HAL
open science

Imagerie térahertz par réflexion interne totale pour la biologie. : Application à l'étude de la perméabilisation cellulaire.

Marianne Grognot

To cite this version:

Marianne Grognot. Imagerie térahertz par réflexion interne totale pour la biologie. : Application à l'étude de la perméabilisation cellulaire.. Biophysique [physics.bio-ph]. Université Paris Saclay (COmUE), 2016. Français. NNT : 2016SACLX068 . tel-01492927

HAL Id: tel-01492927

https://pastel.hal.science/tel-01492927

Submitted on 20 Mar 2017

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.

NNT : 2016SACLX068

THÈSE DE DOCTORAT
DE
L'UNIVERSITÉ PARIS-SACLAY
PRÉPARÉE À
L'ÉCOLE POLYTECHNIQUE

ÉCOLE DOCTORALE N°573 : INTERFACES
Approches interdisciplinaires : fondements, applications et innovations

Spécialité : Physique

Par

Marianne Grognot

Imagerie térahertz par réflexion interne totale pour la biologie. Application à l'étude de la perméabilisation cellulaire.

Thèse présentée et soutenue à l'Ecole Polytechnique le 18 octobre 2016
devant le jury composé de :

M. L. Mir, Directeur de Recherche (Institut Gustave Roussy)	Président du Jury
Mme K. Grenier, Chargée de Recherche (Univ. de Toulouse)	Rapportrice
M. V. Senez, Directeur de Recherche (Université Lille 1)	Rapporteur
M. F. Garet, Maître de Conférences (Université de Savoie)	Examinateur
M. F. Hache, Directeur de Recherche (Ecole Polytechnique)	Examinateur
M. G. Gallot, Directeur de Recherche (Ecole Polytechnique)	Directeur de Thèse

Remerciements

Le style scientifique est certes agréable, mais Ha ! ici ne sera pas. En ces quelques paragraphes il m'est donné la chance de pouvoir exprimer mes plus sincères remerciements à celles et ceux qui m'ont tant aidée -et de tant de façons ! Le style ne sera certes point des plus clairs mais j'espère ne pas vous abrutir de galimatias ; somme toute, l'espoir d'être concise s'affronte à la peur d'oublier quelqu'un. Mais allons donc, et abordons dans un semblant d'ordre les mercis que je peux enfin formuler.

Tout d'abord, et cela ne vous étonnera guère dans un tel manuscrit, mes remerciements seront à ceux que j'ai pu côtoyer au travail ou qui m'ont tout simplement permis d'obtenir le-dit travail. Merci à Jean-Louis Martin, alors directeur, d'avoir accepté ma venue au LOB. Merci à François Hache, notre directeur actuel. Merci aux membres du jury, et plus particulièrement à mes rapporteurs Mme Katia Grenier et M. Vincent Senez, pour leur lecture attentive et les conversations riches qui en ont découlé. Merci également à Guilhem d'avoir eu cette idée saugrenue de m'embaucher, mais aussi l'élégance de survivre, et la patience de m'expliquer ces pans mystérieux de la physique que j'ai pu rencontrer. La confiance dont tu m'as gratifiée a été un moteur pour mon travail, mon enthousiasme et ma progression. Merci à Antoine Azan (« de l'IGR ») et à Lluis Mir pour leur ouverture à la nouveauté, leur rigueur, leur disponibilité et leur bonne humeur qui ont permis une collaboration des plus riches et agréables. Merci à François, Marie-Claire et Antigoni qui, chacun de leur façon, ont apporté un encadrement supplémentaire à ma thèse quand bien même ils n'y avaient aucune obligation. Merci à Xavier et Jean-Marc pour le soutien technique, les coups de main supplémentaires, les bons conseils et les conversations en salle café qui mettent de bonne humeur. Merci à Laure et Christelle pour leur patience et chaperonnage administratif des plus nécessaires. Merci à Vincent K. et Guillaume D. qui, dans un style singulièrement différent, ont porté la casquette du postdoc sympa avec la petite touche infime de paternalisme et les immenses doses de bons conseils, de soutien moral et de blagues parfaitement nulles (*looking at you, Guillaume*). Merci à Marion et Sarah qui m'ont guidée dans les conférences térahertz, qu'elles soient *hype* ou fromagères. Un immense merci à ceux que j'ai côtoyés au quotidien, qui ont supporté mes lubies (à vos *iris*ques et périls) et mes conversations en salle café. Un merci particulier aux autres étudiants avec qui j'ai affronté le plus d'années (et un bouleversant changement de bureaux) ... Kamel, Mouna, Floriane, Claire et Chao.

Par ailleurs, force est de constater que ce travail de thèse n'aurait pu être achevé sans le concours d'autres personnes m'ayant aidée plus personnellement. La pudeur le disputera toujours à l'incommensurable gratitude que j'ai pour eux. Disons-le donc simplement : merci à mes parents, Isabelle et Yves, qui m'ont donné bien plus que la vie. Merci à ma famille. Merci à Timothée. Merci à mes amis ; la « Mafia » -terreau des ambitions et du partage-, le Gang de Blonds, la

diaspora UTCéenne et les autres électrons libres. Concernant ce manuscrit et ce travail de thèse, un trait de gratitude plus précis sera tiré en direction de Monica et Marie.

Il me serait précieux de toujours trouver au cours de ma carrière des conditions de travail aussi humaines, stimulantes et agréables. Merci pour toutes vos éclisses bariolées.

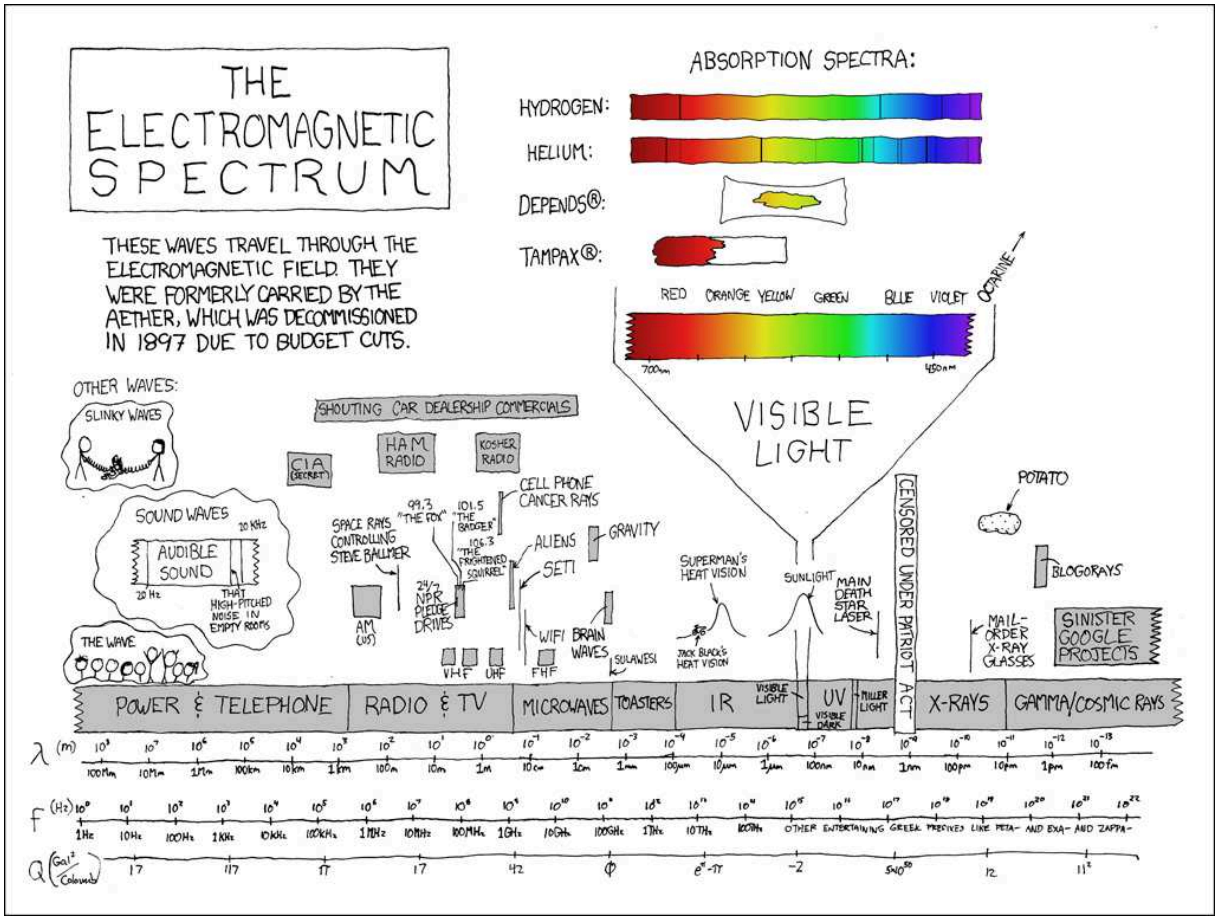


Figure 0.1 – *« Portons un toast au térahertz ! »*. Image tirée du site xkcd.com, lecture divertissante pour soutien de thésard s'il en est. Sous license *CC*.

Table des matières

Remerciements **1**

Table des matières **3**

Table des abbréviations **7**

Avant-propos **9**

1 Introduction **11**

1.1 Propriétés générales du domaine térahertz 12

1.2 L'émergence des différentes applications en térahertz 14

1.2.1 L'astronomie 14

1.2.2 Les premières sources de laboratoire et les sources actuelles 15

1.2.3 La spectroscopie des solides et ses applications 17

1.2.4 La spectroscopie de biomolécules et les débuts des études biomédicales . . 19

1.2.5 Résumé 21

1.3 Le térahertz pour la biologie et le biomédical 22

1.3.1 L'imagerie biomédicale 22

1.3.2 La détection de biomolécules, microorganismes et cellules 23

1.3.3 La caractérisation des états et formes cellulaires 24

1.3.4 La question de l'invasivité : bilan actuel 25

1.4 Motivations exploratoires 27

2 La réflexion interne totale atténuée (ATR) en térahertz pour la biologie **29**

2.1 Limites des géométries en champs proche et transmission 30

2.2 Dimensionnement général d'un montage d'imagerie térahertz en réflexion 31

2.2.1 Modèle et valeurs indices utilisés 31

2.2.2 Influence de l'angle d'incidence - Optimisation du signal réfléchi 34

2.2.3 Influence des variations réalistes d'indice - Optimisation du contraste . . . 35

2.2.4 L'équilibre signal/contraste - Optimisation de la sensibilité 38

2.2.5 Optimisation sur notre propre montage 39

2.2.6 Un autre avantage de l'ATR : une meilleure sensibilité aux petits objets . 41

2.3 La réalisation de notre montage expérimental ATR 43

2.3.1 Un montage TDS classique pour la génération et détection du térahertz . 43

2.3.2 Caractéristiques réelles d'acquisition 45

3 La nature du contraste en imagerie térahertz ATR de cellules 49
3.1 L'objet biologique d'étude : les cellules MDCK, une lignée de cellules adhérentes 50
3.1.1 Petit aperçu de la cellules animale 50
3.1.2 Les cellules MDCK 52
3.1.3 La culture des MDCK pour leur étude sur notre montage d'imagerie ATR 53
3.2 Observation d'un contraste térahertz entre les cellules et leur milieu 55
3.2.1 Acquisition des images térahertz 55
3.2.2 Caractéristiques du contraste 56
3.2.3 Variabilité du contraste d'une expérience à l'autre 59
3.3 Nature du contraste observé 62
3.3.1 Conditions d'acquisition 62
3.3.2 Perméabilisations chimiques 63
3.3.3 Quantification des protéines extracellulaires (BCA) et données qualitatives sur leur taille (Bleu de Coomassie) 65
3.3.4 Tests complémentaires et discussion 69
3.4 Conclusion 72

4 Spectroscopie térahertz des protéines en solution 75
4.1 Travaux actuels sur la spectroscopie des biomolécules en solution 76
4.2 Acquisitions sur le montage ATR pour une large gamme de protéines 78
4.2.1 Choix des acides aminés peptides et protéines 78
4.2.2 Schéma des acquisitions 78
4.2.3 Données brutes obtenues 79
4.3 Modélisation du comportement 82
4.3.1 Démarche et notations 82
4.3.2 Calcul du modèle volumique 83
4.4 Extraction de données spectroscopiques 86
4.4.1 Des modifications du pic d'amplitude aux variations de l'indice complexe effectif 86
4.4.2 Extraction des variations moyennes d'indice et d'absorbance 89
4.4.3 Discussion 92
4.5 Application à la caractérisation de notre outil térahertz 94
4.5.1 Ajustement du modèle à la sensibilité du contraste térahertz 94
4.5.2 Résumé des propriétés de Δ_{rel} 96

