 2.1 – Les principaux composants d’une cellule adhérente (HeLa ; $V = 3000 \mu\text{m}^3$; $L = 20 \mu\text{m}$). Adaptée de [72].

Dans mes expériences, on utilise et étudie principalement les cellules MDCK. Ces cellules ont la taille adéquate pour le dispositif ATR - THz. De plus, elles peuvent atteindre des niveaux de confluence jusque 95%. C’est un paramètre important à prendre en compte : plus la confluence est élevée, plus l’onde évanescence sonde de contenu cellulaire. Enfin, ce sont des cellules largement utilisées comme modèle pour les cellules épithéliales [66].

2.1.2 Composition et structure de la membrane plasmique

Dans le cadre de ma thèse, la structure de la membrane plasmique et ses propriétés représentent un enjeu important. L’intégrité de la cellule, et donc du matériel génétique, est assurée par la membrane plasmique. Celle-ci est de plus responsable d’assurer les échanges entre le milieu intracellulaire (cytoplasme), et le milieu extra-cellulaire. Cette sous-partie introduit les composants clés à la base de la structure et du fonctionnement de la membrane plasmique.

La bicouche lipidique

La membrane plasmique est composée principalement de lipides membranaires et de protéines. Les lipides majoritairement responsables de la structure de la membrane sont les phospholipides, formés de deux chaînes d’acide gras et d’une tête polaire formée d’un alcool associé à un acide phosphorique. Les chaînes d’acides gras sont hydrophobes tandis que la chaîne polaire est hydrophile. Pour former la membrane, deux couches de ces lipides s’alignent face à face. Les têtes polaires de lipides forment les deux surfaces exposées au milieu aqueux. L’eau est donc exclue du centre de la bicouche. Or la majorité des molécules biologiques (acides aminés, sucres, protéines, ions) sont solubles dans l’eau. C’est grâce à cette configuration que la membrane peut agir comme une barrière entre les milieux intra et extra-cellulaire. La structure de la bicouche

est présentée sur la figure 2.2.

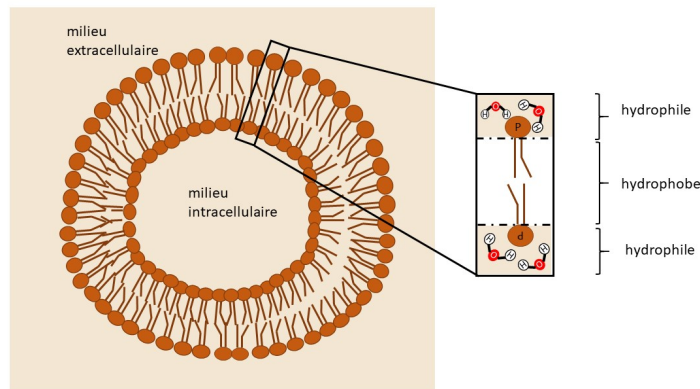


FIGURE 2.2 – Têtes polaires orientées vers les milieux intra et extra – cellulaires. Chaînes hydrophobes regroupées au centre de la bicouche. Figure adaptée de [62].

Les protéines membranaires

Les phospholipides, avec les cholestérols, glycolipides et les protéines membranaires forment la structure globale de la membrane. Les protéines membranaires ont un rôle de lien entre le cytosquelette et la matrice extra-cellulaire ou bien d'autres cellules ; elles servent de plus de récepteurs ou de détecteurs pour des signaux venant de l'environnement cellulaire. Elles sont aussi responsables des fonctions spécifiques de la membrane, notamment de certains processus de perméabilité, que nous verrons plus en détail dans la prochaine partie. Parmi les protéines membranaires, on distingue les protéines transmembranaires, les protéines ancrées à la membrane et les protéines périphériques. Les interactions entre la membrane et ces diverses catégories de protéines sont régies de manière spécifique. Le tableau 2.2 explicite quelques types d'interactions existantes.

Type de protéine membranaire	Interaction avec la membrane
Transmembranaire	Partie hydrophobe (chaînes)
Ancrées	Ancre de base lipidique attachée à la membrane
Périphériques	Interaction électrostatique avec phospholipides ou protéines membranaires

TABLE 2.2 – Les différents types de protéines membranaires [62].

Le cytosquelette

La structure et la stabilité de la membrane plasmique dépendent des interactions entre le cholestérol, les différentes protéines membranaires, la bicouche lipidique, et le cytosquelette. Ce dernier est un ensemble de protéines filamenteuses telles que des micro-filaments d'actine et des microtubules qui interagissent avec la face cytoplasmique de la membrane plasmique. Cette interaction contribue à maintenir la forme cellulaire, à stabiliser la membrane et à réguler la distribution spatiale des protéines membranaires. Certaines protéines membranaires et certains lipides sont capables de diffuser latéralement dans la membrane. Cela dépend notamment de leur interaction avec le cytosquelette.

Polarité de la membrane plasmique

La membrane mesure entre 7.5 nm et 10 nm. L'épaisseur peut varier au sein d'une même cellule, notamment en fonction de l'organisation des protéines membranaires. Comme nous l'avons vu, les cellules épithéliales sont polaires et possèdent deux faces : basale et apicale. En conséquence, la structure de la membrane plasmique est différente pour les deux pôles. Par exemple, concernant les cellules épithéliales du petit intestin, la face apicale, tournée vers l'intérieur de l'intestin, est recouverte de microvilli qui favorisent l'absorption de nutriments. La face basale est tournée vers les tissus sous-jacents et les réserves de sang, et spécialisée dans les transferts de nutriments [62]. Cette structure est représentée sur la figure 2.3 tirée de [62].

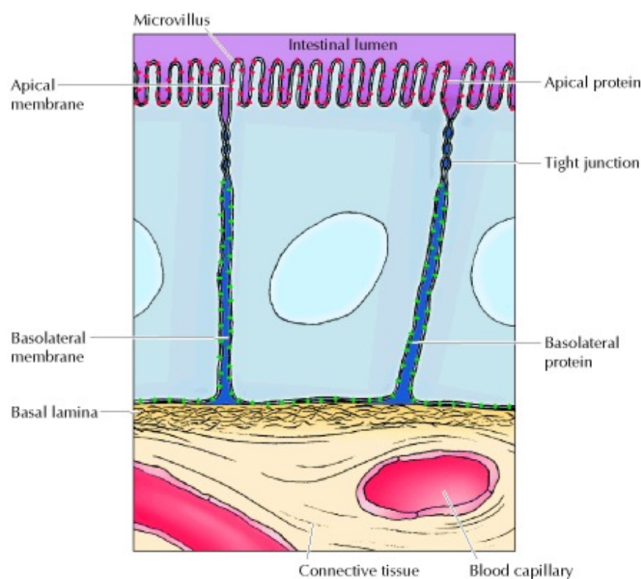


FIGURE 2.3 – Cellule épithéliale polarisée. La structure de la face apicale permet l'absorption de nutriments. Celle de la face basale permet leur transfert aux tissus sous-jacents. Le transfert de protéines membranaires d'un domaine à l'autre est empêché par des jonctions membranaires. Figure tirée de [62].

Il existe donc des mécanismes qui régulent la mobilité des protéines membranaires afin de les maintenir dans les zones adaptées. L'un des mécanismes est la formation de jonctions avec les cellules adjacentes. Elles servent de barrière contre le mouvement des protéines et lipides entre les deux domaines.

La membrane plasmique est composée d'une bicouche lipidique qui assure son étanchéité, avec laquelle interagissent des cholestérols et des protéines membranaires. Sa stabilité en dépend, mais aussi des interactions avec le cytosquelette.

2.1.3 Les forces qui régissent la structure de la membrane

La membrane plasmique, de par sa structure, permet d'assurer l'homéostasie de la cellule. Cette sous-partie présente les forces mise en jeu dans la stabilité de la membrane.

La force principalement responsable de la structure de la membrane est due à l'hydrophobie de la bicouche lipidique. Il faut environ 230 kJ/mol pour retirer une chaîne acyle d'une bicouche

et la placer dans l'eau, ce qui équivaut à l'énergie de 16 liaisons phosphate à haute énergie (\rightarrow ADP) par molécule de lipide [73]. La tension mécanique de la membrane plasmique se situe généralement dans l'intervalle 0.01 - 0.04 mN/m. Comparée aux forces typiques auxquelles les cellules sont exposées (cisaillement, compression, traction), cette tension est plutôt faible et des réponses biologiques importantes peuvent se produire. Les forces responsables de la tension de la membrane sont principalement liées à 4 processus.

- Le premier est la pression hydrostatique qui résulte du déséquilibre osmotique entre le cytosol et le milieu extra-cellulaire. Elle résulte en grande partie des différentes concentrations ioniques.
- Le second découle de l'interaction entre la membrane et le cytosquelette.
- Le troisième est l'adhérence avec un support et avec les cellules adjacentes.
- Le dernier résulte de l'évolution de la quantité de matériel membranaire. L'ajout de matériel réduit la tension, et inversement [74].

La conductance d'une bicouche lipidique a été mesurée expérimentalement, autour de 10^{-3} S/m². Cela fait de la membrane plasmique un bon matériau isolant. De plus, l'intérieur de la bicouche possède une constante diélectrique plutôt faible, d'environ $\epsilon_m \approx 2$ [75]. Au contraire, les constantes diélectriques des milieux environnants sont hautes, de l'ordre de celle de l'eau : $\epsilon_w \approx 78$. Le coup énergétique pour transférer un ion de l'intérieur de la bicouche au milieu extérieur est donc très important. La différence d'énergie propre d'un ion dans la bicouche lipidique et d'un ion dans un milieu aqueux peut se calculer via l'équation de Born [76] :

$$W_B = \frac{z^2 e^2}{8\pi \epsilon_0 R} \left[\frac{1}{\epsilon_m} - \frac{1}{\epsilon_w} \right],$$

avec R le rayon de Stokes de l'ion, e la charge, z la valence de l'ion et ϵ_0 la permittivité dans le vide. L'énergie de Born pour un ion Potassium dans cette configuration est de 3 eV [77]. La présence d'ions dans la bicouche lipidique est donc extrêmement faible.

La bicouche lipidique agit comme une barrière efficace entre les milieux extra et intra-cellulaires. De plus, l'étude des forces et des énergies impliquées dans sa structure et sa stabilité montre qu'en l'absence de processus spécifiques, sa structure est stable. En effet, l'énergie requise pour la déstructurer est très importante. De plus, les différentes jonctions entre la membrane et les objets environnants (cellules, cytosquelette) lui donnent une stabilité physique. En outre, par son élasticité, elle est capable de supporter une mise sous tension. Enfin, l'existence du potentiel membranaire induit un gradient ionique stable entre les milieux.

2.2 Les différents processus de perméabilisation de la membrane plasmique

La bicouche lipidique permet à la membrane plasmique d'agir comme une barrière entre les milieux intra et extra-cellulaire. L'homéostasie de la cellule est en partie assurée par cette caractéristique. Des échanges de matières contrôlés sont cependant nécessaires pour la maintenir.

C'est pourquoi la membrane est semi-perméable. Sa structure permet de nombreux échanges. Par perméabilisation de la membrane plasmique, on désigne dans ce chapitre et les suivants, le passage de molécules et de solvants à travers la membrane plasmique. On se concentrera uniquement sur la perméabilisation de la membrane plasmique et non des autres membranes cellulaires.

2.2.1 Les processus de perméabilisation intrinsèques aux cellules

La structure de la membrane plasmique lui permet d'être quasi-imperméable. Cette caractéristique est nécessaire pour assurer l'intégrité de la cellule, son homéostasie, assurer son fonctionnement en contrôlant son contenu, ainsi que les différents gradients de concentration entre les milieux intra et extra – cellulaires. Certaines cellules dédient deux tiers de leur consommation d'énergie aux processus de transport via les membranes. La cellule peut contrôler les flux d'eau, d'ions, de métabolites. Ces différentes molécules diffèrent par leur charge, leur taille, leur polarité. Les processus de gestion de leur flux via la membrane plasmique sont donc différents. Certains processus vont être pris en charge par la bicouche lipidique. D'autres par les protéines membranaires.

- Flux de molécules et d'eau via la bicouche lipidique

La perméabilité de la bicouche lipidique aux grosses molécules polaires ainsi qu'aux ions est faible. La perméabilité de la bicouche lipidique augmente plus une molécule est petite, neutre et hydrophobe. Les molécules comme l'oxygène ou le CO_2 traversent la membrane par simple diffusion. La figure 2.4 montre la perméabilité de groupes de molécules via la bicouche lipidique. Le coefficient de perméabilité μ s'exprime en distance/temps. Il est défini par le flux de molécules traversant la membrane j et par les concentrations intra et extra-cellulaires, respectivement C_{in} et C_{ex} :

$$j = -\mu \times (C_{in} - C_{ex}).$$

- Flux de molécules via les protéines membranaires

Les **protéines membranaires**, qui constituent environ 50% de la masse de la membrane plasmique, régulent d'autres processus de perméabilité. On distingue parmi ces protéines, les canaux et les transporteurs. Les **canaux** forment des pores dans la membrane, ce qui permet le passage d'ions à travers la membrane, selon le gradient de concentration et/ou de charge. Les canaux sont considérés comme un type de **transport passif** : la cellule ne fournit pas d'énergie pour le passage des ions. Dans les types de transport passif, on distingue aussi les ionophores, des molécules hydrophobes qui se dissolvent dans la bicouche lipidique et augmentent la perméabilité de certains ions.

Les transporteurs peuvent être de type passif ou de type actif. Les **pompes** sont des **transporteurs actifs** : la cellule consomme de l'énergie (hydrolyse de l'ATP ou un gradient d'ion) pour le transfert des molécules à travers la membrane. Le transporteur se lie à la molécule à transporter et alterne entre deux conformations pour faire passer la molécule d'un côté à

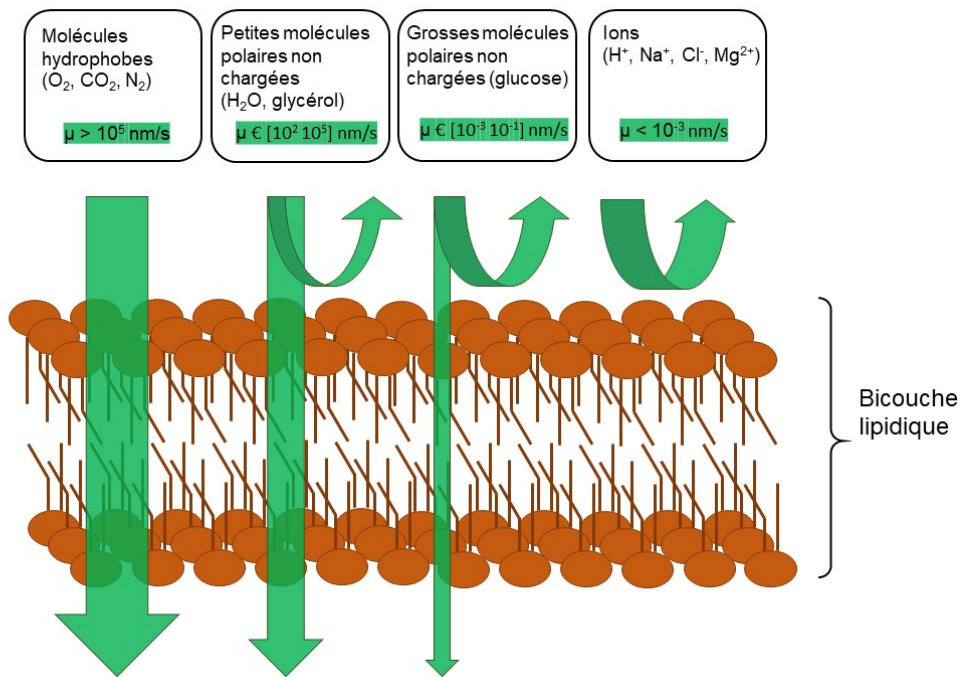


FIGURE 2.4 – Perméabilité par diffusion de certains types de molécules à une bicouche lipidique. Plus une molécule est petite, neutre et hydrophobe, plus son coefficient de perméabilité μ est élevé [72]. Les flèches vertes représentent les flux de molécules. Figure adaptée de [78].

l'autre. Le transfert se fait contre le gradient de concentration et/ou de charge. Les molécules de transport sont spécifiques à certaines classes de molécules (ions, sucres, acides aminés...). L'équilibre des gradients de concentration et de charge se fait via ces types de transport, mais est aussi pris en charge par l'osmose : la diffusion de l'eau à travers la bicouche lipidique. Ces différents mécanismes sont illustrés figure 2.5.

Les canaux et les transporteurs, de par leur taille, ne peuvent assurer le transport de tous les types de molécules, notamment celui des grosses protéines, des polynucléotides ou des polysaccharides. L'entrée et la sortie de ces molécules sont gérées respectivement par l'**endocytose** et l'**exocytose**. Ces phénomènes s'effectuent via l'internalisation des molécules dans des vésicules qui vont fusionner avec la membrane puis relâcher leur contenu.

Ces processus sont plus ou moins rapides, selon notamment la taille des particules à transférer, leur structure, le type de la cellule impliquée et bien d'autres facteurs. Les processus sont de plus régulés par certains signaux cellulaires qui modifient l'activité des protéines impliquées, en accélérant ou en ralentissant les processus en fonction des besoins de la cellule. Von Bonsdorff et al. ont ainsi étudié le processus d'endocytose sur des cellules MDCK pour un probiotique ($[^3\text{H}]$ inuline) et une enzyme (HRP). Ils ont quantifié l'absorption de ces molécules sur les faces basales et apicales de la cellule, et observé des dynamiques différentes, notamment concernant les taux d'internalisation de marqueurs par endocytose [79].

- Particularité des flux de molécules chargées

L'un des outils sur lequel la membrane s'appuie pour contrôler les transports est sa capacité à emmagasiner de l'énergie potentielle sous la forme d'un gradient électrochimique. Cette énergie

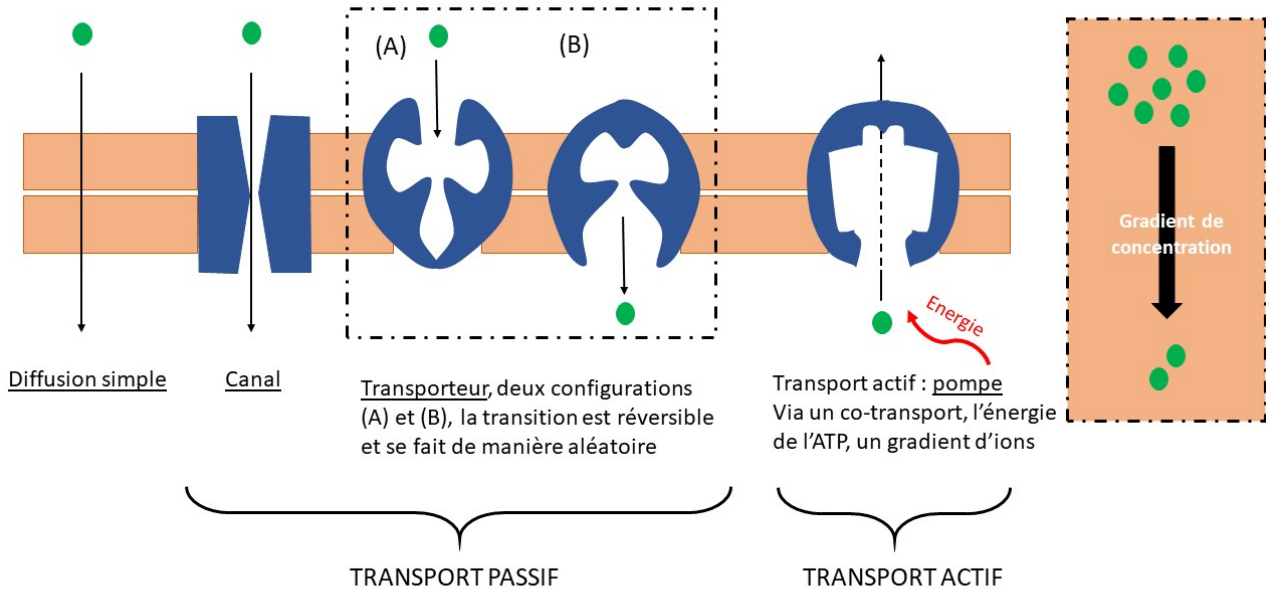


FIGURE 2.5 – Diffusion simple, transports actifs et passifs à travers la membrane plasmique. Dans le cas du transport passif, la protéine membranaire alterne entre deux configurations de manière réversible et aléatoire, permettant le passage de certaines molécules. Dans le cas du transport actif, le transfert se fait dans le sens inverse du gradient électrochimique ; une source d'énergie est nécessaire pour induire le changement de configuration de la protéine membranaire. La partie orange est la bicouche lipidique ; les ronds verts sont les molécules à transporter. Figure adaptée de [78].

provient du gradient de concentration ionique entre les milieux intra et extra-cellulaires. La membrane est chargée négativement à l'intérieur, et positivement à l'extérieur. Le potentiel membranaire ΔE d'un ion peut se calculer via l'équation de Nernst [80] :

$$\Delta E = \left[E - \frac{RT}{zF} \ln(C_{ext}) \right] - \left[E - \frac{RT}{zF} \ln(C_{int}) \right] = \frac{RT}{zF} \ln \left(\frac{C_{int}}{C_{ext}} \right),$$

avec C_{int} et C_{ext} les concentrations de l'ion respectivement intracellulaire et extra-cellulaire, z la valence de l'ion, F la constante de Faraday, R la constante des gaz parfaits et T la température absolue. On peut calculer ce potentiel pour quelques ions :

ion	C_{ext} (mM)	C_{int} (mM)	potentiel de Nernst (mV)
Na^+	145	12	67
Cl^-	123	4.2	-90
K^+	4	155	-98
Ca^{2+}	1.5	100 nM	129

TABLE 2.3 – Répartition ionique et gradient d'énergie [81].

Selon le type cellulaire, le potentiel membranaire au repos est entre -50 mV et -70 mV. Le transport des ions se fait via des protéines membranaires appelées canaux ioniques qui s'ouvrent

et se ferment en fonction de la tension de la membrane, d'un stress mécanique ou de la liaison d'un ligand. Les canaux ioniques gèrent les différences de concentration entre les milieux intra et extra-cellulaires et servent parfois de source d'énergie pour des transports actifs (comme la pompe ATP - Na⁺). Les canaux ioniques sont sélectifs à certains ions. Jusqu'à 100 millions d'ions peuvent traverser un canal ionique par seconde, soit jusqu'à 100 fois plus rapide que n'importe quelle protéine de transport [62].

Il existe de nombreux processus permettant d'assurer l'entrée ou la sortie de molécules dans le milieu intracellulaire. La membrane plasmique joue le rôle d'interface dans ces échanges.

2.2.2 Intérêts et challenge du contrôle de la perméabilisation de la membrane plasmique

La cellule régule ses flux de molécules en temps normal. Il est cependant possible de moduler les flux de perméabilisation des cellules via des méthodes artificielles. Cette sous-partie introduit les motivations pour le contrôle de la perméabilisation.

Les précédents mécanismes permettent de réguler le fonctionnement de la cellule via des interactions entre le milieu intra et extra-cellulaire. Le contrôle de la perméabilisation est très recherché pour de nombreuses applications. Stewart et al. décrivent l'importance de la diffusion intracellulaire dans le but de comprendre la mécanique et la structure des cellules [82]. Ils ont catégorisé les types de molécules à faire entrer dans la cellule, les informations cellulaires qu'elles peuvent apporter ou bien modifier, et les différentes applications que cela rend possible. On y trouve notamment la bio-fabrication, les thérapies cellulaires et le diagnostique. Ces applications sont indiquées sur la figure 2.6.

Dans le cadre de l'industrie pharmaceutique, les thérapies à base de protéines se développent. Le transfert des protéines thérapeutiques dans le cytosol est une méthode prometteuse pour le traitement et le diagnostique de nombreuses pathologies [83, 84]. Cependant, la livraison de protéines non modifiées est un processus difficile à mettre en œuvre. En effet, les protéines sont souvent hydrophiles, au contraire de l'intérieur de la bicouche lipidique. Goswami et al. ont développé une méthode de transfert via des protéines modifiées, cela pour plusieurs types cellulaires, permettant l'induction de recombinaison spécifique au niveau de l'ADN [85]. Stadtmauer et al. ont réussi à faire de l'édition de gène via la méthode CRISPR, l'association d'ARN guide avec une protéine qui peut couper l'ADN [86].

Les principaux challenges à relever en terme de contrôle de la perméabilisation sont la **perturbation minimale de la cellule**, l'**universalité** parmi les types cellulaires, l'**indépendance** du mécanisme de livraison par rapport à la molécule délivrée, le **contrôle du dosage**, l'**activité intracellulaire finale** et le **coût** [82]. D'autres défis sont l'efficacité de l'internalisation ou encore la spécificité et la précision des différents acteurs. L'ensemble de ces objectifs et de ces méthodes dépend de la capacité à induire de manière contrôlée le passage de certaines molécules à travers la membrane.

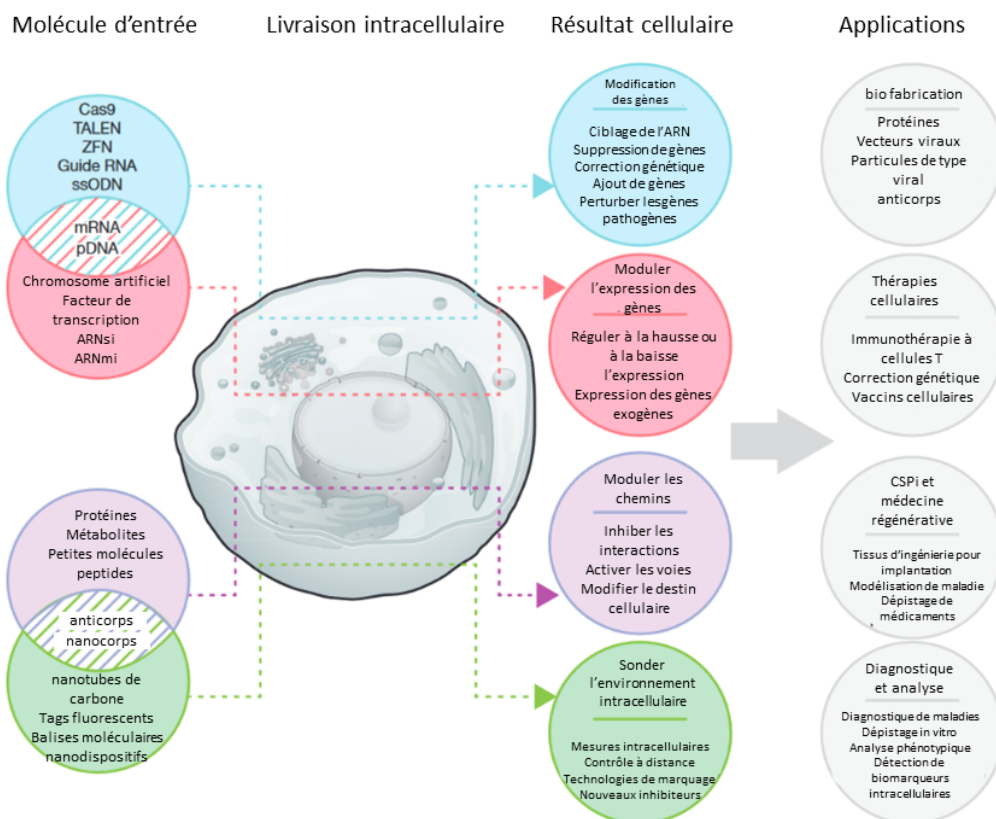


FIGURE 2.6 – Exemples de molécules ciblées pour la diffusion intracellulaire, des mécanismes cellulaires induits, et des applications résultantes. Figure tirée de [82].

Nous avons vu la structure de la membrane plasmique et comment elle agit comme une barrière très sélective entre les milieux intra et extra-cellulaires. Nous allons voir dans la partie suivante, les méthodes développées pour augmenter la perméabilité de la membrane plasmique, et comment ces différentes méthodes permettent, dans une certaine mesure, de répondre aux challenges décrits précédemment.

2.2.3 Processus pour induire et augmenter la perméabilisation de la membrane plasmique

La sous-partie précédente illustre les nombreuses applications possibles via le contrôle de la perméabilisation de la membrane plasmique. En fonction de la molécule visée, les processus de livraison sont très différents. Les méthodes développées pour perméabiliser la membrane utilisent les différentes propriétés de la membrane plasmique, des molécules transférées, des molécules ciblées, ainsi que les processus de transports existants [87].

2.2.3.1 Utilisation d'un transporteur

L'utilisation de transporteurs est une technique couramment employée pour faciliter l'introduction de molécules dans les cellules. Parmi les transporteurs, on retrouve les liposomes, des vésicules lipidiques qui peuvent encapsuler des molécules, puis fusionner avec la membrane pour délivrer leur contenu. Les nanoparticules peuvent aussi être utilisées comme transporteurs. Elles

encapsulent les molécules à livrer, les protégeant de la dégradation, puis peuvent les relâcher, souvent en réponse à des stimuli spécifiques (pH, température, enzymes).

2.2.3.2 Modification de la molécule à livrer

Une méthode classique consiste à modifier la molécule à internaliser. Il est possible d'associer une protéine à des ligands perméables à la membrane par exemple. Une autre solution est de modifier les propriétés ioniques ou covalentes des protéines pour induire de l'endocytose. La limite de ces méthodes est la modification de la molécule livrée.

2.2.3.3 Rupture de la membrane plasmique

La rupture de la membrane plasmique consiste en la formation de pores dans la membrane. Le passage de molécules est alors possible. Il existe de nombreuses méthodes qui permettent de former des pores dans la membrane. Elles utilisent ses différentes propriétés.

- Détergents :

Les détergents sont souvent utilisés pour perméabiliser les membranes cellulaires afin de permettre l'entrée de molécules. Les détergents doux, peu agressifs pour les cellules sont utilisés de préférence. Les plus utilisés sont le Triton-X100, la digitonine et la saponine. Le détergent peut s'insérer dans la membrane et en altérer les propriétés. La saponine est un détergent non ionique qui crée des pores dans la membrane plasmique en se liant avec le cholestérol présent dans la bicouche lipidique [88]. Les pores formés permettent l'entrée de petites molécules tout en préservant l'intégrité globale de la cellule. A faible concentration, son action est réversible.

- Electroporation :

L'électroporation repose sur l'application des impulsions électriques microsecondes ou nanosecondes de forte intensité à une suspension de cellules. Le champ électrique induit une différence de potentiel à travers la membrane plasmique. Celle-ci se polarise, la tension électrique locale augmente. Lorsque le champ électrique dépasse un seuil critique (différent selon le type cellulaire), l'énergie fournie est suffisante pour surmonter la barrière énergétique des lipides membranaires, entraînant la création de pores temporaires dans la membrane cellulaire. Cette méthode permet une introduction efficace de grandes molécules dans les cellules. Elle peut être appliquée à une large gamme de types cellulaires, y compris des cellules bactériennes, végétales, et animales [89]. Le processus est représenté sur la figure 2.7.

La taille et la dynamique des pores dépendent de l'intensité et de la durée des impulsions, mais aussi de la composition de la membrane. La taille des pores peut atteindre quelques nanomètres jusque plusieurs dizaines de nanomètres ([87], [91]). Les pores se forment au bout de quelques microsecondes, leur taille se stabilise pendant une courte durée, puis diminue généralement de manière exponentielle sur une période de quelques minutes à quelques dizaines de minutes après la fin des impulsions électriques [91]. La probabilité de défaut dans la membrane augmente lorsque la différence de potentiel appliquée à la cellule atteint le potentiel transmembranaire [92].

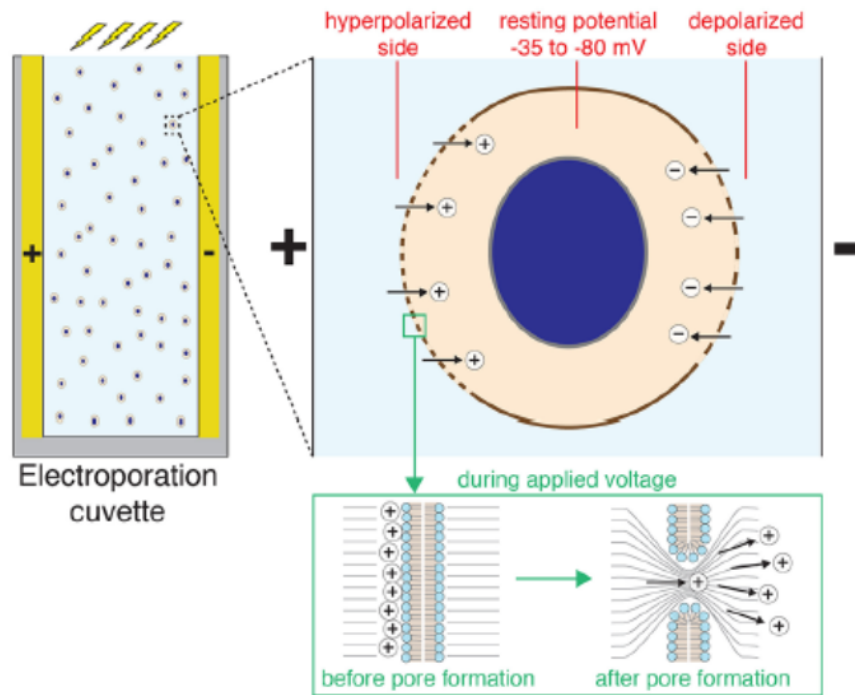


FIGURE 2.7 – Processus d'électroporation. A gauche : configuration classique d'électroporation d'une cuve de cellules suspendues. A droite : polarisation de la cellule et formation de pores hydrophiles. Tirée de [90].

Cette méthode peut cependant entraîner une mortalité cellulaire élevée, les paramètres du champ électrique appliqué doivent être contrôlés. La méthode d'électroporation localisée permet d'appliquer le principe d'électroporation à des échelles microscopiques et nanoscopiques. Mukherjee et al. ont réussi à transférer des molécules fluorescentes comme du mCherry et du tdTomato dans des cellules MDA-MB 231 tout en conservant une bonne viabilité après 24h, et avec une efficacité de livraison supérieure à 95% [87].

- **Micro-injection :**

Cette méthode consiste à introduire des molécules directement dans la cellule à l'aide d'une micro-pipette. C'est un processus qui s'effectue donc sur des cellules uniques. L'efficacité de l'internalisation par micro-injection est généralement très élevée. Le facteur limitant est souvent la forte mortalité cellulaire (autour de 50%) [93].

- **Optoporation :**

Cette technique consiste à perméabiliser la cellule en créant des pores temporairement dans la membrane plasmique à l'aide de la lumière. Il existe plusieurs approches à ce phénomène, qui dépendent du type d'application recherché. La première approche utilise un laser picoseconde ou femtoseconde focalisé sur la membrane qui induit une ablation locale et la formation d'un pore. La longueur d'onde utilisée induit des effets spécifiques sur la perméabilisation. Les mécanismes dominants dans l'UV sont le chauffage et le stress thermoélastique. A 800nm, il s'agit des

effets multi-photons. Les études montrent que les lasers femtoseconde sont plus adaptés, dans le contrôle des pores créés, ainsi que sur la viabilité cellulaire [94]. Une autre technique d'optoporation est l'utilisation de nanoparticules photosensibles [95]. Ces nanoparticules peuvent absorber les radiations laser et induire des dommages locaux à la membrane plasmique via des effets photo-thermiques [96]. Une dernière approche est l'utilisation d'un laser pour activer un substrat photosensibles capables d'induire des effets photo-thermiques ([97], [98]). La thérapie photodynamique (PDT) est une technique d'optoporation, qui repose sur l'utilisation d'une molécule photosensible. Lorsqu'elle est illuminée, elle induit la formation d'espèce oxydantes qui attaquent la cellule. C'est une technique utilisée pour traiter certains cancers. Nous verrons dans le chapitre 4 l'étude la PDT via le capteur ATR - THz.

- Chocs osmotiques :

La perméabilisation cellulaire par processus osmotique est une méthode couramment utilisée pour introduire des molécules dans les cellules. Elle repose sur le principe de l'osmose, qui est le mouvement d'eau à travers une membrane semi-perméable vers une solution plus concentrée en solutés. Les cellules sont exposées à une solution hypotonique. Le gradient de concentration induit l'entrée de l'eau extra-cellulaire dans la cellule. Certaines molécules peuvent à ce moment traverser la membrane via les canaux d'aquaporine [99].

- Sonoporation :

Le principe de la sonoporation repose sur la génération et l'implosion de bulles de cavitation qui créent des pores temporaires dans la membrane plasmique. Des ondes ultra-sonores à hautes fréquences sont émises, elles provoquent la formation de micro-bulles dans le milieu environnant les cellules. Ces bulles peuvent osciller ou imploser, générant des jets rapides ou des ondes de choc qui perforent la membrane plasmique, créant des pores. La taille des pores générées dépend des paramètres acoustiques : pression acoustique, durée de la sonication, fréquence des impulsions [100]. La sonoporation induit une perméabilisation membranaire, ainsi qu'une forte altération du cytosquelette. Wang et al. ont en effet montré, via un marquage du cytosquelette de cellules HeLa par de la GFP, une décroissance exponentielle de la fluorescence après sonoporation. Ils ont en outre quantifié la perméabilisation en récupérant la fluorescence générée par de l'iodure de propidium à l'intérieur d'une cellule sonoporée. La dynamique temporelle est en exponentielle croissante, avec un palier de saturation qui augmente avec l'amplitude de la pression acoustique [101]. Des groupes ont étudié l'impact de la sonoporation sur la membrane plasmique [102–104]. Après sonoporation, des pores sont créés au niveau de la membrane. Ils permettent le passage de molécules de diamètre inférieur à 17 nm [105]. Les molécules plus grandes entrent via des processus d'endocytose. La perforation des pores se fait de manière simultanée à l'implosion des bulles. Si les pores formés sont petits (autour de 5 nm de diamètre), la membrane est restaurée entre 6s et 20s après sonoporation. Si le diamètres des pores est plus large (autour de 20 nm), les pores ne se referment pas [106]. La réparation de ces pores nécessite le recrutement de vésicules intracellulaires vers le site de la lésion, un processus qui dépend de l'ATP [102]. La réparation serait aussi liées à la formation de blebs à la surface de la membrane plasmique [107].

Les techniques développées ici affectent la membrane différemment. La méthode choisie dé-

pend du type de molécule cible, de l'organisme cible, de l'efficacité souhaitée et de nombreux autres paramètres. Si on se réfère aux challenges de perméabilisation listés dans la partie précédente, on peut estimer les méthodes les plus efficaces selon l'objectif. Le tableau 2.4 référence quelques caractéristiques globales des processus de perméabilisation abordés.

Méthode	Perturbation de la cellule	Efficacité de l'internalisation	Contrôle du dosage	Taille des pores
détergents	réversible	$\approx 90\%$ [108]	précis	4 nm (saponine) [109]
électroporation	haut taux de mortalité cellulaire	$> 95\%$ [87]	difficile	< 1 nm [110]
micro-injection	$\approx 50\%$ de mortalité	$\approx 90\%$ [93]	très précis	(200-1000) nm [111]
optoporation	possible toxicité	$\approx 50\%$ [112]	précis	(10-2000) nm [113]
transporteurs	conservation de la viabilité cellulaire	$\approx 70\%$ [114]	précis	
sonoporation	conservation de la viabilité cellulaire	$\approx 30\%$ [115]	difficile	≈ 10 nm [116]
osmotique	modification du volume cellulaire		faible	(20-50) nm [109]

TABLE 2.4 – Quelques propriétés de techniques de perméabilisation de la membrane plasmique.

2.2.4 Processus de réparation de la membrane

Lorsqu'il y a formation de pores au niveau de la membrane plasmique, une réponse cellulaire est immédiatement enclenchée afin de préserver la viabilité cellulaire. Les ions calcium jouent un rôle crucial dans l'activation de la réponse cellulaire. En effet, une brèche dans la membrane induit un flux immédiat d'ions calcium (concentration à 1.5 mM extra-cellulaire contre 0.1 mM intracellulaire) de taille ≈ 40 Da. Cette entrée de Ca^{2+} est approximativement corrélée à la densité des pores. Des études ont montré que le temps de réparation de la membrane augmente dans les environnements pauvres en Ca^{2+} et que la réparation échoue lorsqu'ils ne sont pas présents extracellulairement [117, 118]. Un autre mécanisme de déclenchement est l'oxydation de la membrane plasmique [119]. Lorsqu'un pore se forme, la tension de la membrane est altérée. Les dynamiques de reformation ou d'ouverture de la bicouche lipidique s'exprime par la force F :

$$F = 2\sigma(r_p) - \frac{\lambda}{r_p}, \quad (2.1)$$

avec $\sigma(r_p)$ la tension de surface de la membrane qui tend à ouvrir le pore de rayon r_p , et λ la tension de ligne associée à la pénalité énergétique due à l'exposition des lipides hydrophobes le long du périmètre du pore, et qui tend à les refermer [120].