5 Application de l'imagerie térahertz au suivi de la perméabilisation cellulaire 97
5.1 Motivations et méthodes actuelles autour de la quantification de la perméabilisation cellulaire 98
5.1.1 Pourquoi perméabiliser une cellule ? 98
5.1.2 Méthodes de perméabilisation cellulaire réversible 99
5.1.3 Les outils actuels de quantification de la perméabilisation 101
5.2 Comparaison de l'imagerie térahertz aux méthodes classiques en biologie 103
5.2.1 Méthode au bleu de trypan comparée au BCA 103

5.2.2 Méthode au iodure de propidium comparée au BCA 105
5.2.3 Bilan comparatif 107
5.3 Application à l'étude de la perméabilisation chimique 109
5.3.1 Suivi de la dynamique de perméabilisation 109
5.3.2 Comparaison d'action de deux saponosides 111
5.3.3 Étude de réversibilité de la perméabilisation 112
5.4 Application à l'étude de l'électroporation 114
5.4.1 Problématique et adaptations au montage térahertz 114
5.4.2 Conditions d'acquisition 116
5.4.3 Résultats et premières interprétations 117
5.5 Conclusion 120

Conclusion générale **121**

A Annexes **123**
A.1 Figures complémentaires 123
A.2 Protocole de passage des MDCK 125
A.3 Protocole d'ensemencement des MDCK pour acquisitions THz 127
A.4 Protocole des marquages pour la microscopie confocale 129
A.5 Protocole du BCA 130
A.6 Protocole du test d'exclusion du Bleu de Trypan 133
A.7 Protocole du test de viabilité cellulaire (MTS) 134
A.8 Protocole du test d'exclusion de l'Iodure de Propidium 136

Références bibliographiques **138**

Table des abbréviations

ATR : réflexion interne totale atténuée (Attenuated Total internal Reflection)
BCA : BiCinchoninic acid Assay
BT : Bleu de Trypan
BWO : carcinotron (Backward Wave Oscillator)
DFG : génération de différence de fréquence (Difference Frequency Generation)
DMEM : Dulbecco's Modified Eagle Medium
HBSS : type de liquide physiologique complémenté en sucre (Hank's Balanced Salt Solution)
HEPES : acide 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazine ethane sulfonique
IP : Iodure de Propidium
MDCK : Madin-Darby Canine Kidney (cellules de -)
MPHA : Miroir Parabolique Hors Axe
MTS : 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium
MTT : bromure de 3-(45 -dimethylthiazol-2-yl)-25-diphenyl tetrazolium
OR : rectification optique (Optical Rectification)
PCA : antenne photoconductive (PhotoConductive Antenna)
PBS : type de liquide physiologique simple (Phosphate Buffered Saline)
QCL : laser à cascade quantique (Quantum Cascade Laser)
RSB : Rapport Signal sur Bruit
Si-HR : Silicium Haute Résistivité

Avant-propos

Ma thèse s'est déroulée au sein du Laboratoire d'Optique et Biosciences (LOB), unité mixte de recherche entre l'Ecole Polytechnique, le CNRS et l'INSERM. La philosophie générale du laboratoire est de développer, au-delà des thématiques propres à chaque spécialité, des synergies entre physique et biologie pour favoriser l'émergence de nouveaux concepts et outils, en particulier pour la compréhension du fonctionnement du vivant, des tissus jusqu'à la molécule unique.

Le présent manuscrit est composé de 5 chapitres successifs, correspondant à 5 étapes structurant le travail réalisé. La démarche adoptée est celle du développement d'un outil pour la biologie, à partir d'une technique physique particulière. Notre problématique se situe donc à l'interface de la Physique et de la Biologie, dans la volonté de faire bénéficier la seconde des apports de la première.

A chaque chapitre correspond une **question** et un objectif principal :

— Chapitre 1 : **Qu'est-ce que le térahertz, et pourquoi cherchons-nous ici à l'appliquer au vivant ?**

Ce chapitre permet une introduction au domaine térahertz, de ses premières applications à son entrée récente dans les domaines de la biologie et du biomédical. Il nous permet de contextualiser et *in fine* d'expliciter nos motivations exploratoires -ce qui nous incite à sonder et imager des cellules vivantes avec un rayonnement térahertz.

— Chapitre 2 : **Par quelle méthode d'imagerie pouvons-nous sonder au mieux des objets biologiques ?**

Pour répondre à cette question, nous envisageons différentes géométries d'imagerie et les comparons par une approche théorique, dans le cas d'échantillons biologiques. Le déroulement du chapitre permet de démontrer que la géométrie en réflexion interne totale atténuée (ATR) choisie est idéale pour sonder des cellules en conditions physiologiques. Cette démonstration théorique débouche sur la description du montage expérimental utilisé par la suite.

— Chapitre 3 : **Quelles images obtenons-nous expérimentalement ? Quelle est l'origine biologique du contraste sur ces images térahertz de cellules vivantes ?**

Sont exposées dans ce chapitre la réalisation expérimentale d'images térahertz présentant un contraste entre intérieur et extérieur des cellules, puis la démarche expérimentale pour comprendre l'origine d'un tel contraste. Nous arrivons ainsi à démontrer la sensibilité du térahertz à la composition protéique des cellules.

— Chapitre 4 : **Comment expliquer spectroscopiquement les mécanismes d'un tel contraste ?**

Pour répondre à cette question, nous développons un modèle théorique, qui se révèle pertinent pour décrire les variations du contraste térahertz en fonction de la taille des protéines et de leur

concentration. Ceci nous permet d'affiner notre compréhension de l'information apportée par le contraste térahertz sur la concentration protéique ; ses avantages et ses limites. Dépassant ensuite complètement le cadre de l'étude du contraste, nous proposons une méthode générale déterminant les propriétés spectroscopiques complètes de solutions de protéines, peptides et acides-aminés. Cette méthode atypique ne se repose pas sur des acquisitions spectroscopiques longues classiques, mais sur des données rapidement acquises ajustées à notre modèle théorique. Nous en tirons profit pour extraire des informations spectroscopiques inédites.

— Chapitre 5 : **Quel outil pour la biologie peut-on proposer à partir du suivi de ce contraste térahertz ?**

A partir du contraste indiquant la concentration protéique intracellulaire, nous proposons un outil de suivi des échanges de protéines entre intérieur et extérieur des cellules. Plus précisément, il s'agit de proposer un outil de quantification de la perméabilisation cellulaire. Nous soulignons l'utilité d'une telle quantification en biologie et mettons en avant les avantages de cet outil térahertz comparativement aux tests classiquement utilisés. Nous appliquons ensuite notre méthode térahertz à des perméabilisations chimiques et électriques, pour montrer l'éventail des possibilités offert par ce nouvel outil.

Ainsi, le déroulement des chapitres permet successivement de contextualiser notre travail, expliciter les choix instrumentaux, caractériser l'information obtenue expérimentalement, en affiner ses propriétés puis proposer une utilisation de cette information pour l'étude de phénomènes biologiques. Notons que si la Physique bénéficie à la Biologie, l'inverse est vrai aussi ici quand les contraintes d'acquisitions rapides imposées par la Biologie permettent le développement d'une démarche atypique pour obtenir des renseignements spectroscopiques.

Chapitre 1

Introduction

Sommaire

1.1 Propriétés générales du domaine térahertz **12**

1.2 L'émergence des différentes applications en térahertz **14**

1.2.1 L'astronomie 14

1.2.2 Les premières sources de laboratoire et les sources actuelles 15

1.2.3 La spectroscopie des solides et ses applications 17

1.2.4 La spectroscopie de biomolécules et les débuts des études biomédicales 19

1.2.5 Résumé 21

1.3 Le térahertz pour la biologie et le biomédical **22**

1.3.1 L'imagerie biomédicale 22

1.3.2 La détection de biomolécules, microorganismes et cellules 23

1.3.3 La caractérisation des états et formes cellulaires 24

1.3.4 La question de l'invasivité : bilan actuel 25

1.4 Motivations exploratoires **27**

L'objet de ce chapitre est de donner au lecteur un aperçu du domaine térahertz, pour lui permettre de comprendre les motivations sous-jacente à notre travail dans les chapitres suivants. Après une illustration des propriétés générales du domaine térahertz en section 1.1, nous suivrons par ordre chronologique l'apparition successive des différentes applications, en soulignant leur logique d'émergence liée aux propriétés et verrous technologiques progressivement levés. Nous aboutirons en section 1.3 sur des études utilisant le rayonnement térahertz en biochimie, biologie et biomédical. Les résultats enthousiasmants de ces études nous permettront d'expliciter nos propres motivations exploratoires en section 1.4.

1.1 Propriétés générales du domaine térahertz

La gamme d'onde térahertz est située entre l'infrarouge (domaine de l'optique) et les micro-ondes (domaine de la radioélectricité). Le téra-hertz correspond à 10^{12} hertz dans le système d'unité international, mais aussi aux « ondes monstres » de par sa racine grecque *teras*. Sa situation intermédiaire entre ces deux domaines l'a rendue difficile d'accès pendant de longues années, les techniques de chacun des domaines y atteignant leurs limites respectives. Cette difficulté lui a longtemps valu la dénomination de « fossé térahertz » (terahertz gap, en anglais). Bien que la définition exacte soit sujette à discussion, la gamme térahertz est usuellement délimitée par les bornes suivantes :

$$[0{,}1\,;\,10]\ \text{THz} \Longleftrightarrow [0{,}41\,;\,41{,}3]\ \text{meV} \Longleftrightarrow [0{,}03\,;\,3]\ \text{mm} \Longleftrightarrow [0{,}1\,;\,10]\ \text{ps}$$

Des longueurs d'ondes si importantes, comparativement au reste du domaine optique, lui valent peut-être bien cette qualification de 'monstre'. On retrouve parfois les ondes térahertz sous l'appellation de « rayons T », d'ondes submillimétriques ou encore d'infrarouge lointain (FIR en anglais) selon le domaine. En astronomie on les retrouve même décrites encore comme « micro-ondes », car les propriétés d'intérêt du térahertz pour l'astronomie sont en continuité de celles du domaine micro-ondes (signatures moléculaires des gaz). De par leur basse énergie (ordre de quelques milliélectronvolts pour le centre de la gamme), les ondes térahertz sont non-ionisantes. Leur longueur d'onde, supérieure à l'infrarouge, assure des pertes plus faibles par diffusion dans les échantillons, c'est à dire une profondeur de pénétration très intéressante.

Alors que la spectroscopie infrarouge classique va permettre d'interroger les modes de vibration des liaisons chimiques (liaisons fortes), avec la longueur d'onde croissante (fréquence décroissante) ce sont des modes vibrationnels collectifs et rotationnels de plus grande amplitude que le térahertz excite. Les modes concernés et leur plage d'activité sont détaillés en figure 1.1.

On retrouve les rotations moléculaire dans les gaz, conférant des signatures spectrales spécifiques dans les gammes térahertz et microondes. Les vibrations de phonons, les évènements de déformations à l'échelle de la molécule entière et les vibrations de liaisons faibles sont eux spécifiques à la gamme térahertz. Les liaisons faibles sont des interactions électrostatiques. Ce sont les liaisons de Van de Waals et les liaisons hydrogènes [2, 3]. Elles correspondent à des interactions intramoléculaires permettant de maintenir des structures complexes, par exemple dans les repliements d'une protéine, mais aussi intermoléculaires, par exemple l'interaction d'un

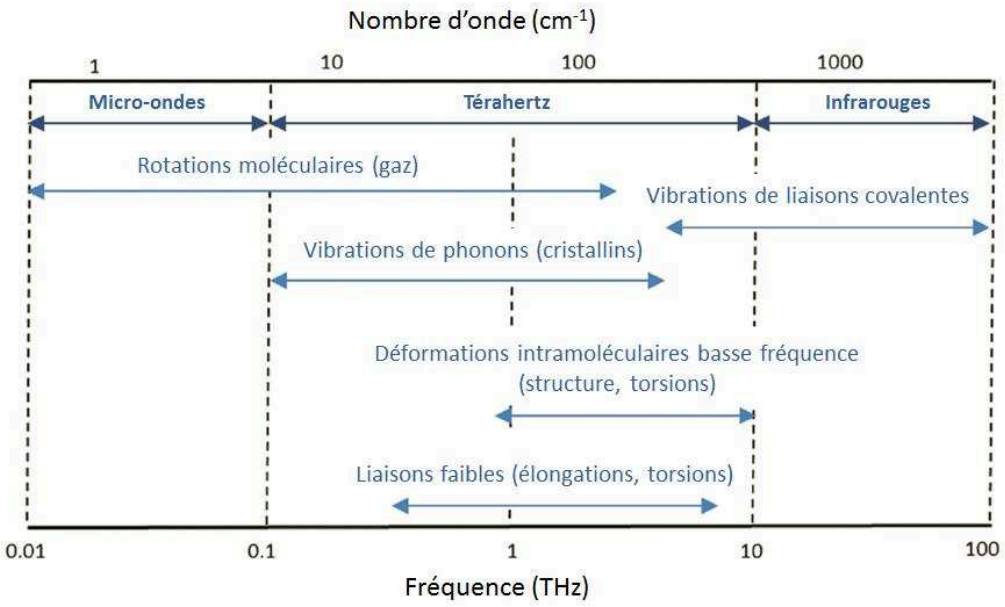


Figure 1.1 – Modes moléculaires et leur activité dans la gamme térahertz. Adapté de [1].

anticorps et sa cible. Le rayonnement térahertz va donc fortement interagir avec les molécules polaires, capables d'établir de telles liaisons faibles en conséquence de leur polarité.

L'exemple le plus marquant est l'eau liquide, mélange dense de molécules d'eau polaires interagissant entre elles et avec leur solutés par liaisons faibles. Comme le rayonnement térahertz correspond à leurs niveaux d'énergie, il sera absorbé de façon importante. Il suffit à un rayonnement de 0.5 THz de traverser moins de 50 µm d'eau pure pour que son amplitude soit divisée par 2. Cette forte interaction avec l'eau est un point critique pour le développement des applications térahertz, et plus particulièrement pour celles dans le domaine biologique. Les échantillons biologiques sont en effet particulièrement riches en eau, solvant universel du vivant ; nous sommes composés de 50 à 70 % d'eau ! Même dans le cas d'une simple vapeur d'eau, comme dans notre atmosphère, l'atténuation restera forte et les pics d'absorption de l'eau seront visibles sur le spectre du rayonnement térahertz : point gênant pour les applications en télécommunications, détection des rayonnements venant de l'espace, ou simplement pour tous les systèmes à air ambiant en laboratoire.

Cette contrainte importante liée à l'eau, ajoutée à l'apparition tardive des technologies d'émission et de détection, a structuré l'avancement du domaine térahertz.

1.2 L'émergence des différentes applications en térahertz

Dans cette section, nous déroulerons chronologiquement les étapes marquantes de développement du domaine térahertz. Ces étapes correspondent à l'ouverture de nouveaux champs d'investigation, souvent liée à un développement technologique. Pour chacun de ces champs nous développerons les études précurseuses, les motivations générales et quelques exemples d'applications actuelles. Nous irons de l'astronomie jusqu'aux toutes premières applications en biologie, domaine atteint le plus récemment. La section suivante donnera un état des lieux plus développé du térahertz en biologie, cadre de ce travail de thèse.

1.2.1 L'astronomie

L'astronomie a été le premier moteur du développement des techniques térahertz, et correspond encore à une partie importante de la recherche dans ce milieu [4]. Les motivations y sont très fortes, car les images et mesures térahertz dévoilent des informations capitales sur l'Univers. Les mesures du fond diffus cosmologique, aperçu de l'Univers peu après le Big Bang, se font autour du pic d'intensité du rayonnement, entre 0.1 et 0.2 THz. Les gaz légers à basse pression possèdent des lignes d'absorption spécifiques dans le bas de la gamme térahertz. Par ailleurs, les galaxies les plus lointaines dont l'émission a été déplacée vers le rouge, jusqu'au domaine térahertz, servent de point de mesure de l'état et de la composition de l'Univers primitif. La région térahertz fourmille donc de renseignements sur l'origine, l'évolution, l'environnement, la composition chimique de divers corps stellaires, planétaires ou galactiques.

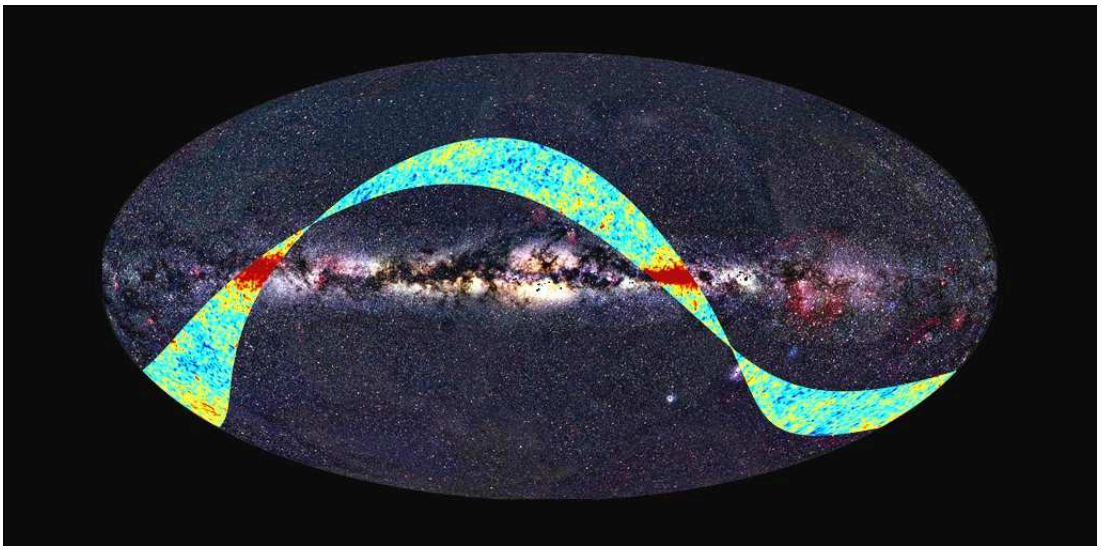


Figure 1.2 – Représentation de la voute céleste vue dans le visible avec en superposition une bande de ciel observée par Planck. Les fausses couleurs représentent les fluctuations de température du fond diffus cosmologique [5].

Suivant ces motivations, de nombreuses expériences ont permis de « voir » l'univers en térahertz, depuis des stations d'observation terrestre (de haute altitude) jusqu'aux satellites. Les premières missions ont été lancées par l'Union Soviétique avec Kosmos 669 (1974) et Salyut 6 (1978), rattrapée par les USA (NASA) une dizaine d'année plus tard avec notamment IRAS (1983) et COBE (1989), les plus connues du public et dont les données récoltées apportent en-

core de nouvelles découvertes. Alors que la détection bolométrique s'améliorait, de nombreuses autres missions ont vu le jour. Notons les deux réalisations les plus récentes et médiatisées : l'instrument MIRO (0.2 et 0.6 THz) à bord de la mission Rosetta qui sonde l'activité cométaire, et la mission Européenne Planck (2009, 30-70 GHz et 0.1-0.85 THz) qui a fourni la cartographie du fond diffus cosmologique la plus fine à ce jour (voir figure 1.2).

1.2.2 Les premières sources de laboratoire et les sources actuelles

Alors que l'astronomie n'a besoin que de détecteurs, les expériences en laboratoire nécessitent aussi une source. Les premières, de type corps noir (source Globar, lampes à mercure), ne dépassant pas l'échelle du picowatt, ont permis des études pionnières dès les années 1900, mais extrêmement fastidieuses et restreintes [6].

Au début des années 70, plusieurs groupes démontrent la faisabilité d'émission en infrarouge lointain par mélange de fréquences dans des cristaux non linéaires [7–10], jetant les toutes premières bases des méthodes actuelles de mélange de fréquences (DFG, Difference-Frequency Generation en anglais), d'amplification paramétrique et de rectification optique (OR, Optical Rectification). Mais la recherche en térahertz ne devient réellement attractive qu'avec la première proposition d'une source pulsée de laboratoire, fonctionnant à température ambiante : les antennes photoconductives (PCA en anglais). Celles-ci, d'abord proposées en gigahertz [11], atteignent le domaine térahertz grâce aux groupes d'Auston [12, 13] et Grischkowsky [14–16] à la toute fin des années 80. Presque simultanément la méthode de redressement optique (OR) est réalisée expérimentalement par le groupe de Zhang [17]. Ces deux méthodes sont jusqu'à aujourd'hui les plus utilisées, véritables catalyseurs pour l'expansion du domaine de recherche térahertz.

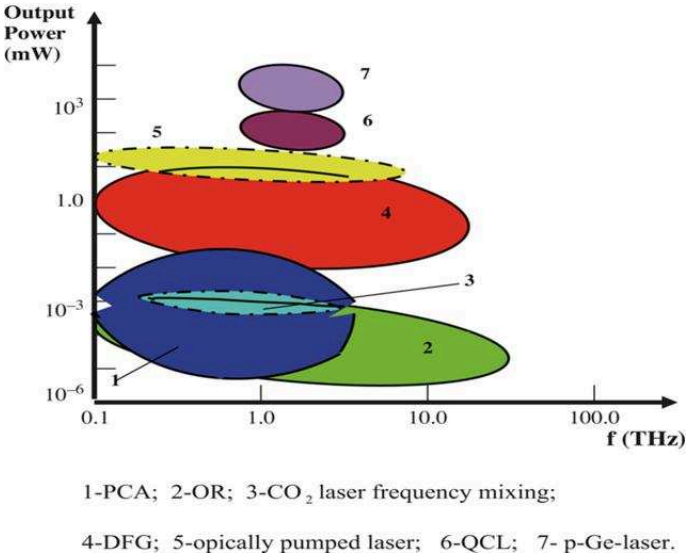


Figure 1.3 – Principales méthodes actuelles de génération de térahertz, selon la puissance fournie et les fréquences obtenables. Issu de [18].

La figure 1.3 présente les méthodes de génération térahertz les plus courantes à ce jour.

A plus basse puissance, on retrouve les **méthodes de génération sous forme pulsée**. Ces sources reposent sur une génération à partir d'une source femtoseconde :

— les antennes photoconductives (PCA, 1) sont composées de matériaux semi-conducteurs à temps de réponse très rapide, éclairés par le laser femtoseconde. L'impulsion optique incidente induit un courant transitoire. Les charges créées, accélérées puis réabsorbées émettent un rayonnement transitoire : une impulsion au spectre térahertz.

— le redressement optique (OR, 2) repose sur la perturbation du nuage électronique dans des cristaux, via des effets d'optique non-linéaire. Cette perturbation polarise transitoirement le cristal. La variation de polarisation rayonne un champs électromagnétique sous forme pulsée, au spectre térahertz.

Ces sources permettent un spectre large en térahertz, jusqu'à la dizaine de térahertz, mais des puissances très basses. Elles sont dites optoélectroniques de par le mélange des deux domaines.

D'autres sources permettent d'obtenir un rayonnement continu, de puissance identique ou supérieure :

— les sources par conversion de fréquence vers le bas (3, 4). La génération de différence de fréquence (DFG, Difference-Frequency Generation) est la plus répandue. Deux faisceaux de fréquences différentes se combinent dans un cristal hautement non linéaire ; la fréquence de sortie sera la différence entre les deux fréquences d'entrée. Le gain térahertz étant dépendant de la susceptibilité non linéaire de second ordre du cristal, la fréquence obtenue est réglable par modification des fréquences des faisceaux incidents.

— les lasers moléculaires pompés optiquement (5). Nous avons vu que les rotations moléculaires de molécules sous forme de gaz correspondaient à des niveaux d'énergie de l'ordre du térahertz (figure 1.1). En utilisant un faisceau optique de haute puissance comme pompe, on peut exciter un gaz spécifique, qui réémettra aux fréquences correspondant à ses niveaux discrets de transitions rotationnelles. La précision spectrale est bonne, la puissance intéressante, mais le choix des fréquences est gouverné par le gaz utilisé.