Plusieurs hypothèses existent quant à la réparation de la membrane. L'un des processus est l'utilisation de stocks de membrane afin de réduire la tension de la surface pour accélérer la

fermeture des pores (voir équation 2.1). Ces stocks sont conservés par la cellule sous forme de vésicules ou de structures membranaires internes, tels que les lysosomes. Une autre hypothèse est la fusion de vésicules existants aux alentours du pore pour créer un patch qui fusionne avec la membrane plasmique pour fermer le pore. Lorsqu'il y a rupture de la membrane pour la perméabiliser, cela résulte souvent en une dégradation du cytosquelette. La réparation des pores dépend donc aussi des processus de reformation du cytosquelette [120].

Cette partie a permis d'introduire quelques processus couramment utilisés pour induire la perméabilisation de la membrane plasmique. Quelques applications ont été listées. L'un des facteurs crucial de ces processus est le contrôle de la perméabilisation induite, ainsi que la conservation de la viabilité cellulaire. Il est nécessaire, en parallèle, de développer des outils d'étude de la perméabilisation, afin de mieux comprendre les processus à l'œuvre.

2.3 Évaluer la perméabilité d'une cellule

Dans le contexte des applications à la perméabilisation de la membrane cellulaire, on retrouve la livraison de médicaments ou de molécules. Il est important dans ce cas de contrôler les dosages, et d'obtenir l'augmentation de la perméabilité de la membrane plasmique mais sans induire la mort cellulaire. Le contrôle de la perméabilité induite est donc nécessaire. Cette partie présente les méthodes permettant d'évaluer la perméabilité de la membrane plasmique.

2.3.1 Quelles sont les méthodes existantes pour obtenir des informations sur la perméabilisation ?

Les critères principaux des méthodes d'évaluation de la perméabilité sont leur efficacité ainsi que leur toxicité. Les techniques décrites ci dessous ont donc pour objectifs de mesurer la quantité de molécules transférées, la nature, ainsi que la viabilité cellulaire. Selon le contexte, différents facteurs sont recherchés. Les plus courants sont l'aspect non-invasif, la sensibilité, l'accès au temps réel, le type d'échantillon qu'il est possible d'analyser, l'aspect quantitatif, ainsi que l'accès à la nature des molécules transférées.

— Tests de traceurs macromoléculaires

Ces tests sont souvent utilisés pour mesurer la perméabilité macromoléculaire de monocouches cellulaires. Une mono-couche est cultivée sur une membrane micro-poreuse semi-perméable. Cet ensemble est placé entre deux compartiments. Le passage de solutés est donc possible à travers la couche cellulaire, et à travers la membrane micro-poreuse, d'un compartiment à l'autre. Les cellules sont perméabilisées, puis des traceurs macromoléculaires marqués par un fluorophore sont ajoutés dans le compartiment supérieur. Le milieu de culture du compartiment inférieur est lui remplacé, souvent par un tampon transparent. Un échantillon de ce nouveau milieu est prélevé à des temps spécifiques. L'augmentation en concentration du traceur dans ce compartiment est proportionnelle à la perméabilité de la mono-couche. La quantité de macromolécules transférée peut s'estimer à l'aide de fluorophores et de la microscopie confocale [121].

— Tests via une mesure de résistance

Ces tests ont l'avantage d'être non invasifs et en temps réel. La perméabilité est estimée via la mesure de la résistance électrique transépithéliale/endothéliale (**TEER**). La membrane plasmique est en effet caractérisée par une résistance électrique. La mesure de la résistance est corrélée à l'intégrité de la membrane. Elle se fait via deux électrodes séparées par une mono-couche de cellules. La mono-couche est cultivée sur une membrane semi-perméable. La résistance est calculée par la loi d'Ohm via la mesure de la tension et du courant qui traverse la mono-couche. La perméabilité de la mono-couche P_e est inversement proportionnelle au produit de la résistance R et de la surface de la membrane semi-perméable S ($TEER = R \times S$ et $P_e \propto 1/TEER$) [122, 123].

— Tests d'exclusion

Une quantité contrôlée de molécules normalement non perméables à la membrane plasmique est placée dans le milieu extra-cellulaire. Les cellules sont perméabilisées. On peut quantifier la quantité de ces molécules qui ont pu entrer dans la cellule. Pour ça on utilise des fluorophores (iodure de propidium) ou du trypan blue. On peut ainsi corrélérer la quantité de molécules entrées avec la perméabilité de la cellule.

Pour la mesure via l'**iodure de propidium (IP)**, cette molécule de 0.67 kDa peut se lier de manière irréversible à l'ADN dans le noyau ou à l'ARN dans le cytosol (moins fortement), puis fluoresce à 620 nm. Le taux de perméabilisation se calcule via la quantité de fluorescence récupérée. Pour le **trypan blue**, les cellules perméabilisées deviennent bleues. Les cellules intactes non. Le taux de perméabilisation est le rapport entre le nombre de cellules bleues et le nombre de cellules total.

— Quantification de molécules typiquement intracellulaires (protéines, ATP, LDH)

Cette méthode est destructive. Elle consiste à mesurer la quantité extra-cellulaire de ces molécules après perméabilisation. La quantification de ces molécules se fait par des méthodes comme un **test BCA** (bicinchoninic acid) ou via de la **spectrométrie de masse**, ou encore via des méthodes chimiques comme la **chromatographie**.

Le **test BCA** est un test colorimétrique qui repose sur deux processus. Le premier est la combinaison des liaisons peptidiques avec les ions Cu^{2+} qui implique la production d'ions Cu^+ en solution alcaline. La quantité de Cu^+ est proportionnelle à la quantité de protéines dans la solution. Le second processus est la combinaison des ions Cu^+ avec de l'acide bicinchoninc qui induit la formation d'un composé violet. Ces processus sont représentés sur la figure 2.8.

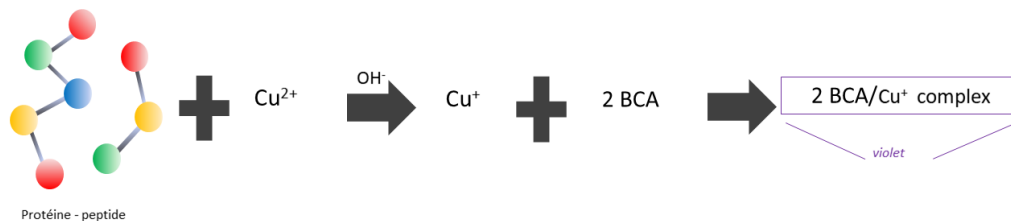


FIGURE 2.8 – Principe du test BCA : réduction des ions Cu^{2+} en ions Cu^+ . l'association des ions Cu^+ avec l'acide bicinchoninic induit la formation d'un complexe violet.

Le taux de perméabilisation est calculé via une mesure d'absorbance du complexe violet.

La **spectrométrie de masse** concerne les molécules de moins de 1000 Da qui sont difficilement détectables. Elle permet de détecter et d'identifier des molécules inconnues en mesurant leur ratio masse sur charge et en caractérisant leur structure chimique. Le principe est le suivant : une protéine est récupérée puis dégradée en petits peptides par des enzymes comme la trypsine. Les peptides sont séparés par chromatographie liquide. La solution de peptides est ionisée. Les molécules de ratio masse/charge identique sont collectées ensemble et détectées. Un spectre est ensuite tracé avec les différents ratios.

— Microscopie électrochimique à balayage (SECM)

Cette méthode est utilisée pour des mesures *in vivo*. Elle concerne l'étude de molécules qui participent à des réactions d'oxydation-réduction (redox). Une sonde est placée près d'une cellule unique. Lorsque la membrane est perméabilisée, des molécules diffusent vers la sonde et l'oxydant. La sonde balaye la cellule à une hauteur fixée avec une tension fixe. Lorsqu'elle est oxydée, le profil (courant, distance) est modifié. La perméabilité peut y être corrélée.

— Dispositif ATR - THz

Le fonctionnement de ce dispositif a été décrit dans le premier chapitre. Son principe est de combiner une configuration ATR avec les fréquences térahertz. Il fait interagir une onde évanescente d'une dizaine de micromètres en longueur caractéristique avec un tapis de cellules adhérentes à confluence. Lorsque les cellules sont perméabilisées, la permittivité relative du milieu sondé par l'onde évanescente est modifiée. La modification d'intensité de l'onde évanescente impacte le signal réfléchi. Cela donne accès, par mesure du signal réfléchi, à la perméabilisation globale induite sur le tapis cellulaire. Ce type de mesure est non invasif. Il est semi quantitatif, puisqu'il donne accès à la perméabilisation globale de la couche cellulaire, mais il a été montré que l'amplitude de la mesure dépendait de la taille des molécules échangées [25]. Le capteur est très sensible : il atteint une sensibilité relative de 10^{-4} et un niveau de détection de l'ordre du μM pour des molécules en solution [56]. De

plus, les informations sur la perméabilisation sont obtenues en temps réel. Des exemples de l'application à l'étude de la perméabilisation sont détaillés dans la [section 2.4](#).

2.3.2 Évaluation des outils d'étude de la perméabilisation

Afin de comparer les différentes méthodes d'étude de la perméabilisation, on peut utiliser plusieurs critères. On définit la limite du blanc (LOB) comme la concentration apparente la plus élevée de l'analyte que l'on s'attend à trouver lorsque l'on teste des répliquats d'un échantillon vierge ne contenant pas d'analyte. La limite de détection (LOD) est la plus faible concentration d'analyte susceptible d'être distinguée de manière fiable de la LOB et à laquelle la détection est possible [124]. Un autre critère clé est le caractère destructif des méthodes utilisées. Cela correspond à la viabilité cellulaire. Ces différents critères ont été schématisés sur la figure 2.9.

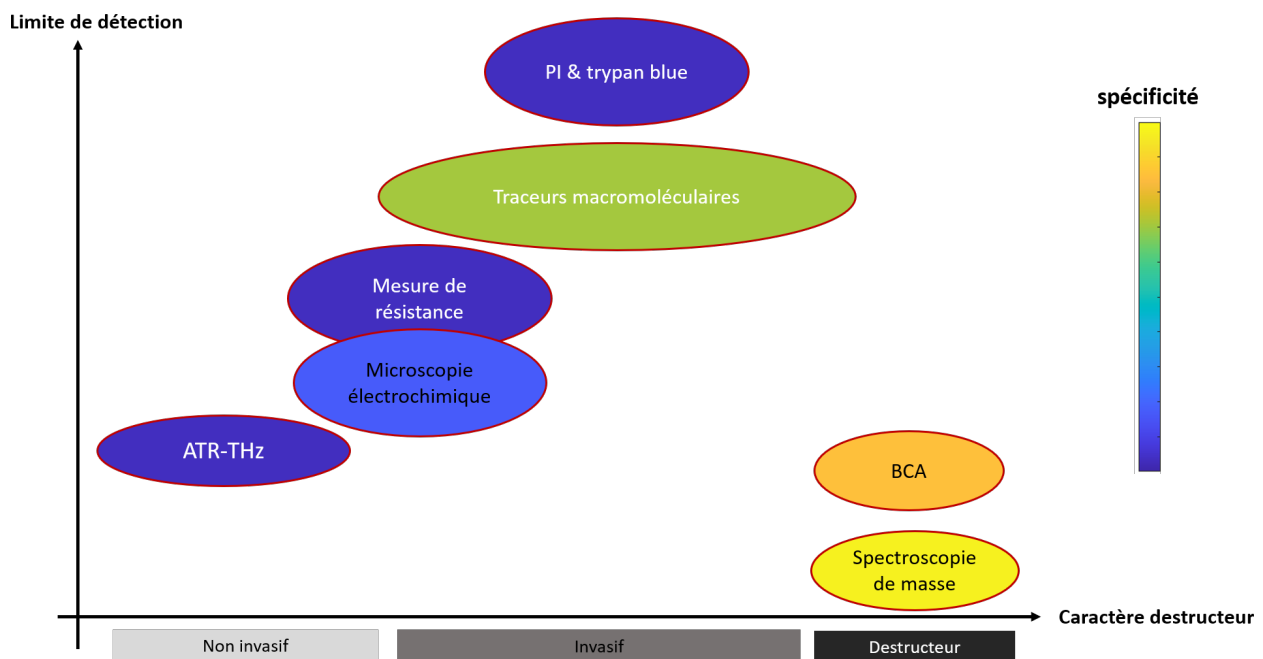


FIGURE 2.9 – Comparaison de différentes méthodes pour mesurer la perméabilité d'une cellule. L'axe des abscisses correspond au caractère destructeur et invasif de la méthode. L'axe des ordonnées correspond à la limite de détection approximative des différentes méthodes [56, 125–127]. La couleur de remplissage des formes correspond à la spécificité de la méthode, selon la barre de couleur indiquée.

Les techniques les plus sensibles en terme de détection sont la spectrométrie de masse et le test BCA. La spectrométrie de masse a de plus la caractéristique d'être extrêmement spécifique. Cependant, ce sont aussi les méthodes la plus invasives et destructrices pour la cellule ou les molécules. Les méthodes [SCEM](#) (microscopie électrochimique) et de mesure de résistance (TEER) sont peu invasives, leur limite de détection est basse. Le dispositif ATR-THz est complètement non invasif, avec une meilleure limite de détection. La méthode utilisée dépend des objectifs recherchés. En effet, les types d'informations récupérées sont différents. La microscopie électrochimique (SECM) est spécifique aux ions redox et ne peut étudier qu'une cellule à la fois. Les tests BCA sont spécifiques aux protéines. Quant au dispositif ATR-THz, il n'est pas spécifique, il récolte un signal moyen sur le contenu du cytosol.

Du fait de sa sensibilité, des mesures en temps réel, de son caractère non invasif, le dispositif ATR - THz est idéal pour l'étude de nombreuses applications liées à la perméabilisation de la membrane plasmique pour des mono-couches de cellules épithéliales.

2.4 Évaluation de la perméabilité d'une cellule via le dispositif ATR - THz

Cette partie présente l'application directe du dispositif à l'étude de la perméabilisation de la membrane plasmique de cellules, via les résultats précédents.

La configuration ATR induit la formation d'une onde évanescente à l'interface entre la surface du prisme et le milieu extérieur, d'une longueur caractéristique de environ 15 μm . Notre dispositif est adapté pour l'étude des dynamiques de perméabilisation de cellules épithéliales, les cellules MDCK (Madin-Darby canine kidney), dont la hauteur correspond à l'ordre de grandeur de l'onde évanescente. Les cellules sont cultivées sur une lame de silicium, de même nature que le prisme. Une fois à confluence, elles sont grattées et retirées d'une moitié de la lame, puis la lame est posée sur un prisme en configuration ATR. Du pinène, un liquide d'indice, est ajouté entre la lame et le prisme. Enfin, la lame est recouverte de milieu de culture. Ainsi, via la modulation duale du faisceau THz, une partie du faisceau va sonder les cellules, et l'autre, de référence, ne va sonder que du milieu de culture.

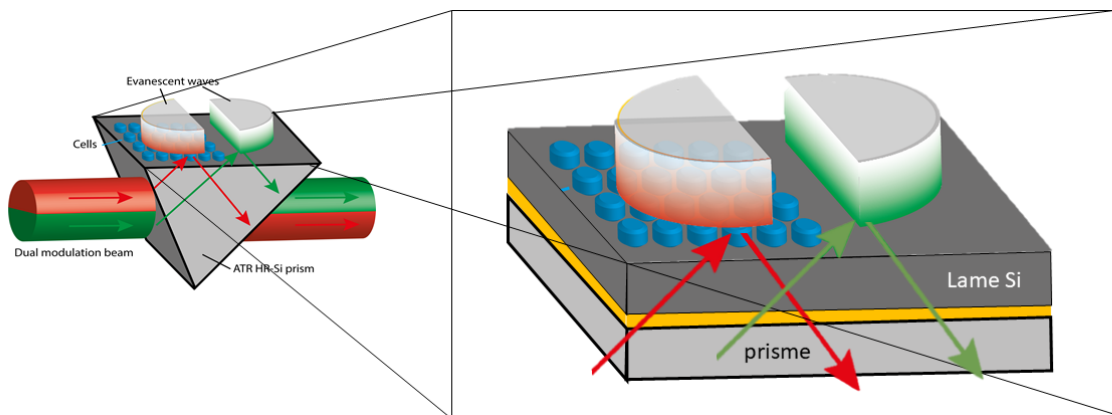


FIGURE 2.10 – Principe de la mesure via le dispositif ATR - THz. A gauche, le prisme sur lequel arrivent les deux faisceaux térahertz modulés à deux fréquences différentes. A droite, un zoom sur la surface du prisme. Des cellules MDCK (en bleu) sont cultivées sur une moitié de lame silicium posée à la surface du prisme. Du milieu de culture recouvre l'ensemble de la lame. Le faisceau THz atteint l'interface lame - cellules en configuration ATR. Une onde évanescente, en dégradé rouge, se forme au niveau des cellules. Une onde évanescente, en dégradé vert, se forme au niveau de la moitié vide de la lame de silicium, qui n'est recouverte que de milieu de culture. Elle sert de référence. L'épaisseur jaune sur la figure représente le pinène, liquide d'indice entre le prisme et la lame de silicium.

La figure 2.10 illustre l'arrivée des deux faisceaux modulés au niveau du prisme, puis leur réflexion sur la surface supérieure de la lame. La partie droite de la figure est un zoom de la

surface du prisme, sur laquelle est posée la lame de silicium. On peut y observer les cellules à confluence, ainsi que l'onde évanescente induite par la configuration ATR.

Il a été montré que l'origine du contraste THz est liée à une modification de la constante diélectrique de l'eau liquide en présence de solutés. Lorsque la cellule est perméabilisée, le contenu cellulaire est modifié. La zone sondée correspond à la hauteur des cellules. On considère donc que lorsqu'une molécule sort de la cellule, elle sort de la zone sondée. On a donc accès aux dynamiques de changement de contenu cellulaire, de manière non invasive et en temps réel. De plus, le signal récupère les informations d'un tapis de cellules, donc il est moyenné sur quelques dizaines de milliers de cellules. Un avantage de cette technique est que le seuil de sensibilité de la détection de la perméabilisation ne dépend pas de la taille des molécules transférées. La méthode est globale.

2.4.1 Perméabilisation induite par un détergent

Grognot et al. ont développé le modèle de couche de solvation (voir chapitre 1) pour expliquer l'origine du contraste THz en solution aqueuse [41]. La figure 2.11 montre l'évolution du contraste THz en fonction du poids moléculaire de différentes molécules, à la fois via les données expérimentales obtenues par de la spectroscopie, et les données du modèle. Les données ont été acquises dans ce cas par TDS - THz. Le contraste relatif Δ_{rel} est calculé en utilisant le maximum d'amplitude du signal (PA) avec et sans échantillon :

$$\Delta_{rel} = \frac{PA_{echantillon} - PA_{reference}}{PA_{reference}}.$$

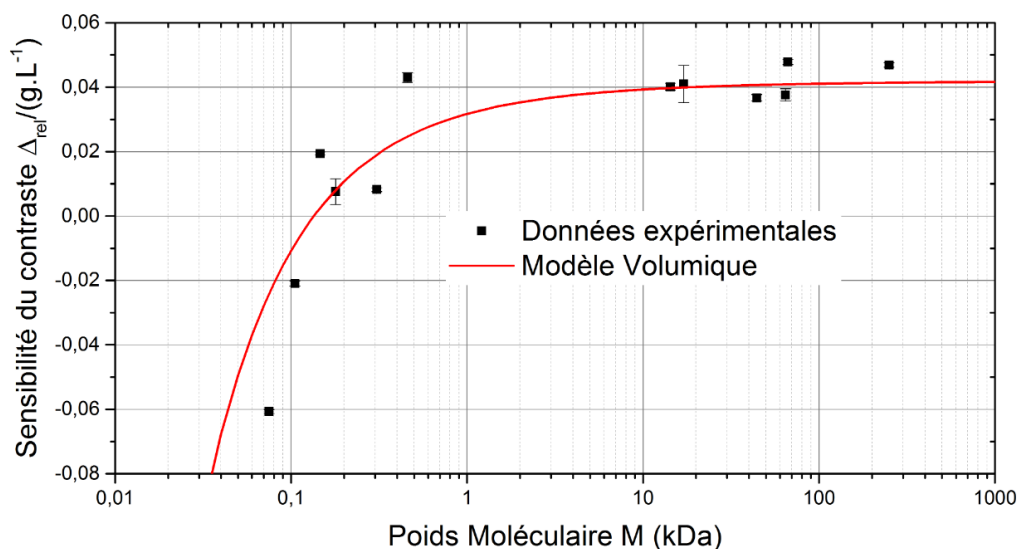


FIGURE 2.11 – Données expérimentales de la sensibilité du contraste à plusieurs acides aminés, peptides et protéines (rectangles noirs). La courbe rouge est obtenue via le modèle de la couche de solvation. Tirée de [25].

Il a été observé que Δ_{rel} était négatif pour des petites molécules comme des ions ou des acides aminés. Le contraste devient positif pour de plus grandes molécules comme des protéines.

On aura donc des informations semi-quantitatives lors de l'étude des changements de contenu cellulaire.

Zheng et al. ainsi que Grognot et al. ont étudié les dynamiques des cellules MDCK après perméabilisation par de la saponine, un détergent qui forme des pores au niveau de la membrane plasmique [128, 129]. La saponine est typiquement utilisée comme expérience contrôle pour des études sur la perméabilisation. Les dynamiques ont été obtenues via un dispositif THz-ATR, sans marquage des cellules, et en temps réel. La figure 2.12 (A) montre ainsi l'évolution du contraste THz en fonction du temps lors de l'ajout de saponine sur des cellules MDCK pour deux concentrations de saponine. La saponine est ajouté à un temps 0 min. On observe que Δ décroît après l'ajout de la saponine. Cela est dû à la fuite du contenu cellulaire dans le milieu extra-cellulaire. On observe que la dynamique est moins rapide et de plus faible amplitude pour la concentration la plus faible en saponine.

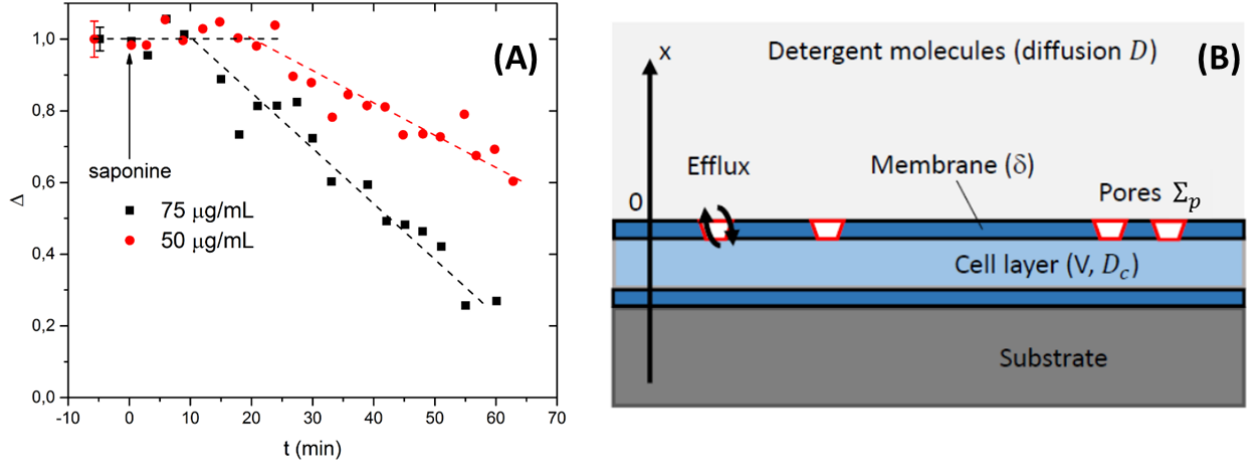


FIGURE 2.12 – Dynamiques de perméabilisation de cellules MDCK par la saponine via le dispositif ATR-THz. (A) : dynamique du signal à deux concentrations différentes : 75 $\mu\text{g/mL}$ (rectangle noir) et 50 $\mu\text{g/mL}$ (rond rouge). En pointillé, le plateau initial, puis les approximations linéaires de la diminution du contraste Δ . Tirée de [25]. (B) : modèle développé pour la formation des pores et les différents paramètres géométriques et de diffusion. Tirée de [128].

Un modèle a été développé prenant en compte la diffusion de la saponine et des molécules du cytosol, la géométrie de la cellule, ainsi que la dynamique des pores formés (voir figure 2.12 (B)). Le modèle permet de déterminer une expression de l'évolution normalisée du nombre de molécules qui sortent du cytosol pour des pores s'agrandissant ou diminuant en taille, N_{ag} et N_{dim} respectivement :

$$\frac{N_{ag}}{N_{c0}} = \exp \left[-\Phi \tau^{3/2} \left\{ \frac{\sqrt{\pi}}{2} \exp \left(\frac{t}{\tau} \right) \operatorname{erf} \sqrt{\frac{t}{\tau}} - \sqrt{\frac{t}{\tau}} \right\} \right], \quad (2.2)$$

$$\frac{N_{dim}}{N_{c0}} = \exp \left[-\Phi \tau^{3/2} \left\{ \frac{\sqrt{\pi}}{2} \exp \left(\frac{t}{\tau} \right) \operatorname{erfi} \sqrt{\frac{t}{\tau}} - \sqrt{\frac{t}{\tau}} \right\} \right]. \quad (2.3)$$

La normalisation se fait en fonction du nombre initial de molécules contenues dans le cytosol N_{c0} . erf correspond à la fonction d'erreur, erfi à la fonction d'erreur imaginaire. τ est le

temps caractéristique de l'évolution de la taille des pores. Φ est une constante qui dépend de la constante de diffusion de la saponine et de celle du cytosol, ainsi que des paramètres géométriques de la cellule affichés sur la figure 2.12. Le modèle montre que la taille des pores créés par les molécules de saponine est statique, et que la perméabilisation des cellules est limitée par la diffusion des molécules de saponine.

2.4.2 Perméabilisation induite par électroporation

Azan et al. ont étudié la composition moléculaire de cellules MDCK exposées à des impulsions électriques via un dispositif ATR -THz. La technique d'électroporation a été abordée dans la sous-partie précédente. L'exposition d'un tapis cellulaire à des impulsions électriques de courte durée induit une perméabilisation temporaire de la membrane plasmique. Ce phénomène a été étudié via le dispositif ATR -THz ainsi que par fluorescence et par spectroscopie Raman combinée à de la microscopie confocale.

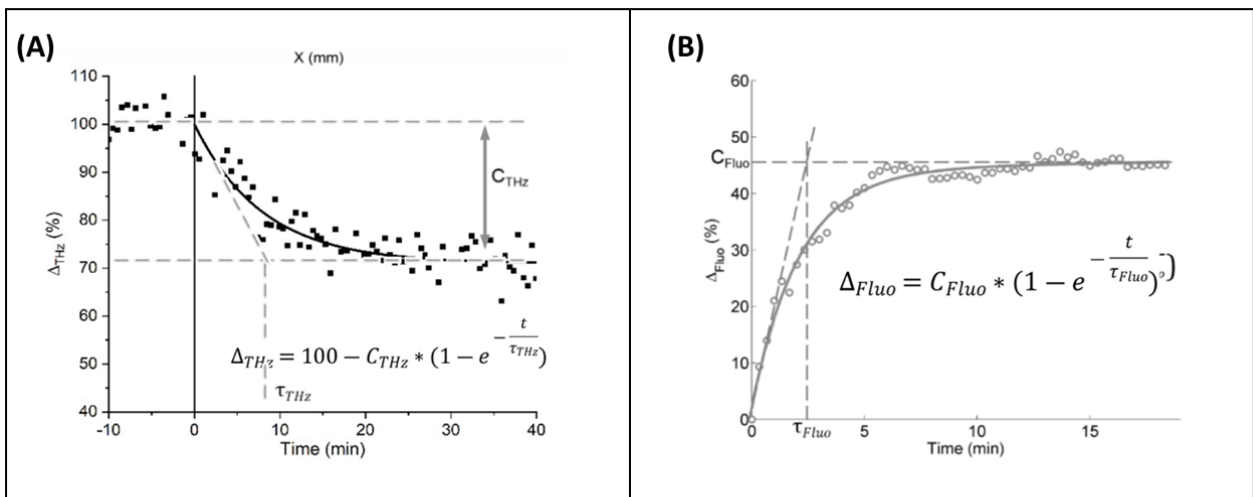


FIGURE 2.13 – Mesures d'électroporation sur des cellules MDCK via le dispositif ATR-THz et de la fluorescence (Yo-PRO-1). (A) : Évolution du signal THz normalisé après avoir été exposé à des impulsions μs . Les carrés sont les points de mesures, la courbe noire est un fit exponentiel décroissant. (B) : Évolution de la fluorescence des cellules correspondant à une entrée de YoPro après exposition à des impulsions μs . Les cercles correspondent aux points de mesure, la courbe grise est un fit exponentiel. Dans les deux cas, les impulsions ont été délivrées au temps $t = 0$ min; il y a eu 8 impulsions à 1250 V/cm. Figure tirée de [130].

Une décroissance du signal ATR -THz est observée après application d'un champ électrique sur une mono-couche de cellules, associée à sa perméabilisation. Cette décroissance est due à la fuite de molécules hors de la cellule, ainsi qu'à une entrée osmotique d'eau induisant une baisse de la concentration des molécules dans la cellule. L'évolution du signal THz est affichée sur la figure 2.13 (A). Un temps caractéristique ainsi qu'une amplitude sont associés aux variations de signal. Des impulsions d'intensité différentes ont été appliquées sur les cellules. Un effet de dose est observé via les mesures THz - ATR. Il est associé au nombre de pores créés ainsi qu'à leur taille. Le dispositif ATR-THz renseigne donc sur les dynamiques de perméabilisation

pour des petites molécules (pour un champ faible appliqué) et des grandes molécules (pour un champ fort appliqué). Le signal dû à la fluorescence est affiché sur la figure 2.13 (B). Il est en exponentielle décroissante, pour l'augmentation de la fluorescence au fur et à mesure de la perméabilisation. Pour des impulsions de faible intensité, la variation du signal de fluorescence est presque négligeable, mais parfaitement identifiable en THz.

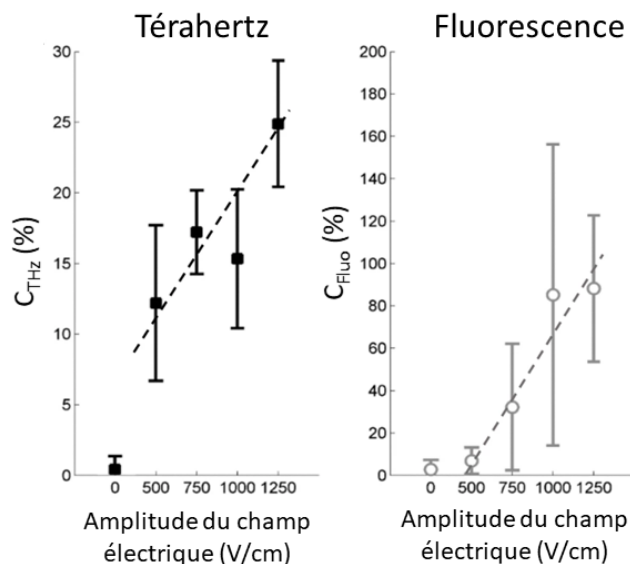


FIGURE 2.14 – Évolution du paramètre d'amplitude du fit exponentiel pour les mesures THz - ATR (C_{THz}) et de fluorescence (C_{Fluo}) sur des cellules MDCK exposées à des impulsions électriques de différentes amplitudes. Les courbes en pointillées sont des guides pour l'œil. Figure tirée de [130].

On peut observer sur la figure 2.14 que l'amplitude de décroissance du signal THz C_{THz} est autour de 10% pour un champ électrique d'amplitude 500 V/cm. Dans les cas de mesures de fluorescence, il faut atteindre 750 V/cm pour observer une réponse. En effet, les informations récupérées ne concernent que la molécule de Yo-PRO-1 de taille 630 Da [130].

Le dispositif ATR - THz a été testé pour l'étude de la perméabilisation de la membrane plasmique induite par diverses méthodes : électroporation, optoporation (voir chapitre 5), détergent. Il permet de faire des mesures semi-quantitatives, en temps réel, et non invasives des dynamiques de perméabilisation de la membrane plasmique d'un tapis cellulaire à confluence.

Conclusion du chapitre

La membrane plasmique assure l'intégrité de la cellule. Sa structure permet de plus d'induire des échanges contrôlés et nécessaires entre les milieux intra et extra-cellulaires. La perméabilisation de la membrane plasmique peut être forcée via différentes techniques. Cette perméabilisation mène à de nombreuses applications, notamment dans le domaine médical. Le contrôle de la perméabilisation induite est important, afin d'avoir un effet optimal, et de maîtriser la viabilité cellulaire. Pour cela, des techniques d'étude de la perméabilisation ont été développées. Parmi elles, le dispositif ATR - THz permet d'étudier la perméabilisation de la membrane plasmique de cellules épithéliales pour une large gamme de molécules, cela de manière semi-quantitatives, en temps réel, et non invasive.

Chapitre 3

Impact de la thérapie photodynamique sur la membrane plasmique

La thérapie photodynamique (PDT) est une méthode utilisée comme traitement contre certains types de cancers. Elle induit la création d'espèces réactives oxydantes (ROS) à proximité de cellules cancéreuses et provoque leur mort. Les ROS oxydent différentes molécules dans la cellule, y compris des lipides, ce qui mène à la création de flux et d'échanges à travers la membrane plasmique. Ce processus est étudié via le dispositif ATR - THz et des méthodes de biologie, afin d'obtenir des informations sur la perméabilisation de la membrane induite par la PDT. Cette étude s'est déroulée en collaboration étroite avec l'équipe IDeAS du laboratoire de Chimie des colloïdes, polymères et assemblages complexes (Softmat) de l'Université de Toulouse.

3.1 La thérapie photodynamique (PDT)

Ce chapitre vise à étudier les processus de perméabilisation induits par la PDT sur la membrane plasmique. Cette partie introduit en premier lieu le fonctionnement global de la PDT. En second lieu, elle présente ses applications principales et les différents challenges que cette technique présente. Enfin, les effets connus sur la membrane plasmique seront introduits.

3.1.1 Principe de la PDT

3.1.1.1 Le mécanisme de la PDT

La PDT repose sur le principe d'oxydation photosensible. Cela désigne l'interaction de la lumière avec une molécule photosensible (PS) en présence d'oxygène (figure 3.1(A)). Cette réaction induit plusieurs transferts d'énergie. Le PS est excité et passe de l'état singulet fondamental (^1PS) à un état supérieur singulet excité instable ($^1\text{PS}^*$) dont le temps de vie est très court. Il peut se désexciter dans son état fondamental et émettre de la fluorescence, mais peut aussi se désexciter dans un état intermédiaire de moindre énergie, plus stable, l'état triplet ($^3\text{PS}^*$). Trois réactions peuvent alors se produire. Soit l'état triplet se désexcite dans l'état fondamental par phosphorescence, soit son énergie est transférée à une molécule oxygène adjacente O_2 . Ce transfert peut mener à la formation d'oxygène singulet $^1\text{O}_2$ (figure 3.1(B)). Celui-ci est une espèce très réactive, qui oxyde la cellule et peut mener à sa mort par photo-oxydation (figure 3.1(C)). Cette réaction est prédominante sur les autres. Une autre réaction est encore possible : si l'état triplet excité $^3\text{PS}^*$ interagit directement avec la membrane plasmique ou avec l'eau environnante, il peut produire des radicaux qui possèdent un ou plusieurs électrons non appariés sur leur couche externe. Ces radicaux interagissent avec l' O_2 et produisent des ROS (espèces réactives de l'oxygène) de type $\text{OH}\cdot$, $\text{O}_2^{\cdot-}$ et H_2O_2 [131, 132].

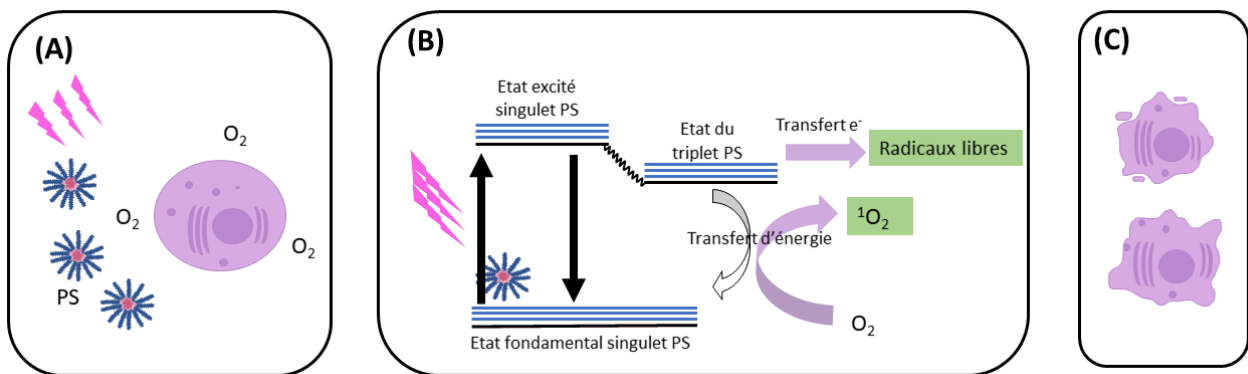


FIGURE 3.1 – Principe de la thérapie photodynamique (PDT). (A) Les trois éléments nécessaires sont réunis autour d'une cellule : les molécules photosensibles (PS), l'oxygène (O_2) et la lumière, représentée par les éclairs roses. (B) Excitation de l'état fondamental de la molécule photo-sensibilisante en état excité, désexcitation dans un état de triplet, qui induit la transformation des oxygènes en espèces réactives oxydantes (ROS). (C) Mort cellulaire induite par photo-oxydation.

Les molécules de PS sont fluorescentes, il est donc possible de les localiser dans les cellules pour identifier où ils agissent [133]. Elles ont été localisées dans les mitochondries, les lysosomes,

le réticulum endoplasmique, les membrane plasmiques. Leur position a un fort impact sur le processus de PDT qui s'ensuit [134].

Les éléments intervenant dans la PDT sont non toxiques. Leur combinaison induit la mort cellulaire des tissus adjacents et sont donc utilisés pour détruire des tumeurs. Selon les paramètres utilisés (type de PS, illumination, quantité d'O₂, localisation du PS dans la cellule notamment), la mort cellulaire est provoquée par différents mécanismes. Mroz et al. [135] les ont recensés.

On trouve en premier lieu **l'apoptose**, la mort cellulaire programmée, pour laquelle les cellules déclenchent leur autodestruction en réponse à un signal. En effet, les ROS créés via la PDT induisent des dommages sur les protéines anti-apoptotiques et en active des pro-apoptotiques [136–138]. La PDT peut induire de l'apoptose autrement, par exemple via la fuite de la protéine cytochrome c des mitochondries dans le cytosol induite par la perméabilisation de la membrane des mitochondries [139,140].

En second lieu, on trouve **la nécrose**, la mort cellulaire induite par une perte d'intégrité de la membrane, accompagnée de la destruction des organelles et d'un gonflement du cytoplasme. La distribution entre les mécanismes d'apoptose et de nécrose lors de la PDT dépend de nombreux paramètres. Un des paramètres est le niveau de cytotoxicité [141]. Un autre est la localisation du PS. Par exemple, la nécrose est plus importante si le PS est dans la membrane. On observe alors que la nécrose est prédominante sur l'apoptose, et est accompagnée d'une fuite rapide d'ATP [142]. Un dernier paramètre est la confluence des cellules [143].

Enfin, le mécanisme de mort cellulaire lié à **l'autophagie** est aussi induit par la PDT [144]. L'autophagie est normalement un processus qui participe au fonctionnement de la cellule. Elle permet aux cellules de se dégrader et de recycler leurs protéines et organites pour maintenir l'homéostasie. L'autophagie est notamment utilisée pour se défendre contre les dommages générés par les ROS [145]. Cependant, lorsque ce mécanisme est perturbé, il peut mener à la mort cellulaire. La PDT pourrait provoquer une réponse excessive de l'autophagie, via la surproduction de ROS [146], ou bien endommager les organelles impliquées dans le processus d'autophagie [147].

3.1.1.2 Les molécules photosensibilisantes s'accumulent dans les tissus cancéreux

La PDT peut induire la mort cellulaire, utile par exemple dans le cas de l'oncologie. Il est alors important que les PS atteignent en priorité les tissus cibles, et non pas les tissus sains.

Le processus de PDT est déclenché par l'association des composants : PS, O₂ et lumière. De plus, la distance de diffusion de l'oxygène singulet ¹O₂ est estimée autour de 0.01-0.02 μm, soit un temps de vie de 0.01-0.04 μs [148]. La PDT agit donc principalement dans la zone éclairée. La zone traitée peut donc être bien contrôlée, en focalisant la lumière.