— les lasers à cascade quantique (QCL, Quantum Cascade Laser, 6), plus récents et très prometteurs. Dans un laser QCL, les électrons font des transitions entre des états liés, créés par des confinements quantiques dans des couches alternées ultraminces de matériaux semi-conducteurs. Du fait de l'état de confinement quantique, l'électron ne peut passer d'un état d'énergie à l'autre que par pas discrets, en émettant des photons. Par application d'une tension extérieure, la structure de potentiel obtenue forme « un escalier ». Les électrons descendent alors en cascade, émettant un photon à chaque « marche » de l'escalier. Dans des conditions très finement contrôlées, il est possible d'obtenir l'effet laser [19].

— les lasers p-Germanium, les plus puissants (7).

— les sources à électrons libres BWO (Backward Wave Oscillator) , parfois appelées carcinotron en Français du nom du modèle commercialisé par la société Thalès. Il faut plusieurs BWO et des multiplicateurs de fréquence pour dépasser les quelques centaines de gigahertz.

— des sources à base de diodes utilisées en radiofréquences ont aussi pu atteindre le bas de la gamme térahertz. Citons ici les multiplexeurs à diodes Schottky, qui réalisent une

multiplication de fréquence à partir des microondes typiquement jusqu'à 0,1 THz et moins de 100 mW. Des montages à base de diodes à effet de transit (diodes Gunn, IMPATT, RTD...) et de transistors ultrarapides ont aussi été proposés. Ces technologies supplantent lentement les BWO, bien que moins puissantes, de par leur compacité et leur simplicité d'emploi.

— enfin, des sources moins classiques permettent d'atteindre des puissances supérieures, jusqu'à quelques kilowatts. Ce sont les lasers à électrons libres ou les sources synchrotron. Ces deux méthodes requièrent un accélérateur de faisceau d'électrons, dont la trajectoire va être infléchie par des champs magnétiques intenses, générant un rayonnement térahertz. Ces sources sont plus rares, bien plus coûteuses et plus volumineuses.

En terme de détection, on peut réaliser soit une détection cohérente, résolue en temps et utilisée pour détecter les émissions pulsées, soit une détection incohérente, mesurant l'intensité des émissions pulsées ou continues. La détection cohérente est la plus couramment employée avec des antennes ou des cristaux non linéaires, suivant les mêmes principes que l'émission par PCA ou OR. Les détections incohérentes sont réalisées le plus souvent à partir de détecteurs thermiques, c'est à dire reposant sur la détection de l'échauffement créé par le rayonnement térahertz incident absorbé. On retrouve dans ces détecteurs thermiques :

— les bolomètres, constitués d'une plaque absorbante et d'un corps de référence à température constante, entre lesquels la différence est relevée par une thermopile. Les bolomètres les plus performants, notamment ceux utilisés en astronomie, nécessitent des refroidissements cryogéniques.

— les cellules de Golay, dans lesquelles un gaz dans un volume clos absorbe le térahertz. L'échauffement en provoque la dilatation, détectée par la déformation d'une membrane.

— les détecteurs pyro-électriques, basés sur un matériau présentant une (très faible) tension à ses bornes lorsqu'il est échauffé par absorption du rayonnement.

En émission continue comme en détection, des photodiodes et des transistors sont parfois aussi proposés. Leurs dimensionnements diffèrent des photodiodes et transistors classiques ; leur gamme de fréquence est très basse, limitée par la rapidité de réponse de ces éléments initialement développés pour des radiofréquences. De récents efforts ont permis de démontrer la possibilité d'atteindre des fréquences de coupure jusqu'au térahertz, mais ils restent marginaux.

1.2.3 La spectroscopie des solides et ses applications

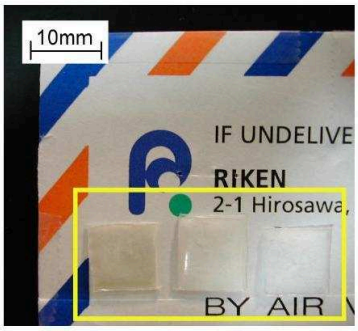
Malgré quelques travaux précurseurs, les applications spectroscopiques térahertz n'ont réellement émergé qu'avec l'apparition des sources pulsées. Dès lors, différents matériaux ont été explorés, et plusieurs tendances d'études se sont dégagées.

Les études de semi-conducteurs et matériaux diélectriques ont été les premières applications spectroscopiques. Le groupe de Grischkowsky a montré dès le début des années 90 que les sources pulsées qu'ils avaient eux-mêmes proposées permettaient de résoudre des dynamiques des porteurs de charge dans les semi-conducteurs [15,20,21]. De tels renseignements sont accessibles en térahertz grâce à des signatures spectrales spécifiques en térahertz de quasi-particules chargées (électrons « libres », trous, polarons, exciton...) c'est à dire les électrons et les trous mobiles au sein du semi-conducteur, dans plusieurs de leurs états possibles. Ce champs

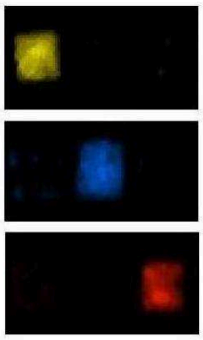
de recherche est toujours actif, appliqué aux semi-conducteurs, mais aussi aux supraconducteurs et plus récemment aux structures et nanostructures semi-conductrices [22].

Au cours des années 90, la spectroscopie térahertz sort du monde de la physique des semi-conducteurs. La recherche de signatures spectrales spécifiques pour divers composés solides est motivée par des applications potentielles dans la **reconnaissance d'éléments chimiques (drogues, explosifs, médicaments...)**, pour le domaine de la défense [23] et celui de l'industrie pharmaceutique [24] en premier lieu.

Mettant à profit la relative transparence des tissus, papiers, cartons et autres emballages secs non métalliques, un effort important a été initié au Japon quand à la reconnaissance de poudres illicites ou dangereuses dans des enveloppes postales. Une illustration des possibilités est montrée en figure 1.4. Ces systèmes, proposés au début des années 2000 [25] et en perpétuelle amélioration [26] sont encore trop lents pour permettre une analyse de toutes les enveloppes (plusieurs minutes par enveloppe). Cependant, les prototypes semblent prometteurs ; la limite est technologique sur l'émission et la détection.



(a) Échantillons avant leur positionnement dans une enveloppe épaisse.



(b) Images caractérisant les composés (MDMA, aspirine et méthamphétamine) par combinaisons de différentes caractéristiques d'absorption .

Figure 1.4 – Exemple d'application de la spectroscopie térahertz (entre 1 et 2 THz) à la détection non destructive de produits chimiques dans le courrier. Extrait de [25].

Dans l'industrie pharmaceutique, le térahertz s'est illustré par des travaux sur l'identification de défauts dans les gélules ou cachets, mais aussi la distinction de différentes petites molécules isoformes [24]. Un grand nombre de molécules a été exploré, toujours sous formes sèches, et la possibilité de distinguer les composés selon leurs différentes absorbances est démontrée. La caractérisation des films d'enrobage (épaisseur, qualité, granularité, défauts...) est également très étudiée, en réponse à un réel besoin de suivi qualité sur les chaines de production. En figure 1.5 est donné un exemple de tomographie sur une pastille simple.

L'énorme potentiel de tels systèmes est, à nouveau, limité pour le moment par les temps nécessaires d'acquisition. L'amélioration des sources et des détecteurs sera un point capital pour la réalisation de ces solutions dans le domaine industriel.

D'autres types de contrôles non destructifs ont été proposés, mettant toujours à profit la relative transparence des milieux diélectriques non polaires et non métalliques. Dans le domaine de l'art, des renseignements sur les pigments utilisés ou les préparations et composition de différentes couches de l'œuvre ont pu être donnés [28–30]. Dans l'industrie des polymères, le térahertz

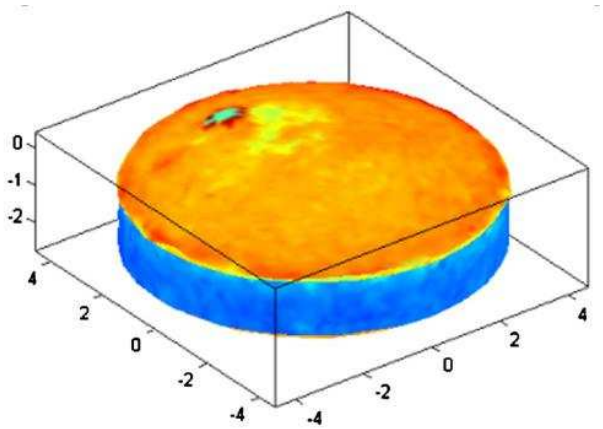


Figure 1.5 – L'enrobage d'une pastille reconstruit en 3D. Les fausses couleurs donnent l'épaisseur de cet enrobage (entre 100 et 180 μm) ; les échelles sont en millimètre. On peut voir un défaut sur la surface supérieure, et un enrobage plus fin sur le contour que sur les deux faces opposées. L'acquisition totale pour cette image demande environ 45 minutes. Extrait de [27].

permet un contrôle qualité des procédés et produits (PVC, joints en polyéthylène...) [31].

D'autres applications encore mettent à profit la sensibilité du rayonnement térahertz à la présence d'eau dans des produits où elle est peu désirable : par exemple dans les contrôles qualité de plastiques et composites [31], ou encore dans des gaufrettes [32].

1.2.4 La spectroscopie de biomolécules et les débuts des études biomédicales

Les études spectroscopiques ont atteint le domaine des biomolécules et des tissus biologiques autour des années 2000, malgré quelques travaux antécédents (surtout sur cristaux de molécules) [33].

La spectroscopie des biomolécules présente un intérêt tout particulier en térahertz . En effet, celles-ci sont (au naturel) dissoutes dans les milieux aqueux biologiques, et forment souvent des structures complexes par repliements, interactions de sous-unités, etc. Pour ce faire, elles établissent des liaisons faibles avec leur solvant (l'eau) mais aussi dans leur structure même pour maintenir leur intégrité. Or, comme nous l'avons vu en section 1.1, figure 1.1, ces interactions faibles et les modes intramoléculaires coïncident avec les fréquences térahertz. Par ailleurs, des modes vibrationnels collectifs des molécules sont aussi attendus en deçà d'1 THz [34, 35]. On s'attend donc à ce que les modifications de conformation, d'état d'hydratation, etc., induisent des modifications dans le spectre térahertz.

L'application de la spectroscopie térahertz aux biomolécules émerge réellement en 2000, avec une publication de Markelz et al. sur l'albumine, le collagène et l'ADN [36]. Dans ce travail est décrit un comportement spectroscopique des protéines sans signature spectrale, par la suite confirmé par de nombreuses études en deçà de 3 THz au moins [3, 37]. Seuls certains acides-aminés et sucres semblent montrer des pics d'absorbance caractéristiques [38]. L'interprétation générale est que les molécules de grande taille ont des modes denses, se recouvrant mutuellement [37]. Il est progressivement démontré que même en absence de signatures spectrales, les études spectroscopiques dans cette région permettent de distinguer des protéines de forme na-

tive de leur forme dénaturée, de plusieurs de leurs conformations fonctionnelles [39, 40], ou de leurs formes mutées [39]. Par exemple, les formes réduites et oxydées du cytochrome c peuvent être distinguées spectroscopiquement par un net changement d'absorbance entre l'état réduit et oxydé [41]. La bacteriorhodopsine est également un cas intéressant : cette molécule d'origine bactérienne se conduit comme une pompe à protons activée par la lumière. En l'extrayant et l'exposant ou non à une illumination, il a été démontré une augmentation de l'absorbance de la forme photoactivée comparativement à la forme inactive (non illuminée) [40]. Ces modifications d'absorbance sont montrées en figure 1.6, ainsi que la dépendance à la température attendue du fait de la modification de l'agitation moléculaire générale. Pour l'ADN, des travaux récents démontrent également la possibilité de distinguer un changement d'une seule base (plus petite mutation génétique possible) dans une séquence courte [42].