Dans le cadre du traitement contre le cancer, il a été montré que les molécules photosensibilisantes tendent à s'accumuler plus dans les tissus cancéreux que dans les tissus sains. Une des raisons principales est la vascularisation des tumeurs. Les tumeurs sont souvent caractérisées par une vascularisation anormalement élevée. Cela augmente la perméabilité des tissus et les rend donc plus accessibles au PS [149]. Ce processus s'explique via l'effet **EPR** (Enhanced Permeability and Retention). Ce phénomène désigne un mécanisme dans lequel des composés macromoléculaires peuvent s'accumuler dans une zone vascularisée d'une tumeur et permettre la délivrance ciblée et la rétention de composés anticancéreux [150], notamment les PS lors de

la PDT [149, 151].

3.1.1.3 Les différentes applications de la PDT

La sous-partie précédente décrit les différents procédés de mort cellulaire induits par la PDT. Les molécules photosensibilisantes, surtout si elles sont vectorisées, tendent à s'accumuler dans les tissus cancéreux, par rapport aux tissus sains. L'application la plus développée de la PDT est donc l'oncologie. Les types de cancers visés concernent des tissus épithéliaux qu'il est possible d'exposer à une lumière : cancer de la peau, de l'œsophage, des poumons [152] ou de la vessie [153]. La PDT a été approuvée par la FDA (US Food and Drug Administration) dès 1995 comme traitement contre le cancer [154].

La PDT a d'autres applications, notamment dans le domaine de la dermatologie, pour le traitement des brûlures [155] ou de l'acné [156]. Mais aussi dans le cadre de malformations vasculaires [157], ou encore cardiovasculaire [158].

3.1.2 Les challenges de la PDT

L'un des principaux facteurs limitants de la PDT est l'impossibilité de traiter des tissus en profondeur. La profondeur d'**absorption** de la lumière visible (pour $\lambda < 600\text{nm}$) est faible. Le coefficient d'absorption au niveau de la poitrine est entre 0.60 et 0.86 cm^{-1} à 530 nm [159]. Cependant, en augmentant la longueur d'onde, vers l'infrarouge proche (entre 600 et 1200 nm), on peut augmenter la profondeur de pénétration. Le coefficient d'absorption au niveau de la poitrine est autour de 0.08 cm^{-1} à 780 nm [159]. Dans ce cas, le facteur limitant devient la faible énergie des photons transmis, qui ne peuvent exciter les molécules de dioxygène. La majorité des PS utilisés cliniquement ont donc une longueur d'onde d'excitation autour de 630 nm [154]. Un autre facteur limitant est lié à l'hypoxie caractérisant les tumeurs. La pression en oxygène est inférieure à 2.5 mm Hg dans une tumeur, contre une pression généralement supérieure à 40 mm Hg dans un tissu normal [160]. L'absence d'oxygène dans les tissus réduit la production de ROS et donc l'efficacité de la PDT [161].

On a vu précédemment que les molécules photosensibilisantes s'accumulent dans les tissus cancéreux. Cependant, la délivrance ciblée et efficace des PS reste limitée, notamment parce que la plupart d'entre elles sont hydrophobes et ont tendance à s'agréger en condition physiologique [162].

3.1.3 Les méthodes pour améliorer l'efficacité de la PDT

Les méthodes développées pour améliorer et adapter la PDT à l'objectif recherché jouent sur les trois acteurs de la PDT : le PS, l'oxygène et la lumière.

3.1.3.1 Il existe de nombreux types de PS, selon l'effet recherché

Modification directe des molécules photosensibles

Il existe de nombreux types de PS, développés pour optimiser le mécanisme de PDT. Les facteurs recherchés sont, d'après [163] :

- accumulation dans les tumeurs : le PS doit être efficace lorsqu'il est utilisé comme traitement contre le cancer. Il faut de plus éviter qu'il attaque les tissus sains.
- haut rendement quantique, afin de générer de nombreuses ROS et augmenter l'efficacité du processus.
- une activité minimale en l'absence de lumière : le processus doit être contrôlé et ne pas atteindre des tissus sains non éclairés.
- la non-toxicité. De plus le PS doit pouvoir être évacué rapidement des tissus après le traitement.
- ne pas s'agréger : du fait de leur caractère hydrophobe, les PS ont une faible solubilité dans l'eau et ont tendance à former des agrégats qui vont diminuer leur efficacité.
- absorber la lumière entre 600 nm et 800 nm.

Les catégories principales de PS sont les porphyrines, les chlorines, les phéophorbides, les porphycènes et les phtalocyanines [164]. Ils sont caractérisés par une structure macrocyclique avec 4 atomes d'azotes (voir figure 3.2). Celle-ci est très favorable à l'insertion de métaux. Ces derniers peuvent agir comme des catalyseurs dans les réactions d'oxydation en abaissant l'énergie d'activation. Ils participent donc au processus de création des ROS.

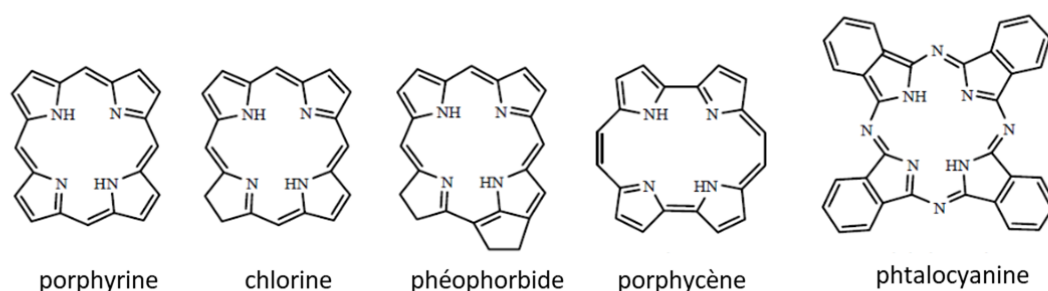


FIGURE 3.2 – Structures des principaux types de molécules photosensibilisantes : porphyrines, chlorines, phéophorbides, porphycènes et phtalocyanines. Figure tirée de [164].

Les micelles polymères pour encapsuler les agents photosensibles

L'encapsulation du PS dans un nano-vecteur est une méthode utilisée pour améliorer l'efficacité de la PDT. Les nanovecteurs limitent l'agréation des PS, augmentent la biocompatibilité du PS et peuvent modifier le taux d'absorption des PS dans les cellules [165]. Ce sont des systèmes de transport nanométriques. Ils protègent le PS de l'environnement extérieur. Il existe plusieurs types de nano-vecteurs, comme par exemple les liposomes [166] ou encore les dendrimères [167]. Un autre type de nano-vecteur utilisé est un auto-assemblage de copolymères, qui possède un bloc hydrophile et un bloc hydrophobe. Le bloc hydrophobe permet de protéger le PS, le bloc hydrophile permet au système de mieux pénétrer les tissus, sans former d'agrégats [168]. Des études ont montré l'augmentation de la photo-cytotoxicité lorsque le PS est encapsulé [169–171]. On se concentre ici sur des auto-assemblages polymère de type micellaires.

3.1.3.2 Paramétrage via l'oxygène

Les tumeurs sont un environnement naturellement hypoxique. Cela peut limiter l'efficacité de la PDT. De plus, l'augmentation de l'hypoxie dans les tissus visés induite par la PDT peut provoquer des dommages comme de l'angiogenèse, des métastases et une invasion tumorale. Shen et al. [172] ont recensé de multiples stratégies développées pour limiter ces phénomènes. Ils citent notamment l'utilisation de transporteurs d'oxygène, ou directement la régulation de l'environnement tumoral. Ainsi, Yan et al. ont développé un liposome permettant de transporter de l'hémoglobine, un transporteur d'oxygène, et une molécule anticancéreuse [173]. La régulation de l'environnement tumoral peut s'effectuer en utilisant des effets photo-thermiques pour augmenter le flux sanguin dans les tumeurs. Une autre méthode est la régulation de la structure micro-vasculaire des tumeurs. Shen et al. ont ainsi utilisé une molécule (thalidomide) pour augmenter la largeur des vaisseaux sanguins et donc amplifier l'oxygénation de la tumeur [174].

3.1.3.3 Paramétrage via l'illumination

Le type d'illumination effectué pendant la PDT a une grande influence sur le traitement. Les paramètres ayant une influence sur le résultat de la PDT sont la fluence incidente, la distribution spatiale de la lumière dans les tissus cibles, la dynamique temporelle d'illumination (lumière continue, pulsée, durée d'illumination). L'énergie lumineuse D reçue par le PS est définie, d'après [175], comme :

$$D = \int_0^t \kappa c(t) \frac{\Phi(t)}{h\nu} dt, \quad (3.1)$$

où κ est le coefficient d'extinction, c la concentration de PS et Φ le taux de fluence.

La PDT est utilisée sur une large gamme de tissus, caractérisés par des coefficients d'absorption et de diffusion différents [159]. Il faut bien connaître les paramètres pour adapter la PDT à l'endroit visé. La figure 3.3 montre l'évolution du coefficient d'absorption pour un tissu mammaire humain *in vivo*. La pénétration de la lumière sera très différente selon la longueur d'onde utilisée. Il faut trouver un compromis en termes de longueur d'onde, pour minimiser l'absorption du tissu, tout en maximisant l'absorption par le PS.

La lumière peut de plus avoir un effet direct sur le PS, par photobleaching, la perte d'efficacité des molécules fluorescentes à émettre de la lumière lorsqu'elles sont exposées à une excitation intense ou prolongée. Cela peut donc induire une baisse d'efficacité de la PDT [175].

Les méthodes d'illumination varient en fonction de la zone visée. Une illumination en surface est suffisante pour des zones accessibles comme la peau. Les sources utilisées peuvent être continues ou pulsées, de type diode laser ou simple LED [176]. La pénétration de la lumière étant limitée, il est nécessaire d'utiliser d'autres types d'illumination pour traiter les tissus en profondeur. De nombreux types de fibres optiques ont été développés à cet effet [177].

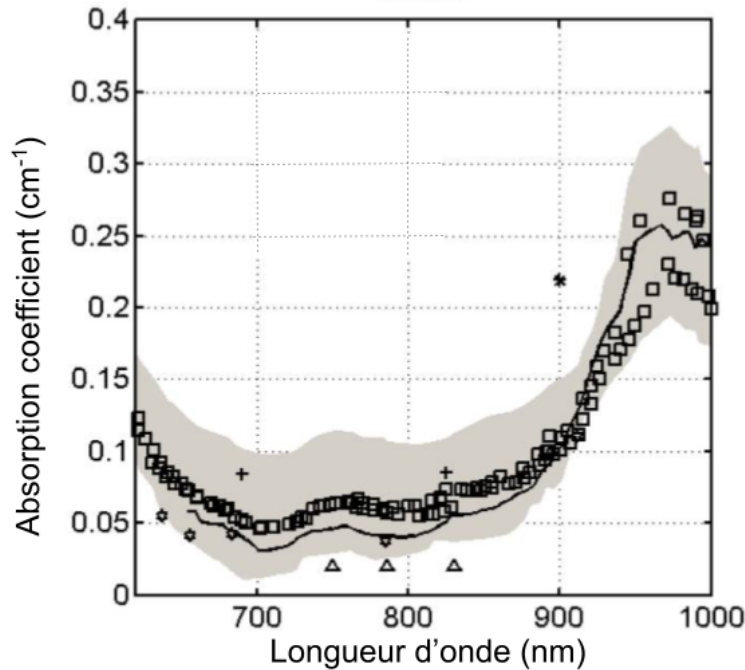


FIGURE 3.3 – Coefficient d’absorption en fonction de la longueur d’onde pour un tissu mammaire humain in vivo. Les données sont tirées de différentes études. La figure est tirée de [159].

3.1.4 Impact de la PDT sur la membrane plasmique de la cellule

La phototoxicité de la PDT est corrélée à la capacité des PS à interagir avec la membrane plasmique [178]. Comprendre les processus de perméabilisation de la membrane plasmique lors de la PDT est important, puisque c’est elle qui va indiquer comment la cellule réagit à la PDT : nécrose, apoptose [179],... ? Les ROS produites lors de la PDT oxydent des biomolécules : ADN, lipides, acides aminés, protéines [180]. Lorsque les ROS sont générées à proximité de la membrane plasmique, les cibles privilégiées de l’oxydation sont les phospholipides non saturés et les stérols [181]. L’oxydation des lipides a un fort impact sur la perméabilité de la membrane plasmique. Runas et al. ont montré qu’au taux de 2.5-10 % de lipides oxydés, la perméabilisation augmente d’un facteur 10 par rapport à un régime normal. Au dessus de 12.5 % de lipides oxydés, des pores se forment au niveau de la bicouche [182]. Les mécanismes par lesquels la membrane est perméabilisée sont encore mal connus. Tsubone et al. [181] ont référencé les études relatives à la perméabilisation par photooxydation. Plusieurs études ont montré que les sous-produits photo-oxydés comme les aldéhydes sont à l’origine de la formation de pores dans la membrane [179, 183, 184]. Ces sous-produits sont des lipides oxydés à chaînes tronquées ; ils ont une configuration différente dans la membrane, qui favorise l’apparition de pores. La perméabilité de la membrane est souvent étudiée via l’utilisation de **GUVs** (Vésicules Unilamellaires Géantes) comme modèle, par exemple en remplaçant une quantité définie de lipides insaturés par des sous-produits photo-oxydés tronqués [179, 185]. Cette réorganisation induit la réorientation des lipides de la bicouche, et mène à la formation de pores (voir figure 3.4).

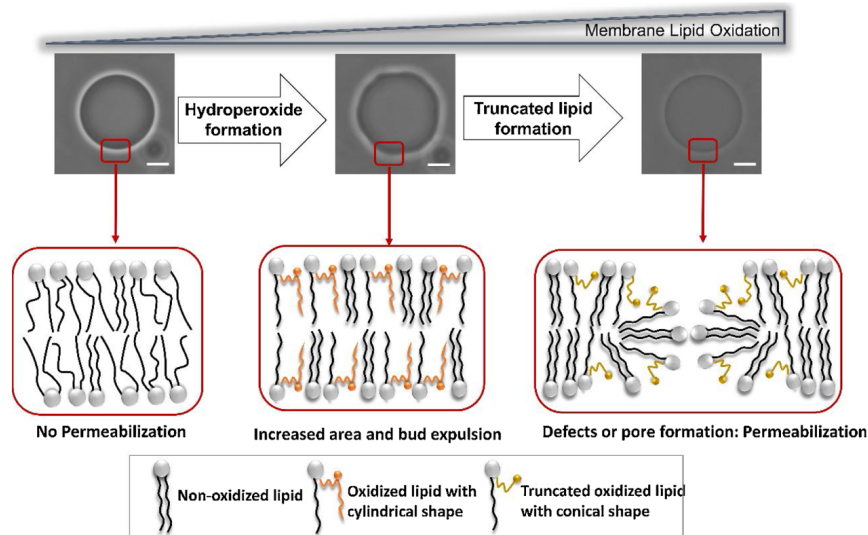


FIGURE 3.4 – Schéma illustrant la formation des pores lors de la photo-oxydation. La formation de lipides hydroperoxydes induit une modification de la structure de la membrane (surface, épaisseur). La présence de sous-produits oxydés tronqués induit la réorientation des lipides de la bicouche et la formation de pores. La barre d'échelle correspond à 10 μm . Figure tirée de [181].

Les mécanismes par lesquels les lipides sont oxydés sont connus. Cependant, les étapes par lesquelles le PS et la lumière mènent à la perméabilisation sont encore peu connues. Dans les exemples cités précédemment, des GUVs sont utilisés, et l'étude de la perméabilisation se fait par exemple, en remplaçant des lipides insaturés par des lipides oxydés. Le processus complet effectué lors de la PDT est encore mal compris. Il y a plusieurs hypothèses quant à l'origine de la perméabilisation. L'une des questions est : pour perméabiliser la cellule, le PS doit-il être en contact direct avec les lipides, ou bien plutôt à distance, et agir via une espèce diffusive intermédiaire? Bacellar et al. [179] ont étudié la perméabilisation induite par la PDT en utilisant deux PS différents, dont l'un avec une colocalisation avec les doubles liaisons lipidiques 27 fois plus élevée que l'autre. Ils ont observé une forte et rapide perméabilisation induite avec le PS en contact avec la bicouche, contrairement à l'autre.

On a vu que la PDT est très modulable. Il est possible de modifier les types de ROS produits, leur quantité. Il est possible, selon le PS utilisé, de modifier la localisation de l'action principale de la PDT etc... La perméabilisation de la membrane plasmique induite par la PDT est indicatrice de l'efficacité de la PDT. Elle renseigne aussi sur le devenir cellulaire. Les dynamiques de perméabilisation sont encore mal comprises. Dans la suite de ce chapitre, nous les avons étudiées via des méthodes biologiques (Softmat) et à l'aide de notre dispositif ATR - THz.

3.2 Effet de la fonctionnalisation du PS par des micelles

La perméabilité de la membrane plasmique induite par la PDT a été étudiée via le dispositif ATR - THz et des méthodes biologiques (Softmat). L'étude a été effectuée en utilisant du pheophorbide a (noté Pheo) comme PS. La perméabilité induite par le Pheo a été comparée à celle induite par le pheo encapsulé dans des micelles copolymères : PEO-PCL 5000-4000 (noté

PEO-PCL 5-4). La comparaison a été faite via plusieurs méthodes, dans le but de récupérer des paramètres relatifs à la viabilité cellulaire, à la perméabilité, au type de molécules traversantes, et aux dynamiques de perméabilité. Cette partie résume l'article "Terahertz Spectroscopy Sheds Light on Real-Time Exchange Kinetics Occurring through Plasma Membrane during Photodynamic Therapy Treatment" de Zheng, Lordon et al. [186].

3.2.1 Conditions expérimentales

Le **PEO-PCL** 5000-4000 a été acheté à Polymer Source (Polymer Source, Inc., Dorval, Canada). Il s'agit d'un copolymère dibloc constitué de poly(éthylène glycol) (**PEO**) et de poly(caprolactone) (**PCL**), pour lequel la masse molaire du bloc PEO est de 5000 g/mol et celle du bloc PCL est de 4000 g/mol. Le phéophorbide-a (Pheo) a été acheté à Wako (Japon). L'acétone et le tampon phosphate salin (**PBS**) ont été achetés à Sigma-Aldrich (Merck, Darmstadt, Allemagne). L'eau utilisée est de l'eau ultrapure d'une résistivité de 18 M Ω cm obtenue à partir d'un système ELGA Purelab Flex (ELGA LabWater, High Wycombe, UK).

Les cellules étudiées sont des cellules MDCK1 décrites dans la section 2.1.1.2. Elles sont cultivées dans du **DMEM** (Dulbecco's Modified Eagles Medium) avec glucose, glutamine et sodium pyruvate (Dutscher # L0103-500), supplémenté par du serum bovin foetal à 10% (Gibco, #10270-106) et 1% pénicilline-streptomycine (Corning, #30-002-Cl). Les cellules sont incubées pendant 48 heures avant le traitement pour atteindre 95-100% de confluence. La densité d'ensemencement des cellules est fixée à 30 000 cellules cm⁻². Lors du traitement de PDT, les cellules à confluence sont incubées pendant 30 min à 37 °C avec :

- milieu de culture DMEM (condition de contrôle),
- le PS libre Pheophorbide a (Pheo seul) à une concentration spécifique,
- les micelles vides,
- le photosensibilisateur encapsulé (Pheo-micelles) à une concentration spécifique.

Le ratio molaire entre le PS et le polymère est constant à 1/30 ratio molaire. Après les 30 minutes d'incubation, le tout est soumis à une illumination : un projecteur est placé à 4 cm au-dessus des échantillons. Les cellules sont illuminées pendant un total de 4 min (2 min lumière allumée, 2 min lumière éteinte et ensuite 2 min lumière allumée, afin d'éviter l'échauffement). Chaque cellule est exposée à un total de 8,2 J.cm⁻². Le Pheo a un pic d'absorption à 408 nm et un pic secondaire à 668 nm. Un spectre de la LED utilisée pour l'illumination a été obtenu, afin de vérifier que le Pheo est bien activé. Ce spectre est affiché sur la figure 3.5. Le pic principal est centré autour 450 nm, le pic secondaire autour de 580 nm. Le Pheo est donc bien activé par l'illumination.

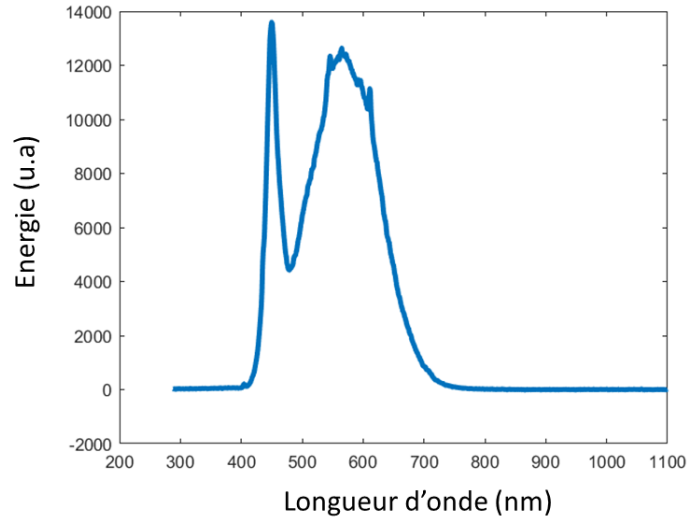


FIGURE 3.5 – Spectre d'émission de la LED utilisée pour l'illumination lors de la PDT.

Dans le cas des tests biologiques, après l'illumination, les cellules sont replacées dans l'incubateur jusqu'à l'analyse. Dans le cas des mesures térahertz, après les 48h d'incubation, les cellules sont placées sur le prisme du dispositif chauffé à 37°C, la solution de {Pheo - Pheo-micelles - micelles seules - milieu seul} est ajoutée et le tout repose 30 minutes. Les cellules sont ensuite illuminées pendant un total de 4 min. Après l'illumination, les cellules sont laissées sur le prisme pendant environ 1h. Le signal est enregistré avec un intervalle de temps de 300 ms. Lorsque le signal est stabilisé, les cellules sont retirées de la lame, pour normalisation. Cette procédure est résumée sur la figure 3.6.

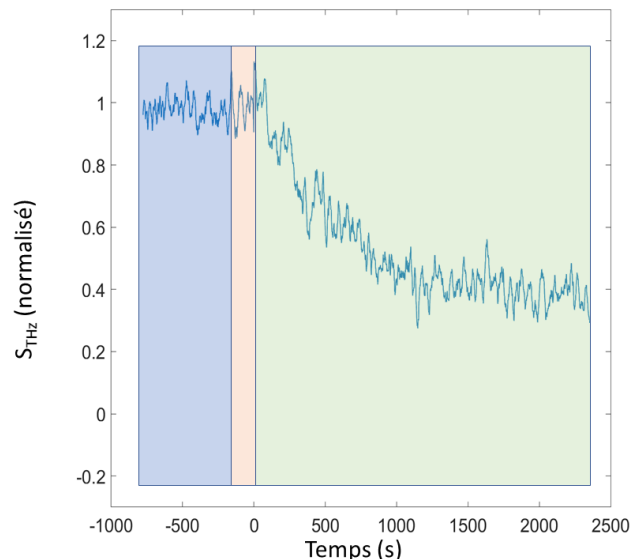


FIGURE 3.6 – Signal THz de la procédure PDT sur des cellules MDCK1. En premier lieu, une période d'incubation de 30 minutes laisse le temps à la solution de sédimenter sur les cellules (**zone bleue**). En second lieu, la période d'illumination est activée par la LED (**zone corail**). Enfin, la **zone verte** englobe la dynamique du signal puis sa stabilisation. Le signal est normalisé en utilisant la valeur moyenne du signal pendant la première phase de l'expérience, et la valeur moyenne du signal après avoir retiré les cellules de la lame.

Plusieurs contrôles ont été effectués dans le cadre des expériences ATR - THz. En premier lieu, l'absence de variations du signal THz a été vérifiée dans les cas de traitement PDT sans illumination et sans molécule photosensibilisante. En second lieu, plusieurs vérifications ont été effectuées concernant une influence potentielle d'un changement de forme des cellules pendant le traitement de PDT. En effet, le tapis de cellule étudié est épithélial, avec une haute confluence. Si les cellules, sous une action extérieure, changent de forme, cela peut entraîner des variations de signal, puisque la répartition de la permittivité sondée par l'onde évanescente sera modifiée (voir chapitre 4). Des images confocales des cellules ont été acquises 30 minutes après le traitement de PDT. Pour une concentration en Pheo à 1.65 μM , aucun changement de forme n'a été observé. Pour vérifier une potentielle influence à court terme sur le signal, les mesures de PDT ont été effectuées via le dispositif ATR - THz en traitant les lames de Si-HR avec de la fibronectine. Il s'agit d'une glycoprotéine de la matrice extracellulaire qui se lie à des récepteurs membranaires de la cellule et permet de renforcer l'adhésion cellulaire au substrat (voir annexe). Ces tests ont été effectués pour du Pheo-micelles à 1.65 μM . Un temps caractéristique de décroissance d'environ 2 min et une amplitude de décroissance d'environ 65 % ont été mesurés, ce qui correspond aux mêmes ordre de grandeur que ceux dans la section 3.3.3.3. Il n'y a donc pas d'artefacts de mesure dus à des potentiels changements morphologiques de la cellule.

3.2.2 Méthodes statistiques utilisées pour caractériser les résultats

Les données sont analysées par calcul de la moyenne \pm l'erreur standard de la moyenne (SEM). Pour estimer si les mesures sont différentes de manière statistiquement significative, il faut estimer la *p-value* à 5 % (notée p). La *p-value* est une probabilité qui estime "l'accord" entre une hypothèse nulle (H_0 , souvent le contrôle) et une hypothèse autre (H_1). Un seuil de 5 % est couramment utilisé pour déterminer si l'hypothèse H_1 a une réelle différence par rapport à H_0 . Si $p > 0.05$, il n'y a pas suffisamment de preuves pour conclure à une différence entre H_0 et H_1 , le résultat est non significatif (n.s). Lorsque $p < 0.05$, d'autres seuils sont utilisés pour estimer le niveau de significativité :

- $p < 0.05$: niveau de significativité de 5 % : noté * ou #,
- $p < 0.01$: niveau de significativité de 1 % : noté ** ou ##,
- $p < 0.001$: niveau de significativité de 0.1 % : noté *** ou ###,
- $p < 0.0001$: niveau de significativité de 0.01 % : noté **** ou ####.

Plus le seuil est bas, plus le résultat est statistiquement rigoureux. On utilise deux méthodes pour mesurer la *p-value* dans ce chapitre : le t-test indépendant et l'ANOVA unidirectionnelle. Le t-test permet de comparer deux groupes de données indépendantes, l'un correspondant à H_0 , l'autre à H_1 . Le calcul de la *p-value* s'effectue en utilisant une distribution de probabilité normale. La statistique de test t se calcule, d'après [187] par :

$$t = \frac{\bar{X} - \mu_0}{\sqrt{\frac{s^2}{n_0} + \frac{s^2}{n_1}}} \quad (3.2)$$

où \bar{X} est la moyenne des données de H_1 , μ_0 celle de H_0 , s la déviation standard estimée, et n_0 et n_1 la taille respective des groupes H_0 et H_1 . Soit df le nombre de degré de liberté : $df = n_0 + n_1 - 2$. Plus df est élevé, plus s se rapproche de la valeur de σ la déviation standard

réelle ; moins la distribution de $p(t)$ est étalée et plus elle correspond à une distribution normale. La valeur de la p -value s'obtient finalement en utilisant une table de statistiques avec df et t en paramètres. Dans ce chapitre, le t -test est utilisé pour comparer les résultats avec le contrôle.

L'ANOVA unidirectionnelle est utilisée pour déterminer s'il y a une différence statistiquement significative entre 3 groupes de données ou plus. Il y a deux aspects à prendre en compte : la variance entre les différents groupes de données s_X^2 et la variance au sein d'un groupe de données s_p^2 , dont les expressions sont, d'après [187] :

$$s_X^2 = \frac{1}{a-1} \sum_{i=1}^a (\bar{X}_i - \bar{\bar{X}})^2 \quad \text{et} \quad s_p^2 = \frac{1}{a(n-1)} \sum_{i=1}^a \sum_{t=1}^n (X_{it} - \bar{X}_i)^2, \quad (3.3)$$

où a est le nombre de groupes de données, n est le nombre d'échantillons dans chaque groupe, X_{it} un point de données, \bar{X}_i la moyenne d'un groupe et $\bar{\bar{X}}$ la moyenne globale des groupes. Comparer les groupes entre eux revient à estimer s_X^2 relativement à s_p^2 . Le paramètre F est introduit :

$$F = \frac{ns_X^2}{s_p^2}. \quad (3.4)$$

La valeur de la p -value s'obtient en utilisant une table de statistiques dont les paramètres sont F et les deux degrés de liberté : $df_1 = a - 1$ et $df_2 = a(n - 1)$. Dans ce chapitre, l'ANOVA unidirectionnelle est utilisée pour comparer les différentes configuration du traitement de PDT entre elles.

3.2.3 La viabilité cellulaire diminue avec l'encapsulation de l'agent photosensible

L'efficacité de la PDT s'estime via une mesure de la viabilité cellulaire. Elle est effectuée dans cette sous-partie pour les deux conditions du PS : Pheo libre ou Pheo encapsulé dans des micelles (Softmat).

Pour tester l'efficacité du traitement PDT, on peut évaluer classiquement la viabilité cellulaire. La figure 3.7 montre l'évolution de la viabilité cellulaire de cellules MDKC1 24h après le traitement PDT. La viabilité est mesurée par test Prestoblue. Ce test utilise une solution de résazutine, perméable aux cellules ; lorsque la cellule est viable, une réaction induit une fluorescence rouge du Prestoblue. La quantification de la viabilité s'effectue soit par mesure de fluorescence (excitation à 560 nm, émission à 590 nm), soit par mesure d'absorbance à 570 nm. Le test est effectué pour des concentrations croissantes, pour la condition *Pheo seul* et la condition *Pheo - micelles*. Pour les concentrations les plus basses, l'impact sur la viabilité est négligeable dans les deux cas. Un écart se creuse entre les deux conditions à partir d'une concentration en Pheo à 0.6 μ M. La viabilité cellulaire atteint 25% au bout de 24h lorsque le Pheo est encapsulé, contre 75% lorsque le Pheo est seul. L'écart entre les deux conditions diminue progressivement à partir d'une concentration en Pheo à 2.3 μ M, la viabilité tend vers une valeur de 50% environ.

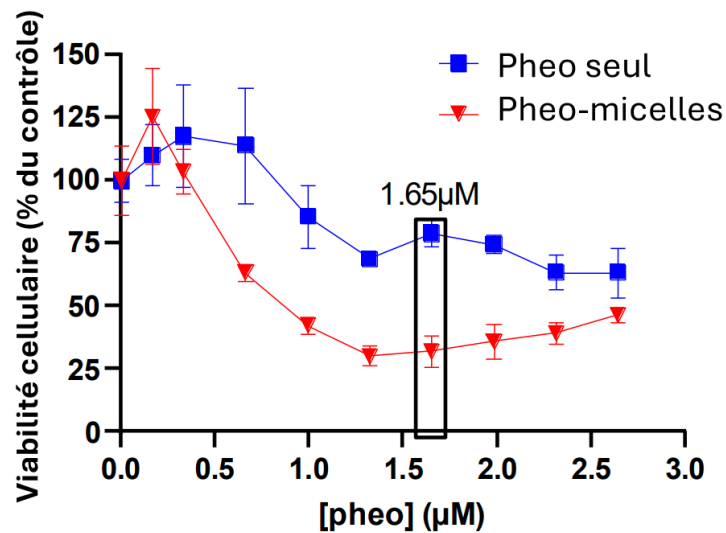


FIGURE 3.7 – L’encapsulation du phéophorbide altère radicalement la viabilité cellulaire 24 heures après la PDT, évaluée par le test Prestoblue. Les données sont représentées par la moyenne \pm SEM. 3 échantillons (Sofmat).

L’impact du Pheo sur la viabilité cellulaire est d’autant plus fort lorsqu’il est encapsulé. Donc on va ensuite investiguer les effets membranaires qui mènent à cette haute mortalité. Il s’agit aussi d’identifier certaines des espèces impliqués dans les flux de perméabilisation, afin de mieux comprendre les processus induits.

3.2.4 Perméabilisation de la membrane plasmique lors de la PDT

Une augmentation de la mortalité cellulaire est observée lorsque le Pheo est encapsulé. La perméabilité de la membrane plasmique est évaluée dans cette sous-partie. Il s’agit de voir si perméabilité et mortalité cellulaire sont corrélées.

3.2.4.1 Évaluation de la perméabilisation par des méthodes biologiques

Test de perméabilisation

La perméabilité de la membrane plasmique lors de la PDT a été évaluée par un test d’iodure de propidium (IP) (voir chapitre 2). La fluorescence a été quantifiée avec de la vidéomicroscopie. Des images en fluorescence rouge (longueur d’onde d’émission centrée à 617 nm) ont été acquises toutes les 5 min pendant les 4 premières heures, puis toutes les heures, avec des quantifications effectuées à l’aide d’un logiciel lié au vidéomicroscope. La figure 3.8 montre le nombre de cellules perméabilisées 15h après la PDT.

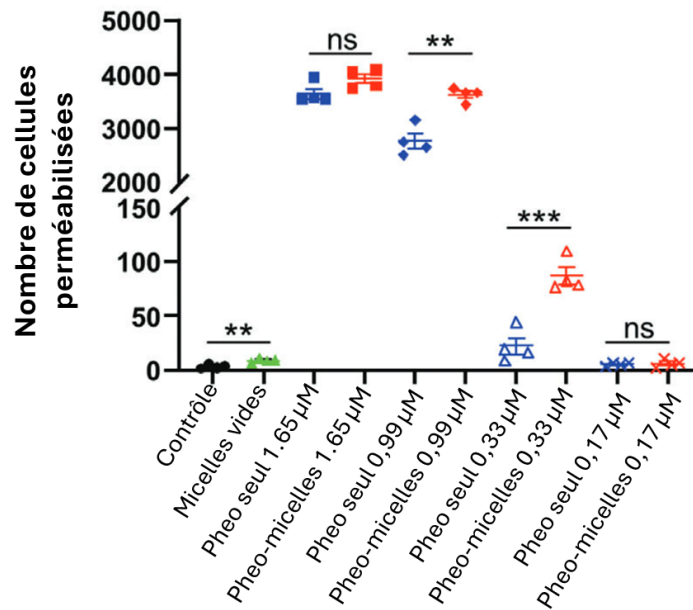


FIGURE 3.8 – L’encapsulation du Pheo accentue son effet sur la perte d’intégrité de la membrane plasmique. Cette dernière a été évaluée via un test d’iodure de propidium, et quantifiée par de la vidéo-microscopie de fluorescence. Ici, les données ont été acquises 15h après le traitement de PDT, et cela pour plusieurs concentrations. Les données sont analysées via un t-test. 4 échantillons. Figure tirée de [186].

La détection la plus précoce de la pénétration de l’IP, c’est-à-dire la perte de l’intégrité de la membrane plasmique, a été enregistrée 20 min après l’illumination de la plus forte concentration de Pheo libre ou encapsulé (1,65 μM). 4h après l’illumination, aucune différence significative n’a été observée au niveau de l’intégrité de la membrane plasmique entre le Pheo libre et encapsulé aux concentrations les plus faibles de 0,33 et 0,17 μM . Certaines différences sont détectables 15h après l’illumination, du moins dans le cas de la concentration de 0,33 μM (Figure 3.8). Quelle que soit la concentration testée, la condition encapsulée conduit à une pénétration d’IP plus élevée que le Pheo libre. Cela signifie que plus de défauts membranaires se sont formés. Plus la concentration en PS est faible, plus l’avantage de l’encapsulation est important. Ainsi, 15h après l’illumination, l’encapsulation du Pheo a augmenté la perméabilité cellulaire d’un facteur de 1,1, 1,3 et 4,0 pour les conditions 1,65, 0,99 et 0,33 μM respectivement. La taille d’une molécule d’IP est d’environ 690 Da. Les flux de molécules de taille inférieure ne sont donc pas pris en compte lors de ce test.

Quantification des espèces échangées

Le test d’IP a montré une perméabilisation des cellules lors du traitement de PDT. Les défauts membranaires induits par la PDT peuvent davantage être caractérisés en quantifiant certaines espèces. Les espèces quantifiées sont l’adénosine triphosphate (ATP) extracellulaire (507 Da) et la lactate déshydrogénase (LDH) extracellulaire (140 kDa).

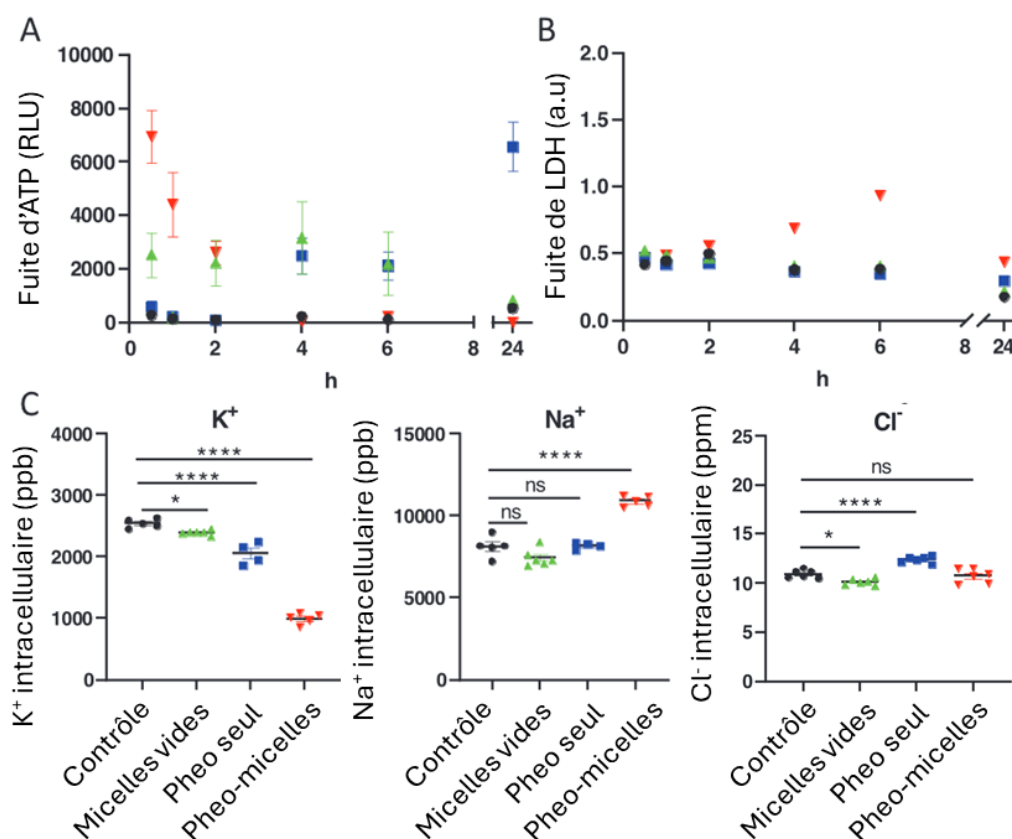


FIGURE 3.9 – L’encapsulation du Pheo augmente son effet sur le flux de molécules échangées à travers la membrane plasmique. Quantification de molécules de différents poids dans le milieu extracellulaire après traitement PDT sur des cellules MDCK1. (A) Fuite d’ATP quantifiée par luminescence, 6 échantillons. (B) Fuite de lactate dehydrogenase (LDH) quantifiée par absorbance, 6 échantillons. (C) Mouvements ioniques (K^+ - Na^+ - Cl^-) 30 minutes après la PDT, quantifiés par ICP-OES (spectrométrie d’émission optique à plasma à couplage inductif) et de la chromatographie ionique, 6 échantillons. La moyenne des données est affichée \pm SEM. L’analyse est faite avec une ANOVA unidirectionnelle suivie d’un test de comparaison de Dunnett, qui compare toutes les conditions avec la condition de contrôle. ● = Contrôle ; ▲ = micelles vides ; ■ = Pheo seul ; ▼ = Pheo encapsulé. Figure tirée de [186].

La LDH est classiquement utilisée comme test de cytotoxicité pour surveiller le niveau de dommages de la membrane plasmique dans une population de cellules. L’ATP est une molécule clé pour le métabolisme énergétique des cellules. Sa fuite hors du milieu intracellulaire est souvent un signe de dommages cellulaires ou de mort cellulaire.

Elle permet, tout comme la fuite de LDH, d’évaluer l’intégrité de la membrane plasmique. La fuite du LDH et de l’ATP a été quantifiée respectivement par absorbance et par luminescence sur 24h. Les résultats sont affichés sur les figures 3.9 (A) et (B). Une fuite rapide et massive d’ATP est observée pour les Pheo-micelles encapsulées dès 30 min après l’illumination. Le flux de sortie diminue ensuite jusqu’à ce que l’ATP ne soit plus détectable, 4h après le traitement. Au contraire, pour le Pheo seul, l’ATP extracellulaire augmente régulièrement au cours du temps après l’illumination. Il est intéressant de noter que la cinétique est clairement différente pour le Pheo libre et le Pheo encapsulé. Il semble que l’encapsulation du photosensibilisateur peut améliorer de manière significative la libération d’ATP, qui est l’une des principales caractéristiques

téristiques de la mort cellulaire. Il convient de noter que les micelles vides ont induit une fuite constante d'ATP. En ce qui concerne la libération de LDH, elle est de plus en plus présente dans le milieu extracellulaire lorsque les cellules sont exposées au Pheo encapsulé, alors qu'elle reste indétectable dans les autres conditions [186].

Les ions intracellulaires ont été quantifiés par spectrométrie d'émission optique à plasma inductif (ICP-OES) et par chromatographie ionique à un moment fixe de 30 minutes après le traitement PDT (figure 3.9(C)). Les micelles vides ont conduit à un efflux léger mais significatif d'ions K^+ et Cl^- . Avec la fuite d'ATP, ces résultats mettent en lumière l'interaction efficace des micelles seules avec la membrane plasmique. Une fuite massive d'ions K^+ a été quantifiée 30 minutes après la PDT, deux fois supérieur pour la condition Pheo encapsulé par rapport au Pheo seul. L'influx de Na^+ est non significatif dans la condition Pheo libre, contrairement à la condition encapsulée. Les ions Cl^- ont pénétré de manière significative dans les cellules après l'illumination du Pheo libre, tandis que l'influx est non significatif pour le Pheo encapsulé [186].

L'évaluation de la perméabilisation de la membrane plasmique par des méthodes biologiques lors de la PDT a montré plusieurs points. Premièrement, les effets membranaires sont globalement supérieurs lorsque le Pheo est encapsulé par rapport à sa forme libre. Les micelles seules ont un impact non négligeable sur la membrane, surtout par rapport aux échanges de petites molécules (ions et ATP). La première information de perméabilisation est obtenue 30 minutes après l'illumination. Enfin, la PDT induit des échanges variés de molécules : différentes tailles, différentes charges.

3.2.4.2 Le dispositif ATR -THz mesure les dynamiques de la perméabilisation induite par la PDT

Le dispositif ATR - THz est capable de suivre des processus de perméabilisation de la membrane plasmique en temps réel et de manière non-invasive (section 2.4). La PDT induit des processus de perméabilisation de la membrane plasmique qui sont encore mal compris (section 3.1.4). On utilise le dispositif ATR -THz comme méthode complémentaire des méthodes présentées précédemment.

La figure 3.10 montre le signal térahertz normalisé en fonction du temps pour les différentes configurations de PDT. On observe que lorsque les conditions nécessaires à la PDT (lumière, PS, O_2) ne sont pas réunies en même temps, le signal reste constant. Dès lors que le PS est présente dans un tissu, puis illuminé, le signal térahertz affiche une décroissance de forme exponentielle de grande amplitude. La décroissance est plus rapide lorsque le PS est encapsulé.

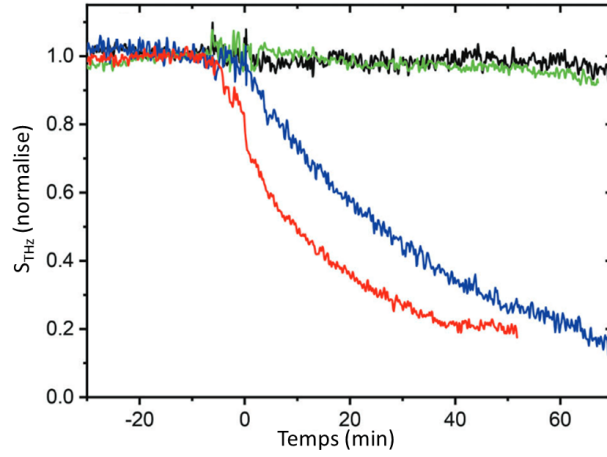


FIGURE 3.10 – PDT appliquée sur cellules MDCK1 à 37°C. Signal térahertz normalisé pour les différentes conditions des acquisitions. Les courbes affichées sont les moyennes des différentes acquisitions. La concentration en pheophorbide a est de 1.65 μM . — = contrôle (6); — = micelles seules (6); — = Pheo seul (4); — = Pheo-micelles (6). Nombre de mesures indiqué entre parenthèses. Figure tirée de [186].

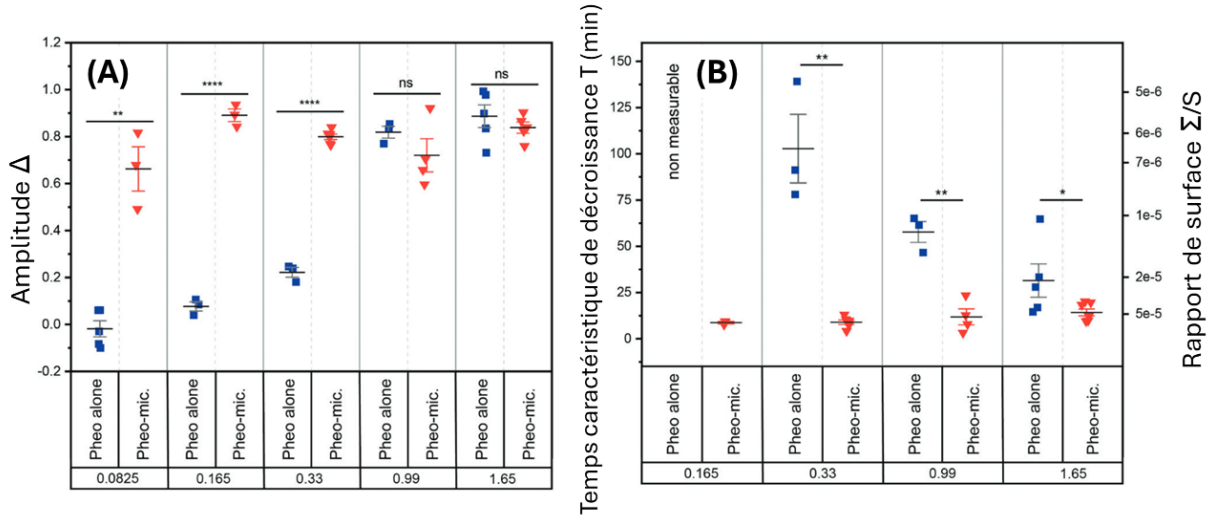


FIGURE 3.11 – Paramètres pour étudier les dynamiques pour des concentrations entre 0.165 et 1.65 μM de Pheo. (A) : Amplitude de décroissance Δ lorsqu'il y a illumination, en présence de Pheo seul et de Pheo-micelles. (B) : Temps caractéristique de décroissance T lorsqu'il y a illumination, en présence de Pheo seul et de Pheo-micelles. Temps obtenu via un ajustement en exponentielle décroissante. Les valeurs de T pour le Pheo seul aux concentrations 0.0825 μM et 0.126 μM ne sont pas accessibles car l'amplitude de décroissance est trop faible. ■ = Pheo seul. ▼ = Pheo-micelles. Figure tirée de [186].

Afin de comparer les différentes dynamiques des signaux, on effectue un ajustement en exponentielle décroissante $\Delta \exp^{-t/T}$ sur les courbes. Cela permet de récupérer le temps caractéristique de décroissance T (figure 3.11(B)). On récupère aussi l'amplitude de décroissance normalisée Δ , qui correspond à la valeur du signal lorsque ce dernier est stabilisé (figure 3.11(A)). Ces paramètres ont été récupérés pour des concentrations en Pheo entre 0.0825 μM et 1.65 μM .

Les amplitudes Δ du Pheo seul et du Pheo encapsulé sont comparées dans la figure 3.11(A) pour ces différentes concentrations. L'effet de l'encapsulation est négligeable pour les plus hautes concentrations (0.99 μM et 1.65 μM). L'effet devient très significatif pour des concentrations décroissantes. Pour une concentration de 0.0825 μM , le Pheo seul n'a pas d'impact sur le signal, tandis que le Pheo encapsulé conserve une amplitude de décroissance élevée. Concernant les temps de décroissance caractéristiques, on observe que la dynamique du Pheo encapsulé est toujours plus rapide que celle du Pheo seul. L'encapsulation accélère donc les altérations cellulaires. L'effet de l'encapsulation est de plus davantage prononcé à des faibles concentrations de Pheo.

Le temps caractéristique de décroissance T peut être lié à la quantité de défauts membranaires créés pendant l'illumination, par un modèle de diffusion dérivé de la seconde loi de Fick [188]. On considère que les défauts membranaires induits pendant la PDT ne se produisent que pendant l'illumination. Par conséquent, l'inverse du temps T est proportionnel à la surface totale des défauts membranaires selon la relation suivante :

$$\frac{1}{T} = \frac{\Sigma D_c}{S L \delta}$$

avec Σ la surface totale des défauts, S la surface totale de la membrane, D_c la constante de diffusion des molécules sortant du cytosol, L la hauteur de la cellule et δ l'épaisseur de la membrane. Plus le PS est efficace, plus la surface des défauts créée est grande, plus la dynamique est rapide et donc plus T est petit. Avec $D_c = 1 \mu\text{m}^2\text{s}^{-1}$, $L = 10 \mu\text{m}$, et $\delta = 4 \text{ nm}$, on peut calculer pour chaque signal THz le nombre relatif de défauts par surface de membrane $\frac{\Sigma}{S}$. Ce nombre est affiché sur l'axe vertical de droite de la figure 3.11(B). Par exemple, un temps moyen $T = 30 \text{ min}$ est mesuré pour la dynamique THz pour la condition Pheo seul à 1,65 μm . Cela correspond à un rapport $\frac{\Sigma}{S} \approx 2 \times 10^{-5}$. La comparaison directe entre les expériences est encore plus précise. À 1,65 μm , la surface relative des défauts avec le Pheo encapsulé est 2,1 fois plus élevée qu'avec le Pheo seul. Elle est 11 fois plus élevée à 0,33 μm , ce qui démontre clairement et quantifie également la forte augmentation de la production de défauts lors de l'utilisation de micelles.

Le dispositif ATR - THz permet d'obtenir des informations sur les effets membranaires de la PDT en temps réel et de manière non invasive. Par rapport aux méthodes biologiques, les effets membranaires sont observables pour de très faibles concentrations, et cela dès les premières secondes après l'illumination. Contrairement aux méthodes biologiques, les informations ne sont pas spécifiques à certains types de molécules, l'effet observé est global, sur plusieurs dizaines de milliers de cellules. Plusieurs paramètres ont été utilisés pour caractériser les dynamiques du signal lors de la PDT (amplitude, temps de décroissance et rapport de surface).

3.3 Encapsulation du photosensibilisateur par différents types de nanovecteurs

Dans les expériences précédentes, on a montré l'efficacité de l'encapsulation du PS dans un nanovecteur polymère de type micellaire, le PEO-PCL 5-4. Cette partie présente l'étude de la PDT avec les mêmes méthodes que précédemment, mais en utilisant différents types de nanovecteurs pour encapsuler le Pheo. Les nanovecteurs utilisés ont des structures très différentes, amenant à un impact modifié sur les cellules lors de la PDT. En premier lieu, les différents

nanovecteurs utilisés sont présentés. Ensuite, l'impact des nanovecteurs seuls puis celui du Pheo encapsulé lors de la PDT sont étudiés par des expériences biologiques réalisées par Tiffany Champion, ingénieure d'étude à Softmat. Enfin, ces processus seront étudiés par le dispositif ATR - THz.

3.3.1 Conditions expérimentales

De nombreux nanovecteurs sont testés dans le cadre de la PDT. Les critères principaux de fabrication sont les suivants [189] :

- la non toxicité et la dégradation,
- le transport d'une quantité suffisante de principe actif,
- la libération contrôlée du principe actif, en termes de temps et d'espace,
- un temps de circulation suffisant pour permettre le relargage,
- aucune interaction avec le système immunitaire.

Les nanovecteurs choisis dans notre étude sont des blocs de poly(oxyde d'éthylène) poly(ϵ -caprolactone) (PEO-PCL) de masse molaire 5000 4000 (PEO-PCL 5-4, Polymer Source, Inc., #P3778), 2000 7000 (PEO-PCL 2-7, Polymer Source, Inc., #P9714), et 5000 11000 (PEO-PCL 5-11, Polymer Source, Inc., #P3128). Les auto-assemblages formés possèdent des structures différentes. Les micelles PEO-PCL 5-4 sont caractérisées par une couronne hydrophile et un cœur hydrophobe. Les systèmes PEO-PCL 5-11 sont appelés des micelles à mutli-compartiments, caractérisés par une couronne hydrophile, et des îlots intérieurs hydrophobes. Ils peuvent encapsuler des composés hydrophiles et hydrophobes. Les micelles PEO-PCL 2-7 ont une structure similaire aux PEO-PCL 5-4, mais sont de forme allongée, dites "wormlike" et très flexibles [190,191].

Il est possible de complexifier la structure des nanovecteurs, notamment via une [réticulation](#) de la couronne, du cœur, ou bien de l'interface entre les zones hydrophobes et hydrophiles. Ce processus confère aux nanovecteurs une structure plus stable, et souvent plus rigide. Le contrôle de la libération des principes actifs est davantage contrôlé [192]. Les réticulations utilisées dans ce travail ont été réalisées au niveau du cœur des auto-assemblages. La liste des nanovecteurs étudiés donc est la suivante :

- PEO-PCL 5000-4000, noté PEO-PCL 5-4,
- PEO-PCL 2000-7000, noté PEO-PCL 2-7,
- PEO-PCL 5000-11000, noté PEO-PCL 5-11,
- PEO-PCL 5000-4000 réticulé, noté X-PEO-PCL 5-4,
- PEO-PCL 2000-7000 réticulé, noté X-PEO-PCL 2-7.

Les images obtenues par [TEM](#) de certains des nanovecteurs utilisés sont affichés sur la figure [3.12](#). On observe que leur taille et leur forme sont très différentes. Les nanovecteurs PEO-PCL 5-4 et PEO-PCL 5-11 ont des formes de type circulaires, les PEO-PCL 5-11 ayant un plus grand diamètre. Les assemblages PEO-PCL 2-7 ont quant à eux une forme de type vermiculaire.

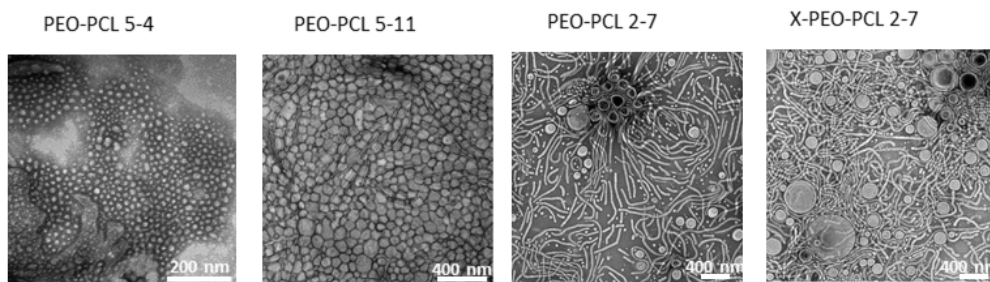


FIGURE 3.12 – Images en microscopie électronique à transmission des différents types de nanovecteurs vides : PEO-PCL 5-4 ; PEO-PCL 5-11, PEO-PCL 2-7 et X-PEO-PCL 2-7 (Softmat).

Il faut trouver un compromis pour la taille des nanovecteurs, qui risquent d'être éliminés par l'organisme s'ils sont trop petits (< 5 nm), et qui ne circulent pas assez longtemps si elles sont trop grosses. La taille des nanovecteurs a été mesurée par **DLS** (Dynamic Light Scattering). Les résultats sont affichés sur le tableau 3.1.

	Taille moyenne en intensité (nm)	Taille moyenne en nombre (nm)
PEO-PCL 5-4	27 ± 3.4	18 ± 2.0
X-PEO-PCL 5-4	63 ± 19.6	19 ± 2.2
PEO-PCL 2-7	245 ± 34.0	39 ± 12.1
X-PEO-PCL 2-7	274 ± 40.0	68 ± 58.9
PEO-PCL 5-11	142 ± 7.7	87 ± 6.3

TABLE 3.1 – Caractérisation DLS des nanovecteurs vides. Les données sont représentées sous forme de moyenne \pm erreur standard de la moyenne. 12 expériences indépendantes (Softmat).

La différence principale entre ces copolymères est la masse molaire de chaque bloc PEO et PCL, ainsi que la **réticulation** présente ou non. Ces différences influent sur la structure et la forme des assemblages, ainsi que sur leurs propriétés : la solubilité du copolymère dans l'eau, sa stabilité, sa dégradation, ainsi que sa capacité à former des micelles et à encapsuler le PS [193]. Les conditions expérimentales relatives au processus de PDT et aux cellules utilisées sont similaires à celles décrites dans la section 3.2.1. Toutes les expériences sont réalisées à 37°C , pour une concentration en Pheo de $1.65 \mu\text{M}$, avec un ratio molaire entre le PS et les polymères constant de 1/30.

3.3.2 Impact des nanovecteurs seuls lors de la PDT

3.3.2.1 Contrôle de la toxicité des nanovecteurs seuls

Il faut en premier lieu vérifier que les nanovecteurs seuls n'ont pas d'effet sur les cellules. Pour cela, des tests ont été effectués par le test de Prestoblue, mesurant la viabilité cellulaire après PDT (Softmat). Les résultats sont affichés sur la figure 3.13, 6h et 24h après le traitement de PDT.

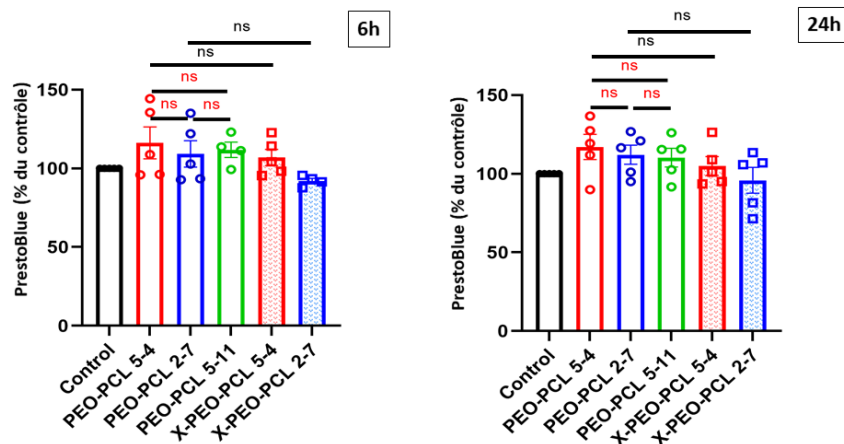


FIGURE 3.13 – Quantification de la mort cellulaire à différents moments après traitement PDT des cellules MDCK1 avec des nanovecteurs vides. (A) Prestoblue quantifié par fluorescence à 24h. 5 échantillons. Les données sont représentées en moyenne \pm erreur standard de la moyenne (SEM) et analysées par ANOVA unidirectionnelle suivie du test de comparaisons multiples de Tukey, qui compare toutes les conditions entre elles. ● = Contrôle, ○ = PEO-PCL 5-4, ◐ = PEO-PCL 2-7, ◑ = PEO-PCL 5-11, ◒ = X-PEO-PCL 5-4, ◓ = X-PEO-PCL 2-7 (Softmat).

On observe que les nanovecteurs seuls ne font pas diminuer de manière significative la viabilité cellulaire, par rapport au contrôle. Il n’y a pas non plus de différence significative entre les différents types de nanovecteurs.

3.3.2.2 Contrôle de la perméabilité de la membrane plasmique pour les nanovecteurs seuls

Les nanovecteurs seuls n’induisent pas de mortalité cellulaire. Leur impact sur des potentiels échangeant membranaires a été évalué en quantifiant les échanges intra-extra cellulaires de certaines espèces. Un test d’IP a été effectué : la fluorescence a été quantifiée par vidéo microscopie toutes les 5 minutes pendant les 4 premières heures, puis toutes les heures. La figure 3.14(C) montre le nombre de cellules perméabilisées en fonction du temps. Aucune perméabilisation n’est détectable pour l’ensemble des nanovecteurs. Tout comme dans la partie précédente, les ions intracellulaires ont été quantifiés par ICP-OES 30 minutes après le traitement de PDT (figure 3.14(A)). Des fuites de Na^+ sont observées pour l’ensemble des nanovecteurs, de manière significative par rapport au contrôle. Des fuites de Mg^{2+} sont observés pour les nanovecteurs PEO-PCL 5-4 (○), X-PEO-PCL 5-4 (◒), PEO-PCL 2-7 (◐) et PEO-PCL 5-11 (◑). Des fuites de K^+ sont observés pour les nanovecteurs X-PEO-PCL 5-4 (◒), PEO-PCL 2-7 (◐), X-PEO-PCL 2-7 (◓) et PEO-PCL 5-11 (◑). Les mouvements ioniques ne sont pas significativement différents entre les types de nanovecteurs. La fuite d’ATP a aussi été quantifiée pour la PDT avec les nanovecteurs seuls, par un test de luminescence. Les résultats sont affichés sur la figure 3.14(B). La quantification concerne l’ATP extracellulaire 30min, 2h et 4h après le traitement de PDT. Une sortie progressive de l’ATP est observée, principalement au bout de 4h pour les nanovecteurs réticulés. Déjà, au bout de 30 minutes, une sortie d’ATP est mesurée pour les nanovecteurs de type X-PEO-PCL 5-4 (◒), PEO-PCL 2-7 (◐) et X-PEO-PCL 2-7 (◓). Des mesures extracellulaire de LDH après PDT ont montré une fuite de LDH significative pour le X-PEO-PCL 2-7 (◓) au bout de 6h.

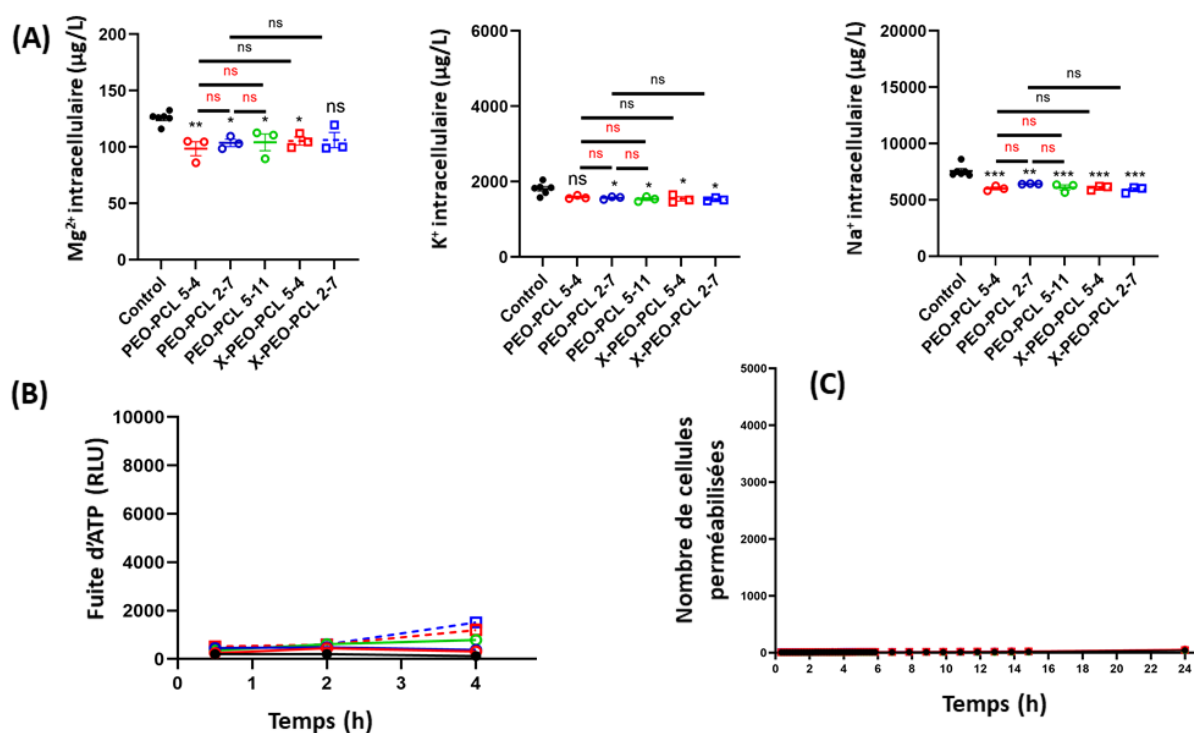


FIGURE 3.14 – Contrôle de la perméabilité induite par les nanovecteurs seuls lors de la PDT sur des cellules MDCK1. (A) Mouvements ioniques 30 minutes après le traitement de PDT quantifiés par ICP-OES et chromatographie ionique. nombre d'échantillons = 3. (B) Fuites d'ATP quantifiées par luminescence au bout de 30 min, 2h et 4h. (C) Suivi en temps réel de l'intégrité de la membrane plasmique par pénétration d'iodure de propidium, quantifiée par vidéo-microscopie de fluorescence. Les données sont représentées en moyenne \pm SEM et analysées par ANOVA unidirectionnelle suivie du test de comparaisons multiples de Tukey, qui compare toutes les conditions entre elles. * par rapport au contrôle, # par rapport au nanovecteur réticulé, # par rapport à la forme du nanovecteur. ● = Contrôle, ○ = PEO-PCL 5-4, ○ = PEO-PCL 2-7, ○ = PEO-PCL 5-11, □ = X-PEO-PCL 5-4, □ = X-PEO-PCL 2-7 (Softmat).

Les méthodes biologiques montrent que les nanovecteurs seuls n'induisent pas de mortalité cellulaire. Cependant, leur impact sur la membrane plasmique lors du traitement de PDT n'est pas négligeable. Des fuites d'ATP, de LDH et de certains ions ont été observées, de manière inégale selon le type de nanovecteur.

3.3.2.3 Impact des nanovecteurs seuls étudiés par le dispositif ATR - THz

L'impact des nanovecteurs seuls sur les cellules MDCK1 a aussi été étudié via le dispositif ATR - THz. Les conditions expérimentales sont les mêmes que celles décrites dans la sous-partie 3.2.1. Les nanovecteurs sont ajoutés au niveau des cellules MDCK1. Le tout repose 30 minutes à 37°C. L'illumination est déclenchée, la dynamique est ensuite enregistrée. Le temps $t = 0s$ correspond au début de la dynamique. Les courbes normalisées selon les différentes conditions sont affichées sur la figure 3.15. L'amplitude entre la phase de stabilisation et la phase 30 minutes après l'illumination est mesurée. Elle est affichée sur la figure 3.16. Aucune des conditions n'affiche de différence significative avec le contrôle. On estime donc que les nanovecteurs seuls n'ont pas d'influence sur le signal THz lors du traitement de PDT.

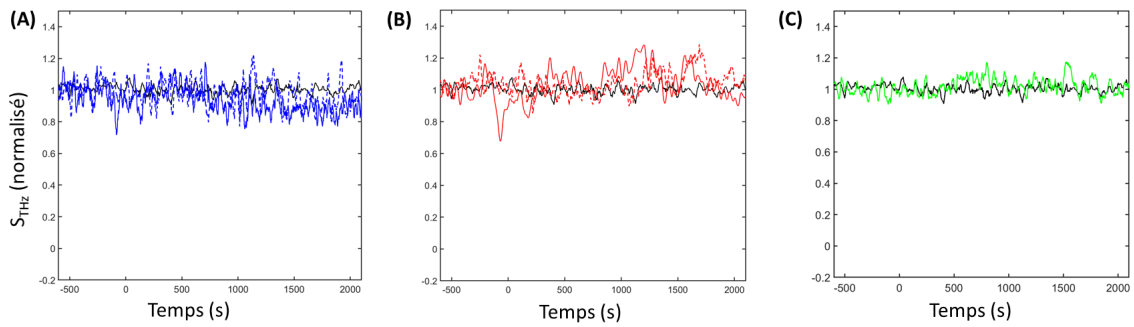


FIGURE 3.15 – Acquisitions THz des différents types de nanovecteurs vides. Comparaison avec le contrôle pour les nanovecteurs (A) PEO-PCL 2-7 et X-PEO-PCL 2-7; (B) PEO-PCL 5-4 et X-PEO-PCL 5-4; PEO-PCL 5-11. — = contrôle ; — = PEO-PCL 2-7; ■■■ = X - PEO-PCL 2-7; — = PEO-PCL 5-4; ■■■ = X - PEO-PCL 5-4; — = PEO-PCL 5-11. 3 échantillons par courbe.

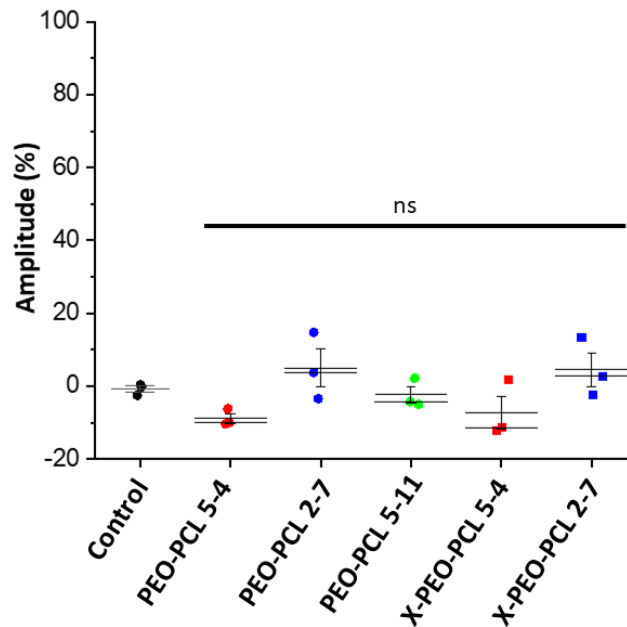


FIGURE 3.16 – Quantification de l’impact des nanovecteurs vides sur les cellules MDCK1 lors de la PDT. Amplitudes (en %) entre le signal Thz moyenné avant l’étape d’illumination de la PDT et 25 minutes après. Les données sont représentées en moyenne \pm SEM et analysées par ANOVA unidirectionnelle suivie du test de comparaisons multiples de Tukey qui compare toutes les conditions avec le contrôle. ● = Contrôle, ● = PEO-PCL 5-4, ● = PEO-PCL 2-7, ● = PEO-PCL 5-11, ■ = X - PEO-PCL 5-4, ■ = X - PEO-PCL 2-7.

Il faut cependant considérer que si des fuites ont lieu, elles n’ont peut-être pas été détectées par le dispositif ATR - THz. En effet, les expériences biologiques ont montré des fuites d’ATP et de cations à court terme. Des amplitudes de $\pm 10\%$ sont à la limite de la détection du dispositif.

L’impact des nanovecteurs seuls durant la PDT a été étudié par des méthodes biologiques et le dispositif ATR - THz. De faibles mouvements ioniques et des fuites d’ATP ont été mesurés

à court terme, et de LDH à long terme, pour certains types de nanovecteurs. Les nanovecteurs seuls ont donc globalement une certaine toxicité intrinsèque. Les mesures THz n'ont, elles, pas montré d'effet significatif d'impact membranaire.

3.3.3 PDT avec PS encapsulé dans différents types de nanovecteurs

Cette partie présente les résultats obtenus par les différentes méthodes sur l'impact du PS encapsulé lors de la PDT. Les effets de chaque type de nanovecteur sur la toxicité et les effets membranaires sont analysés.

3.3.3.1 Contrôle de la toxicité

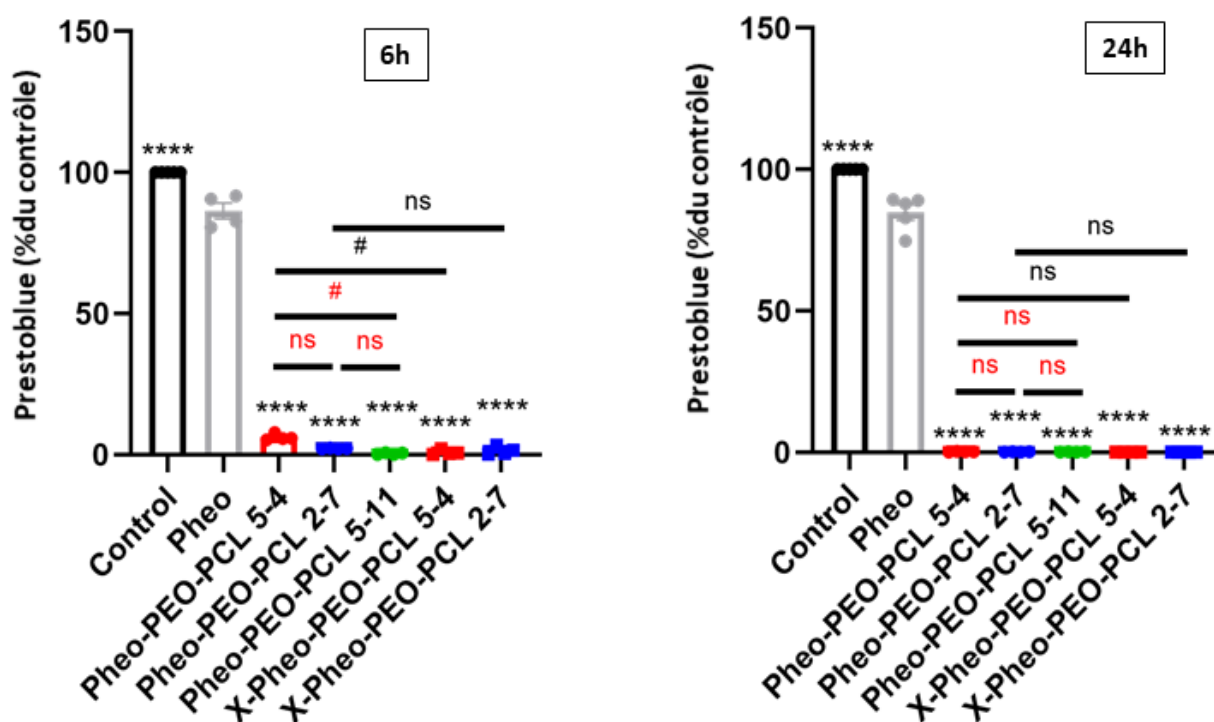


FIGURE 3.17 – Quantification de la viabilité cellulaire des cellules MDCK1 après traitement de PDT pour Pheo seul ou Pheo encapsulé dans différents types de nanovecteurs à 1.65 µM. (A) Test de Prestoblué quantifié par fluorescence 6h et 24h après traitement de PDT. Les données sont représentées en moyenne \pm SEM et analysées par ANOVA unidirectionnelle suivie du test de comparaisons multiples de Tukey, qui compare toutes les conditions entre elles. * par rapport au Pheo seul, # par rapport au nanovecteur réticulé, # par rapport à la forme du nanovecteur. ● = Contrôle, ● = Pheo seul, ● = Pheo - PEO-PCL 5-4, ● = Pheo - PEO-PCL 2-7, ● = Pheo - PEO-PCL 5-11, ■ = X - Pheo - PEO-PCL 5-4, ■ = X - Pheo - PEO-PCL 2-7 (Softmat).

L'influence du type de nanovecteur sur la photocytotoxicité des cellules lors de la PDT a été examinée par un test de Prestoblué. La figure 3.17 affiche le nombre de cellules vivante 6h et 24h le traitement de PDT pour une concentration en Pheo de 1.65 µM. Dans tous les cas, comparé au Pheo non encapsulé, la photocytotoxicité est augmenté significativement lorsque le Pheo est encapsulé. Lorsque le Pheo est libre, la viabilité cellulaire est autour de 80 %. Lorsque le Pheo est encapsulé, la viabilité au bout de 6h est inférieure à 10 % pour tous les types de nanovecteurs. Au bout de 6h, la photocytotoxicité est significativement plus forte pour la

condition X-Pheo-PEO-PCL 5-4 (■) par rapport à la condition Pheo-PEO-PCL 5-4 (●); de même pour la condition Pheo-PEO-PCL 5-11 (●) par rapport à la condition Pheo-PEO-PCL 5-4 (●). Au bout de 24h, il n'y a plus de différence significative de photocytotoxicité entre les différents types d'encapsulation.

3.3.3.2 Contrôle de la perméabilité de la membrane plasmique

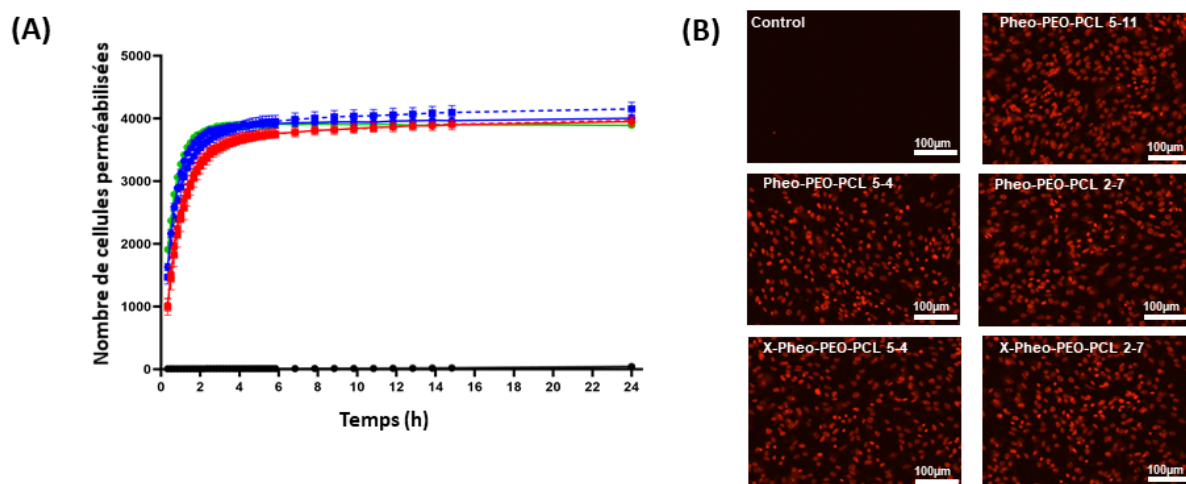


FIGURE 3.18 – Quantification de la perméabilisation des cellules MDCK1 lors du traitement de PDT. (A) Suivi en temps réel de l'intégrité de la membrane plasmique par un test d'iodure de propidium, quantifié par vidéo-microscopie de fluorescence. 6 échantillons. (B) Images des cellules par vidéo-microscopie. ● = Contrôle, ● = Pheo seul, ● = Pheo - PEO-PCL 5-4, ● = Pheo - PEO-PCL 2-7, ● = Pheo - PEO-PCL 5-11, ■ = X-Pheo - PEO-PCL 5-4, ■ = X-Pheo - PEO-PCL 2-7 (Softmat).

La photocytotoxicité induite par la PDT lorsque le Pheo est encapsulé est importante. L'impact de l'encapsulation sur la membrane plasmique a été évaluée, en mesurant le nombre de cellules perméabilisées par un test d'IP, et en quantifiant les flux de certaines espèces. Pour le test d'IP, la fluorescence a été quantifiée par vidéo microscopie toutes les 5 minutes pendant les 4 premières heures, puis toutes les heures. La figure 3.18(A) montre le nombre de cellules perméabilisées en fonction du temps. La perméabilisation induite est visible dès 5 minutes après le traitement de PDT. La dynamique de progression est similaire pour l'ensemble des conditions : une augmentation progressive du nombre de cellules perméabilisées pendant les 3 premières heures après le traitement. Au bout de 4h, une stabilisation s'observe, le nombre de cellules perméabilisées reste ensuite presque constant. La figure 3.18(B) montre des images de vidéomicroscopie avec la fluorescence de l'IP, on voit donc bien les cellules perméabilisées, qui apparaissent rouges.