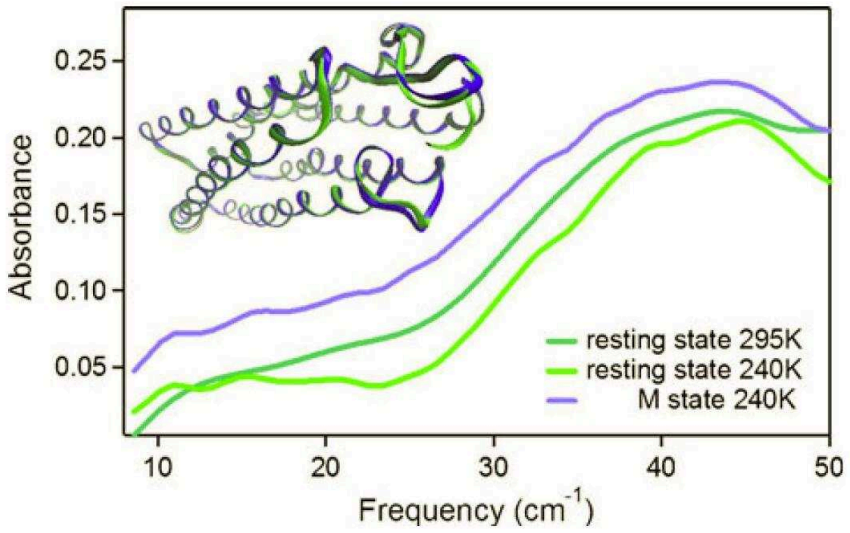


Figure 1.6 – Illustration de la dépendance de l'absorbance entre 0.1 et 1.5 THz à la conformation fonctionnelle (vert clair contre violet) ou la température (vert clair contre vert sombre) d'un film de bacteriorhodopsine purifiée. Tiré de [3].

Ces études portent toutes sur des échantillons lyophilisés, cristallins, en poudre compressée ou en film fin. Au-delà des difficultés techniques liées à la réalisation de telles préparations, le grand problème est que ces études se font dans des conditions non hydratées, non physiologiques. Or la solvatation est capitale pour la conformation d'une molécule et la réalisation de sa fonction. On voudrait donc accéder aux renseignements spectroscopiques des biomolécules quand elles sont dans leur état physiologique, sachant que leur solvant va avoir une importante influence sur leur état. Mais l'eau liquide, solvant polaire, possède une profusion de modes actifs dans le domaine térahertz. Leurs participations spectroscopiques vont en grande partie « cacher » celles des molécules dissoutes. Des équipes ont proposé d'étudier des solutions gelées (Terahertz Freeze-Out Spectroscopy), diminuant l'absorbance en réduisant les mouvements de l'eau et des molécules. Elles ont pu en tirer des renseignements intéressants [43, 44] mais reposant intrinsèquement sur l'altération du comportement des molécules. On ne peut pas, par ailleurs, essayer de simplement soustraire la grande participation de l'eau en prenant ses valeurs brutes (eau pure), car les pro-

priétés spectroscopiques de l'eau ne vont pas rester homogènes dans la solution. En effet, les modes de vibration de l'eau vont être modifiés dans le voisinage de la molécule dissoute.

Les études spectroscopiques de biomolécules en solution ne vont donc pas pouvoir donner forcément accès à des renseignements de même nature que celles sur biomolécules à hydratation nulle ou très faible. Nous verrons en chapitre 5 que plusieurs équipes ont démontré à partir de 2006 [45–47] la possibilité d'explorer les effets de solvatation. Cette approche de spectroscopie en solution a permis au cours des dix dernières années d'accéder à des renseignements tels que l'épaisseur de la couche d'hydratation autour des molécules. Par exemple, Shiraga et al. ont démontré pouvoir accéder aux nombres de molécules d'eau impliquées dans la couche d'hydratation autour de différents sucres, et ont corrélé l'état d'hydratation aux nombres de groupes hydroxyles et à l'état stérique des molécules [48,49].

La spectroscopie des tissus a quand à elle débutée à la fin des années 90 avec les travaux de Mittleman, et de Fitzgerald, Berry et Chamberlain. Ceux-ci ont exploré plusieurs types de tissus (gras, muscle, peau...), suggéré des explications quant aux variations d'indice observées [50] et proposé un catalogue de données spectroscopiques [51,52] . La peau a été le premier tissu exploré, in vivo comme in vitro, grâce à sa facilité d'accès et à la possibilité d'imager en réflexion sans perdre trop de signal [53]. En synergie avec ces travaux de caractérisation, la première preuve de principe d'une application biomédicale est proposée par Woodward, Pepper, Wallace et al., qui montrent la distinction possible d'un carcinome de la peau qui l'entoure [54] ou encore entre une peau saine ou brulée. Ces résultats historiques ont ouvert un pan entier de la recherche biomédicale en térahertz, exposé plus loin en section 1.3.

1.2.5 Résumé

Succinctement, on peut donc comprendre le développement du domaine de recherche térahertz par les contraintes fortes liées aux technologies et à ses caractéristiques particulières vis à vis de l'eau. Le premier domaine d'application a été l'astronomie, où seuls des détecteurs étaient nécessaires, pour accéder aux renseignements passionnants cachés dans les émissions térahertz spontanées de l'Univers. Le domaine de la spectroscopie en laboratoire a été ouvert grâce au bond technologique représenté par les nouvelles sources pulsées en 1989-1990. A compter de ce moment, l'étude des objets non hydratés explose, tant par nécessité exploratoire que déjà pour des applications dans le domaine des semi-conducteurs, des polymères, de la défense.... Cependant, de par la très forte absorbance de l'eau en térahertz et du retard technologique du domaine, les investigations spectroscopiques des biomolécules et objets biologiques ne débutent réellement que 10 ans après, et encore bien souvent sur des objets entièrement ou partiellement déshydratés. A l'heure actuelle un effort d'investigation des échantillons hydratés est réalisé, et l'amélioration des sources permet progressivement de rendre la perte de signal due à l'eau moins critique. L'état, la présence et la quantité d'eau est à la fois source de renseignements et obstacle au développement des méthodes : la médaille et son revers.

1.3 Le térahertz pour la biologie et le biomédical

Dans cette section est donné un aperçu de la recherche biomédicale actuelle dans le domaine térahertz. Ceci nous permet de contextualiser les motivations exploratoires de ce travail de thèse, exposées dans la section 1.4 qui suivra.

1.3.1 L'imagerie biomédicale

L'imagerie biomédicale est le premier champs d'application du térahertz en biologie, avec un essor impressionnant au cours des dix dernières années. Ces études utilisent le plus souvent le contraste intrinsèque des tissus en lumière térahertz. Ce contraste intrinsèque viendrait de l'inhomogénéité de répartition de l'eau (à laquelle le térahertz est si sensible), mais aussi, dans une moindre mesure, de différences structurelles [55], bien que ce phénomène ne soit pas encore complètement compris.

L'imagerie et la discrimination de tissus cancéreux est le principal axe de recherche [38,56], et ce depuis les démonstrations de principe au début des années 2000 évoquées en sous-section 1.2.4. Une grande partie est encore en phase de tests ex vivo, avec un effort général de comparaison et valorisation des techniques térahertz comparativement à la référence que sont les coupes histopathologiques. Les études ex vivo se font encore très souvent sur échantillons gelés [57,58], en moindre nombre fixés [59] ou inclus dans de la paraffine [59,60] pour surmonter les effets de forte absorption par l'eau. La plupart des systèmes utilisent une géométrie de réflexion, et sont capables de distinguer entre le gras, les zones saines et les zones tumorales, avec des résolutions de l'ordre du 50 à 500 µm. Les images en amplitude simple sont utilisées, mais de nettes améliorations en résolution ont été atteinte en contraste de phase ou en champs proches.

Un bon exemple des capacités actuellement atteintes est montré en figure 1.7, où les tissus sains et le gras sont distingués des cellules d'un carcinome infiltrant, dans une coupe de tissu mammaire (récupéré après mastectomie), avec une résolution proche de 100 µm [60]. En dehors de la préparation des échantillons, les temps d'acquisitions sont encore le point noir de telles techniques. Sur l'exemple pris en figure 1.7, une acquisition produisant les trois images b à d prend un quart d'heure, mais pour obtenir la résolution des agrandissements l'ensemble de l'image demande près de quatre heures d'acquisition. De récentes études ont par ailleurs montré d'excellents résultats sur tissus fraichement excisés [61–63], et de premiers essais (encore très invasifs) ont été réalisés *in vivo* sur des souris [64].

Un domaine a également récemment émergé : **le suivi de brûlures de la peau**. Le bon contraste obtenu et la facilité d'accès à la peau ont permis une étude prometteuse in vivo chez le rat [65], après de nombreuses études *ex vivo* et *in vivo* de la peau « normale » [53,66]. Ce champs est particulièrement stimulé par l'absence à ce jour d'outils de diagnostic non invasifs de la gravité des brûlures de la peau, ou de suivi de l'évolution de la cicatrisation. D'autres applications liées à la peau ont été proposées, comme le suivi de diffusion de drogue après application cutanée [67] ou la visualisation de la vascularisation [68].

Plus marginalement, de la tomographie sur des os humains [69] ou encore de l'imagerie ex vivo de cartilage [70] et de foie cirrhosé [55] ont été réalisées.

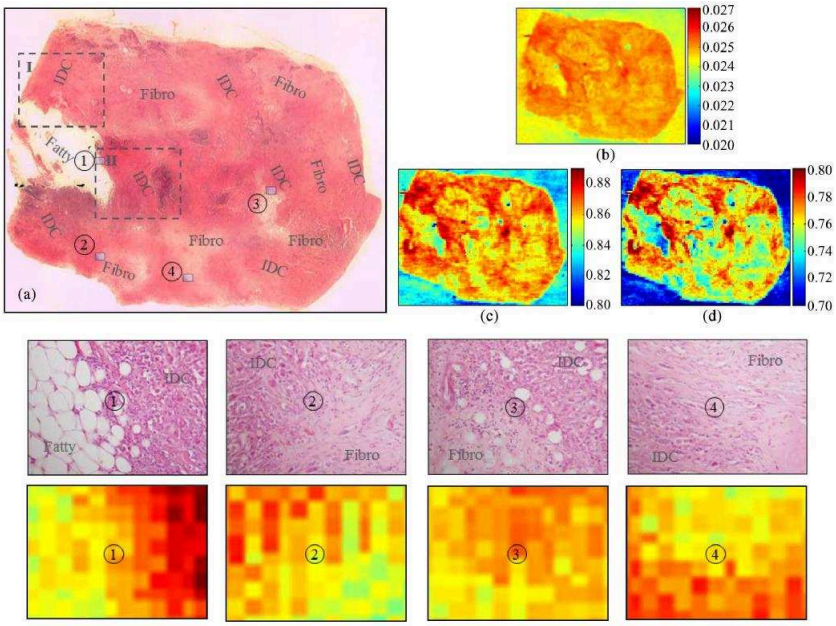


Figure 1.7 – Coupe histopathologique (a) et images térahertz en réflexion, en amplitude du signal large bande (b) ou pour des fréquences précises (c,d), de tissu mammaire. Les zones de tissu sain (gras -fatty- et tissus fibroglandulaire -fibro-) présentent un contraste intrinsèque entre eux et relativement aux zones cancéreuses (IDC, Infiltrating Ductal Carcinoma). Des agrandissements sont effectués sur les bordures entre différentes zones (1-4) pour montrer la bonne corrélation entre le contraste térahertz (même contraste qu'en c) et l'image histopathologique. Depuis [60].

1.3.2 La détection de biomolécules, microorganismes et cellules

La sensibilité du rayonnement térahertz à l'eau et ses solutés a permis plusieurs preuves de concept de biocapteurs dédiés à la détection de biomolécules ou de microorganismes sans aucun marquage. Des détections d'ADN en solution ont pu être réalisées à des concentrations de 0.1 mg/L dans des volumes de 10 µL [71]. Beaucoup de développements actuels reposent sur une amélioration de la sensibilité grâce à des structures résonnantes, sensibles à la concentration ou à l'hybridation d'ADN ou d'ARN [72, 73]. La détection de sucres dans des sodas ou d'autres solutions [74], mais aussi la détection et quantification de globules rouges ouvrent de potentielles applications pour l'étude du sang non préparé [75, 76].

La détection peut aussi être utilisée dans le cas de liaisons d'agents à détecter (molécule, organisme) avec une surface fonctionnalisée (anticorps spécifiques). Ce principe a permis à la détection de microorganismes (bactéries, champignons) de passer d'études basées sur des solutions très concentrées [77], voire des dépôts séchés [78], à de la détection en solution à faible concentration [79, 80].