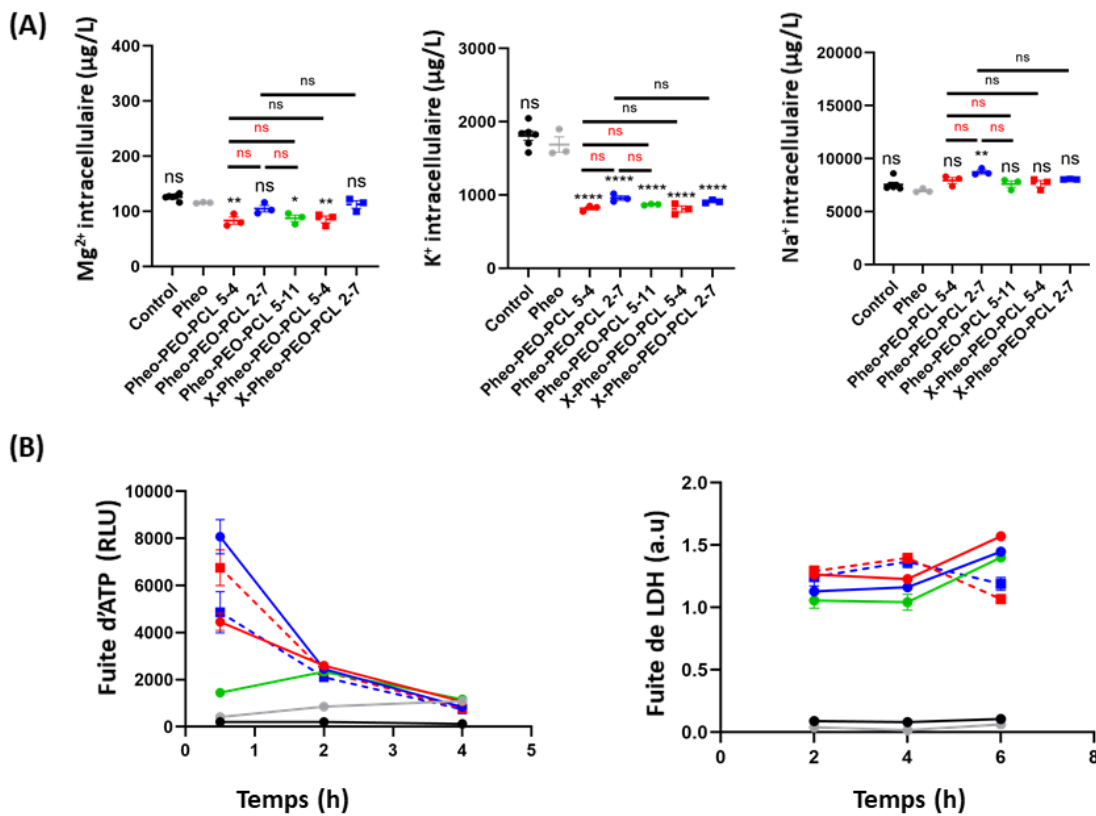


FIGURE 3.19 – Quantification de la perméabilisation induite par le Pheo libre et encapsulé sur des cellules MDCK1 pour une concentration en Pheo de 1.65 μM . (A) Mouvements ioniques quantifiés 30 min après traitement par ICP - OES et chromatographie ionique. 3 échantillons. (B) Fuite d'ATP quantifiée par luminescence. 5 échantillons. Les données sont représentées en moyenne \pm SEM et analysées par ANOVA unidirectionnelle suivie du test de comparaisons multiples de Tukey, qui compare toutes les conditions entre elles. * par rapport au Pheo seul, # par rapport au nanovecteur réticulé, # par rapport à la forme du nanovecteur. ● = Contrôle, ● = Pheo seul, ● = Pheo - PEO-PCL 5-4, ● = Pheo - PEO-PCL 2-7, ● = Pheo - PEO-PCL 5-11, ■ = X-Pheo - PEO-PCL 5-4, ■ = X-Pheo - PEO-PCL 2-7 (Softmat).

Tout comme dans la partie précédente, les ions intracellulaires ont été quantifiés par ICP-OES 30 minutes après le traitement de PDT (figure 3.19(A)). Des fuites de K⁺ sont observées pour l'ensemble des nanovecteurs, de manière significative par rapport au Pheo libre. Ces fuites sont quantitativement bien supérieures à celles observées lorsque les nanovecteurs sont seuls. Une entrée significative d'ions Na⁺ est observée pour la condition Pheo-PEO-PCL 2-7 par rapport à la condition Pheo, tandis que les autres nanovecteurs n'affichent pas de différence significative. Une fuite significative de Mg²⁺ est observée pour les conditions Pheo-PEO-PCL 5-4 (●), X-Pheo-PEO-PCL 5-4 (■) et Pheo-PEO-PCL 5-11 (●) par rapport à la condition Pheo. Il n'y a pas de différence significative de mouvement d'ions entre les différents types d'encapsulation.

Les fuites d'ATP et de LDH ont aussi été quantifiées pour la PDT dans les différentes conditions, respectivement par un test de luminescence et par un test d'absorbance. Les résultats sont affichés sur la figure 3.19(B). Une sortie forte et rapide de l'ATP est observée pour

les conditions Pheo-PEO-PCL 5-4 (●), X-Pheo-PEO-PCL 5-4 (■), Pheo-PEO-PCL 2-7 (●) et X-Pheo-PEO-PCL 2-7 (■). Cette fuite diminue drastiquement aux prochains points de mesures au bout de 2h et 4h post-traitement. La condition Pheo-PEO-PCL 5-11 (●) présente une dynamique bien différente : une augmentation progressive de faible amplitude qui atteint son maximum au bout de 2h puis diminue. Un test ANOVA au bout de 6h montre que la fuite d'ATP est significativement différente selon la forme et la présence de la réticulation lorsque le Pheo est encapsulé avec du PEO-PCL 2-7. La sortie d'ATP relative au Pheo seul est beaucoup plus faible et progressive dans le temps que les autres.

Concernant la fuite de LDH, elle est négligeable lorsque le Pheo est seul. La fuite reste significative pour l'ensemble des nanovecteurs de 2h à 6h après le traitement. En terme de dynamiques, on observe une augmentation de la fuite de LDH au bout de 6h pour les nanovecteurs non réticulés, et le contraire pour les nanovecteurs réticulés. Au bout de 6h, il y a une différence significative de la fuite de LDH entre les nanovecteurs réticulés et non réticulés (● vs ■ et ● vs ■).

L'impact de la PDT sur la membrane plasmique dépend du type de nanovecteur utilisé pour encapsuler le Pheo. La quantification de certaines molécules a montré des dynamiques significativement différentes entre les types de nanovecteurs, mais aussi entre les conditions réticulé ou non réticulé.

3.3.3.3 Etude par le dispositif ATR -THz

L'impact des différents types d'encapsulation est testé par le dispositif ATR-THz sur les cellules MDCK1 dans les mêmes conditions expérimentales que précédemment. Le temps $t=0s$ correspond à la fin de l'illumination des cellules, et au début de la dynamique étudiée. Les courbes THz normalisées sont affichées sur la figure 3.20. Les conditions comparées sont : en (A) : le contrôle, le Pheo seul, le Pheo-PEO-PCL 2-7 et le X-Pheo-PEO-PCL 2-7; en (B) le contrôle, le Pheo seul, le Pheo-PEO-PCL 5-4 et le X-Pheo-PEO-PCL 5-4; en (C) le contrôle, le Pheo seul, le Pheo-PEO-PCL 5-11. Les données brutes sont affichées, ainsi qu'une régression linéaire ($y=ax+b$) ou exponentielle ($y=Ae^{-x/t}+y_0$) correspondant au mieux au comportement de la dynamique.

Dans le cas du Pheo-PEO-PCL 5-11 et du (X)-Pheo-PEO-PCL 5-4, les dynamiques de décroissance du signal sont plus rapides et de plus grande amplitude que par rapport au Pheo seul. Dans le cas du (X)-Pheo-PEO-PCL 2-7, les dynamiques ne sont pas forcément plus rapides que celle du Pheo seul. De plus, l'amplitude de décroissance du X-Pheo-PEO-PCL 2-7 semble du même ordre de grandeur que celle du Pheo.

Les analyses précédentes avaient été effectuées en utilisant comme paramètres l'amplitude de décroissance du signal après stabilisation, et le temps caractéristique de décroissance de la régression exponentielle appliqués à la dynamique du signal. Il a fallu modifier cette approche car les dynamiques de certains types d'encapsulation ne correspondent plus à un fit exponentiel simple. La figure 3.21 illustre ces différentes dynamiques pour 2 types d'encapsulation : Pheo-PEO-PCL 2-7 (A) et Pheo-X-PEO-PCL 5-4 (B).

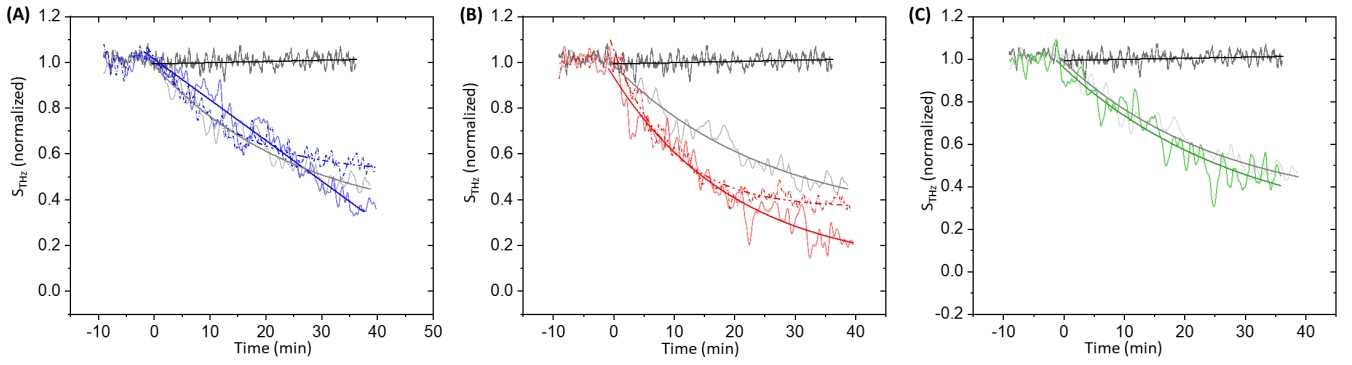


FIGURE 3.20 – Dynamiques de la perméabilité de la membrane plasmique après PDT pour du Pheo seul ou du Pheo encapsulé à $1.65 \mu\text{M}$. (A) Comparaison des dynamiques entre le Pheo libre, et le Pheo-PEO-PCL 2-7 réticulé ou non. (B) Comparaison des dynamiques entre le Pheo libre, et le Pheo-PEO-PCL 5-4 réticulé ou non. (C) Comparaison des dynamiques entre le Pheo libre et le Pheo-PEO-PCL 5-11. Les courbes bruitées correspondent aux données brutes. Les courbes non bruitées correspondent à des régressions linéaires ($y=ax+b$) ou exponentielles ($y=Ae^{-x/t}+y_0$) et servent de guide pour l’œil. — = contrôle; — = Pheo; — = Pheo - PEO-PCL - 2-7; ■■■ = X-Pheo - PEO-PCL - 2-7; — = Pheo - PEO-PCL - 5-4; ■■■ = X-Pheo - PEO-PCL - 5-4; — = Pheo - PEO-PCL - 5-11. (5 échantillons par condition).

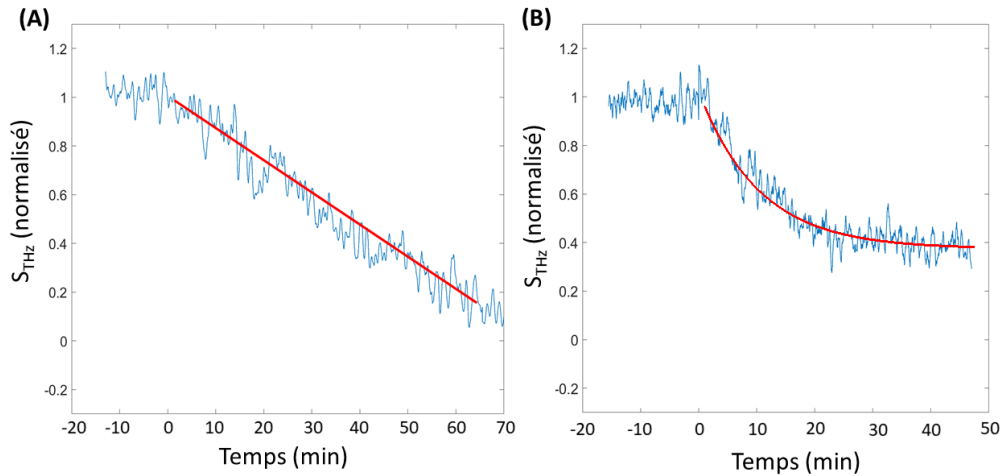


FIGURE 3.21 – Signal THz pour deux types d’acquisitions : traitement PDT sur des cellules MDCK1 pour une concentration de Pheo de $1.65 \mu\text{M}$ avec encapsulation par (A) : Pheo-PEO-PCL 2-7 et (B) : X-Pheo-PEO-PCL 5-4. Les courbes rouges correspondent respectivement à un fit linéaire et un fit en exponentielle décroissante.

Il faut donc modifier les paramètres pour caractériser de façon cohérente les différentes dynamiques des signaux THz. Les paramètres choisis pour analyser les dynamiques des signaux THz sont maintenant :

- l’amplitude de décroissance A_d en % après stabilisation du signal.
- Le temps de décroissance $\tau_{1/2}$ en minutes pour lequel A_d a atteint 50 % de sa valeur finale.

Le temps de décroissance $\tau_{1/2}$ et l'amplitude de décroissance A_d sont affichés sur les figures 3.22 (A) et (B) respectivement. Par rapport à $\tau_{1/2}$, chaque type d'encapsulation est significativement différente de la condition Pheo seul, sauf la condition X-Pheo-PEO-PCL 5-4. Les conditions Pheo-PEO-PCL 5-4 X-Pheo-PEO-PCL 5-4 ont une dynamique plus rapide que le Pheo seul. A_d atteint 50% de sa valeur au bout de presque 10 minutes pour le Pheo. Cette valeur est atteinte presque 2 fois plus rapidement pour le X-Pheo-PEO-PCL 5-4, et environ 4 fois plus rapidement pour le Pheo-PEO-PCL 5-4. Au contraire, les autres conditions Pheo-PEO-PCL 2-7, X-Pheo-PEO-PCL 2-7 et PEO-PCL 5-11 ont une dynamique plus lente que le Pheo seul. $\tau_{1/2}$ atteint une valeur moyenne de ≈ 17 min pour X-Pheo-PEO-PCL 2-7, contre ≈ 30 min pour Pheo-PEO-PCL 2-7.

Par rapport aux amplitudes de décroissance, toutes les conditions de Pheo encapsulé dans un assemblage non réticulé sont caractérisées par une amplitude de décroissance supérieure à celle du Pheo libre.

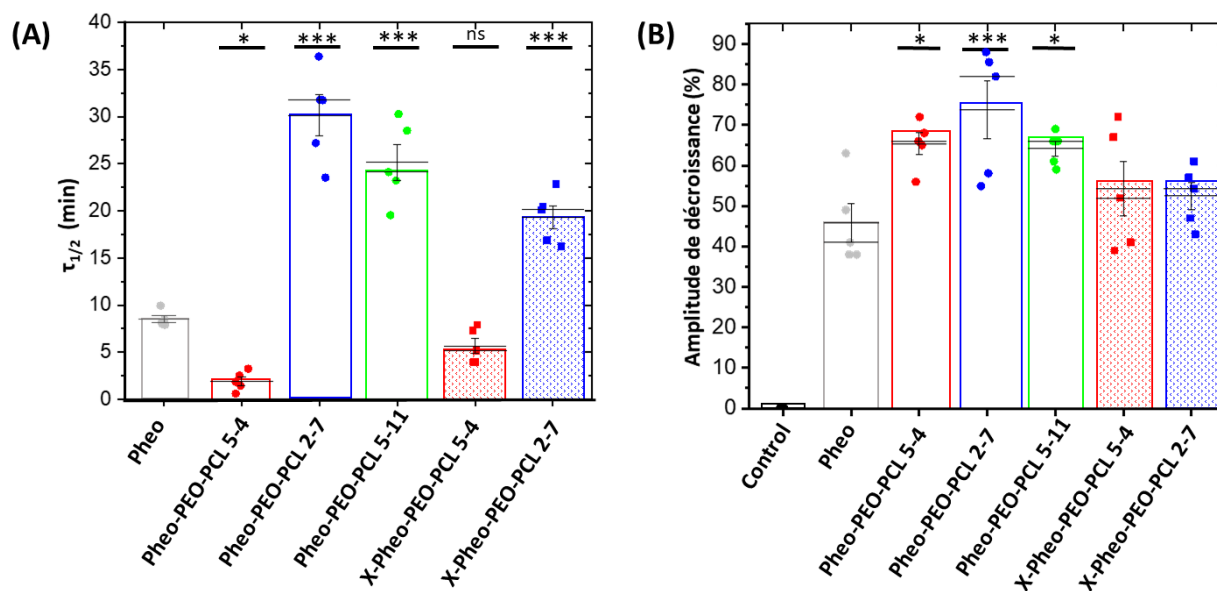


FIGURE 3.22 – Dynamiques de la perméabilisation de la membrane plasmique lors de la PDT pour Pheo libre et Pheo encapsulé à 1.65 μM . (A) Paramètre du temps caractéristique pour une amplitude de décroissance à 50% de sa valeur totale $\tau_{1/2}$. (B) Paramètre d'amplitude de décroissance. L'analyse est faite avec une ANOVA unidirectionnelle qui compare toutes les conditions avec la condition de Pheo seul. ● = Contrôle, ● = Pheo seul, ● = Pheo - PEO-PCL 5-4, ● = Pheo - PEO-PCL 2-7, ● = Pheo - PEO-PCL 5-11, ■ = X-Pheo - PEO-PCL 5-4, ■ = X-Pheo - PEO-PCL 2-7.

Les amplitudes de décroissance caractérisées par la plus grande incertitude sont relatives au Pheo-PEO-PCL 2-7. En effet, du fait de sa dynamique d'apparence linéaire, il n'y a pas de stabilisation observée du signal pendant le temps de mesure. L'amplitude mesurée dépend fortement du temps d'acquisition. Sur la figure 3.21 (B) qui correspond à la condition X-Pheo-PEO-PCL 5-4, le signal se stabilise environ 25 min après l'illumination. Tandis que sur la figure 3.21 (A) qui correspond à la condition Pheo-PEO-PCL 2-7, le signal n'est pas encore stabilisé 60 min après l'illumination. Il est donc nécessaire d'avoir un signal stable sur au moins 60 min pour mesurer la dynamique complète de la PDT. L'amélioration de la stabilité du système (section 1.4.2) a permis de limiter les dérives lentes dues aux fluctuations de température. La

durée des acquisitions peut maintenant atteindre plus de 90 minutes, et donc d’obtenir des dynamiques complètes.

Cette dynamique pseudo-linéaire semble concerner les conditions Pheo-PEO-PCL 2-7 et Pheo-PEO-PCL 5-11. Ce sont ces conditions qui sont caractérisées par un temps $\tau_{1/2}$ très élevé, surtout par rapport aux conditions PEO-PCL 5-4 et X-PEO-PCL 5-4. Cette différence pose la question de la présence éventuelle de plusieurs processus de perméabilisation agissant de manière parallèle, ou bien d’un processus de perméabilisation bien différent des autres configurations. Une première piste serait d’étudier le processus de PDT sur des MDCK1 avec la condition Pheo-PEO-PCL 2-7 en modifiant le milieu de culture, par exemple en utilisant un tampon comme du HBSS ou du PBS. Cela permettrait de diminuer le nombre d’espèces impliqués dans les flux extra-intra cellulaires, et donc le nombre de processus relatifs à la perméabilisation de la membrane plasmique. Le modèle en exponentielle décroissante utilisé jusque ici ne fonctionne plus pour expliquer et analyser certaines des données THz. Plusieurs types de modèles sont testés.

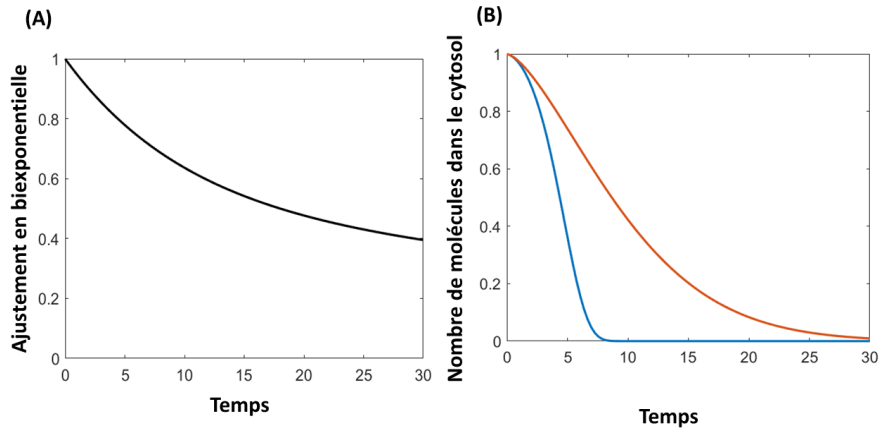


FIGURE 3.23 – Modélisations de la dynamique du signal. (A) Modélisation biexponentielle. (B) Nombre de molécules dans le cytosol dans le cas où des pores se forment au niveau de la membrane ($\tau > 0$) en fonction du temps dans deux configurations pour le paramètre τ . Φ est une constante, fixée ici à 0.04. La courbe bleue, d’allure presque exponentielle, correspond à $\tau=20$. La courbe rouge, d’allure presque linéaire, correspond à $\tau=200$.

Par exemple, un modèle en biexponentielle : $A_1 \exp(-t/\tau_1) + A_2 \exp(-t/\tau_2)$, où A_1 et A_2 sont les deux amplitudes, et τ_1 et τ_2 les deux temps caractéristiques. La figure 3.23(A) affiche une courbe biexponentielle dans le cas où $\tau_1 = 10$ et $\tau_2 = 100$. A court terme, la dynamique est d’apparence linéaire. Une telle modélisation pourrait impliquer soit la présence de plusieurs mécanismes de perméabilisation, soit des mécanismes identiques, mais d’intensités différentes.

Un autre modèle possible reprend celui développé par Zheng et al. [128] et dans lequel le signal THz, qui dépend du contenu du cytosol, est corrélé à la création ou la destruction de pores dans la membrane. Ce modèle est décrit dans le chapitre 2, section 2.4.1. Il calcule le nombre de molécules dans le cytosol en utilisant deux paramètres : τ et Φ . Φ est lié au coefficient de diffusion des molécules dans le cytosol et τ correspond à l’évolution de la taille des pores. Si $\tau < 0$, les pores se referment ; si $\tau > 0$, les pores s’ouvrent, si $\tau = 0$, la taille des pores est statique. La figure 3.23(B) affiche la modélisation de l’évolution du nombre de molécules dans le

cytosol en faisant varier τ . Lorsque la configuration est caractérisée par une faible variation de la taille des pores, la dynamique est de type exponentielle décroissante (courbe bleue). Lorsque la configuration est caractérisée par une forte augmentation de la taille des pores, la dynamique est de type linéaire (courbe rouge). Ce modèle pourrait être une interprétation de la différence entre les dynamiques du signal THz observée lors du traitement de PDT pour plusieurs types d'encapsulation.

Les mesures biologiques et térahertz montrent des dynamiques différentes dans les flux induits par le PS encapsulé dans différents types de nanovecteurs. La combinaison de ces méthodes donne des informations complémentaires : mesures spécifiques à certaines espèces & mesures globale sur un tapis cellulaire ; mesures à des intervalles de temps précis & mesures en temps réel ; mesures avec marquage & mesures non invasives ; mesures quantitatives & mesures moyennées.

Conclusion du chapitre

Dans ce chapitre, l'étude des dynamiques de perméabilisation induite par la PDT a été étudié. En premier lieu, l'efficacité de l'encapsulation de la molécule photosensibilisante par un nanovecteur a été montrée. A court terme, les dynamiques du signal THz sont plus rapides et de plus grandes amplitudes lorsque le PS est encapsulé. A long terme, les flux d'ATP, de LDH et d'ions sont généralement supérieurs lorsque le PS est encapsulé. La photocytotoxicité a de plus été montré comme supérieure dans cette configuration. En second lieu, différents types d'encapsulation ont été étudiés. Le dispositif THz a mesuré des dynamiques significativement différentes selon le type d'encapsulation. Les mesures biologiques ont aussi montré des dynamiques de flux de molécules différentes. La combinaison de ces différentes méthodes permet d'obtenir des informations sur l'encapsulation à différentes échelles temporelles, sur des espèces précises, ou bien en effet global sur un tapis cellulaire, et de manière plus ou moins invasive.

Chapitre 4

Impact de la trypsine sur le cytoplasme de la cellule lors du détachement des cellules

La trypsine est une enzyme utilisée régulièrement dans la culture cellulaire pour détacher les cellules de leur substrat. Elle clive les protéines responsables de l'adhésion cellulaire. C'est la protéolyse de la trypsine. Cependant, la trypsine induit également des effets indésirables sur les cellules, tels que la modification de la composition du cytoplasme, la perméabilisation de la membrane plasmique, l'altération du cytosquelette et des protéines membranaires, voire la mort cellulaire. En utilisant le dispositif ATR - THz et la microscopie confocale, nous avons étudié quantitativement et en temps réel le changement du contenu cytoplasmique induit par la protéolyse de la trypsine sur des cellules épithéliales MDCK1.

4.1 Protéolyse de la trypsine

L'objectif de ce chapitre est d'étudier les modifications de contenu cytoplasmique induites par la trypsine. Il convient, dans un premier temps, d'étudier l'impact global de la trypsine sur les cellules. La trypsine est utilisée régulièrement en culture cellulaire pour détacher les cellules de leur substrat. Cette partie présente le processus de détachement des cellules et son impact sur la morphologie, la structure et le contenu de la cellule.

4.1.1 Utilisation de la trypsine en culture cellulaire

La trypsine est une protéase utilisée quotidiennement en biologie pour la culture des cellules lors du passage ou pour le comptage des cellules en cytométrie de flux [194]. La trypsine clive les liaisons peptidiques (principalement la lysine et l'arginine) des protéines responsables de l'adhésion cellulaire (adhésion cellule-cellule et cellule-substrat), laissant les cellules en suspension. La figure 4.1 (A) montre le passage d'une monocouche de cellules MDCK1 adhérentes les unes entre elles et avec le substrat, à une solution de cellules détachées, de forme plus ronde. Le processus de clivage est représenté sur la figure 4.1 (B).

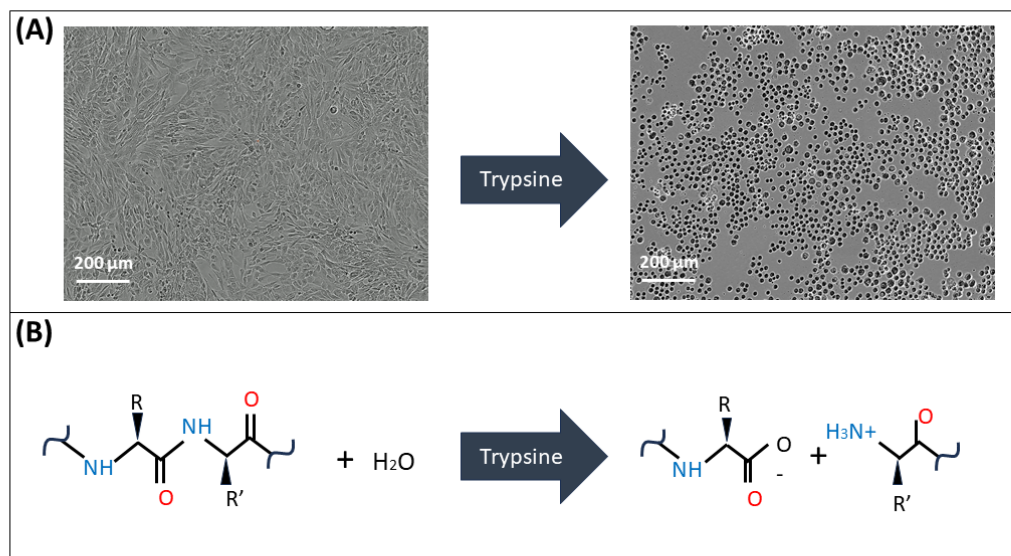


FIGURE 4.1 – Protéolyse de la trypsine. (A) : Cellules épithéliales MDCK1 avant (à gauche) et après (à droite) protéolyse de la trypsine, obtenue par microscopie en transmission. (B) : Clivage des liaisons peptidiques de protéines membranaires, ici l'arginine ou la lysine (R).

La trypsine permet de détacher les cellules adhérentes du substrat. On utilise de la trypsine/EDTA, une combinaison de trypsine et d'acide éthylènediaminetétraacétate (EDTA), un chélateur du calcium et du magnésium. L'EDTA est ajouté à la trypsine pour améliorer son efficacité à affaiblir l'adhésion cellule-cellule et pour augmenter l'accès de la trypsine aux liaisons peptidiques ciblées pour l'hydrolyse. La trypsine/EDTA utilisée est composée à 0,025 % de trypsine et 0,01 % d'EDTA, dilués dans du PBS. La trypsine/EDTA est plus efficace autour de 37°C [195].

On observe sur la figure 4.1(A) qu'après l'action de la trypsine, les cellules changent de forme. Elles se détachent les unes des autres, deviennent rondes, leur hauteur augmente et leur surface d'étalement diminue. Yan et al. [196] ont quantifié certains aspects des modifications morphologiques induites par la trypsine sur des cellules SMCC-7721. La figure 4.2 montre l'évolution en hauteur (A), en largeur et en longueur (B) de ces cellules traitées avec différentes concentrations de trypsine pendant 2 minutes. Plus la concentration en trypsine est élevée, plus la hauteur des cellules augmentent, et plus leur longueur et largeur diminuent.

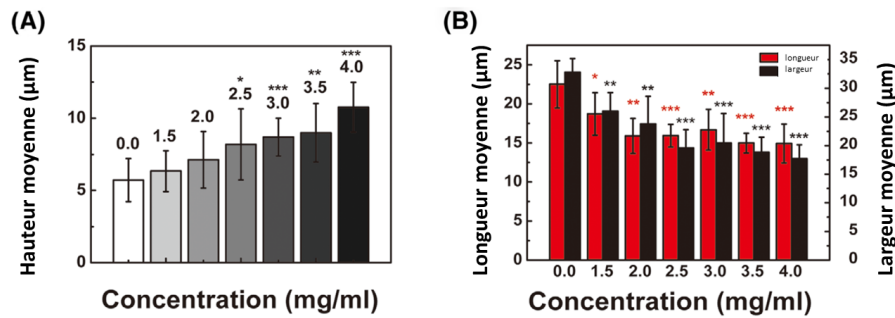


FIGURE 4.2 – Les variations de morphologie des cellules traitées par de la trypsine à différentes concentrations pendant 2 minutes. (A) Hauteur moyenne des cellules. (B) Longueur et largeur moyenne des cellules. Les résultats sont affichés comme la moyenne pm la déviation standard. Figure tirée de [196].

On désigne ces effets de modification de forme des cellules comme la **contribution morphologique** de la protéolyse de la trypsine.

4.1.2 Les effets secondaires de la protéolyse de la trypsine

Bien que très efficace pour ce type de procédé, la trypsinisation a de nombreux effets secondaires sur les cellules. La principale raison est que la trypsine hydrolyse de manière indifférenciée les protéines comportant un résidu d'arginine ou de lysine qui n'est pas suivi de proline, et cette terminaison est commune à de nombreuses protéines membranaires. Il a donc été démontré que la trypsine induit de nombreux changements au niveau de la membrane cellulaire et du cytoplasme. La trypsinisation peut entraîner la perte de protéines membranaires en raison d'une dégradation enzymatique excessive, ce qui peut interférer avec l'analyse des marqueurs de surface et réduire la viabilité cellulaire, en particulier celle des cellules souches [197]. La trypsine altère la structure et l'intégrité du cytosquelette [198], ce qui peut finalement entraîner la mort de la cellule [199]. Yan et al. [196] ont quantifié la mortalité cellulaire de cellules SMCC-7721 pour plusieurs concentrations de trypsine (autour de 3 mg/mL). La mortalité augmente avec la concentration : elle passe de 7 % à 1.5 mg/mL, à 20 % à 4 mg/mL. Plusieurs groupes ont également montré que la trypsine induit la formation de microvillosités (extensions cellulaires fines et cylindriques) à la surface des cellules épithéliales [200, 201]. Il s'agit de la façon dont la cellule gère l'excès de membrane cellulaire lorsque la cellule s'arrondit. Le détachement des cellules du substrat perturbe également l'organisation des filaments d'actine et des microtubules corticaux, entraînant une modification de la rigidité cellulaire et de l'équilibre osmotique [202].

Bien que la trypsine soit largement utilisée dans la culture cellulaire, son impact sur le transfert de molécules à travers la membrane a reçu moins d'attention. L'absorption par la

cellule de molécules pendant la trypsinisation a été observée par Lemons *et al* à la fin des années 1980 dans des fibroblastes en utilisant un marquage radioactif ^{125}I -BSA ou ^{14}C leucine [203].

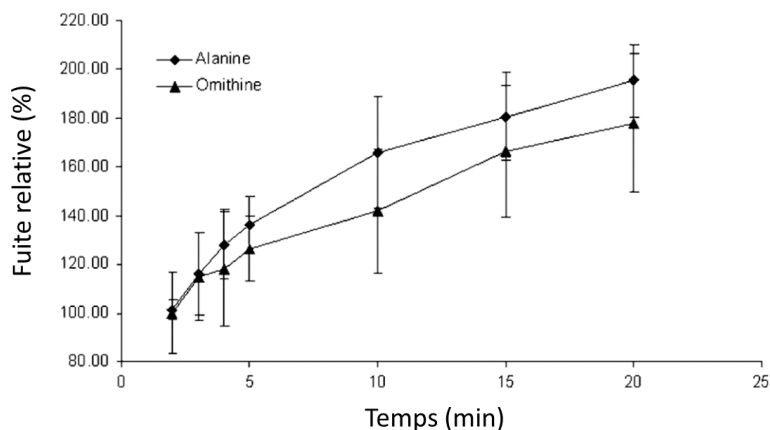


FIGURE 4.3 – Etude des effets secondaires de la protéolyse de la trypsine. Fuite relative des acides aminés alanine et ornithine après protéolyse par trypsine/EDTA sur des cellules endothéliales. Figure tirée de [204].

Des articles ont également documenté la fuite de métabolites induite par la trypsine à travers la membrane plasmique pendant le traitement, en particulier de glycopeptides, de lipides, d'acides aminés (voir figure 4.3(B)) et de protéines [204–206], parfois associés à une désorganisation du cytosquelette [207].

Ainsi, la trypsine peut déclencher le transfert de molécules à travers la membrane par plusieurs moyens : perméabilisation, fragmentation ou rupture de la membrane, activation des canaux, endocytose, vésicules, etc... Cela entraîne un changement net dans la composition moléculaire du cytoplasme [208, 209]. Cet impact sur la cellule est défini comme la **contribution cytoplasmique** de la trypsine. Il est essentiel de comprendre la dynamique de la modification du cytoplasme pendant la trypsinisation pour minimiser les dommages cellulaires au cours du processus. Il existe de nombreuses techniques permettant d'étudier les dynamiques du contenu du cytoplasme d'une cellule. On retrouve la spectroscopie de masse [210], chromatographie en phase gazeuse [204], éléments radio-étiquetés et centrifugation [203, 206] ou élimination du milieu [205], et d'autres méthodes, décrites dans le chapitre 2.

Le premier chapitre a introduit le dispositif ATR - THz, capable de suivre les dynamiques cytoplasmiques sans marqueur, sans préparation ni destruction d'échantillon, et en temps réel. C'est cette méthode que nous avons utilisé pour étudier le processus de protéolyse de la trypsine d'un tapis de cellules épithéliales.

*La trypsine/EDTA est utilisée pour détacher les cellules de leur substrat et les mettre en solution. Elle induit une modification de la morphologie des cellules. L'étude des effets secondaires induits par la trypsine/EDTA indique des variations cytoplasmiques pour plusieurs types de molécules. Les informations relatives à ces variations cytoplasmiques ne sont pas exhaustives. On identifie deux contributions à l'action de la trypsine sur les cellules MDCK1 : une **contribution morphologique** et une **contribution cytoplasmique**. C'est cette dernière que l'on cherchera à identifier dans la partie suivante.*

4.2 Etude des dynamiques des variations cytoplasmiques induites par la protéolyse de la trypsine par le dispositif ATR - THz et la microscopie confocale

La partie suivante présente la réponse térahertz et confocale des cellules pendant la protéolyse de la trypsine/EDTA sur une monocouche de cellules MDCK1. La microscopie confocale permet d'identifier la contribution morphologique de la trypsine sur les cellules. Le dispositif ATR - THz permet d'identifier sa contribution globale. En utilisant un modèle multicouche, il est possible de démêler les contributions morphologique et cytoplasmique du signal ATR - THz mesuré. L'échange moléculaire à travers la membrane plasmique est ainsi observé en temps réel. Les paramètres des dynamiques sont récupérés pour de nombreuses concentrations de trypsine.

4.2.1 Conditions expérimentales

On utilise des cellules MDCK1, des cellules adhérentes de morphologie épithéliale qui se développent en monocouche (section 2.1.1.2). Lorsque les cellules forment une monocouche confluente, leur épaisseur est d'environ $7 \pm 2 \mu\text{m}$ [211]. Le milieu de culture est constitué de milieu Eagle modifié de Dulbecco (ThermoFisher Scientific, 10566016) complété par 10 % de sérum bovin fœtal (DMEM, ThermoFisher Scientific, 10500064) et 1 % de pénicilline-streptomycine (ThermoFisher Scientific, 15140122). La trypsine/EDTA (ThermoFisher Scientific, R001100) est utilisée pour détacher les cellules et composée à 0,025 % de trypsine et 0,01 % d'EDTA. Les cellules sont ensuite déposées sur des lamelles de verre (pour les mesures confocales) ou sur des lames de Si-HR (pour les mesures térahertz). La densité cellulaire est d'environ 31 250 par cm^2 , comptée à l'aide d'un hémocytomètre de Malassez. Les cellules sont cultivées jusqu'à confluence pendant 48 heures et rincées deux fois avec le tampon phosphate salin (PBS, ThermoFisher Scientific, 10010023) sans ions Ca^{2+} ni Mg^{2+} . Avant les expériences térahertz, les cellules sont retirées d'une moitié de la lame de Si-HR pour fournir un signal de référence pendant les mesures térahertz.

4.2.2 Détermination de la contribution morphologique via la microscopie confocale

On utilise un microscope confocal (Leica, TCS SP8 X) pour obtenir le volume de la monocouche de cellules MDCK1 confluentes. Un microscope confocal utilise un système de balayage pour obtenir des volumes. Le laser atteint les échantillons en profondeur grâce à un système de pinhole qui élimine la lumière hors foyer. Le marquage des cellules a été réalisé avec CellTracker Orange CMTMR (ThermoFisher Scientific, C2927), qui traverse librement les membranes cellulaires et pénètre dans les cellules, où il est converti en molécules imperméables à la membrane plasmique. Il est stable et non toxique.

Le pic d'excitation du fluorophore se situe à 552 nm et le pic d'émission à 580 nm. La concentration finale du colorant est de 0,5 μM , diluée dans une solution de PBS. Pour effectuer le marquage, le milieu de culture est retiré, la solution CellTracker Orange est ajoutée et les cellules sont incubées pendant 35 minutes à 37°C dans une atmosphère contrôlée à 5% de CO_2 . Ensuite, les lamelles sont rincées deux fois avec du PBS, placées sur un support et recouvertes de PBS. Pendant l'imagerie confocale, la température est réglée à 37°C via une

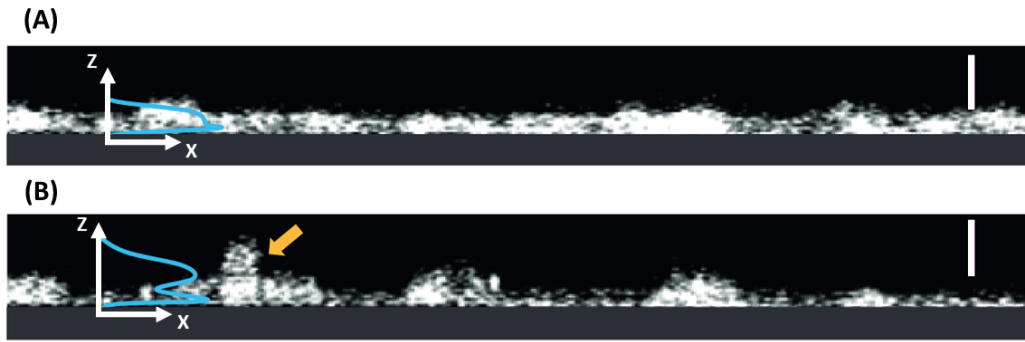


FIGURE 4.4 – Images confocales sur des cellules MDCK1, vue transverse. (A) Cellules MDCK1 à confluence marquées au CellTracker Orange. (B) Les mêmes cellules mais après protéolyse par la trypsine pendant 15 min à une concentration de 5 μM . La courbe bleue représente la distribution en intensité intégrée. La flèche jaune indique une cellule détachée du substrat. La barre d'échelle est de 20 μm .

enceinte contrôlée en température. Le champ de vue est de 291,2 x 291,2 μm (0.085 mm^2); les différentes sections horizontales sont acquises avec un pas de hauteur de 0,5 μm , sur une plage de 20 μm . Un volume de référence est acquis, puis la trypsine est ajoutée. Les sections forment des volumes, acquis à intervalle constant de temps pendant 15 minutes, pour former un hyper-volume à 4 dimensions : 3 d'espace (X-Y-Z) et 1 de temps (t). Une vue transversale XZ de référence est affichée sur la figure 4.4(A). Le même volume après protéolyse par la trypsine pendant 15 minutes à 5 μM est affiché sur la figure 4.4(B). On remarque qu'avant l'action de la trypsine, le fluorophore est réparti assez uniformément sur l'ensemble de la vue transversale, les cellules occupent un espace presque continu. Après l'action de la trypsine, on peut voir des zones dans lesquelles le fluorophore est absent. La forme des cellules est discernable, leur hauteur a augmenté. Certaines cellules se sont décollées (flèche jaune sur la figure 4.4).