En figure 1.8 on voit un principe de fonctionnement d'une telle détection, basée sur la modification du pic d'absorbance d'un capteur à base de métamatériau, fonctionnalisé avec un anticorps fixant la bactérie E. Coli. La détection est plus sensible, mais aussi potentiellement très spécifique selon le choix de la fonctionnalisation. Ce domaine encore à ses débuts semble très prometteur, bien que les seuils de détection soient encore trop élevés pour une application immédiate de tels prototypes. En effet, le seuil de détection reste de l'ordre de 10^4 ufc/ml [1] au

1. ufc signifie unité formant colonie. La solution contaminée est grandement diluée, puis un volume connu est

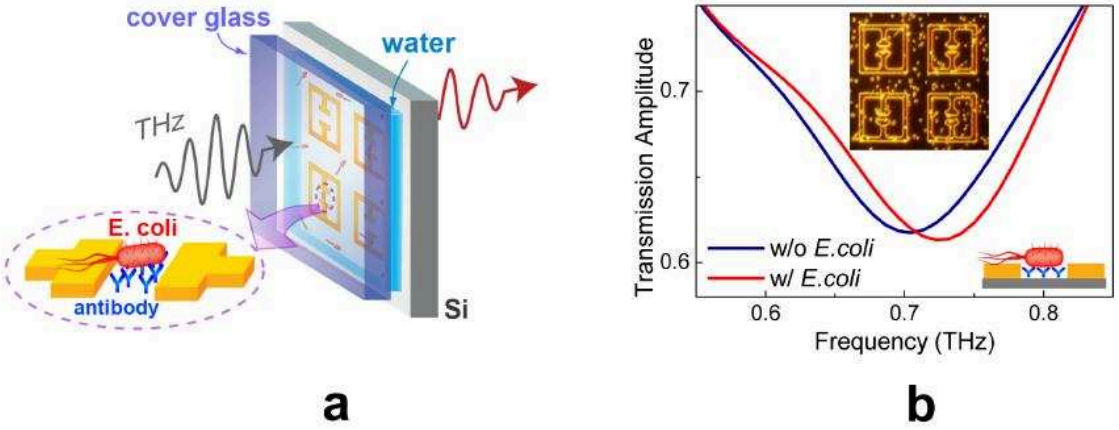


Figure 1.8 – Schéma de principe (a) et exemple de signaux avec ou sans présence d'E. Coli dans la structure centrale du métamatériau (b). Extrait de [80].

mieux [79], à comparer aux 0 à une dizaine de ufc/ml donnant les limites actuelles de qualité de l'eau (potabilité, baignade..) selon l'arrêté du 22 septembre 2008.

1.3.3 La caractérisation des états et formes cellulaires

Alors que leur détection est encore souvent un défi, quelques équipes ont démontré la possibilité de caractériser différents états des microorganismes ou cellules. Des études réalisant des caractérisations après préparation (séchage, concentration..) d'échantillons ont déjà fourni des renseignements intéressants, par exemple le taux de bactéries tuées après traitements thermiques [78]. Cependant, ces études doivent idéalement être menées en conditions physiologiques pour permettre d'obtenir des renseignements sur la forme, la taille et la composition, qui soient précis et d'intérêt pour les biologistes, sans risque de dégradation par ces préparations. Travailler en conditions physiologiques permettrait par ailleurs de valoriser la non-invasivité du térahertz et de suivre des échantillons au fil du temps *in vitro* ou *in vivo*. De tels travaux sont très rares dans le domaine térahertz.

Une étude [81] a rapporté pour la première fois la caractérisation spectroscopique de différents types cellulaires en conditions physiologiques, il y a deux ans. Ils démontraient une plus faible absorbance des cellules que leur milieu extracellulaire, d'amplitude variant avec le type cellulaire. L'hypothèse avancée mais non prouvée est que certains types cellulaires étaient plus riches en macromolécules, source supposée de contraste. Il avançaient également la possibilité de distinction spectroscopique des cellules cancéreuses des cellules saines, mais selon des modalités encore trop lourdes par rapport aux possibilités démontrées dans le domaine connexe des micro-ondes [82], surtout du fait du retard technologique encore existant entre les deux domaines.

Une autre étude [83] a démontré la possibilité de caractériser des petits changements structurels dans les cellules « en conditions physiologiques » (*sic*), non visibles au microscope ou par mesure d'impédance cellule-substrat. Cependant, cette étude illustre parfaitement l'éternel problème de l'absorption par l'eau et des solutions proposées inadaptées à l'objet biologique. En effet,

étalé sur boite de Pétri. Après incubation les colonies observée à l'œil sont dénombrées, et on considère que chaque colonie correspond à une bactérie initialement déposée. 1 ufc/ml est donc a priori égale à 1 bactérie/ml.

les cellules étudiées sont vivantes et en conditions physiologiques... puis la surface de culture est séchée à l'air libre pour ensuite être pouvoir être imagée à la verticale dans un montage térahertz en transmission.

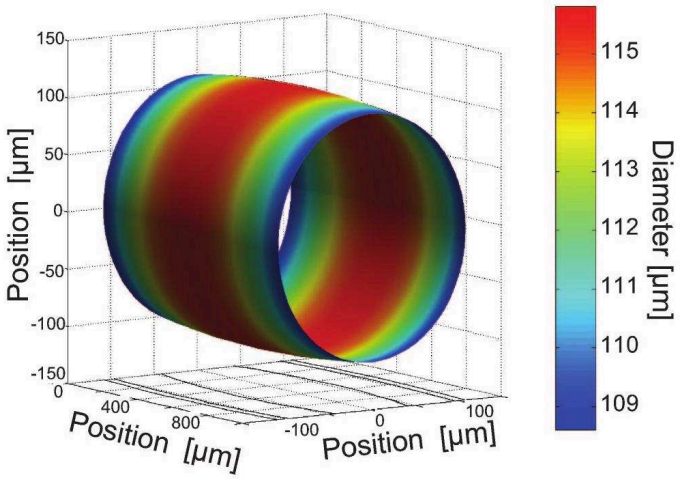


Figure 1.9 – Reconstitution 3D de l'enveloppe d'un axone de verre de terre, et observation d'une variation de son diamètre. Issu de [84].

Dans notre équipe, des preuves de principe ont été avancées, exposées en section 1.4. Une d'entre elles concerne l'étude de l'état et de la forme cellulaire. La microscopie de champs proche dans le domaine térahertz a été utilisée pour reconstituer le diamètre d'un axone (figure 1.9), avec ou sans action d'une neurotoxine et pour différentes températures [84]. Les résultats démontraient une sensibilité de l'ordre du micromètre au diamètre de l'axone. L'étude était réalisée sur un axone extrait (partie tubulaire du neurone) et non pas sur le neurone vivant, mais l'axone est connu en électrophysiologie pour conserver ses propriétés longtemps après extraction. L'axone était placé entre lamelles de verre, baignant dans un milieu physiologique. Cette « préparation » permet une étude simplifiée mais tendant vers des conditions de cellule vivante.

1.3.4 La question de l'invasivité : bilan actuel

La question de l'invasivité du rayonnement térahertz n'est pas récente ; dès les années 70, quelques études ont été réalisées malgré l'immaturité des sources térahertz. Les résultats déjà contradictoires laissaient augurer un vaste débat.

Il convient, comme dans toutes les gammes d'onde, de séparer les effets thermiques des effets non-thermiques.

Les effets thermiques ont été rapportés par quelques publications, pour des tissus [85] ou des cellules [86,87]. Ces effets apparaissent généralement pour des expositions à des rayonnements térahertz de plus de 30 minutes à des irradiances d'à minima plusieurs dizaines de mW/cm^2. Les tissus et les cellules présentent alors des échauffements de plusieurs degrés, proportionnels à la puissance, et montrent des réactions de stress, des changement de morphologies, jusqu'à éventuellement la mort cellulaire. Le seuil d'endommagement thermique (ED50 : probabilité de 50% de dommages définitifs) est rapporté à 2 secondes à environ 7 W/cm^2 (0.1-1 THz) pour de la peau de chamois [85] et plus de 20 secondes à 0.23 W/cm^2 (2.52 THz) pour des cellules

humaines (Jurkat, lymphocytes T humains immortalisés) [86]. Ces données sont cohérentes avec les modélisations classiques, et ne provoquent guère controverse ou inquiétude. Par comparaison, les sources classiques utilisées en spectroscopie en laboratoire ne dépassent que difficilement le microwatt, tout comme la plupart des instruments proposés commercialement [18].

La discussion devient plus délicate autour d'**éventuels effets non-thermiques**. La question est : « Existe-t-il des effets des ondes térahertz pour des irradiances et des temps d'exposition faibles, via d'autres mécanismes que l'échauffement global ? ». Plusieurs équipes ont proposé des résultats différant grandement, dans un débat qui manque encore de sources et méthodes standardisées.

A l'échelle de l'organisme, une petite douzaine d'études ont été réalisées à ce jour [88]. Toutes signalent un effet du térahertz pour de faibles irradiances et de temps inférieurs à 3h. Les effets signalés vont de la stimulation de la guérison de brulures [89] à l'induction de coagulation, fibrinolyse et agrégation de plaquettes [90–93]. Cependant, il est impossible d'en tirer de réelles conclusions pour le moment. Une seule étude à été réalisée sur l'Homme, et elle n'apparait qu'en revue de conférence il y a plus de 10 ans, sans suite. Les études sur rats et humains ont toutes été menées par la même équipe, sans répétition par une autre équipe à ce jour. Celles sur drosophiles et plantes qui ne relèvent a priori pas de l'effet thermique sont toutes antérieures aux années 90, sans suite depuis.

C'est à l'échelle cellulaire que les données sont les plus nombreuses, mais aussi contradictoires. A partir des années 2000, de nombreux groupes se sont intéressés à ces éventuels effets non-thermiques du térahertz. Le projet européen « Térahertz BRIDGE » (2001-2004) a initié le mouvement, en rassemblant dix équipes autour d'expériences portant notamment sur l'effet du térahertz sur des liposomes, cellules et ADN [**?**]. Elles concluaient à un effet certain sur la perméabilité des liposomes. Malheureusement, aucune équipe n'a quantifié les variations de températures durant exposition. Plus récemment, de rares études ont implémenté un suivi fin de la température, et plus rarement encore de l'expression de gènes spécifiques au stress thermique (expression des Heat Shock Protein). Parmi celles-ci, trois signalent des effets de modulation de la synthèse protéique et/ou des effets génotoxiques au cours de la réplication cellulaire pour des expositions de plusieurs heures à des rayonnements en deçà de 2 mW/cm^2 [94–96]. Inversement, d'autres études montrent pour de mêmes conditions d'exposition une absence total d'effets (expression génétique, viabilité, état de l'ADN...) [97–101].

La réponse à ce débat demandera malheureusement un meilleur développement des outils dosimétriques, une standardisation et un effort pour le développement d'études plus approfondies sur le plan biologique. L'ordre de grandeur du mW/cm^2 n'est pas atteint par les deux types de dispositifs de génération/détection les plus couramment utilisés (PCA et OR, ~10^{-3} mW, cf figure 1.3). Cependant, avec l'émergence des nouvelles sources (notamment les lasers QCL) plus puissantes et leur probable future popularisation, ainsi que l'ouverture des applications en biomédical, la question deviendra plus sensible et certainement plus largement étudiée.

1.4 Motivations exploratoires

Nous avons pu voir au cours de ce chapitre que l'eau est encore souvent vue comme un élément gênant par son absorbance si importante. Cependant, si celle-ci est surmontée, le domaine térahertz est riche en informations sur l'état de l'eau, modifié par ses conditions physico-chimiques et surtout par la présence d'éléments dissous. Dans des objets biologiques, particulièrement riches en eau, on peut s'attendre à ce que le rayonnement térahertz soit sensible aux concentrations de molécules, et donc aux asymétries de répartition éventuelles de ces molécules, source de contraste pour un dispositif d'imagerie térahertz. Une telle asymétrie perturbée peut donner accès à des dynamiques d'échanges, par exemple entre intérieur et extérieur d'une cellule. Si la résolution du dispositif d'imagerie est suffisant, l'asymétrie source de contraste permet aussi d'accéder aux dimensions des objets, par exemple les dimensions d'une cellule.

Les démonstrations de principe précédentes dans l'équipe donnaient les ions comme étant les molécules dont l'asymétrie de répartition était source de contraste.