La distribution en intensité du fluorophore selon l'axe vertical Z (courbe bleue sur la figure 4.4) est calculée par le logiciel ImageJ. Un ajustement par une double gaussienne y est ensuite appliqué. La première gaussienne est étroite et localisée à proximité sur la lame de microscope. Elle correspond au fluorophore résiduel de la lame. Ce pic est stationnaire pendant l'action de la trypsine. La seconde gaussienne est plus large, et correspond au fluorophore intégré dans les cellules. Sa largeur à mi-hauteur équivaut à la hauteur moyenne du tapis cellulaire selon l'axe Z notée $H(t)$. Cette hauteur est mesurée pour chaque intervalle de temps ($\Delta t = 1 \text{ min}$) pendant 15 minutes. La mesure est effectuée pour plusieurs concentrations entre 1 μM et 8 μM . L'évolution de la hauteur moyenne du tapis cellulaire en fonction du temps pour ces différentes concentrations est affichée sur la figure 4.5. Ces courbes correspondent à la **contribution morphologique** de la protéolyse de la trypsine sur les cellules MDCK1.

La concentration en trypsine la plus faible induisant une modification morphologique est 1 μM . A partir d'une concentration de 2 μM , la hauteur du tapis cellulaire augmente rapidement pendant les premières minutes puis se stabilise au niveau d'un plateau au bout de 10 minutes. Le fit en exponentielle croissante est bien corrélé aux données expérimentales, il est représenté par les courbes solides sur la figure 4.5. La microscopie confocale a permis de quantifier les modifications induites sur la hauteur des cellules.

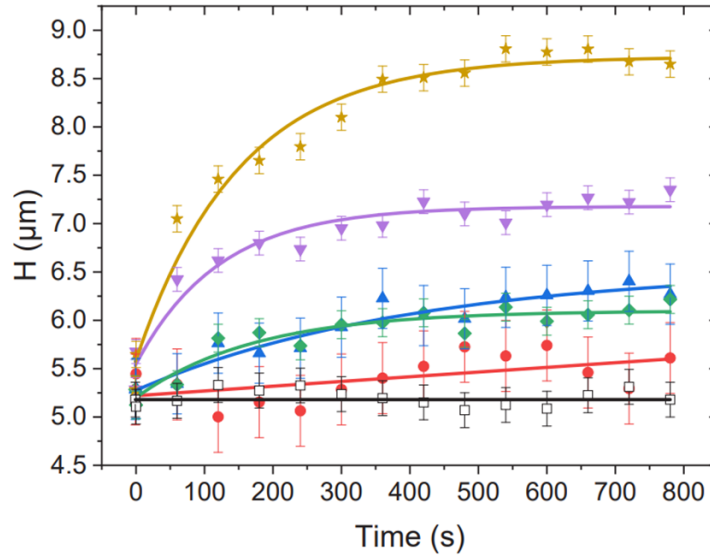


FIGURE 4.5 – Evolution de la hauteur moyenne du tapis de cellules MDCK1 en fonction du temps pendant la protéolyse de la trypsine pour différentes concentrations. Les points de mesure sont obtenus via la distribution en intensité du fluorophore selon l'axe Z . Les lignes pleines correspondent à un fit en exponentielle décroissante inverse. La courbe noire est un contrôle ; rouge = 1 μM ; bleu = 2 μM ; verte = 3.5 μM ; violette = 5 μM ; orange = 8 μM .

4.2.3 Détermination de la contribution globale via le dispositif ATR - THz

Lorsque la trypsine décolle les cellules, ces dernières changent de forme : leur largeur diminue et leur hauteur augmente. On a vu dans le chapitre 1 que la réponse THz dépend de la permittivité relative complexe du milieu sondé par l'onde évanescente. Lors du changement de forme induit par la trypsine sur les cellules, la distribution entre les cellules et le milieu extracellulaire est modifiée. Cela impacte la réponse térahertz. De plus, le signal THz sera influencé par les variations de contenu intracellulaire. La mesure effectuée via le dispositif ATR - THz prend donc en compte les deux contributions : morphologique et cytoplasmique.

Pour ces mesures, une lame de silicium est placée sur le prisme en HR-Si. La lame est recouverte d'une monocouche de cellules MDCK1 à confluence recouverte de 1 mL de PBS. Le signal THz, noté R_{THz} , est enregistré pendant 15 minutes pour vérifier la stabilité et permettre à la température du milieu de se stabiliser à 37°C. Ces 15 minutes de stabilisation permettent aussi de normaliser le signal. Cette phase correspond à la zone bleue de la figure 4.6.

À $t = 0$ s, une solution de trypsine/EDTA diluée dans du PBS est ajoutée au dessus des cellules. Plusieurs aller-retour sont effectués afin d'homogénéiser la solution. Le signal ATR - THz est ensuite enregistré pendant 30 minutes. Cette phase correspond à la zone verte de la figure 4.6. Enfin, après stabilisation du signal, les cellules sont retirées de la lame de silicium afin d'obtenir une référence pour la normalisation du signal. Cette phase correspond à la zone jaune sur la figure 4.6. Ces mesures ont été effectuées pour que la concentration finale de trypsine, après ajout au 1 mL de PBS présent sur la lame de silicium soit dans l'intervalle $[0.5 \text{ } 8] \mu\text{M}$. Les mesures effectuées par le dispositif ATR - THz prennent en compte la **contribution globale** de la protéolyse de la trypsine sur les cellules MDCK1.

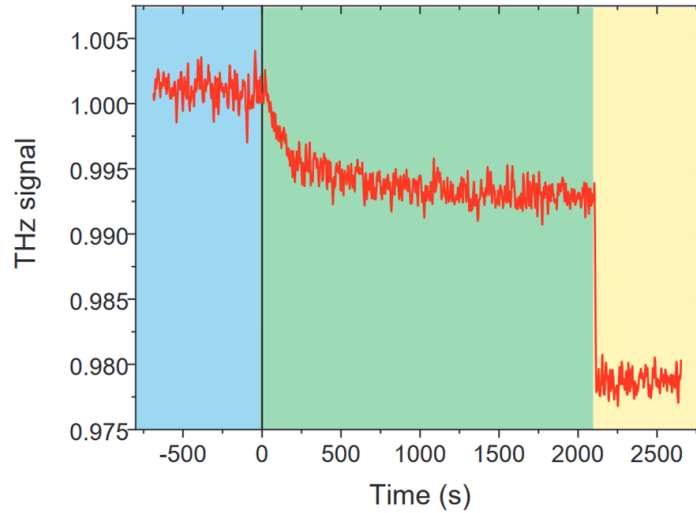


FIGURE 4.6 – Acquisition ATR - THz durant l’action de la trypsine/EDTA sur des cellules MDCK1. La concentration est de $5 \mu\text{M}$. Le signal est divisé en 3 zones. La zone bleue correspond à la phase de stabilisation, les cellules sont recouvertes de PBS. La solution de trypsine/EDTA est ajoutée au temps $t = 0$ s. La zone verte correspond à la dynamique du signal pendant la protéolyse de la trypsine. La zone jaune correspond au signal après avoir retiré les cellules de la lame en silicium.

4.2.4 Détermination de la contribution cytoplasmique via un modèle multicouche

Pour analyser les données térahertz et démêler les contributions morphologique et cytoplasmique pendant la trypsinisation, le dispositif expérimental est modélisé comme un système multicouche : le prisme de silicium, la monocouche cellulaire et le milieu extracellulaire considéré comme infini au-dessus des cellules. Ce modèle est représenté sur la figure 4.7.

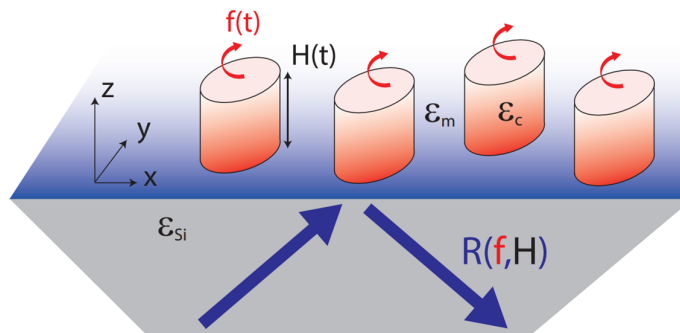


FIGURE 4.7 – **Modèle multicouche** pour calculer le coefficient de réflexion en fonction de la hauteur de la couche cellulaire $\mathbf{H}(\mathbf{t})$ et de la fraction de variation du contenu du cytoplasme $\mathbf{f}(\mathbf{t})$. Les flèches bleues montrent les faisceaux térahertz incidents et réfléchis. Les flèches rouges symbolisent la variation du contenu cytoplasmique. Le gradient bleu représente le champ évanescent.

Chaque couche est caractérisée par sa permittivité relative complexe à 2,5 THz. Le coefficient de réflexion R du prisme ATR est calculé pour la polarisation p à partir du coefficient de réflexion de Fresnel d'un système optique multicouche [28]. Il dépend de la permittivité ainsi que de la confluence et de l'épaisseur de la couche cellulaire. Il est potentiellement modifié par l'action de la protéolyse trypsine/EDTA. Des études précédentes ont montré que la permittivité des solutés dans le domaine térahertz dépend de leur masse molaire M . La permittivité du cytoplasme est une moyenne de la permittivité de chaque soluté, pondérée par sa réponse térahertz et sa concentration (voir équation 4.3) [41, 56].

Les paramètres du modèle sont introduits dans le tableau 4.1. On définit la permittivité relative complexe du cytoplasme et du milieu par ϵ_c et ϵ_m respectivement. Dans le cas de l'étude d'une solution, si la modification de densité du solvant due à la présence du soluté est négligeable, on peut considérer que les dynamiques du soluté $\Delta\epsilon(t)$ peuvent s'obtenir via la soustraction suivante [212], $\Delta\epsilon(t) = \epsilon_c(t) - \epsilon_m$.

L'approximation de la relation de Clausius Mossotti permet d'exprimer la permittivité relative en fonction de la polarisabilité d'une molécule [213] :

$$\epsilon \approx 1 + N\alpha, \quad (4.1)$$

où N est la densité volumique de molécules. Dans le cas d'une solution hétérogène très diluée, la polarisabilité totale de la solution peut s'écrire comme la somme de leur polarisabilité, pondérée par leur densité volumique. Si par exemple une solution s contient deux types de molécules a et b , la polarisabilité de la solution α_s peut s'écrire [214] :

$$\alpha_s = n_a\alpha_a + n_b\alpha_b, \quad (4.2)$$

où n_a et n_b sont les densités des molécules a et b respectivement, et α_a et α_b leur polarisabilité. Ainsi, lors du calcul de la différence entre la permittivité relative du cytosol ϵ_c et celle du milieu ϵ_m , il ne reste plus que la contribution des solutés dans le cytoplasme. Celle ci s'exprime en combinant les équation 4.1 et 4.2 sur le volume du cytosol V_c :

$$\Delta\epsilon(t) = \epsilon_c(t) - \epsilon_m = \frac{1}{V_c(t)} \int D(t, M)\alpha(M)dM = \frac{\alpha_T(t)}{V_c(t)}, \quad (4.3)$$

où D est la distribution molaire des solutés dans le cytoplasme, α la polarisabilité des solutés dans le cytosol, et α_T la polarisabilité volumique totale.

On considère maintenant que la cellule est dans un état d'équilibre physiologique au temps $t_0 = 0$ min. Pour un temps $t > t_0$, on induit une variation de contenu cytoplasmique. On définit à ce moment la fraction de variation du contenu cytoplasmique f , telle que $\alpha_T(t) = f(t) \alpha_T(t_0)$.

Soit ϵ_{eff} la permittivité complexe de la zone sondée par l'onde évanescente. Avant l'ajout de la trypsine/EDTA au temps $t = 0$, ϵ_{eff} est une fonction de la surface totale sondée S_T et de la permittivité complexe du milieu et du cytoplasme, respectivement ϵ_m et ϵ_c . En utilisant l'équation de Gladstone-Dale [215], on peut écrire la permittivité effective comme :

$$\epsilon_{eff} = \frac{1}{S_T} [\epsilon_m S_m + \epsilon_c S_c], \text{ où } S_c \text{ et } S_m \text{ sont les surfaces sondées respectives du cytoplasme et du milieu, vérifiant la relation } S_m + S_c = S_T. \text{ Ainsi, } \epsilon_{eff} = \frac{1}{S_T} [\epsilon_m (S_T - S_c) + \epsilon_c S_c]$$

TABLE 4.1 – Liste des paramètres.

Paramètre	Symbole
Hauteur moyenne cellule	H
Surfaces du cytoplasme, du milieu, et totale sondées	S_c, S_m, S_T
Volume sondé du cytoplasme	$V_c = H \cdot S_c$
Permittivité relative complexe du cytoplasme, du milieu, du silicium	$\epsilon_c, \epsilon_m, \epsilon_{Si}, \epsilon_{eff}$
Fraction de variation du contenu du cytoplasme	f

En utilisant l'équation 4.3 et la relation $V_c = H \cdot S_c$ où H est la hauteur de la cellule, on obtient,

$$\begin{aligned} \epsilon_{eff} &= \frac{1}{S_T} \left[S_c \left(\epsilon_m + f(t) \frac{\alpha_T(0)}{V_c(t)} \right) + \epsilon_m (S_T - S_c) \right] \\ &= \epsilon_m [1 + \delta(t)] \quad \text{avec} \quad \delta(t) = f(t) \frac{\alpha_T(0)}{H(t) S_T \epsilon_m}. \end{aligned} \quad (4.4)$$

Il est important de noter que selon l'équation 4.4, ϵ_{eff} ne dépend pas explicitement du volume cellulaire. La permittivité effective dépend de deux paramètres : la fraction de variation du contenu du cytoplasme $f(t)$ et la hauteur de la couche cellulaire $H(t)$. En effet, le dispositif ATR -THz repose sur la présence du champ évanescent à la surface du prisme, selon l'axe z , ce qui va briser la symétrie du volume (voir figure 4.7). Ainsi, le signal térahertz reste constant lorsque les cellules sont étalées, à condition que les solutés restent à une même distance de la surface du prisme (donc dans le plan xy). En effet, seule la répartition de la permittivité selon z est sondée par l'onde évanescente.

Dans le modèle multicouches, le coefficient de réflexion du prisme R_{THz} s'exprime par une fonction de H , ϵ_{Si} , ϵ_{eff} , R_0 et ϵ_m . Le coefficient de proportionnalité R_0 prend en compte le coefficient de transmission constant du système, à l'exception du prisme ATR. La permittivité du silicium est connue $\epsilon_{Si} = 11.7$ [216], celle du milieu est très proche de celle de l'eau et également bien connue [217]. R_0 est obtenu à partir des données de cellules au repos, où $f = 0$ (voir la zone 3 de la Fig. 4.6). R_{THz} est également comparé aux données expérimentales de contrôle (en absence de trypsine/EDTA, zone 1 de la figure 4.6 pour $t < 0$) et $f = 1$. On calcule ainsi $\delta_0 = \delta(0)$ défini par l'équation 4.4 de manière à ce que $R(\delta_0) = R_{THz}(t < 0)$, Ainsi on peut exprimer la permittivité effective comme,

$$\epsilon_{eff} = \epsilon_m \left[1 + \delta_0 f(t) \frac{H_0}{H(t)} \right], \quad (4.5)$$

où H_0 est la hauteur de la cellule au repos sans trypsine/EDTA. Par conséquent, les seuls paramètres inconnus restants sont $f(t)$ et $H(t)$.

On introduit à présent $R_p(f, H)$, le signal réfléchi théorique calculé pour une polarisation p. R_p ne dépend que de la hauteur moyenne de la monocouche de MDCK1 H et de la fraction de variation du contenu du cytoplasme f (voir figure 4.7). Connaissant $H(t)$ à partir des mesures confocales, on peut calculer $f(t)$ de telle sorte que $R_{THz} = R_p(f, H)$ pour chaque concentration de trypsine. Les valeurs de R_{THz} sont obtenues via les mesures térahertz brutes, tandis que des ajustements exponentiels sont faits pour $H(t)$ afin de minimiser les incertitudes des mesures confocales.

Un code Matlab a été écrit pour résoudre l'équation $R_{\text{THz}} = R_p(f, H)$. La première étape est une lecture des données térahertz brutes. Ces données sont normalisées par le coefficient R_0 calculé précédemment. Les arguments d'entrée du code Matlab sont la hauteur du tapis cellulaire H , la fréquence utilisée (2.5 THz), ainsi que l'angle d'incidence du faisceau noté θ . L'argument de sortie est le coefficient de réflexion de la polarisations p pour un système à 3 couches R_p . Ce coefficient se calcule via les équations de Fresnel appliquées à un système multicouche absorbant [218]. Pour un système à 3 couches, le coefficient de réflexion en amplitude, noté r s'exprime par :

$$r = \frac{\eta \vec{E}_m - \vec{H}_m}{\eta \vec{E}_m + \vec{H}_m},$$

avec \vec{E}_m et \vec{H}_m les champs électriques et magnétiques respectivement. Ils s'expriment via un système de matrices :

$$\begin{pmatrix} \vec{E}_m \\ \vec{H}_m \end{pmatrix} = \mathbf{M} \begin{pmatrix} 1 \\ \eta \end{pmatrix},$$

où \mathbf{M} est une matrice 2x2, produit des matrices M_j qui caractérisent chacune des couches j , et η est l'indice de réfraction effectif de la couche. Il s'exprime par :

$$\eta = \begin{cases} \frac{\tilde{n}}{\cos(\theta)} & \text{pour une polarisation p} \\ \tilde{n} \cos(\theta) & \text{pour une polarisation s} \end{cases}$$

Chacune des couches est caractérisée par son épaisseur d_j , son indice complexe \tilde{n}_j et un angle de réfraction θ_j . Pour $j \in [1,2,3]$,

$$M_j = \begin{pmatrix} m_{11} & im_{12} \\ im_{21} & m_{22} \end{pmatrix} = \begin{pmatrix} \cos(\delta_j) & \frac{i}{\tilde{n}_j} \sin(\delta_j) \\ i\tilde{n}_j \sin(\delta_j) & \cos(\delta_j) \end{pmatrix} \text{ avec } \delta_j = \frac{2\pi}{\lambda} [\tilde{n}_j d_j \cos(\theta_j)]$$

Dans cette configuration, $d_1 = d_3 = 0$. Les paramètres inconnus dans ce système sont la largeur $H(t)$ (qui correspond à d_2) et l'indice complexe de la seconde couche, celle des cellules donc. Le système est représenté sur la figure 4.8. On peut y retrouver les paramètres introduits précédemment.

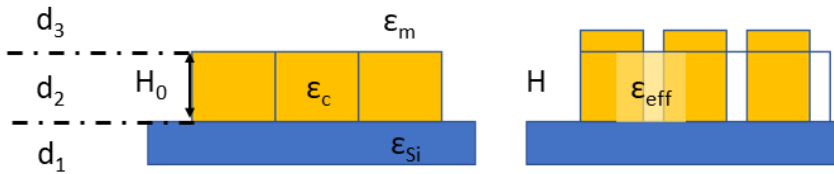


FIGURE 4.8 – Système multicouches. La couche inférieure (en bleu) correspond à la lame en silicium et est considérée comme d'épaisseur nulle. La couche intermédiaire (en jaune) correspond au tapis cellulaire, d'épaisseur initiale H_0 puis d'épaisseur variable H . La dernière couche correspond au milieu extracellulaire et est considérée comme d'épaisseur nulle.

ϵ_{eff} varie en fonction de $H(t)$ et de $f(t)$ selon l'équation 4.5. Les données confocales sont récupérées pour obtenir l'évolution de $H(t)$. Les données térahertz donnent accès au coefficient

de réflexion réel $R_{\text{THz}}(t)$. Le code Matlab permet de trouver pour quelle valeur de f on a l'égalité $R_p(t) = R_{\text{THz}}(t)$. Le processus est résumé sur la figure 4.9.

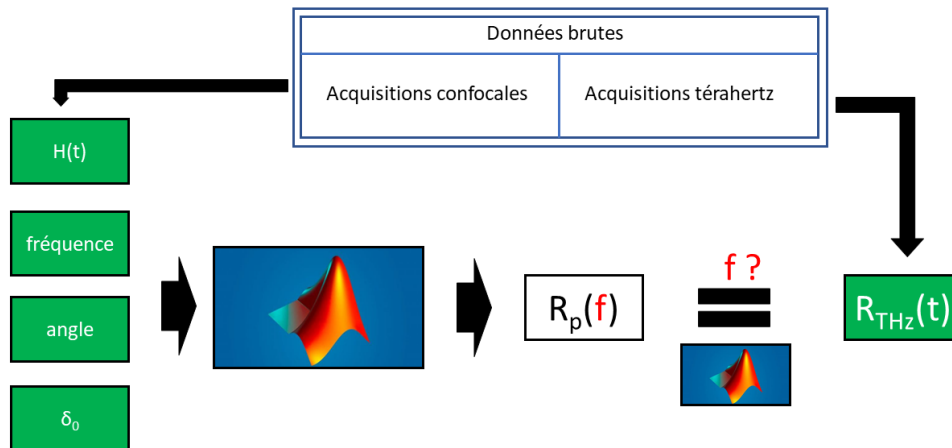


FIGURE 4.9 – Méthode pour extraire la fraction de variation cytoplasmique $f(t)$. A partir des données confocales, on récupère la hauteur des cellules $H(t)$, et des mesures térahertz $R_{\text{THz}}(t)$. Les données confocales sont placées comme argument d'entrée du code Matlab, avec d'autres paramètres du système (fréquence, angle, δ_0). Cette fonction donne en sortie un coefficient de réflexion R_p qui dépend de la fraction cytoplasmique f . Le code Matlab permet de trouver pour chaque temps t pour quelle valeur de f l'équation 4.5 est vérifiée. Les rectangles verts correspondent aux données connues.

L'évolution de $f(t)$ est présentée dans la figure 4.10A. On observe une décroissance de f sur les 200 premières secondes, suivie d'un plateau. La contribution morphologique au signal térahertz total est d'environ 25 % pour le détachement complet des cellules. La dynamique présente un comportement en exponentielle décroissante. Une régression adéquate $f_0 + A e^{-t/T}$ est effectuée pour obtenir l'amplitude de la décroissance A et le temps de décroissance caractéristique T . La Figure 4.10B montre l'évolution de A et du taux de décroissance $\gamma = 1/T$ en fonction de la concentration en trypsine. On observe une augmentation importante de A et γ avec la concentration de trypsine. Pour une faible concentration de trypsine (1 μM), la modification du cytoplasme est faible. Elle correspond à environ 10 % de la variation du contenu du cytoplasme. La variation de f atteint 30 % pour une concentration de trypsine de 8 μM . L'ampleur des changements concernant le temps de décroissance caractéristique est encore plus grande, d'un facteur 10. Le temps caractéristique passe ainsi de 33 ± 5 s pour 8 μM à 320 ± 50 s pour une concentration de 1 μM .

La combinaison de la microscopie confocale avec le dispositif ATR - THz permet d'obtenir les contributions morphologiques et globales de l'influence de la trypsine sur les cellules MDCK1. Un modèle multicouche permet de combiner ces informations, pour en extraire la contribution cytoplasmique induite par la trypsine. Les variations induites augmentent avec la concentration de la trypsine jusqu'à saturation, à la fois en terme d'amplitude et en terme de vitesse de la dynamique.

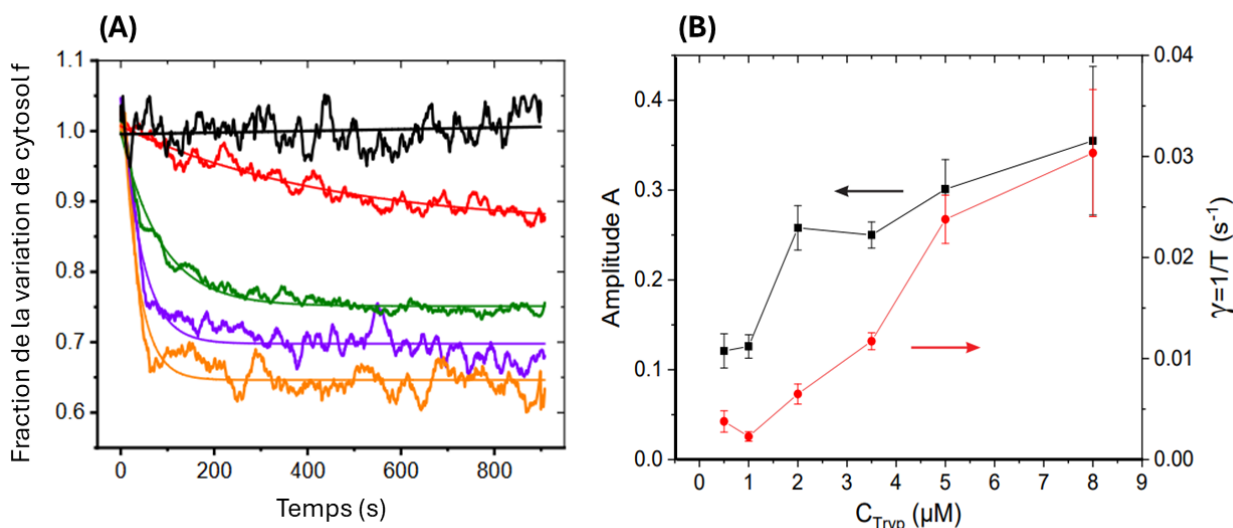


FIGURE 4.10 – **Dynamique du cytoplasme cellulaire.** (A) Fraction du contenu du cytoplasme $f(t)$ pour différentes concentrations de trypsine/EDTA. La courbe noire est le contrôle (3); courbe rouge = $1\mu\text{M}$ (6); courbe verte = $3,5\mu\text{M}$ (3); courbe violette = $5\mu\text{M}$ (5); courbe orange = $8\mu\text{M}$ (3). () est le nombre d'échantillons. (B) Paramètres de l'ajustement de la décroissance exponentielle de $f(t)$ pour les différentes concentrations de trypsine/EDTA : $f_0 + A e^{-t/T}$. La courbe noire représente l'amplitude A de la décroissance; la courbe rouge est le taux de décroissance $\gamma = 1/T$.

4.3 Quelles types de molécules sont impliquées dans la variation du contenu cytoplasmique induit par la trypsine ?

On a vu précédemment que la protéolyse de la trypsine induit des variations de contenu cytoplasmique importantes, jusque 30% pour une concentration classique en culture cellulaire. Ces variations sont caractérisées par une décroissance du signal térahertz (voir figure 4.10(A)). Il est possible d'identifier certains des flux de molécules via cette information. Cette partie introduit en premier lieu comment le signal THz évolue en fonction de la masse molaire des molécules échangées. En second lieu, elle présente les types de molécules ayant déjà été identifiés dans la littérature comme impliqués dans la protéolyse de la trypsine. Cela permet d'identifier les flux mis en jeux et observés.

4.3.1 Influence de la masse molaire des solutés sur le signal térahertz

On peut étudier l'influence de la masse molaire des molécules au niveau du signal térahertz. Ce paramètre est inclu dans la variation de la polarizabilité des solutés α dans l'expression de la permittivité effective (Eq.4.3), et donc inclu dans l'expression de R_{THz} . La figure 4.11 montre l'influence de la masse molaire d'une molécule en solution sur le signal térahertz. Les données et le modèle théoriques ont été développés précédemment [25, 41]. Le modèle est explicité dans le chapitre 1, il s'agit du modèle à 3 volumes pour représenter une molécule en solution : un volume pour le soluté, un pour la couche de solvation qui l'entoure, un dernier pour l'eau

massive l'entourant. Les données montrent que le signal térahertz dépend beaucoup de la masse molaire du soluté. La contribution au signal est négative pour des petites molécules de taille inférieure à environ 110 Da. La contribution est positive pour des molécules plus grandes : des acides aminés, des peptides ou encore des protéines.

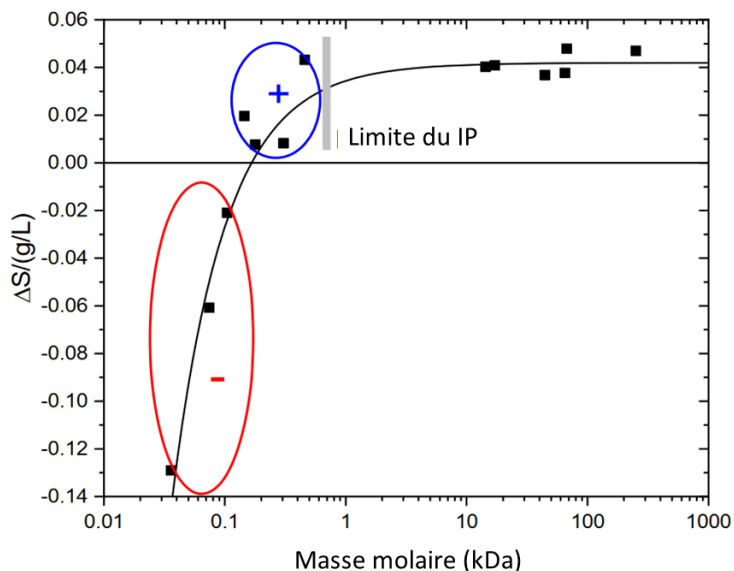


FIGURE 4.11 – Données térahertz expérimentales et théoriques de la variation du signal ATR réfléchi pour des molécules biologiques d'intérêt (voir tableau 4.2). ΔS ($\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$) est la variation molaire du signal térahertz. La courbe pleine est obtenue à partir du modèle décrit dans [41]. Le trait — correspond à la masse molaire de l'IP.

TABLE 4.2 – Liste des molécules utilisées dans la figure 4.11, avec leur masse molaire.

Molécule	Masse molaire (kDa)
K^+/Cl^-	0.037
glycine	0.075
serine	0.105
lysine	0.146
tricine	0.179
gluthatione	0.307
LSKL-NH2 peptide	0.458
lysozyme	14.3
myoglobine	17.1
ovalbumine	44.3
hemoglobine	64.5
albumine	66
catalase	≈ 250

Ainsi, une décroissance du signal térahertz peut signifier une entrée d'ions dans les cellules, ou bien une sortie de plus grandes molécules comme des protéines.

4.3.2 Les molécules impliquées dans les variations de contenu cytoplasmique

La fraction de variation du contenu du cytoplasme f est induite par une modification dans le nombre de molécules dans le cytoplasme, via des transferts dans et hors des cellules. Les défauts membranaires induits par la trypsine/EDTA ont été étudiés via un test d'IP (Merck #P4170, Darmstadt, Allemagne) par de la vidéo-microscopie. L'iodure de propidium s'intercale à l'ADN et peut fluorescer. Il pénètre dans la cellule lorsque la membrane plasmique présente des défauts. Les mesures d'iodure de propidium ont été réalisées par le Laboratoire Softmat de l'Université de Toulouse.

20,000 cellules MDCK1 sont cultivées dans des plaques de 96 puits jusqu'à atteindre 95% de confluence. Les cellules sont rincées avec du PBS sans ions Ca^{2+} ni Mg^{2+} puis elles sont incubées avec 100 μL de trypsine/EDTA (8 μM) contenant 1 μM d'IP. Les cellules sont placées sous le vidéo microscope. Des images de phase et de fluorescence sont acquises toutes les 5 minutes pendant 2h. La figure 4.12 montre les acquisitions effectuées sur des cellules MDCK1 avec un suivie par iodure de propidium pendant la protéolyse de la trypsine.

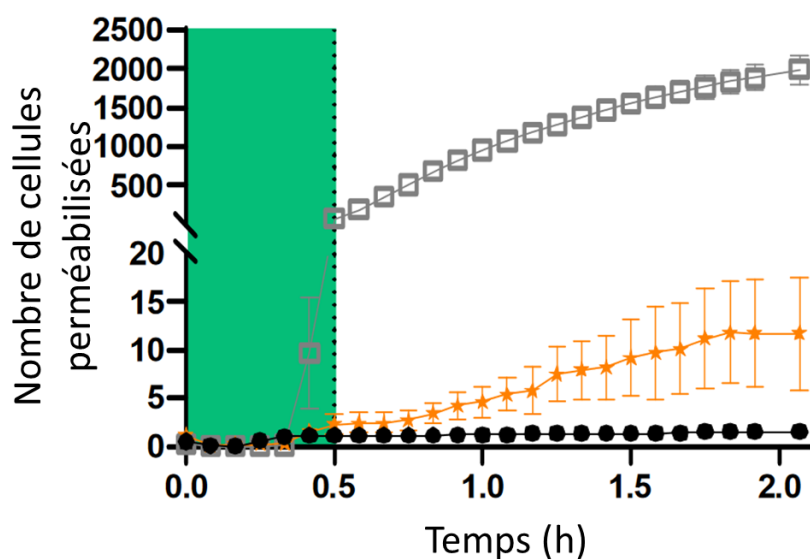


FIGURE 4.12 – Contrôle de la pénétration de l'IP par vidéo-microscopie après incubation des cellules MDCK1 avec de la trypsine/EDTA à 8 μM . Le nombre de cellules est compté via un logiciel et correspond aux étoiles oranges. La zone verte représente la dynamique du signal pendant les 30 premières minutes après exposition à la trypsine. La saponine (détergent, voir chapitre 2) est utilisée comme contrôle positif pour la perméabilisation membranaire et correspond aux carrés gris. Un contrôle a été effectué, sans trypsine/EDTA et correspond aux ronds noirs. Pour chaque point, 5 échantillons ont été utilisés.

La figure montre une entrée négligeable d'IP dans les cellules, au moins 100 fois moins importante que pour le contrôle positif effectué via la saponine. La saponine est une référence pour la création de pores dans la membrane plasmique [88]. Ce test exclue donc la perméabilisation concernant des molécules plus grandes que l'iodure de propidium (690 Da).

Cependant, Dettmer et al. [204] ont observé une fuite significative de métabolites pour la lignée cellulaire SW480 adénocarcinome, après un traitement de trypsine/EDTA. Tous ces métabolites sont caractérisés par une masse molaire entre 90 et 340 Da. Ils ont de plus observé la fuite d'acides aminés (alanine et ornithine) dans un temps caractéristique de 10 minutes. Cela est compatible avec l'évolution de f (figure 4.10).

De plus, la modification du volume cellulaire observé lors de la protéolyse de la trypsine est associée à une expansion de la membrane et un aplatissement des microvilli ou des plis membranaires, ou bien encore à une modification de la tension membranaire et de la structure des micro-filaments d'actine [219]. Ces phénomènes sont alors équilibrés par endocytose ou exocytose [220, 221]. Venkova et al. [222] ont montré l'existence d'un couple mécano-osmotique qui définit une tension membranaire homéostatique dans la cellule, induisant des fluctuations du volume cellulaire et associée à des modifications rapides de la forme de la cellule. Des variations du volume jusque 20 % ont été mesurées, impliquant une réponse homéostatique de la cellule, et donc un transfert d'électrolytes à travers la membrane plasmique.

Ces observations peuvent expliquer la décroissance du signal térahertz. En premier lieu, l'entrée dans le cytoplasme des ions contenus dans la solution de PBS autour de la cellule induit une décroissance du signal térahertz. La contribution des petites molécules étant négative. La composition du PBS est affichée dans le tableau 4.3. Le tableau 4.4 affiche la masse molaire des ions correspondant à la composition du PBS. Les masses molaires sont de l'ordre de 10^{-2} kDa. Si l'on se réfère à la figure 4.11, on a bien une contribution négative du signal. En second lieu, la sortie d'acides aminés et de petits peptides du cytoplasme mène aussi à une décroissance du signal térahertz puisque leur contribution est positive (voir figure 4.11). La masse molaire de telles molécules, déterminée par Dettmer et al. [204] est inférieure à 240 Da, et est donc cohérente avec les tests d'exclusion par iodure de propidium (figure 4.12). Les flux de molécules induisant une décroissance du signal térahertz sont représentés sur la figure 4.13.

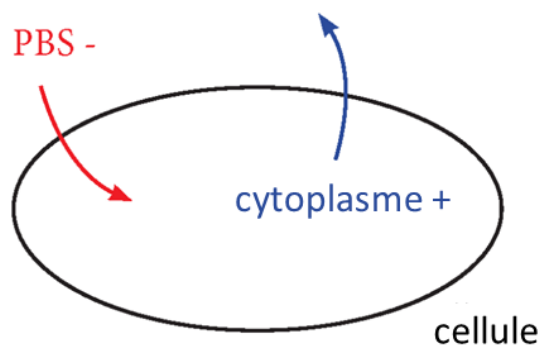


FIGURE 4.13 – Flux de molécules contribuant à la décroissance du signal térahertz : entrée d'ions depuis le PBS, sortie de peptides et d'acides aminés depuis le cytoplasme.

TABLE 4.3 – Composition du PBS, pH 7.4, ThermoFisher Scientific, 10010023.

Molécules	Concentration (mg/L)
KH_2PO_4	144
NaCl	9000
$\text{Na}_2\text{HPO}_4 - 7\text{H}_2\text{O}$	795

TABLE 4.4 – Liste des ions correspondant au tableau 4.3, avec leur masses molaire.

ions	masse molaire (Da)
Na^+	23
Cl^-	35
K^+	39
HPO_4^{2-}	96
H_2PO_4^-	97

La décroissance observée sur la fraction de variation cytoplasmique est potentiellement due à une entrée d’ions depuis le milieu entourant les cellules, le PBS. L’autre contribution vient d’une sortie de peptides et d’acides aminés depuis le cytoplasme. Les mesures confocales, térahertz et le modèle multicouche ont donc permis d’identifier en temps réel les flux de molécules déclenchés par la protéolyse de la trypsine.

4.4 Quelle est la méthode la moins invasive pour les cellules : une forte concentration en trypsine pendant un temps court, ou l’inverse ?

La trypsine est utilisée très fréquemment en culture cellulaire. Il est important de minimiser les effets secondaires induits, afin d’obtenir des résultats fiables. Est-il plus sûr d’utiliser une forte concentration de trypsine pendant une courte période, ou d’augmenter le temps d’exposition à une faible concentration de trypsine, afin de minimiser les effets secondaires cytoplasmiques de la trypsinisation ? En d’autres termes, quel est le rôle intrinsèque de la concentration de trypsine sur les effets secondaires de l’altération cytoplasmique ?

On observe sur la figure 4.14 qui affiche Δf (la variation cytoplasmique) en fonction de ΔH (la variation de la hauteur des cellules), que plus le décollement recherché est fort, plus la perméabilisation est importante. La question posée dans cette partie est sur la possibilité de trouver une combinaison temps d’exposition à la trypsine - concentration en trypsine, qui permettrait de diminuer au maximum les effets de perméabilisation induits.

Pour chaque concentration de trypsine/EDTA étudiée et à partir des dynamiques enregistrées de $f(t)$ et $H(t)$, nous pouvons calculer pour un temps donné t_1 les valeurs correspondantes de la variation de la hauteur des cellules $\Delta H = H(t_1) - H_0$ et de la variation du contenu du cytoplasme $\Delta f = 1 - f(t_1)$. Les résultats sont présentés sur la Figure 4.14 pour 5 délais de 80 à 300s et pour 6 concentrations de 0,5 à $8\mu\text{M}$. Ils montrent une forte corrélation entre Δf et ΔH ($R^2=0.98$) avec l’ajustement exponentiel $\Delta f = 0.332(1 - e^{-\Delta H/0.655})$.