— sur un axone extrait, comme nous l'avons vu en 1.3.3, l'asymétrie de répartition des ions de part et d'autre de la membrane et un système d'imagerie en champs proche ont permis d'accéder à une information de dimensions (diamètre de l'axone) et à celle d'échanges (eau, ions) lors de l'application d'une neurotoxine perturbant l'équilibre ionique. C'est plus précisément l'asymétrie de répartition des ions potassium qui était majoritairement source du contraste ; à l'état physiologique d'équilibre, ces ions sont quarante fois plus concentrés à l'intérieur de l'axone qu'à l'extérieur. L'ion sodium possède une répartition inverse, mais absorbe beaucoup moins que l'ion potassium en solution : l'intérieur de l'axone absorbe donc de façon plus importante que son milieu physiologique environnant.

— un travail spectroscopique sous-jacent a été effectué pour démontrer l'importante absorbance de solutions de KCl comparativement à celles de NaCl, et de façon plus générale pour explorer la sensibilité du térahertz à un très grand nombre d'ions.

— sur une fibre musculaire (auriculaire) extraite d'un cœur de grenouille et disposé dans un liquide physiologique, le même montage de champs proche a permis de suivre la contraction musculaire (spontanée). L'enregistrement des potentiels d'action générant cette contraction étaient acquis en parallèle. L'enregistrement térahertz avait une résolution de 10 ms ; la forme des signaux correspondaient bien aux dynamiques d'échanges ioniques connues, sous-jacentes au potentiel d'action à la surface de la membrane de la cellule musculaire cardiaque. Des événements normaux ou arythmiques ont pu être distingués, comme exposé en figure 1.10.

Dans la continuité de ces démonstrations de principe, notre objectif est de sonder des cellules vivantes, en conditions physiologiques, en mettant à profit la non-invasivité du térahertz (aux puissances que nous utilisons en tous les cas). Le contraste, *a priori* ionique, entre intérieur et extérieur des cellules devrait nous permettre d'accéder aux dynamiques d'échanges lors de perturbations telles que la perméabilisation transitoire des cellules. L'objectif initial à long terme d'une telle étude était de suivre les brusques échanges ioniques au cours de l'électroperméabilisation de cellules. Mais comme nous l'avons vu en section 1.3.3, la simple détection de ces cellules peut déjà être complexe, à la fois par l'absorbance importante de l'eau mais aussi par leur petite taille (ordre de la dizaine de micromètres). Les travaux précédents de l'équipe

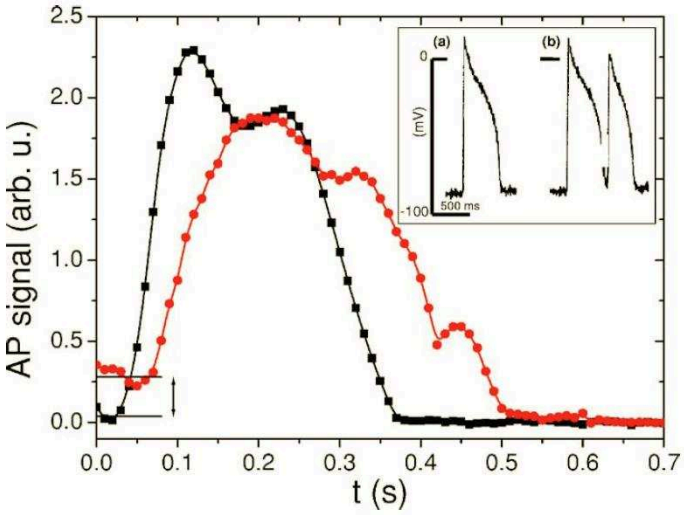


Figure 1.10 – Le signal térahertz, de forme proche du potentiel d'action (insert), pour une contraction normale (courbe noire) ou une contraction arythmique (courbe rouge) [102].

portaient jusqu'à présent sur des objets de dimensions millimétriques en longueur et de diamètre de l'ordre d'au moins une centaine de micromètres. Pour réaliser la détection des cellules, le doctorant précédent a mis en place un nouveau montage d'imagerie en réflexion. Bien qu'il n'ai pas eu le temps d'implémenter l'étude des cellules sur ce montage, il en avait démontré le bon fonctionnement et les possibilités en imagerie de contraste de phase sur un objet métallique [103].

Mon travail de thèse est exposé dans ce manuscrit suivant la logique du développement d'un outil pour la biologie, de sa caractérisation théorique (chapitre 2), expérimentale (3 et 4) jusqu'à son utilisation (5). Le chapitre 2 concernera la caractérisation théorique du montage d'imagerie, afin de démontrer son adéquation pour l'étude des cellules vivantes. Le chapitre 3 concernera la démonstration expérimentale de sa capacité à détecter les cellules, ainsi qu'une démonstration de l'origine du contraste permettant la discrimination des cellules de leur milieu physiologique. Nous verrons que la source de contraste n'est pas majoritairement ionique, mais créée par d'autres biomolécules. En chapitre 4 nous caractériserons plus finement ce contraste, en explorant ses origines spectroscopiques. Une fois ses caractéristiques (sensibilité, spécificité...) dégagées, nous en proposerons son application en chapitre 5, pour étudier différentes perturbations appliquées aux cellules, notamment dans une étude des phénomènes d'électroporation ou encore de perméabilisation chimique.

Chapitre 2

La réflexion interne totale atténuée (ATR) en térahertz pour la biologie

Sommaire

2.1 Limites des géométries en champs proche et transmission **30**

2.2 Dimensionnement général d'un montage d'imagerie térahertz en réflexion . . . **31**

2.2.1 Modèle et valeurs indices utilisés 31

2.2.2 Influence de l'angle d'incidence - Optimisation du signal réfléchi 34

2.2.3 Influence des variations réalistes d'indice - Optimisation du contraste . 35

2.2.4 L'équilibre signal/contraste - Optimisation de la sensibilité 38

2.2.5 Optimisation sur notre propre montage 39

2.2.6 Un autre avantage de l'ATR : une meilleure sensibilité aux petits objets 41

2.3 La réalisation de notre montage expérimental ATR **43**

2.3.1 Un montage TDS classique pour la génération et détection du térahertz 43

2.3.2 Caractéristiques réelles d'acquisition 45

Ce chapitre vise à expliciter les raisons du choix d'un montage en réflexion interne totale, pour l'étude des objets biologiques, et plus spécifiquement pour notre cas d'étude de cellules vivantes. Suivant les motivations détaillées en section 1.4, nous cherchons les paramètres théoriques d'un montage apte à établir un contraste suffisant entre différents milieux biologiques proches - pour *in fine* étudier les variations de composition de ceux-ci.

Le raisonnement suivi ira du cas général jusqu'au cas particulier. Nous verrons d'abord les limitations des montages en géométrie de champs proche ou de transmission pour l'étude d'objets biologiques, en section 2.1, qui nous mènera à favoriser la géométrie en réflexion. La section 2.2 consistera, après avoir dégagé les variations typiques d'indice entre différents objets biologiques, à définir les paramètres de réflexion les plus intéressants pour obtenir le contraste voulu entre eux. Ceci se fera grâce à l'utilisation d'un modèle théorique permettant de relier les variations d'indices aux variations d'amplitude du signal attendu. Nous analyserons plus finement ces paramètres dans notre cas particulier de variation d'indice entre un liquide physiologique et des cellules, pour aboutir à la caractérisation théorique du montage d'imagerie utilisé expérimentalement. Enfin, en section 2.3 nous détaillerons le montage expérimental dans son ensemble. En progressant du cas général jusqu'au cas spécifique de notre montage, ce chapitre permettra d'en montrer les avantages concernant la sensibilité théorique obtenue. Il mène jusqu'au chapitre 3, dans lequel le contraste térahertz entre cellules et milieu physiologique est démontré et étudié expérimentalement.

2.1 Limites des géométries en champs proche et transmission

Les échantillons biologiques sont particulièrement riches en eau, solvant universel du vivant. Or le térahertz est particulièrement sensible à l'eau, comme nous l'avons vu au cours du chapitre introductif (section 1.1). En termes spectroscopiques, les échantillons riches en eau ont de très importants coefficients d'absorption.

Nous définirons l'indice complexe par $\hat{n} = n - i\kappa$ avec $\kappa = (2\alpha c)/\omega$ où α est le coefficient d'absorption en intensité (double du coefficient d'absorption en amplitude), n l'indice réel et ω la pulsation. Quelques exemples d'indices sont indiqués dans le tableau 2.1, extraits de [51]. On retrouve un coefficient d'absorption variant, de façon attendue, avec la teneur en eau du tissu. Cette perte de signal est le revers de la médaille pour une grande sensibilité à l'eau, et indirectement à ses composés qui interagissent avec leur solvant. Notre attente principale est justement de trouver, grâce à la sensibilité du rayonnement térahertz à la présence de l'eau et ses solutés, le plus important contraste entre des objets biologiques riches en biomolécules et une référence qui en est dépourvue. Plus ce contraste est important, mieux nous pourrons suivre les compositions des échantillons biologiques (et leur évolution éventuelle).

Dans ce cadre, imager des objets biologiques est parfois une gageure. On retrouve un grand nombre d'études sur des échantillons déshydratés ou de très faibles épaisseurs, comme vu au cours du chapitre 1 (partie 1.2.4). Cependant, l'étude d'objets biologiques doit tendre vers des conditions plus physiologiques, plus réalistes. L'adaptation du montage à l'objet biologique, et non l'inverse, est alors la clef.

Parmi les techniques proposées en térahertz, l'imagerie en transmission parait adaptée uniquement à un nombre restreint d'objets, puisque leur épaisseur doit être très faible, et surtout

@1 THz	n (dev. standard)	κ
Eau déionisée	2.04 (0.07)	0.525
Peau	1.69 (0.39)	0.239
Tissu adipeux	1.58 (0.58)	0.239
Muscle strié	1.79 (0.54)	0.310

Tableau 2.1 – Indices de quelques tissus humains issus de [51].

très contrôlée (à l'échelle du micromètre) pour des raisons de reproductibilité. On considère parfois la limite haute de 500 µm d'épaisseur au-delà de laquelle l'utilisation d'une autre géométrie est indispensable [104]. La profondeur de pénétration maximale détectable selon le bruit existant sur le montage peut être estimée par l'équation (2.1), à partir du rapport signal à bruit (RSB). Dans le cas d'un échantillon de muscle par exemple, à 1 térahertz et compte tenu le rapport signal sur bruit de notre propre montage (environ 140), nous ne pourrions dépasser une épaisseur de 1,5 mm sans perdre totalement le signal.

$$d = \frac{1}{\alpha}\ln(RSB) \tag{2.1}$$

Des microscopes de champs proches ont aussi été proposés [102, 105]. Bien que permettant d'atteindre des résolutions intéressantes, bien en deçà de la limite de diffraction rencontrée en transmission, ces microscopes sont actuellement restreints dans leur application par leur complexité de mise en place et calibration, et par la difficulté de disposition de la sonde au plus proche de l'échantillon. Leur utilisation se limite à des objets fins ou à la seule surface de l'échantillon.

Face à ces limites des autres géométries, la mesure en réflexion sur des échantillons biologiques est donc envisagée en section 2.2, pour dégager ses caractéristiques et paramètres critiques.

2.2 Dimensionnement général d'un montage d'imagerie térahertz en réflexion

Nous cherchons un montage en réflexion permettant d'étudier des objets biologiques avec le moins de perte de signal, mais aussi le meilleur contraste entre les objets et une référence (milieu pauvre en biomolécules). L'optimisation de l'angle d'incidence se fera en s'appuyant sur un modèle théorique et des valeurs spectroscopiques typiques issues de la littérature (2.2.1). Les critères optimisés seront la quantité de signal réfléchi (2.2.2) et le contraste attendu (2.2.3). L'équilibre entre l'optimisation de ces deux critères sera abordé dans le cas général (2.2.4), puis dans le cas particulier de notre montage (2.2.5).

2.2.1 Modèle et valeurs indices utilisés

Pour établir les valeurs attendues de signal réfléchi (donc détecté) et de contraste entre des objets biologiques et une référence, un modèle simple est utilisé. Afin de restreindre le champs de comparaison, seules les mesures d'amplitude du signal sont abordées. Les valeurs en intensité sont naturellement obtenues en prenant le module du carré des amplitudes.

Pour quantifier l'importance du signal réfléchi, nous utilisons la réflectivité |r|. Celle-ci est définie par le module du rapport de l'amplitude complexe du signal réfléchi $\bar{E}_r$ sur l'amplitude

complexe du signal incident $\bar{E}_i$ (figure 2.1 et équation (2.2)). Elle prend ses valeurs entre 0 (aucun signal réfléchi) et 1 (tout le signal incident est réfléchi).