Sur la figure 4.14, les différentes formes pour les points de données correspondent aux différentes concentrations. On observe que plus la concentration est basse plus le décollement ainsi que les effets de perméabilisations sont faibles. Lorsque la concentration augmente, le décollement augmente aussi ; tandis que pour Δf , on arrive à une forme de plateau (surtout pour les triangles vers le bas : $5\mu\text{M}$ et les étoiles : $8\mu\text{M}$). Les différentes couleurs, elles, correspondent à quel intervalle de temps les données ont été obtenues. Les temps choisis vont de 80 s à 300 s,

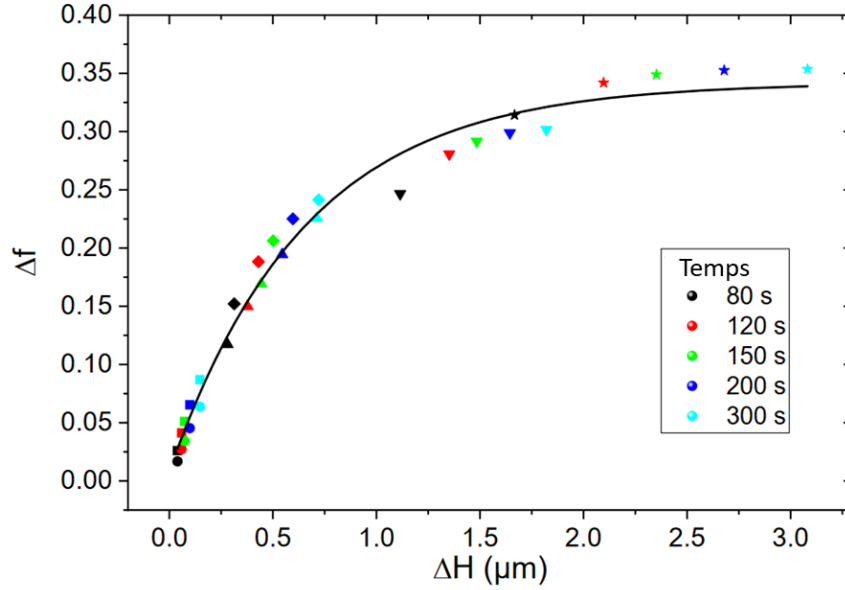


FIGURE 4.14 – Corrélation entre la fraction de cytoplasme et la hauteur des cellules. La variation du contenu du cytoplasme Δf en fonction de la variation de hauteur ΔH pour 5 délais temporels identiques entre 80 et 300s, et pour 6 concentrations de trypsine/EDTA. Les couleurs font référence aux délais temporels, comme indiqué sur la légende. Les symboles font référence aux concentrations à 0.5 μM (cercle), 1 μM (carré), 2 μM (triangle vers le haut), 3.5 μM (losange), 5 μM (triangle vers le bas), et 8 μM (étoile). La courbe pleine est un ajustement exponentiel décroissant inverse : $\Delta f = 0.332(1 - e^{-\Delta H/0.655})$.

lorsque la majorité des effets ont été observés. On observe que plus le temps d'exposition à la trypsine augmente, plus Δf et ΔH augmentent, jusqu'à atteindre le même plateau concernant Δf pour les hauts temps.

Dans l'hypothèse où l'objectif serait de décoller les cellules de 2 μm , la figure 4.14 montre qu'on a le choix entre exposer des cellules à une solution de trypsine/EDTA à 8 μM pendant 80s, ou bien à une concentration de 5 μM pendant 200s.

Les points définissent une courbe très régulière, indépendante de la concentration. Cela signifie que lorsqu'un détachement cellulaire donné est obtenu lors de la trypsinisation, la modification du cytoplasme est toujours la même quelle que soit la concentration de trypsine/EDTA utilisée, du moins dans la gamme de concentrations utilisée dans cette étude.

Le même effet secondaire cytoplasmique est attendu, qu'une faible concentration de trypsine soit utilisée pendant une longue période ou qu'une forte concentration soit utilisée pendant une courte période. Il est intéressant de noter que, dans la gamme de concentrations de trypsine étudiée ici, l'impact sur la cellule dépend essentiellement du nombre total de molécules de trypsine rencontrées par la cellule, indépendamment de l'aspect temporel. Ceci implique que l'effet de la trypsine/EDTA semble être très tolérant dans le sens où une gamme raisonnablement large de concentration de trypsine peut être utilisée pour obtenir les mêmes résultats sur les cellules. Ceci est en accord avec les procédures de culture cellulaire.

Conclusion du chapitre

Dans ce chapitre, nous avons étudié la modification du contenu cytoplasmique en tant qu'effet secondaire du détachement des cellules pendant la trypsinisation. Les mesures sont effectuées en temps réel par des mesures térahertz, par microscopie confocale et par vidéomicroscopie. Nous avons identifié deux contributions de la trypsinisation sur les cellules : une contribution morphologique, responsable du changement de forme des cellules ; une contribution cytoplasmique, responsable des flux de molécules à travers la membrane plasmique. La microscopie confocale permet d'identifier directement la contribution morphologique. Le dispositif ATR - THz permet d'identifier l'effet global des deux contributions. Un modèle multicouche combinant les différentes données permet d'extraire la contribution cytoplasmique induite par la trypsine/EDTA sur la membrane plasmique, de manière quantitative et en temps réel. Une modification significative du contenu cytoplasmique est observée au cours des premières minutes suivant l'ajout de la trypsine/EDTA. Son impact est d'autant plus important et rapide que la concentration en trypsine est grande. Cette modification peut s'expliquer à la fois par l'entrée d'ions inorganiques provenant de la solution PBS extracellulaire et par la fuite d'acides aminés et de petits peptides du cytoplasme. En effet, la vidéomicroscopie montre que des molécules d'une taille de 690 Da ou plus ne sont pas impliqués dans ce processus. Une très bonne corrélation non linéaire a été trouvée entre l'altération du cytoplasme et le décollement des cellules. Et cela, indépendamment de la concentration de trypsine et du temps d'exposition. Cela peut expliquer pourquoi les procédures de culture cellulaire trouvées dans la littérature sont tolérantes à la concentration en trypsine à utiliser.

Conclusion

Les méthodes pour suivre en temps réel les processus d'échanges et de flux à travers la membrane plasmique des cellules sont rares. L'interaction entre les ondes térahertz et les modes vibrationnels des liquides biologiques, combiné à une géométrie de réflexion totale atténuée, a permis d'élaborer un dispositif capable de mesurer les variations de contenu de cellules vivantes avec une très bonne précision. Une onde évanescente vient sonder un tapis cellulaire ; le signal mesuré dépend des propriétés diélectriques des cellules ; lorsque, sous l'action d'un processus extérieur, des flux de molécules se produisent à travers la membrane plasmique, les propriétés diélectriques des cellules sont modifiées, et donc le signal mesuré aussi. Ce travail de thèse a été divisé en plusieurs axes.

Le premier est le développement technologique du dispositif térahertz. Un travail sur l'amélioration de la stabilité du système a été effectué, ce qui a permis d'augmenter sensiblement le temps d'acquisition des mesures, pour avoir accès à l'ensemble de la dynamique de perméabilisation induite par un processus.

Les deux autres axes sont des applications directes de l'étude de perméabilisation de la membrane plasmique. La première application est celle de la thérapie photodynamique (PDT), en collaboration avec l'équipe IDeAS du laboratoire Sofmat de Toulouse. L'illumination d'une molécule photosensibilisante à proximité de cellules induit leur mort. Cette méthode est très modulable, à la fois dans les composants utilisés et dans leur dosage, et l'est donc aussi au niveau de l'impact sur les cellules. L'efficacité de la PDT a été associée à la mortalité cellulaire induite ; celle-ci, d'après les mesures biologiques, peut être augmenté en encapsulant la molécule photosensible dans un nanovecteur. Une première étude a montré que le dispositif térahertz mesure aussi un impact plus important sur la perméabilisation de la membrane plasmique. Ces mesures ont l'avantage d'être non invasives, en temps réel, et de se faire sans préparation de l'échantillon. De plus, elles ont montré une excellente sensibilité : les effets de l'encapsulation sont observés pour des concentrations très basses. Une seconde étude a comparé l'impact de la PDT sur le tapis cellulaire pour différents types d'encapsulation. Les mesures biologiques et térahertz ont mesuré des flux de nature et de cinétiques différentes. Les dynamiques observées impliquent la présence soit de plusieurs mécanismes de perméabilisation, soit d'un même mécanisme, mais d'intensité variable.

La deuxième application est l'étude de la protéolyse de la trypsine ; il s'agit d'une procédure couramment utilisée en culture cellulaire. Son but est de détacher les cellules de leur substrat, pour les mettre en solution. Son impact direct, pour des cellules épithéliales, est une modification de la morphologie cellulaire. Son impact indirect est la création de flux de petites molécules à travers la membrane plasmique. Nous avons montré que le dispositif térahertz permet de mesurer l'ensemble de ces phénomènes. La microscopie confocale a permis de quantifier les variations morphologiques induites. Un modèle multicouche a isolé la contribution du signal due aux flux de molécules. Cette étude a été faite pour plusieurs concentrations, il a été montré

que ces flux restent similaires pour un même décollement, qu'importe la concentration et le temps d'exposition en trypsine (dans la gamme étudiée).

Perspectives

L'augmentation du temps d'acquisition lors des mesures donne accès à des dynamiques plus complètes. Cependant, le dispositif actuel permet l'étude d'un seul échantillon à la fois. L'élaboration d'un système de balayage pour effectuer des mesures en parallèle est donc nécessaire. La conception de ce système doit prendre en compte la réduction de la taille des échantillons, et donc de la taille du faisceau térahertz. Pour cela, un système optique doit être élaboré, assurant à la fois la focalisation du faisceau, mais aussi son incidence constante sur l'ensemble des échantillons lors du balayage. Le système de réduction du faisceau sera assuré par plusieurs miroirs paraboliques, caractérisés par l'absence d'aberrations sphériques et chromatiques, et de pertes par absorption. Le but est d'atteindre une résolution d'environ 1 mm pour chaque zone de mesure. Le système de balayage sera assuré par un ensemble de platines de translation motorisées, de haute précision et répétabilité.

L'augmentation de la durée des acquisitions implique de plus la création d'un environnement davantage biocompatible. Les conditions de culture pour les cellules utilisées sont une température de 37°C et un taux de CO₂ à 5 %. Le prisme sur lequel les cellules sont placées lors des expériences est déjà à 37°C. Le taux à 5 % de CO₂ sera obtenue par la mise en place d'une enceinte de régulation de l'atmosphère.

L'utilisation du dispositif térahertz pour l'étude d'autres mécanismes de perméabilisation va être examinée. La versatilité du dispositif a plusieurs applications a été montré, pour l'instant sur le même type cellulaire. D'autres applications vont être étudiées, notamment dans le cadre de la maladie d'Alzheimer. Des tests doivent être effectués pour observer si le dispositif est adapté à l'étude d'autres types cellulaire, comme des cellules neuronales.

Le signal ATR térahertz obtenu à partir des cellules est la somme des contributions de toutes les molécules présentes dans le cytosol. Le signal mesuré est donc la somme des efficacités de chaque molécule du cytosol multipliée par leur concentration. Une base de données de ces efficacités sera établie, pour une large gamme de molécules représentatives du contenu du cytosol : ions, acides aminés, protéines etc. Cette base de données sera établie par un dispositif de spectroscopie temporelle térahertz commercial. Des mesures préliminaires avaient déjà été effectuées, qui ont montré une corrélation entre la taille des molécules et le contraste térahertz. Le but de ce nouveau dispositif est d'élargir la gamme de fréquences sur laquelle ces mesures sont faites, ainsi que la gamme des molécules étudiées, afin d'affiner la modélisation du contraste térahertz.

Annexes

Protocole de passage des MDCK1

Matériel

- Trypsine (0,025 %)/EDTA (0,01 %),
- milieu complet : DMEM sans pyruvate + 10 % sérum bovin + 1% pénicilline streptomycine,
- solution saline dans un tampon phosphate (PBS),
- boîte T25 de cellules MDCK1 à confluence.

Mode opératoire

- Vider le milieu usé de la T25 à confluence,
- rincer la T25 avec 3 mL de PBS, puis vider le PBS,
- placer 1 mL de trypsine/EDTA dans la T25 et laisser à l'incubateur pendant 7 min à 37°C et 5% CO₂,
- ajouter 5 mL de milieu de culture pour arrêter l'action de la trypsine,
- placer le tout dans un falcon de 50 mL,
- centrifuger pendant 5 min à 200 rpm,
- prélever le surnageant,
- ajouter 3 mL de milieu, resuspendre les cellules,
- prélever le volume nécessaire (cf table suivante) et le placer dans une nouvelle T25,
- ajouter 7 mL de milieu et placer à l'incubateur.

Volume à prélever	Temps jusqu'à confluence
5 µL	1 semaine
150 µL	3 jours
500 µL	2 jours
1 mL	1 jour

Protocole d'ensemencement des MDCK1 pour acquisitions THz

Matériel

- Trypsine (0,025 %)/EDTA (0,01 %),
- milieu complet : DMEM sans pyruvate + 10 % sérum bovin + 1% pénicilline streptomycine,
- solution saline dans un tampon phosphate (PBS),
- T25 de cellules MDCK1 à confluence,
- lames de Si-HR,
- éthanol 70 % et 96 %.

Mode opératoire

- Nettoyer les lames de Si-HR à l'éthanol 70 % puis 96 %,
- placer les lames dans des boîtes de pétri stériles (2 lames par boîte, les lames sont posées sur la surface de plus grand diamètre de la boîte de pétri),
- faire un passage, selon le protocole précédent,
- à la fin du passage, les cellules en suspension sont dans un falcon de 50 mL. Prélever 1 mL de cette solution et la diluer dans 4 mL de milieu complet.
- nettoyer l'hématimètre de Malassez avec l'éthanol à 70 %,
- placer un volume de 15 μL de la solution diluée sur la partie centrale de l'hématimètre,
- sous le microscope x10, compter le nombre Σ de cellules dans les 25 zones quadrillées et prendre la moyenne $M_{25}=\Sigma/25$,
- la concentration de cellules est $C=M_{25}\cdot 10^5$ cells/mL,
- on cible 31 250 cells/cm² sur la lame de Si-HR de surface 10,74 cm²,
- le volume à placer sur la lame est donc de 31 250 x 10,74/C,
- placer le volume de solution sur chaque lame Si-HR,
- placer les lames à l'incubateur à 37°C et 5% CO₂ pendant 48h.

- 24h après l'ensemencement, préparer l'équivalent de 1 mL pour chaque lame de Si-HR de milieu complet et de PBS,
- les mettre à réchauffer à 37°C,
- avec un grattoir, retirer les cellules sur la moitié de chaque lame de Si-HR,
- rincer chaque lame avec 1 mL de PBS,
- retirer le PBS et ajouter 1 mL de milieu complet,
- replacer les lames dans l'incubateur à 37°C et 5% CO₂.

- 48h après l'ensemencement, réitérer l'opération précédente,
- les lames sont prêtes à être utilisées.

Remarques

Le retrait des cellules par un grattoir 24h avant l'ensemencement est effectué avant que les cellules n'atteignent une confluence trop importante. Cela évite d'arracher une zone trop large de cellules. La figure ?? montre l'interface entre la zone de cellules à confluence (à droite) et la zone où les cellules ont été retirées avec un grattoir (à gauche). L'image a été acquise avec un microscope métallurgique OKM-1 KERN, de grandissement x10.

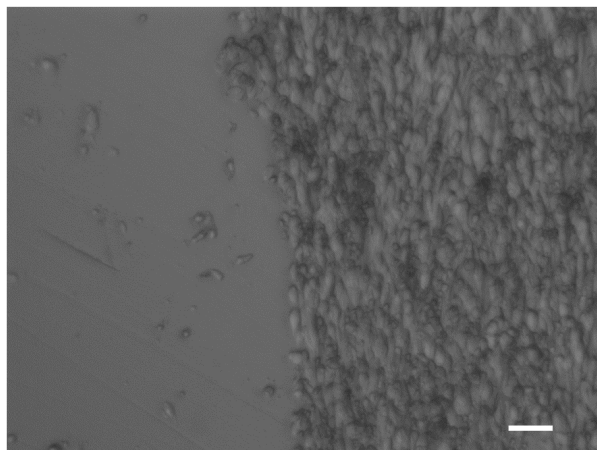


FIGURE 4.15 – Image de la lame Si-HR au niveau de l'interface entre le tapis confluent de cellules et la zone où les cellules ont été retirées. Image acquise avec un microscope métallurgique OKM-1 KERN, x10. La barre d'échelle est 25 μm .

L'état de confluence peut fortement différer entre plusieurs acquisitions, selon l'heure de l'ensemencement, et l'heure à laquelle les acquisitions sont faites. Il faut effectuer les acquisitions 48h après l'ensemencement. La figure 4.16 montre quelques états de confluence, obtenus à des intervalles de temps différents après ensemencement.

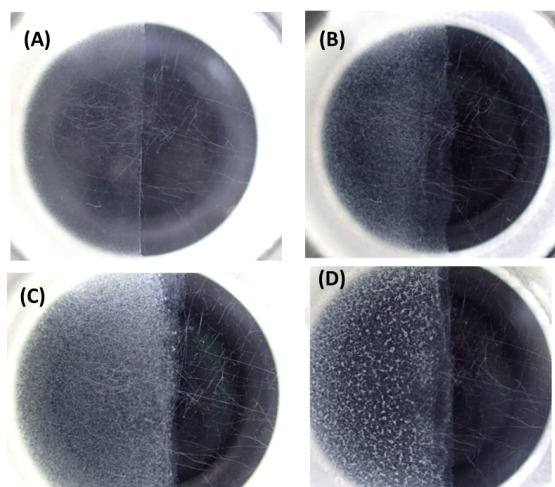


FIGURE 4.16 – Photos des lames Si-HR avec les cellules MDCK1 à différents stades de confluence. (A) et (B) : pas assez confluent ; (C) à confluence ; (D) trop confluent. Figure tirée de [25].

Protocole de marquage fluorescent sur des MDCK1

Matériel

- Lames de culture avec MDCK1 ensemencées il y a 24h selon le protocole précédent,
- milieu complet : DMEM sans pyruvate + 10 % sérum bovin + 1% pénicilline streptomycine,
- solution saline dans un tampon phosphate (PBS),
- Aliquot de CellTracker Orange à 2 mM dans du DMSO sorti du frigo 30 min avant l'expérience, et protégé de la lumière ambiante.

Mode opératoire

- Faire chauffer à 37°C un volume de PBS,
 - diluer la solution de CellTracker dans le PBS pour obtenir une solution à 0.5 μM ,
 - placer la solution dans un falcon,
 - remuer la solution avec un mélangeur à vortex pour homogénéiser,
 - rincer les lames avec 1 mL de PBS deux fois,
 - ajouter 2 mL de la solution de fluorophores sur chaque échantillon,
 - incuber le tout pendant 35 minutes à 37°C et 5% de CO_2 ,
 - rincer les lames avec 1 mL de PBS deux fois,
 - mettre 2 mL de milieu complet par échantillon,
 - incuber à 37°C et 5% de CO_2 .
-
- 24h après, les cellules sont à confluence,
 - faire chauffer à 37°C un volume de PBS,
 - rincer les lames avec 1 mL de PBS deux fois,
 - placer les lames sur des portes-lame,
 - ajouter 1 mL de PBS,
 - les lames sont prêtes à être imagées.

Remarques

Pour les acquisitions confocales, l'ensemble du dispositif est placé dans une enceinte à 37°C. Le pic d'excitation se fait à 552 nm, celui d'émission à 580 nm. L'objectif utilisé est x40 EAU. Le liquide d'indice utilisé est de l'huile pour objectif de type G d'indice 1.3. La figure 4.17 montre une acquisition confocale sur des cellules MDCK1 marquées par le CellTracker Orange.

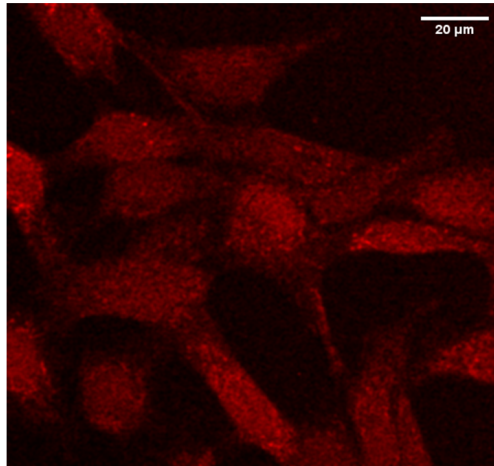


FIGURE 4.17 – Acquisition confocale de cellules MDCK1 par marqueur fluorescent CellTracker Orange.

Protocole de fabrication de solution de pheophorbide a

Matériel

- eau filtrée,
- pheophorbide a (Pheo) en poudre,
- argon,
- parafilm,
- 2 petits piluliers,
- aiguilles,
- petit barreau aimanté,
- seringues Hamilton 100 μ L, 500 μ L et 1 mL,
- acétone

Mode opératoire pour une solution d'acétone-Pheo à 0.5 mg/mL

- Peser exactement x grammes de Pheo dans un petit pilulier en prélevant le Pheo en poudre avec une spatule,
- fermer le pilulier,
- laver la spatule avec de l'acétone,
- éteindre la lumière,
- ouvrir l'argon avec un petit débit,
- mettre le pilulier sous atmosphère argon pendant 1 min,
- fermer le pilulier et mettre du parafilm autour du couvercle,
- mettre au frigo en attendant,
- avec la seringue de 1 mL : prélever $2 \times x$ mL d'acétone et verser dans le pilulier.

Mode opératoire pour une solution eau-Pheo

- Prélever 5 mL d'eau filtrée à l'aide d'une pipette dans un pilulier moyen,
- ajouter le petit barreau aimanté,
- fermer le pilulier et peser l'ensemble,
- poser le moyen pilulier sur l'agitateur magnétique, il faut que l'agitateur magnétique bouge assez rapidement mais il ne faut pas créer de vortex dans le pilulier,
- a l'aide de la seringue Hamilton de 500 μ L, préparer un volume de 310 μ L d'acétone dans un pilulier,
- prélever 90 μ L de la solution de pheo-acétone à 0.5 mg/mL et la diluer dans les 310 μ L d'acétone,
- avec la seringue Hamilton de 500 μ L : prélever les 400 μ L de la solution pheo-acétone et la verser au goutte à goutte dans le pilulier d'eau sur l'agitateur magnétique,

- laisser agiter 30 minutes avec le bouchon ouvert et en couvrant l'ensemble d'aluminium pour protéger de la lumière ambiante,
- laver la verrerie à l'acétone,
- une fois les 30 minutes passées : laisser reposer la solution 48h, toujours sous aluminium et les bouchons ouverts pour laisser l'acétone s'évaporer,
- après les 48h, peser de nouveau l'ensemble pilulier + agitateur + couvercle + solution et comparer avec le poids initial. Compenser la perte avec de l'eau distillée

Protocole d'acquisition ATR - THz PDT

Matériel

- Lames Si-HR avec cellules MDCK1 à confluence et dont un côté à été retiré,
- solution de Pheo à la concentration requise,
- pinène,
- milieu de culture complet,
- LED.

Mode opératoire

- Poser la lame sur le prisme,
- ajouter 3 μ L de pinène au milieu du prisme et obtenir l'adhérence,
- verser doucement sur la partie de la lame sans cellules 2 mL de milieu DMEM (+pheo à la concentration voulue),
- faire des aller-retour pour homogénéiser,
- mettre au-dessus de la lame un couvercle pour éviter l'évaporation du milieu,
- positionner la LED au-dessus du prisme,
- laisser le signal se stabiliser (30min) pour laisser le pheo sédimenter
- allumer la LED 2x2 min avec 2 min entre chaque illumination,
- attendre la stabilisation du signal s'il y a,
- gratter les cellules,
- laisser le signal se stabiliser 10 min.

Protocole de dépôt de fibronectine

La fibronectine est une glycoprotéine qui facilite l'adhésion des cellules sur leur substrat. Elle a été utilisée sur des lames de culture et sur les lames de Si-HR pour plusieurs contrôles :

- Vérification de l'absence d'influence d'un décollement des cellules lors de la PDT.
- Vérification de la présence de variations du signal ATR - THz lors de la trypsination des cellules.

Matériel

- Lames de culture,
- fibronectine en solution à 0.02 mg/mL dans du PBS,
- éthanol 70 %,
- PBS,
- plaques 6 puits si expérience en microscopie confocale ; lame de Si-HR si expérience THz.

Mode opératoire

- Placer une lame de culture dans un puit de la plaque ,
- rincer les lames à l'éthanol 70 %,
- laisser tremper 15 min puis aspirer l'éthanol,
- rincer 2 fois avec 1 mL de PBS
- remuer la solution de fibronectine avec un mélangeur à vortex pour homogénéiser,
- verser 1 mL de la solution dans chaque puit,
- laisser le tout soit 1h à 37°C soit 1 nuit à 4°C,
- aspirer la fibronectine
- les lames traitées sont utilisables 1 semaine.

Protocole gomme gélane

La gomme gélane est un gel clair et résistant à la chaleur, qui peut rester humide plusieurs heures. Il est fabriqué, dans notre cas, sous forme de film mince. On l'utilise pour l'alignement du dispositif ATR - THz. Il est déposé sur le prisme. Lorsque le faisceau est focalisé dessus, le signal diminue fortement, à cause de la présence d'eau. On l'utilise de part sa malléabilité et son adhésion au prisme : il n'y a pas de bulles d'air entre les deux surfaces.

Matériel pour film d'environ 25cm x 15cm avec un film d'épaisseur 5 mm :

- 300 mL d'eau,
- 9g de gomme gélane,
- 0.15g d'acétate de sodium,
- Bécher haut.

Mode opératoire

- Peser et mélanger la gomme et l'acétate ,
- verser l'eau dans le bécher,
- verser progressivement la gomme et l'acétate dans l'eau tout en mélangeant
- bien mélanger,
- mettre au micro-onde pendant 6 à 7 minutes,
- verser uniformément dans le plateau,
- le film se récupère sur les bords du grand plat.

Protocole fabrication de pâte d'indice à base de BaTiO₃

Matériel

- BaTiO₃ (baryum titanate) à 99.995 %,
- acide oléique > 99 %,
- heptane,
- BCB (benzocyclobutène).

Mode opératoire (adapté de [223])

Toutes les opérations s'effectuent sous une hotte de laboratoire.

- Mélanger 0.1 mL de BaTiO₃ avec 0.1 mL d'acide oléique,
- ajouter 90 mL d'heptane,
- soniquer la solution pendant 1h pour assurer une dispersion uniforme des particules,
- ajouter le BCB à la solution soniquée, le volume se calcule de manière à obtenir une concentration de 10%, 20%, 30% ou 40% de BaTiO₃ selon l'indice désiré,
- laisser la solution sous la hotte jusqu'à évaporation complète de l'heptane.

Nomenclature

- ATP** : Adénosine triphosphate : molécule permettant de stocker et fournir de l'énergie pour divers processus cellulaires.
- ATR** : Réflexion totale atténuée – Attenuated total reflectance.
- Chromatographie** : Technique analytique utilisée pour séparer, identifier et quantifier les composants d'une solution. Elle repose sur la distribution des composants entre une phase mobile et une phase stationnaire.
- Chélateur** : Molécule capable de se lier à des ions métalliques pour former un complexe stable.
- CMB** : Fond diffus cosmologique – Cosmic microwave background.
- Confluence** : Terme couramment utilisé pour décrire la densité des cellules adhérentes (en %). Il est utilisé comme mesure de leur prolifération.
- Diélectriques** : Se dit d'une substance ne possédant pas d'électrons libres capables de transporter un courant électrique, mais qui peut être polarisée par un champ électrique.
- DLS** : Diffusion dynamique de la lumière – Dynamic light scattering.
- DMEM** : Dulbecco's Modified Eagles Medium.
- EDTA** : Acide éthylènediaminetétraacétate – Ethylenediaminetetraacetate acid.
- EPR** : Amélioration de la perméabilité et de la rétention – Enhanced permeability and retention.
- GUVs** : Vésicules unilamellaires géantes – Giant unilamellar vesicles.
- HCT** : Tumeur colorectale humaine – Human colorectal tumor.
- HDPE** : Polyéthylène haute-densité.
- HeLa** : Henrietta Lacks.
- Homéostasie** : Processus de régulation par lequel l'organisme maintient les différentes constantes du milieu intérieur (ensemble des liquides de l'organisme) entre les limites des valeurs normales
- Hydrolyse d'une protéine** : Coupure des liaisons peptidiques entre les différents acides aminés qui constituent la protéine.
- ICP-OES** : Spectrométrie d'émission optique à plasma à couplage inductif – Inductively Coupled Plasma Optical Emission Spectrometry.
- IP** : Iodure de propidium.
- IR** : Infrarouge.
- LDH** : Lactate déshydrogénase.
- LOB** : Limite du blanc – Limit of white.

LOD : Limite de détection – Limit of detection.

MDCK : Madin-Darby canine kidney.

PA : Maximum d’amplitude – Peak amplitude.

PBS : Phosphate salin.

PCA : Antenne photoconductrice – Photoconductive antenna.

PCL : Poly(caprolactone).

PDT : Thérapie photodynamique – Photodynamic therapy.

PEO : Poly(éthylène glycol).

PEO-PCL : Poly(éthylène glycol) - poly(caprolactone).

Polarisabilité : Capacité d’une molécule à se polariser en réponse à un champ électrique externe

PS : Molécule photosensible.

PTFE : Téflon.

QCL : Quantum cascade laser.

ROS : Espèces réactives de l’oxygène – Reactive oxygen species.

Réticulation : La réticulation désigne la formation de liaisons covalentes entre les chaînes polymères du nanovecteur pour créer un réseau tridimensionnel.

SCEM : Microscopie électronique à cellule unique – Single cell electron microscopy.

Si-HR : Silicium haute résistivité.

Spectrométrie de masse : Technique analytique utilisée pour identifier et quantifier les molécules en fonction de leur masse. Les molécules étudiées sont ionisées. Les ions sont ensuite séparés en fonction de leur rapport masse/charge. Enfin, les ions sont détectés et un spectre de masse est généré.

Spectroscopie : Analyse des constituants d’un corps par leur spectre d’absorption.

Taille moyenne en intensité : Taille moyenne des particules pondérée par l’intensité de la lumière qu’elles diffusent. Donne une idée de la présence de particules plus grandes dans la distribution, et donc des agrégats.

Taille moyenne en nombre : Taille moyenne des particules pondérée par le nombre de particules de chaque taille. Donne une idée plus représentative de la taille moyenne des particules.

TEER : Résistance transépithéliale/endothéliale – Transepithelial/endothelial resistance.

TEM : Microscopie électronique en transmission – Transmission electron microscopy.

Test BCA : Test d’acide bicinchoninic : méthode biochimique utilisée pour quantifier la concentration de protéines dans une solution.

THz : Térhertz.

THz-TDS : Térhertz - Spectroscopie dans le domaine temporel – Terahertz - Time Domain Spectroscopy.

TIRF : Fluorescence par réflexion interne totale – Total internal reflection fluorescence.

TPI : Imagerie par impulsions térhertz – Terahertz pulse imaging.

UV : Ultraviolet.

Bibliographie

- [1] A. McIntosh, B. Yang, and S. Goldup, “Terahertz spectroscopy : a powerful new tool for the chemical sciences?,” *Chemical Society Reviews*, vol. 41, pp. 2072–2082, 2012.
- [2] L. Chusseau, J. Demaison, and J. Coutaz, *Optoélectronique térahertz*. 2008.
- [3] K. Shiraga, Y. Ogawa, and T. Suzuki, “Characterization of dielectric responses of human cancer cells in the terahertz region,” *Journal of Infrared, Millimeter, and Terahertz Waves*, vol. 35, pp. 493–502, 2014.
- [4] P. Jepsen, U. Møller, and H. Merbold, “Investigation of aqueous alcohol and sugar solutions with reflection terahertz time-domain spectroscopy,” *Opt. Express*, vol. 15, pp. 14717–14737, 2007.
- [5] H. Guerboukha, G. Yan, and O. Skorobogata, “Silk foam terahertz waveguides,” *Advanced Optical Materials*, vol. 2, pp. 1181–1192, 2014.
- [6] G. Zhao, M. ter Mors, and T. Wenckebach, “Terahertz dielectric properties of polystyrene foam,” *J. Opt. Soc. Am. B*, vol. 19, pp. 1476–1479, 2002.
- [7] A. Wojdyla, *Polarisation des impulsions térahertz et développement de l’imagerie par réflexion interne totale pour l’étude d’objets d’intérêt biologique*. Theses, Ecole Polytechnique X, 2011.
- [8] L. Wang, C. Tang, and S. Zhu, “Terahertz time domain spectroscopy of transformer insulation paper after thermal aging intervals,” *Materials*, vol. 11, 2018.
- [9] F. Wan, J. Han, and Z. Zhu, “Dielectric response in ferroelectric BaTiO₃,” *Physics Letters A*, vol. 372, pp. 2137–2140, 2008.
- [10] M. A. Ordal, L. L. Long, and R. J. Bell, “Optical properties of the metals al, co, cu, au, fe, pb, ni, pd, pt, ag, ti, and w in the infrared and far infrared,” *Appl. Opt.*, vol. 22, pp. 1099–1119, 1983.
- [11] D. Grischkowsky, S. Keiding, and M. Exter, “Far-infrared time-domain spectroscopy with terahertz beams of dielectrics and semiconductors,” *Journal of the Optical Society of America B*, vol. 7, pp. 2006–2015, 1990.
- [12] A. G. Davies, A. D. Burnett, and W. Fan, “Terahertz spectroscopy of explosives and drugs,” *Materials Today*, vol. 11, pp. 18–26, 2008.
- [13] A. G. Davies, E. H. Linfield, and M. Pepper, “Applications of terahertz spectroscopy to pharmaceutical sciences,” *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series A : Mathematical, Physical and Engineering Sciences*, vol. 362, pp. 351–364, 2004.
- [14] K. Fukunaga, I. Hosako, and Y. Kohdzuma, “Terahertz analysis of an east asian historical mural painting,” *Journal of the European Optical Society - Rapid publications*, vol. 5, 2010.

- [15] J.-M. Manceau, A. Nevin, C. Fotakis, and S. Tzortzakis, "Terahertz time domain spectroscopy for the analysis of cultural heritage related materials," *Applied Physics B*, vol. 90, pp. 365–368, 2008.
- [16] J. Zhang, Z. Zhu, and Y. Wu, "Broadband terahertz spectroscopy and weak interactions of adenosine with vib mode analysis," *Journal of infrared millimeter and terahertz waves*, vol. 44, pp. 814–829, 2023.
- [17] J. Xu, K. W. Plaxco, and S. J. Allen, "Probing the collective vibrational dynamics of a protein in liquid water by terahertz absorption spectroscopy," *Protein Science*, vol. 15, pp. 1175–1181, 2006.
- [18] B. E. Cole, R. M. Woodward, and D. A. Crawley, "Terahertz imaging and spectroscopy of human skin in vivo," in *Commercial and Biomedical Applications of Ultrashort Pulse Lasers ; Laser Plasma Generation and Diagnostics*, vol. 4276, pp. 1 – 10, International Society for Optics and Photonics, SPIE, 2001.
- [19] R. M. Woodward, V. P. Wallace, and B. E. Cole, "Terahertz pulse imaging in reflection geometry of skin tissue using time-domain analysis techniques," in *Clinical Diagnostic Systems : Technologies and Instrumentation*, vol. 4625, pp. 160 – 169, International Society for Optics and Photonics, SPIE, 2002.
- [20] A. Fitzgerald, E. Berry, and N. Zinov'ev, "Catalogue of human tissue optical properties at terahertz frequencies," vol. 29, pp. 123–128, 2003.
- [21] X. Yang, X. Zhao, and K. Yang, "Biomedical applications of terahertz spectroscopy and imaging," *Trends in Biotechnology*, vol. 34, pp. 810–824, 2016.
- [22] A. Markelz, A. Roitberg, and E. Heilweil, "Pulsed terahertz spectroscopy of dna, bovine serum albumin and collagen between 0.1 and 2.0 thz," *Chemical Physics Letters*, vol. 320, pp. 42–48, 2000.
- [23] R. Balu, H. Zhang, and E. Zukowski, "Terahertz spectroscopy of bacteriorhodopsin and rhodopsin : Similarities and differences," *Biophysical Journal*, vol. 94, pp. 3217–3226, 2008.
- [24] C. Can, S. Kazunori, and K. Keiko, "Terahertz spectroscopy tracks proteolysis by a joint analysis of absorptance and debye model," *Biophysical Journal*, vol. 119, pp. 2469–2482, 2020.
- [25] M. Grognot, *Imagerie térahertz par réflexion interne totale pour la biologie : Application à l'étude de la perméabilisation cellulaire*. phd thesis, Université Paris Saclay, 2016.
- [26] S. Baek, H. Lim, and H. Chun, "Detection of melamine in foods using terahertz time-domain spectroscopy," *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, vol. 62, pp. 5403–5407, 2014.
- [27] A. Quema, H. Takahashi, and M. Sakai, "Identification of potential estrogenic environmental pollutants by terahertz transmission spectroscopy," *Japanese Journal of Applied Physics*, vol. 42, p. L932, 2003.
- [28] M. Born and E. Wolf, *Principle of Optics*. Pergamon, 1980.
- [29] K. Toshihiko, T. Masayoshi, and Y. Masatsugu, "Laser terahertz-emission microscope for inspecting electrical faults in integrated circuits," *Opt. Lett.*, vol. 28, pp. 2058–2060, 2003.
- [30] D. Adrian, O. Chiko, and K. Kodo, "Terahertz-wave sources and imaging applications," *Measurement Science and Technology*, vol. 17, p. R161, 2006.

- [31] Y. Shen, Y. Yin, and B. Li, “Detection of impurities in wheat using terahertz spectral imaging and convolutional neural networks,” *Computers and Electronics in Agriculture*, vol. 181, p. 105931, 2021.
- [32] Docomo, “White paper 5g evolution and 6g.” https://www.docomo.ne.jp/english/binary/pdf/corporate/technology/whitepaper_6g/DOCOMO_6G_White_PaperEN_v5.0.pdf, 2024.
- [33] C. Kulesa, “Terahertz spectroscopy for astronomy : From comets to cosmology,” *IEEE transactions on terahertz science and technology*, vol. 1, pp. 232–240, 2011.
- [34] G. Pilbratt, “The First Mission : Baseline, Science Objectives and Operations,” in *The Far Infrared and Submillimetre Universe*. (A. Wilson, ed.), vol. 401 of *ESA Special Publication*, 1997.
- [35] F. Motte, “La formation stellaire.” http://www.herschel.fr/fr/naissance_des_etoiles/formation_stellaire.php, 2024.
- [36] R. You, Z. Tao, and R. Ni, “Space applications of terahertz present and potential future,” in *2018 11th UK-Europe-China Workshop on Millimeter Waves and Terahertz Technologies (UCMMT)*, 2018.
- [37] J. W. Zhou and M. H. Arbab, “Effective debye relaxation models for binary solutions of polar liquids at terahertz frequencies,” *Phys. Chem. Chem. Phys.*, vol. 23, pp. 4426–4436, 2021.
- [38] J. T. Kindt, , and C. A. Schmuttenmaer, “Far-infrared dielectric properties of polar liquids probed by femtosecond terahertz pulse spectroscopy,” *The Journal of Physical Chemistry*, vol. 100, pp. 10373–10379, 1996.
- [39] E. Pickwell, B. E. Cole, and A. J. Fitzgerald, “Simulation of terahertz pulse propagation in biological systems,” *Applied Physics Letters*, vol. 84, pp. 2190–2192, 2004.
- [40] K. J. Tielrooij, D. Paparo, and L. Piatkowski, “Dielectric relaxation dynamics of water in model membranes probed by terahertz spectroscopy,” *Biophysical Journal*, vol. 97, pp. 2484–2492, 2009.
- [41] M. Grognot and G. Gallot, “Relative contributions of core protein and solvation shell in the terahertz dielectric properties of protein solutions,” *The Journal of Physical Chemistry B*, vol. 121, pp. 9508–9512, 2017.
- [42] K.-E. Peiponen, A. Zeitler, and M. Kuwata-Gonokami, “Terahertz spectroscopy and imaging,” 2013.
- [43] J. Wang, L. Peng, and D. Han, “Label-free detection and identification of single bacteria via terahertz near-field imaging,” *Frontiers in microbiology*, vol. 14, 2023.
- [44] Y. C.S., J. Park, and K. Ahn, “Terahertz imaging of excised oral cancer at frozen temperature,” *Biomed. Opt. Express*, vol. 4, pp. 1413–1421, 2013.
- [45] Y. Ji, C. Park, and H. Kim, “Feasibility of terahertz reflectometry for discrimination of human early gastric cancers,” *Biomedical optics express*, vol. 6, pp. 1398–1406, 2015.
- [46] H. Chen, S. Ma, and W. Yan, “The diagnosis of human liver cancer by using thz fiber-scanning near-field imaging,” *Chinese Physics Letters*, vol. 30, p. 030702, 2013.
- [47] X. Zhan, Y. Liu, and Z. Chen, “Revolutionary approaches for cancer diagnosis by terahertz-based spectroscopy and imaging,” *Proceedings of the Dutch Archaeological and Historical Society*, vol. 259, p. 124483, 2023.

- [48] C. Mengyang, L. Wen, and L. Yang, “Biomedical application of terahertz imaging technology : a narrative review,” *Quantitative Imaging in Medicine and Surgery*, vol. 13, 2023.
- [49] S. Yamaguchi, Y. Fukushi, and O. Kubota, “Brain tumor imaging of rat fresh tissue using terahertz spectroscopy,” *Scientific Reports*, vol. 6, p. 30124, 2016.
- [50] Y. Miura, A. Kamataki, and M. Uzuki, “Terahertz-wave spectroscopy for precise histopathological imaging of tumor and non-tumor lesions in paraffin sections,” *The Tohoku Journal of Experimental Medicine*, vol. 223, pp. 291–296, 2011.
- [51] K. Meng, T. Chen, and T. Chen, “Terahertz pulsed spectroscopy of paraffin-embedded brain glioma,” *Journal of Biomedical Optics*, vol. 19, 2014.
- [52] A. J. Fitzgerald, S. Pinder, and A. D. Purushotham, “Classification of terahertz-pulsed imaging data from excised breast tissue,” *Journal of Biomedical Optics*, vol. 17, 2012.
- [53] M. Danciu, T. Alexa-Stratulat, and C. Stefanescu, “Terahertz spectroscopy and imaging : A cutting-edge method for diagnosing digestive cancers,” *Materials*, vol. 12, 2019.
- [54] K. I. Zaytsev, K. G. Kudrin, and V. E. Karasik, “In vivo terahertz spectroscopy of pigmented skin nevi : Pilot study of non-invasive early diagnosis of dysplasia,” *Applied Physics Letters*, vol. 106, 2015.
- [55] K. Kamburoğlu, B. Karagöz, and H. Altan, “An ex vivo comparative study of occlusal and proximal caries using terahertz and x-ray imaging,” *Dentomaxillofacial Radiology*, vol. 48, p. 20180250, 2019.
- [56] X. Zheng, T. Gevert, and G. Gallot, “High precision dual-modulation differential terahertz ATR sensor for liquid measurements,” *Optics Letters*, vol. 46, pp. 4045–4048, 2021.
- [57] K. J. G. Francis, M. L. P. Chong, and Y. E, “Terahertz nonlinear index extraction via full-phase analysis,” *Opt. Lett.*, vol. 45, pp. 5628–5631, 2020.
- [58] J. Faist, F. Capasso, and D. L. Sivco, “Quantum cascade laser,” *Science*, vol. 264, pp. 553–556, 1994.
- [59] M. S. Vitiello and A. Tredicucci, “Physics and technology of terahertz quantum cascade lasers,” *Advances in Physics : X*, 2021.
- [60] R. Whatmore, “Pyroelectric arrays : Ceramics and thin films,” *Journal of electroceramics*, vol. 13, pp. 139–147, 2004.
- [61] E. Mavrona, F. Appugliese, and J. Andberger, “Terahertz refractive index matching solution,” *Opt. Express*, vol. 25, 2019.
- [62] G. M. Cooper, “Structure of the plasma membrane,” in *The Cell : A Molecular Approach. 2nd edition*, Sinauer Associates, 2000.
- [63] S. M. Zehnder, M. Suaris, and M. M. Bellaire, “Cell volume fluctuations in MDCK monolayers,” *Biophysical Journal*, vol. 108, pp. 247–250, 2015.
- [64] N. Simmons, “Cultured monolayers of mdck cells - a novel model system for the study of epithelial development and function,” *General Pharmacology*, vol. 13, 1982.
- [65] J. Lavelle, H. Negrete, and P. Poland, “Low permeabilities of mdck cell monolayers : A model barrier epithelium,” *American Journal Of Physiology-Renal Physiology*, vol. 273, 1997.
- [66] F. Capellini, W. Vencia, and M. Amadori, “Characterization of MDCK cells and evaluation of their ability to respond to infectious and non-infectious stressors,” *Cytotechnology*, vol. 72, 2020.

- [67] C. Gongora, L. Candeil, and N. Vezzio, “Altered expression of cell proliferation-related and interferon-stimulated genes in colon cancer cells resistant to SN38,” *Cancer Biology & Therapy*, vol. 7, pp. 822–832, 2008.
- [68] J.-P. Gillet, A. M. Calcagno, and S. Varma, “Redefining the relevance of established cancer cell lines to the study of mechanisms of clinical anti-cancer drug resistance,” *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 108, pp. 18708–18713, 2011.
- [69] P. N. Preis, H. Saya, and L. Nádasi, “Neuronal cell differentiation of human neuroblastoma cells by retinoic acid plus herbimycin a,” *Cancer Research*, vol. 48, pp. 6530–6534, 1988.
- [70] O. Vazquez-Mena, I. Medina-Martinez, and E. Juárez-Torres, “Amplified genes may be overexpressed, unchanged, or downregulated in cervical cancer cell lines,” *PLoS One*, vol. 7, p. e32667, 2012.
- [71] T. Nakano, Y. Okaie, and Y. Kinugasa, “Roles of remote and contact forces in epithelial cell structure formation,” *Biophysical Journal*, vol. 118, pp. 1466–1478, 2020.
- [72] R. Milo and R. Phillips, *Cell Biology by the Numbers*. Garland Science, 2015.
- [73] J. Zimmerberg, “Membrane biophysics,” *Current Biology*, vol. 16, pp. R272–R276, 2006.
- [74] B. Ovaryn, T. T. Bishop, and D. Krapf, “Physics of the cell membrane,” in *Physics of Molecular and Cellular Processes*, pp. 147–172, Springer International Publishing, 2022.
- [75] G. Gramse, A. Dols-Perez, and M. Edwards, “Nanoscale measurement of the dielectric constant of supported lipid bilayers in aqueous solutions with electrostatic force microscopy,” *Biophysical Journal*, vol. 104, pp. 1257–1262, 2013.
- [76] M. Born, “Volumen und hydrationswärme der ionen,” *Zeitschrift für Physik*, vol. 1, pp. 45–48, 1920.
- [77] H. Coster, “The physics of cell membranes,” *Journal of biological physics*, vol. 29, pp. 363–99, 2003.
- [78] B. Alberts, A. Johnson, J. Lewis, M. Raff, K. Roberts, and P. Walter, *Molecular Biology of the Cell*. Garland Science, 4th ed., 2002.
- [79] C. H. von Bonsdorff, S. D. Fuller, and K. Simons, “Apical and basolateral endocytosis in madin-darby canine kidney (MDCK) cells grown on nitrocellulose filters,” *The EMBO Journal*, vol. 4, pp. 2781–2792, 1985.
- [80] S. Chatkaew and M. Leonetti, “Contribution du potentiel de nernst à la mécanique des membranes biologiques,” in *17e congrès de Mécanique - CFM 2005*, Section : Biomécanique, 2005.
- [81] B. Hille, “Ionic channels in excitable membranes. current problems and biophysical approaches,” *Biophysical Journal*, vol. 22, p. 283, 1978.
- [82] M. P. Stewart, A. Sharei, and X. Ding, “In vitro and ex vivo strategies for intracellular delivery,” *Nature*, vol. 538, pp. 183–192, 2016.
- [83] F. Scaletti, J. Hardie, and Y.-W. Lee, “Protein delivery into cells using inorganic nanoparticle-protein supramolecular assemblies,” *Chemical Society reviews*, vol. 47, pp. 3421–3432, 2018.

- [84] A. M. Vargason, A. C. Anselmo, and S. Mitragotri, “The evolution of commercial drug delivery technologies,” *Nature Biomedical Engineering*, vol. 5, pp. 951–967, 2021.
- [85] R. Goswami, V. Lehot, and Y. Çiçek, “Direct cytosolic delivery of citraconylated proteins,” *Pharmaceutics*, vol. 15, p. 218, 2023.
- [86] E. A. Stadtmauer, J. A. Fraietta, and M. M. Davis, “CRISPR-engineered t cells in patients with refractory cancer,” *Science (New York, N.Y.)*, vol. 367, p. eaba7365, 2020.
- [87] P. Mukherjee, S. P. Nathamgari, and J. A. Kessler, “Combined numerical and experimental investigation of localized electroporation-based cell transfection and sampling,” *ACS nano*, vol. 12, pp. 12118–12128, 2018.
- [88] G. Francis, Z. Kerem, and H. P. S. Makkar, “The biological action of saponins in animal systems : a review,” *British Journal of Nutrition*, vol. 88, p. 587–605, 2002.
- [89] N. Chen, Y. He, and M. Zang, “Approaches and materials for endocytosis-independent intracellular delivery of proteins,” *Biomaterials*, vol. 286, p. 121567, 2022.
- [90] M. P. Stewart, R. Langer, and K. F. Jensen, “Intracellular delivery by membrane disruption : Mechanisms, strategies, and concepts,” *Chemical Reviews*, vol. 118, pp. 7409–7531, 2018.
- [91] D. C. Chang and T. S. Reese, “Changes in membrane structure induced by electroporation as revealed by rapid-freezing electron microscopy,” *Biophysical Journal*, vol. 58, pp. 1–12, 1990.
- [92] J. Gehl, “Electroporation : theory and methods, perspectives for drug delivery, gene therapy and research,” *Acta Physiologica Scandinavica*, vol. 177, pp. 437–447, 2003.
- [93] J. Hajduk, K. Szajna, and B. Lisowski, “The influence of microinjection parameters on cell survival and procedure efficiency,” *MethodsX*, vol. 10, p. 102107, 2023.
- [94] A. L. Garner, B. Neculaes, and D. V. Dylov, “Infrared laser-based single cell permeabilization by plasma membrane temperature gradients,” *Membranes*, vol. 12, 2022.
- [95] J. Liu, J. C. Fraire, and S. C. De Smedt, “Intracellular labeling with extrinsic probes : delivery strategies and applications,” *Small*, vol. 16, p. 2000146, 2020.
- [96] D. Morshedi Rad, M. Alsadat Rad, and S. Razavi Bazaz, “A comprehensive review on intracellular delivery,” *Advanced Materials*, vol. 33, p. 2005363, 2021.
- [97] W. Shen, S. Kalies, and M. Madrid, “Intracellular cargo delivery induced by irradiating polymer substrates with nanosecond-pulsed lasers,” *ACS Biomaterials Science & Engineering*, vol. 7, pp. 5129–5134, 2021.
- [98] T. E. Pylaev, E. S. Avdeeva, and B. N. Khlebtsov, “High-throughput cell optoporation system based on au nanoparticle layers mediated by resonant irradiation for precise and controllable gene delivery,” *Scientific Reports*, vol. 14, p. 3044, 2024.
- [99] Y.-C. Chen, L.-A. Chen, and S.-J. Chen, “A modified osmotic shock for periplasmic release of a recombinant creatinase from escherichia coli,” *Biochemical Engineering Journal*, vol. 19, pp. 211–215, 2004.
- [100] Y. Qiu, Y. Luo, and Y. Zhang, “The correlation between acoustic cavitation and sonoporation involved in ultrasound-mediated DNA transfection with polyethylenimine (PEI) in vitro,” *Journal of Controlled Release*, vol. 145, pp. 40–48, 2010.

- [101] M. Wang, Y. Zhang, and C. Cai, “Sonoporation-induced cell membrane permeabilization and cytoskeleton disassembly at varied acoustic and microbubble-cell parameters,” *Scientific Reports*, vol. 8, p. 3885, 2018.
- [102] V. Zarnitsyn, C. Rostad, and M. R. Prausnitz, “Modeling transmembrane transport through cell membrane wounds created by acoustic cavitation,” *Biophysical journal*, vol. 95, pp. 4124–4138, 2008.
- [103] K. Tachibana, T. Uchida, and K. Ogawa, “Induction of cell-membrane porosity by ultrasound,” *Lancet*, vol. 353, p. 1409, 1999.
- [104] M. Fechheimer, J. Boylan, and S. Parker, “Transfection of mammalian-cells with plasmid dna by scrape loading and sonication loading,” *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 84, pp. 8463–8467, 1987.
- [105] B. D. M. Meijering, L. J. M. Juffermans, and A. van Wamel, “Ultrasound and microbubble-targeted delivery of macromolecules is regulated by induction of endocytosis and pore formation,” *Circulation Research*, vol. 104, pp. 679–U226, 2009.
- [106] Y. Hu, J. M. F. Wan, and A. C. H. Yu, “Membrane perforation and recovery dynamics in microbubble-mediated sonoporation,” *Ultrasound in medicine and biology*, vol. 39, pp. 2393–2405, 2013.
- [107] R. K. Schlicher, J. D. Hutcheson, and H. Radhakrishna, “Changes in cell morphology due to plasma membrane wounding by acoustic cavitation,” *Ultrasound in medicine and biology*, vol. 36, pp. 677–692, 2010.
- [108] Y. Flores Bueso, S. Walker, and J. Quinn, “A novel cell permeability assay for macromolecules,” *BMC Molecular and Cell Biology*, vol. 21, p. 75, 2020.
- [109] P. Seeman, D. Cheng, and G. H. Iles, “Structure of membrane holes in osmotic and saponin hemolysis,” *Journal of Cell Biology*, vol. 56, pp. 519–527, 1973.
- [110] W. Krassowska and P. D. Filev, “Modeling electroporation in a single cell,” *Biophysical journal*, vol. 92, pp. 404–417, 2007.
- [111] L. Wang, X. Zhu, and C. Xu, “Artificial breakthrough of cell membrane barrier for transmembrane substance exchange : A review of recent progress,” *Advanced Functional Materials*, vol. 34, p. 2311920, 2024.
- [112] X. Du, J. Wang, and L. Chen, “Delivery of foreign materials into adherent cells by gold nanoparticle-mediated photoporation,” *Membranes*, vol. 11, 2021.
- [113] Q. Fan, W. Hu, and A. T. Ohta, “Efficient single-cell poration by microsecond laser pulses,” *Lab on a Chip*, vol. 15, pp. 581–588, 2015.
- [114] S. Silva, A. J. Almeida, and N. Vale, “Combination of cell-penetrating peptides with nanoparticles for therapeutic application : A review,” *Biomolecules*, vol. 9, 2019.
- [115] B. Elburg, J. Deprez, and M. Broek, “Dependence of sonoporation efficiency on microbubble size : An in vitro monodisperse microbubble study,” *Journal of Controlled Release*, vol. 363, pp. 747–755, 2023.
- [116] P. Prentice, A. Cuschieri, and K. Dholakia, “Membrane disruption by optically controlled microbubble cavitation,” *Nature physics*, vol. 1, pp. 107–110, 2005.
- [117] A. Jimenez and F. Perez, “Plasma membrane repair : the adaptable cell life-insurance,” *Current opinion in cell biology*, vol. 47, pp. 99–107, 2017.

- [118] P. L. McNeil, S. S. Vogel, and K. Miyake, "Patching plasma membrane disruptions with cytoplasmic membrane," *Journal of cell science*, vol. 113, pp. 1891–1902, 2000.
- [119] F. G. Ottaviano, D. E. Handy, and J. Loscalzo, "Redox regulation in the extracellular environment," *Circulation journal*, vol. 72, pp. 1–16, 2008.
- [120] S. He, D. Singh, and B. Helfield, "An overview of cell membrane perforation and resealing mechanisms for localized drug delivery," *Pharmaceutics*, vol. 14, p. 886, 2022.
- [121] R. Bednarek, "In vitro methods for measuring the permeability of cell monolayers," *Methods and Protocols*, vol. 5, p. 17, 2022.
- [122] B. Srinivasan, A. Kolli, and M. Esch, "TEER measurement techniques for in vitro barrier model systems," *Journal of laboratory automation*, vol. 20, pp. 107–126, 2015.
- [123] H. Nazari, J. Shrestha, and V. Naei, "Advances in TEER measurements of biological barriers in microphysiological systems," *Biosensors and Bioelectronics*, vol. 234, p. 115355, 2023.
- [124] D. A. Armbruster and T. Pry, "Limit of blank, limit of detection and limit of quantitation," *The Clinical Biochemist Reviews*, vol. 29, pp. S49–S52, 2008.
- [125] E. Klarbring, "Studies of the bca assay for determination of total protein in allergen extracts," 2011.
- [126] I. Bischoff, M. C. Hornburger, and B. Mayer, "Pitfalls in assessing microvascular endothelial barrier function : impedance-based devices versus the classic macromolecular tracer assay," *Scientific Reports*, vol. 6, p. 23671, 2016.
- [127] C. Li, S. Chu, and S. Tan, "Towards higher sensitivity of mass spectrometry : A perspective from the mass analyzers," *Frontiers in Chemistry*, vol. 9, p. 813359, 2021.
- [128] X. Zheng and G. Gallot, "Dynamics of cell membrane permeabilization by saponins using terahertz attenuated total reflection," *Biophysical Journal*, vol. 119, pp. 749–755, 2020.
- [129] M. Grognot and G. Gallot, "Quantitative measurement of permeabilization of living cells by terahertz attenuated total reflection," *Applied Physics Letters*, vol. 107, p. 103702, 2015.
- [130] A. Azan, M. Grognot, and T. García-Sánchez, "Monitoring the molecular composition of live cells exposed to electric pulses via label-free optical methods," *Scientific Reports*, vol. 10, p. 10471, 2020.
- [131] J. H. Correia, J. A. Rodrigues, and S. Pimenta, "Photodynamic therapy review : Principles, photosensitizers, applications, and future directions," *Pharmaceutics*, vol. 13, p. 1332, 2021.
- [132] "Tailoring photosensitive ROS for advanced photodynamic therapy," vol. 53, 2021.
- [133] S. Mallidi, B. Spring, and S. Chang, "Optical imaging, photodynamic therapy and optically triggered combination treatments," *The Cancer Journal*, vol. 21, pp. 194–205, 2015.
- [134] E. Buytaert, M. Dewaele, and P. Agostinis, "Molecular effectors of multiple cell death pathways initiated by photodynamic therapy," *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Reviews on Cancer*, vol. 1776, pp. 86–107, 2007.
- [135] P. Mroz, A. Yaroslavsky, and G. Kharkwal, "Cell death pathways in photodynamic therapy of cancer," *Cancers*, vol. 3, pp. 2516–2539, 2011.

- [136] N. L. Oleinick, R. L. Morris, and I. Belichenko, "The role of apoptosis in response to photodynamic therapy : what, where, why, and how," *Photochemical & Photobiological Sciences*, vol. 1, pp. 1–21, 2002.
- [137] X. Shen, N. Zacal, and G. Singh, "Alterations in mitochondrial and apoptosis-regulating gene expression in photodynamic therapy-resistant variants of ht29 colon carcinoma cells," *Photochemistry and photobiology*, vol. 81, pp. 306–313, 2005.
- [138] H.-R. C. Kim, Y. Luo, and G. Li, "Enhanced apoptotic response to photodynamic therapy after bcl-2 transfection," *Cancer Research-Paper Edition*, vol. 59, pp. 3429–3432, 1999.
- [139] S. Chiu and N. Oleinick, "Dissociation of mitochondrial depolarization from cytochrome c release during apoptosis induced by photodynamic therapy," *British journal of cancer*, vol. 84, pp. 1099–1106, 2001.
- [140] N. Zamzami and G. Kroemer, "Apoptosis : mitochondrial membrane permeabilization—the whole story?," *Current Biology*, vol. 13, pp. R71–R73, 2003.
- [141] S. Nagata, A. Obana, and Y. Gohto, "Necrotic and apoptotic cell death of human malignant melanoma cells following photodynamic therapy using an amphiphilic photosensitizer, atx-s10 (na)," *Lasers in Surgery and Medicine : The Official Journal of the American Society for Laser Medicine and Surgery*, vol. 33, pp. 64–70, 2003.
- [142] D. Kessel and R. Poretz, "Sites of photodamage induced by photodynamic therapy with a chlorin e6 triacetoxymethyl ester (came)," *Photochemistry and photobiology*, vol. 71, pp. 94–96, 2000.
- [143] J. Dahle, H. B. Steen, and J. Moan, "The mode of cell death induced by photodynamic treatment depends on cell density," *Photochemistry and photobiology*, vol. 70, pp. 363–367, 1999.
- [144] D. Kessel, M. G. H. Vicente, and J. J. Reiners Jr, "Initiation of apoptosis and autophagy by photodynamic therapy," *Lasers in Surgery and Medicine : The Official Journal of the American Society for Laser Medicine and Surgery*, vol. 2, pp. 289–290, 2006.
- [145] R. Scherz-Shouval, E. Shvets, and E. Fass, "Reactive oxygen species are essential for autophagy and specifically regulate the activity of atg4," *The EMBO journal*, vol. 26, pp. 1749–1760, 2007.
- [146] A. Sasnauskiene, J. Kadziauskas, and N. Vezelyte, "Apoptosis, autophagy and cell cycle arrest following photodamage to mitochondrial interior," *Apoptosis*, vol. 14, pp. 276–286, 2009.
- [147] K. Berg and J. Moan, "Lysosomes as photochemical targets," *International journal of cancer*, vol. 59, pp. 814–822, 1994.
- [148] J. Moan and K. Berg, "The photodegradation of porphyrins in cells can be used to estimate the lifetime of singlet oxygen," *Photochemistry and photobiology*, vol. 53, pp. 549–553, 1991.
- [149] R. Shinde, N. Revi, and S. Murugappan, "Enhanced permeability and retention effect : A key facilitator for solid tumor targeting by nanoparticles," *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*, vol. 39, p. 102915, 2022.
- [150] J. Wu, "The enhanced permeability and retention (EPR) effect : The significance of the concept and methods to enhance its application," *Journal of Personalized Medicine*, vol. 11, p. 771, 2021.

- [151] R. Sun, J. Xiang, and Q. Zhou, "The tumor EPR effect for cancer drug delivery : Current status, limitations, and alternatives," *Advanced Drug Delivery Reviews*, vol. 191, p. 114614, 2022.
- [152] R. R. Allison and S. Bansal, "Photodynamic therapy for peripheral lung cancer," *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*, vol. 38, p. 102825, 2022.
- [153] K. Plaetzer, M. Berneburg, and T. Kiesslich, "New applications of photodynamic therapy in biomedicine and biotechnology," *BioMed research international*, vol. 2013, 2013.
- [154] J. H. Correia, J. A. Rodrigues, and S. Pimenta, "Photodynamic therapy review : Principles, photosensitizers, applications, and future directions," *Pharmaceutics*, vol. 13, p. 1332, 2021.
- [155] A. de Souza da Fonseca, F. de Paoli, and A. Mencialha, "Photodynamic therapy for treatment of infected burns," *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*, vol. 38, p. 102831, 2022.
- [156] P. Calzavara-Pinton, M. Rossi, E. Aronson, and The Italian Group for Photodynamic Therapy, "A retrospective analysis of real-life practice of off-label photodynamic therapy using methyl aminolevulinate (MAL-PDT) in 20 italian dermatology departments. part 1 : Inflammatory and aesthetic indications," *Photochemical & Photobiological Sciences*, vol. 12, pp. 148–157, 2013.
- [157] W. Jerjes, T. Upile, and Z. Hamdoon, "Interstitial PDT for vascular anomalies," *Lasers in Surgery and Medicine*, vol. 43, pp. 357–365, 2011.
- [158] S. Houthoofd, M. Vuylsteke, S. Mordon, and I. Fourneau, "Photodynamic therapy for atherosclerosis. the potential of indocyanine green," *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*, vol. 29, 2020.
- [159] J. L. Sandell and T. C. Zhu, "A review of in-vivo optical properties of human tissues and its impact on PDT," *Journal of Biophotonics*, vol. 4, p. 773, 2011.
- [160] J. E. Moulder and S. Rockwell, "Tumor hypoxia : its impact on cancer therapy," *Cancer and metastasis reviews*, vol. 5, p. 313–341, 1987.
- [161] L. Hong, J. Li, and Y. Luo, "Recent advances in strategies for addressing hypoxia in tumor photodynamic therapy," *Biomolecules*, 2022.
- [162] P. Sarbadhikary, B. P. George, and H. Abrahamse, "Recent advances in photosensitizers as multifunctional theranostic agents for imaging-guided photodynamic therapy of cancer," *Theranostics*, vol. 11, pp. 9054–9088, 2021.
- [163] M. Kolarikova, B. Hosikova, and H. Dilenko, "Photodynamic therapy : Innovative approaches for antibacterial and anticancer treatments," *Medicinal Research Reviews*, vol. 43, pp. 717–774, 2023.
- [164] A. B. Ormond and H. S. Freeman, "Dye sensitizers for photodynamic therapy," *Materials*, vol. 6, pp. 817–840, 2013.
- [165] L. Gibot, M. Demazeau, and V. Pimienta, "Role of polymer micelles in the delivery of photodynamic therapy agent to liposomes and cells," *Cancers*, vol. 12, p. 384, 2020.
- [166] H.-P. Lassalle, D. Dumas, and S. Gräfe, "Correlation between in vivo pharmacokinetics, intratumoral distribution and photodynamic efficiency of liposomal mthpc," *Journal of controlled release*, vol. 134, pp. 118–124, 2009.

- [167] S. Battah, S. Balaratnam, and A. Casas, “Macromolecular delivery of 5-aminolaevulinic acid for photodynamic therapy using dendrimer conjugates,” *Molecular cancer therapeutics*, vol. 6, pp. 876–885, 2007.
- [168] M. Demazeau, L. Gibot, and A.-F. Mingotaud, “Rational design of block copolymer self-assemblies in photodynamic therapy,” *Beilstein Journal of Nanotechnology*, vol. 11, p. 180–212, 2020.
- [169] T. Li and L. Yan, “Functional polymer nanocarriers for photodynamic therapy,” *Pharmaceuticals*, vol. 11, 2018.
- [170] A. Oudin, J. Chauvin, and L. Gibot, “Amphiphilic polymers based on polyoxazoline as relevant nanovectors for photodynamic therapy,” *Journal of Materials Chemistry B*, vol. 7, pp. 4973–4982, 2019.
- [171] J. Bonelli, E. Ortega-Forte, and A. Rovira, “Improving photodynamic therapy anticancer activity of a mitochondria-targeted coumarin photosensitizer using a polyurethane–polyurea hybrid nanocarrier,” *Biomacromolecules*, vol. 23, 2022.
- [172] Z. Shen, Q. Ma, and X. Zhou, “Strategies to improve photodynamic therapy efficacy by relieving the tumor hypoxia environment,” *NPG Asia Materials*, vol. 13, pp. 1–19, 2021.
- [173] J. Yang, W. Li, and L. Luo, “Hypoxic tumor therapy by hemoglobin-mediated drug delivery and reversal of hypoxia-induced chemoresistance,” *Biomaterials*, vol. 182, pp. 145–156, 2018.
- [174] Y. Shen, S. Li, and X. Wang, “Tumor vasculature remodeling by thalidomide increases delivery and efficacy of cisplatin,” *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research : CR*, vol. 38, p. 427, 2019.
- [175] B. C. Wilson, M. S. Patterson, and L. Lilge, “Implicit and explicit dosimetry in photodynamic therapy : a new paradigm,” *Lasers in Medical Science*, vol. 12, pp. 182–199, 1997.
- [176] M. M. Kim and A. Darafsheh, “Light sources and dosimetry techniques for photodynamic therapy,” vol. 96, pp. 280–294, 2020.
- [177] J. Zou, W. Li, and N. Meng, “Evaluation of lensed fibers used in photodynamic therapy (pdt),” *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*, vol. 31, 2020.
- [178] C. Pavani, A. F. Uchoa, and C. S. Oliveira, “Effect of zinc insertion and hydrophobicity on the membrane interactions and PDT activity of porphyrin photosensitizers,” vol. 8, pp. 233–240, 2009.
- [179] I. O. L. Bacellar, M. C. Oliveira, and L. S. Dantas, “Photosensitized membrane permeabilization requires contact-dependent reactions between photosensitizer and lipids,” *Journal of the American Chemical Society*, vol. 140, pp. 9606–9615, 2018.
- [180] I. O. L. Bacellar, T. M. Tsubone, and C. Pavani, “Photodynamic efficiency : From molecular photochemistry to cell death,” *International Journal of Molecular Sciences*, vol. 16, pp. 20523–20559, 2015.
- [181] T. Tsubone, M. Baptista, and R. Itri, “Understanding membrane remodelling initiated by photosensitized lipid oxidation,” *Biophysical Chemistry*, vol. 254, p. 106263, 2019.
- [182] K. A. Runas and N. Malmstadt, “Low levels of lipid oxidation radically increase the passive permeability of lipid bilayers,” *Soft Matter*, vol. 11, pp. 499–505, 2015.

- [183] M. Vignoni, M. Urrutia, and H. Junqueira, "Photo-oxidation of unilamellar vesicles by a lipophilic pterin : Deciphering biomembrane photodamage," *Langmuir*, vol. 34, pp. 15578–15586, 2018.
- [184] W. Caetano, P. S. Haddad, and R. Itri, "Photo-induced destruction of giant vesicles in methylene blue solutions," *Langmuir*, vol. 23, pp. 1307–1314, 2007.
- [185] K. A. Runas, S. J. Acharya, and J. J. Schmidt, "Addition of cleaved tail fragments during lipid oxidation stabilizes membrane permeability behavior," *Langmuir*, vol. 32, pp. 779–786, 2016.
- [186] X. Zheng, B. Lordon, A.-F. Mingotaud, P. Vicendo, R. Brival, I. Fourquaux, L. Gibot, and G. Gallot, "Terahertz Spectroscopy Sheds Light on Real-Time Exchange Kinetics Occurring through Plasma Membrane during Photodynamic Therapy Treatment," *Advanced Science*, p. 2300589, 2023.
- [187] T. Wonnacott and R. Wonnacott, *Introductory Statistics*, vol. 13 of *Wiley Series in Probability*.
- [188] J. Crank, *The Mathematics of Diffusion*. Oxford science publications, Clarendon Press, 1979.
- [189] U. V. Till, *Oncopol - Vers le développement critique de vecteurs polymères pour l'oncologie*. PhD thesis, 2016.
- [190] S. Ezrahi, E. Tuval, and A. Aserin, "Properties, main applications and perspectives of worm micelles," *Advances in Colloid and Interface Science*, vol. 128, pp. 77–102, 2006.
- [191] A. Figarol, L. Gibot, and M. Golzio, "A journey from the endothelium to the tumor tissue : distinct behavior between peo-pcl micelles and polymersomes nanocarriers," *Drug Delivery*, vol. 13, pp. 1766–1778, 2018.
- [192] Y. Dai, X. Chen, and X. Zhang, "Recent developments in the area of click-crosslinked nanocarriers for drug delivery," *Macromolecular Rapid Communications*, vol. 40, p. 1800541, 2019.
- [193] H. Cabral, K. Miyata, and K. Osada, "Block copolymer micelles in nanomedicine applications," *Chemical Reviews*, vol. 118, pp. 6844–6892, 2018.
- [194] N. Campbell, *Biology*. Pearson, 11th ed., 2016.
- [195] T. Sipos and J. Merkel, "Effect of calcium ions on the activity, heat stability, and structure of trypsin," *Biochemistry*, vol. 9, pp. 2766–2775, 1970.
- [196] J. Yan, C. Xie, J. Zhu, Z. Song, Z. Wang, and L. Li, "Effect of trypsin concentration on living SMCC-7721 cells studied by atomic force microscopy," *Journal of Microscopy*, vol. 284, pp. 203–213, 2021.
- [197] B. Fischer, A. Meier, A. Dehne, A. Salhotra, T. A. Tran, S. Neumann, K. Schmidt, I. Meiser, J. C. Neubauer, H. Zimmermann, and L. Gentile, "A complete workflow for the differentiation and the dissociation of hiPSC-derived cardiospheres," *Stem Cell Research*, vol. 32, pp. 65–72, 2018.
- [198] M. Raizada, G. Tan, and R. Fellows, "Trypsin-induced alterations of insulin binding, microfilament organization and cell shape in fibroblastic cultures from non-diabetic and diabetic mice," *Experimental Cell Research*, vol. 133, pp. 261–271, 1981.

- [199] A. Nowak-Terpiłowska, P. Śledziński, and J. Zeyland, “Impact of cell harvesting methods on detection of cell surface proteins and apoptotic markers,” *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, vol. 54, p. e10197, 2021.
- [200] C. Harrison and T. Allen, “Cell Surface Morphology After Trypsinisation Depends on Initial Cell Shape,” *Differentiation*, vol. 15, pp. 61–66, 1979.
- [201] L. Furcht and G. Wendelschafer-Crabb, “Trypsin-induced coordinate alterations in cell shape, cytoskeleton, and intrinsic membrane structure of contact-inhibited cells,” *Experimental Cell Research*, vol. 114, pp. 1–14, 1978.
- [202] S. Nehls, H. Nöding, S. Karsch, F. Ries, and A. Janshoff, “Stiffness of MDCK II Cells Depends on Confluency and Cell Size,” *Biophysical Journal*, vol. 116, pp. 2204–2211, 2019.
- [203] R. Lemons, S. Forster, and J. Thoene, “Protein microinjection by protease permeabilization of fibroblasts,” *Analytical Biochemistry*, vol. 172, pp. 219–227, 1988.
- [204] K. Dettmer, N. Nürnberger, H. Kaspar, M. A. Gruber, M. F. Almstetter, and P. J. Oefner, “Metabolite extraction from adherently growing mammalian cells for metabolomics studies : Optimization of harvesting and extraction protocols,” *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, vol. 399, pp. 1127–1139, 2011.
- [205] K. G. Vogel, “Effects of hyaluronidase, trypsin, and EDTA on surface composition and topography during detachment of cells in culture,” *Experimental Cell Research*, vol. 113, pp. 345–357, 1978.
- [206] C. Kirkpatrick, I. Melzner, and T. Göller, “Comparative effects of trypsin, collagenase and mechanical harvesting on cell membrane lipids studied in monolayer-cultured endothelial cells and a green monkey kidney cell line,” *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*, vol. 846, pp. 120–126, 1985.
- [207] X. Liu, S. Oh, and M. W. Kirschner, “The uniformity and stability of cellular mass density in mammalian cell culture,” *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, vol. 10, p. 1017499, 2022.
- [208] I. Hapala, “Breaking the barrier : Methods for reversible permeabilization of cellular membranes,” *Critical reviews in biotechnology*, vol. 17, pp. 105–122, 1997.
- [209] M. P. Stewart, A. Sharei, X. Y. Ding, G. Sahay, R. Langer, and K. F. Jensen, “In vitro and ex vivo strategies for intracellular delivery,” *Nature*, vol. 538, pp. 183–192, 2016.
- [210] JF. Ziemanski, JZ. Chen, and KK. Nichols, “Evaluation of Cell Harvesting Techniques to Optimize Lipidomic Analysis from Human Meibomian Gland Epithelial Cells in Culture,” *International journal of molecular sciences*, vol. 21, 2020.
- [211] M. Cho and D. Thompson, “The madin darby canine kidney (mdck) epithelial cell monolayer as a model cellular - transport barrier,” *Journal of Pharmaceutical Sciences*, vol. 76, p. S49, 1987.
- [212] P. Dutta and K. Tominaga, “Dependence of low frequency spectra on solute and solvent in solutions studied by terahertz time-domain spectroscopy,” *Molecular Physics*, vol. 107, pp. 1845–1854, 2009.
- [213] I. E. Eremin, V. V. Neshchimenko, and D. S. Shcherban, “System modification of the equation lorenz–lorentz–clausius–mossotti,” *Optik*, vol. 231, p. 166327, 2021.

- [214] D. E. Aspnes, “Local-field effects and effective-medium theory : A microscopic perspective,” *American Journal of Physics*, vol. 50, pp. 704–709, 1982.
- [215] J. C. R. Reis, I. M. S. Lampreia, Â. F. S. Santos, M. L. C. J. Moita, and G. Douhéret, “Refractive Index of Liquid Mixtures : Theory and Experiment,” *ChemPhysChem*, vol. 11, pp. 3722–3733, 2010.
- [216] J. Dai, J. Zhang, W. Zhang, and D. Grischkowsky, “Terahertz time-domain spectroscopy characterization of the far-infrared absorption and index of refraction of high-resistivity, float-zone silicon,” *J. Opt. Soc. Am. B*, vol. 21, pp. 1379–1386, 2004.
- [217] C. Ronne, P.-O. Astrand, and S. R. Keiding, “THz spectroscopy of liquid H₂O and D₂O,” *Phys. Rev. Lett.*, vol. 82, pp. 2888–2891, 1999.
- [218] M. Bass, C. DeCusatis, and J.M.Enoch, *Handbook of Optics, 5 Volumes*. 2010.
- [219] L. Figard, H. Xu, and H. G. Garcia, “The plasma membrane flattens out to fuel cell-surface growth during drosophila cellularization,” *Developmental Cell*, 2013.
- [220] N. Groulx, F. Boudreault, and S. Orlov, “Membrane reserves and hypotonic cell swelling,” *Journal of membrane biology*, 2006.
- [221] T. A. Masters, B. Pontes, and V. Viasnoff, “Plasma membrane tension orchestrates membrane trafficking, cytoskeletal remodeling, and biochemical signaling during phagocytosis,” *Proceedings of the national academy of sciences of the United States of America*, 2013.
- [222] L. Venkova, A-S.Vishen, and S.Lembo, “A mechano-osmotic feedback couples cell volume to the rate of cell deformation,” *eLife*, vol. 11, p. e72381, 2022.
- [223] E. Mavrona, F. Appugliese, J. Andberger, J. Keller, M. Frankie, G. Scalari, and J. Faist, “Terahertz refractive index matching solution,” *Optics Express*, vol. 27, pp. 14536–14544, 2019.

Titre : Etude de la perméabilisation de la membrane plasmique par spectroscopie térahertz : thérapie photodynamique et protéolyse de la trypsine

Mots clés : térahertz, perméabilisation, thérapie photodynamique, réflexion totale atténuée, membrane plasmique

Résumé : Le térahertz désigne la zone de fréquence entre 0.1 et 10 THz, entre les domaines de l'infrarouge et des ondes radios. Les ondes térahertz présentent une forte sensibilité à l'eau et à ses changements de configurations, induits notamment par la présence de solutés. Bénéficiant des récents développements technologiques, la région térahertz du spectre électromagnétique offre un potentiel important dans le domaine de la biologie, et dans notre cas, du domaine biomédical. Les méthodes permettant de suivre en temps réel les échanges moléculaires à travers la membrane des cellules vivantes sont encore rares. Notre groupe a développé un montage de routine combinant les ondes térahertz avec une configuration en réflexion totale atténuée (ATR). Ce dispositif permet d'obtenir des informations en temps réel et de quantifier les échanges entre les membranes cellulaires induits par la perméabilisation de la membrane plasmique des cellules épithéliales. Il y a trois axes principaux à ce travail de thèse. Le premier concerne la caractérisation et le développement technologique du dispositif térahertz. Cela a permis d'améliorer la répétabilité et la stabilité des mesures. Le second axe est l'étude de la perméabilisation induite par la thérapie photodyna-

mique, un traitement contre certains types de cancers. Cette étude s'est faite en collaboration avec une équipe de biologistes et de chimistes du laboratoire Softmat à Toulouse. Une comparaison constante de l'évaluation de l'intégrité de la membrane plasmique avec le dispositif térahertz et avec les techniques biologiques standard est effectuée. Le dispositif térahertz, combiné à ces méthodes biologiques, a montré une augmentation de l'efficacité de la thérapie photodynamique lorsque les photosensibilisateurs sont encapsulés par des nanovecteurs micellaires. D'autres types de nanovecteurs ont ensuite été étudiés. Les résultats biologiques et térahertz montrent que selon le type de nanovecteur, les dynamiques de perméabilisation de la membrane plasmique sont différentes. Enfin, le troisième axe est l'étude de la perméabilisation induite par la protéolyse de la trypsine, enzyme utilisée en culture cellulaire pour détacher des cellules de leur substrat. L'étude de ce processus par le dispositif térahertz, combinée à un modèle multicouche, à de l'imagerie confocale et de la fluorescence, a montré que cette procédure quotidienne en culture cellulaire induit des échanges de petites molécules à travers la membrane plasmique.

Title : Study of plasma membrane permeabilization by terahertz spectroscopy: photodynamic therapy and trypsin proteolysis

Keywords : terahertz, permeabilization, photodynamic therapy, attenuated total reflection, trypsin proteolysis

Abstract : Terahertz refers to the frequency range between 0.1 and 10 THz, between the infrared and radio wave domains. Terahertz waves are highly sensitive to water and its changing configurations, induced in particular by the presence of solutes. Benefiting from recent technological developments, the terahertz region of the electromagnetic spectrum offers significant potential in the field of biology, and in our case, the biomedical field. Methods enabling real-time monitoring of molecular exchanges across the membrane of living cells are still rare. Our group has developed a routine setup combining terahertz waves with an attenuated total reflection (ATR) configuration. This device enables us to obtain real-time information and quantify exchanges between cell membranes induced by permeabilization of the plasma membrane of epithelial cells. There are three main axes to this thesis. The first concerns the characterization and technological development of the terahertz device. This has enabled us to improve measurement repeatability and stability. The second is the study of permeabilization induced by photodynamic therapy, a treatment for certain

types of cancers. This study was carried out in collaboration with a team of biologists and chemists from the Softmat laboratory in Toulouse. A constant comparison of plasma membrane integrity assessment with the terahertz device and with standard biological techniques is carried out. The terahertz device, combined with these biological methods, has shown an increase in the efficacy of photodynamic therapy when photosensitizers are encapsulated by micellar nanovectors. Other types of nanovectors were then studied. Biological and terahertz results show that, depending on the type of nanovector, plasma membrane permeabilization dynamics differ. Finally, the third area of focus was the study of permeabilization induced by proteolysis of trypsin, an enzyme used in cell culture to detach cells from their substrate. The study of this process using the terahertz device, combined with a multilayer model, with confocal imaging and fluorescence, has shown that this everyday procedure in cell culture induces exchanges of small molecules across the plasma membrane.