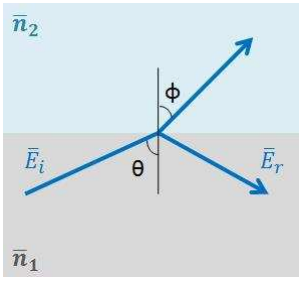


Figure 2.1 – Schéma des notations utilisées pour un rayonnement incident à un angle θ, réfléchis à un même angle et réfracté à un angle ϕ.

$$|r| = \left|\frac{\bar{E}_r}{\bar{E}_i}\right| \tag{2.2}$$

Cette réflectivité est dépendante de plusieurs paramètres, et peut être calculée grâce aux formules de Fresnel [106]. On peut décrire tout signal par sa décomposition virtuelle en deux composantes orthogonales, dites s et p, telles que définies en figure 2.2. Les formules de Fresnel sont donc données pour ces deux composantes orthogonales seules.

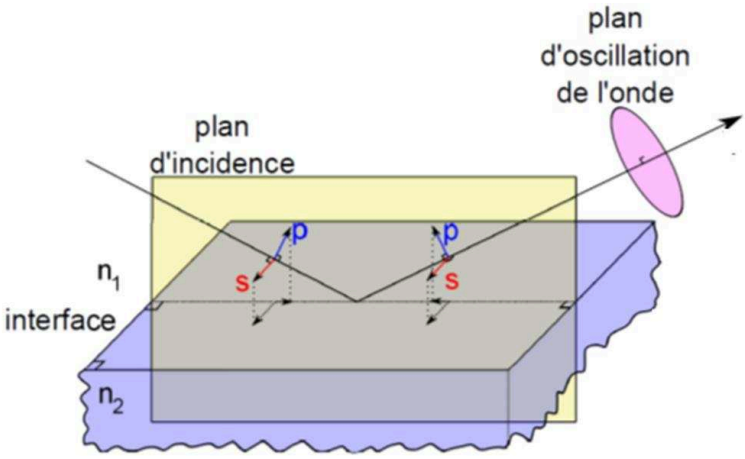


Figure 2.2 – Définition des vecteurs unitaires orthogonaux s et p de décomposition du signal, tiré de [107]. Issu de l'allemand, les dénominations font référence à **p**arallèle et **s**enkrecht=perpendiculaire.

Dans le cas de la polarisation p, le coefficient de Fresnel en réflexion r_p, dont le module donnera la réflectivité, est décrit par l'équation (2.3) pour une incidence d'un milieu 1 à 2 à un angle θ, et un angle de réfraction Φ. Il est aisé de s'affranchir de la dépendance à l'angle de réfraction Φ par utilisation de la loi de Snell-Descartes (équation (2.4)).

$$r_p = \frac{\hat{n}_2\cos(\theta) - \hat{n}_1\cos(\Phi)}{\hat{n}_2\cos\theta) + \hat{n}_1\cos(\Phi)} \overset{2.4}{=} \frac{\hat{n}_2\cos(\theta) - \hat{n}_1\sqrt{1-\left(\frac{\hat{n}_1}{\hat{n}_2}\sin(\theta)\right)^2}}{\hat{n}_2\cos(\theta) + \hat{n}_1\sqrt{1-\left(\frac{\hat{n}_1}{\hat{n}_2}\sin(\theta)\right)^2}} \tag{2.3}$$

$$\hat{n_1}\sin(\theta) = \hat{n_2}\sin(\Phi) \Rightarrow cos(\Phi) = \sqrt{1 - \left(\frac{\hat{n_1}}{\hat{n_2}}\sin(\vartheta)\right)^2} \tag{2.4}$$

De la même façon pour la polarisation s :

$$r_s = \frac{\hat{n}_1\cos(\theta) - \hat{n}_2\sqrt{1 - \left(\frac{\hat{n_1}}{\hat{n_2}}\sin\theta)\right)^2}}{\hat{n}_1\cos(\theta) + \hat{n}_2\sqrt{1 - \left(\frac{\hat{n_1}}{\hat{n_2}}\sin(\theta)\right)^2}} \tag{2.5}$$

Nous nous intéresserons surtout à la polarisation p, utilisée par la suite dans le montage expérimental [1].

Pour quantifier le contraste attendu entre un échantillon biologique et sa référence, nous définissons également le contraste théorique en amplitude $\Delta_{théorique}$, tel que :

$$\Delta_{théorique} = \frac{|r_p|_{echantillon} - |r_p|_{référence}}{|r_p|_{référence}} \tag{2.6}$$

Les conditions d'étude de ces deux critères $|r|$ et $\Delta_{théorique}$ sont pour l'instant restreintes à 1 térahertz, pour des échantillons d'épaisseur semi-infinie, et ne dépendent pas du type de source utilisé. Les échantillons considérés sont ceux cités en tableau 2.2 pour des cellules, du sang et des solutions physiologiques [75, 81, 109]. Devant la variabilités des valeurs obtenues d'une publication à une autre, les indices des échantillons sont uniquement comparés à ceux issus de la même publication.

@1 THz	n	κ	source
Eau distillée	2.160	0.683	[81]
Cellules (HeLa)	2.156	0.5913	
Eau	2.15	0.5658	[75]
Sang de rat	2.14	0.5013	
Eau distillée	1.963	0.5988	[109]
Ringer	1.97	0.6019	

Tableau 2.2 – Indices de cellules, de sang ou de solution physiologique.

Dans la suite du chapitre, les échantillons sont toujours comparés en contraste à l'eau pure. En réalité, la référence est plus probablement un milieu physiologique tel que le Ringer par exemple, dans lequel baignera l'échantillon. Ce choix est avant tout imposé par l'absence de données. Cependant, spectroscopiquement, la différence entre eau et milieu physiologique est faible (cf tableau 2.2). Nous vérifierons en partie 2.2.3 que cette approximation sur la référence n'a pas d'impact négatif sur les choix d'angles d'incidence pour l'optimisation du contraste et de la réflectivité.

Afin de définir la zone la plus à même de fournir un signal réfléchi important, regardons d'abord en partie 2.2.2 le cas théorique d'un échantillon de référence d'indice $\hat{n_2} = 2{,}1 - i * 0{,}6$

1. La réalisation de ces calculs est faite grâce à un modèle utilisant en partie des fonctions fournies par [108]. Le site lié au livre (d'accès libre) fourni le pdf intégral de celui-ci et un ensemble de fonctions utiles. Les fonctions permettent de déjouer certaines erreurs de Matlab, notamment lors de calculs de racines de grandes matrices complexes contenant des valeurs proches de 0.

(proche de l'indice complexe de l'eau pure) pour définir puis distinguer les zones d'intérêt pour la quantité de signal récupéré. Cette référence sera ensuite comparée à des échantillons présentant des variations de $\delta n = \pm 0{,}007$ et $\delta\kappa = \pm 0{,}06$, qui sont de l'ordre des variations moyennes observées entre l'eau et les échantillons biologiques cités en tableau 2.2, pour déterminer les zones d'intérêt où les images auraient de forts contrastes. Ce travail sera centré sur la polarisation p car ce sera la seule utilisée, pour des raisons exposées en partie 2.3.2.

2.2.2 Influence de l'angle d'incidence - Optimisation du signal réfléchi

Regardons le cas de la réflectivité simple pour un milieu d'indice typique, avec ou sans la participation de l'absorbance (κ), pour un milieu d'incidence fixé à $n_1 = 3{,}42$.

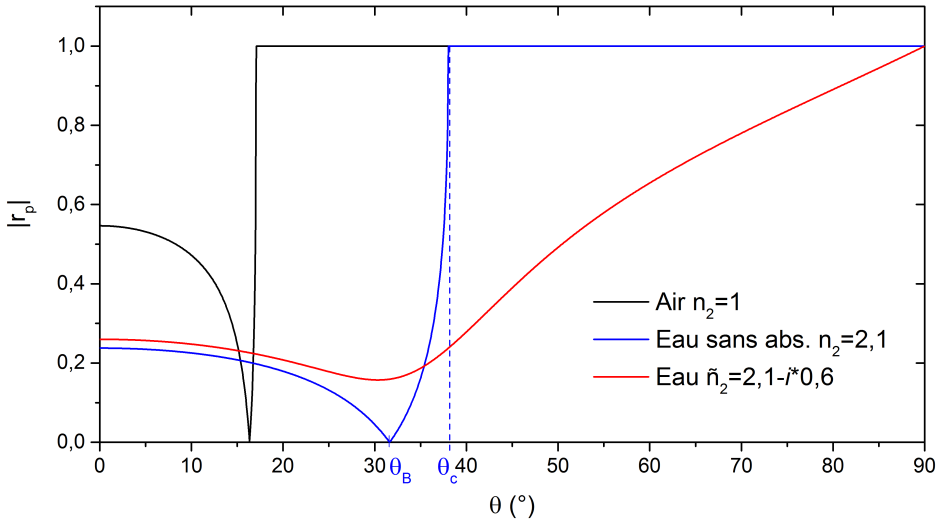


Figure 2.3 – Réflectivité typique pour la polarisation p dans le cas d'un milieu absorbant (rouge) ou non (bleu et noir) pour un même milieu d'incidence, selon l'angle d'incidence. Les cas sans absorbance sont pour un second milieu d'indice 1 (noir, air) ou 2,1 (bleu, eau). Ce dernier est à comparer à la courbe rouge qui donne la réflectivité pour un même indice mais avec une absorbance non négligée.

On observe sur la figure 2.3 **dans les cas sans absorbance** (courbes bleue et noire) une nette délimitation entre 2 zones :

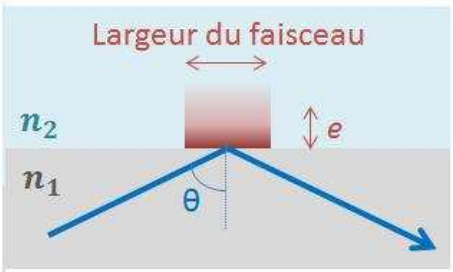
— à faibles degrés d'incidence, le rayon est réfléchi et réfracté à la fois. La réflectivité est assez basse, surtout dans le cas théorique de l'eau sans absorbance (courbe bleue). Le passage par une réflectivité nulle (cas de la polarisation p) marque l'angle de Brewster θ_B, pour lequel le rayon est théoriquement totalement transmis.

— au-delà de l'angle de réflexion θ_c, le rayon est totalement réfléchi ($|r_p|$=1). On parle alors de **réflexion interne totale**. La valeur délimitant la zone de réflexion interne totale est l'angle critique, donnée par l'équation (2.7). La différence de position de l'angle critique entre n_2=1 (courbe noire) et n_2=2,1 (courbe bleue) illustre sa dépendance à l'indice du second milieu.

$$\theta_c = \sin^{-1}(\frac{n_2}{n_1}) \tag{2.7}$$

Ce phénomène ne peut apparaitre qu'avec $n_1 > n_2$. Étant donné les fortes valeurs d'indice de l'eau dans le domaine térahertz, il faut un milieu d'incidence d'indice très important et d'absorbance négligeable pour ne pas perdre de signal. Le polyéthylène ou le téflon sont d'indices trop faibles et d'absorbance non négligeable. Il reste le silicium haute résistivité, d'indice 3,4 et d'absorbance négligeable. C'est l'indice de milieu d'incidence adopté dans la suite de ce chapitre, et utilisé dans notre propre montage.

On lit, dans le cas de notre modélisation avec un milieu d'incidence d'indice $n_1 = 3{,}42$ et un second milieu d'indice $n_2 = 2{,}1$, un angle critique à $\sin^{-1}(2{,}1/3{,}42) \approx 38°$. Dans ces circonstances, le coefficient de Fresnel r_p devient complexe pur. Dans le second milieu n'apparait qu'une onde locale, non propagative, située à l'interface entre les deux milieux et décroissant exponentiellement en s'en éloignant : l'onde évanescente. L'épaisseur caractéristique de cette décroissance est exprimée par la formule 2.8 :



$$e = \frac{c}{\omega\sqrt{n_1^2 \sin^2(\theta) - n_2^2}} \tag{2.8}$$

Figure 2.4 – Représentation schématique de la situation de l'onde évanescente et équation de son épaisseur caractéristique.

Dans le cas réel d'un milieu de forte absorbance (courbe rouge), la courbe est comme lissée, et les zones moins bien délimitées. La réflexion n'est jamais totale et l'angle critique n'a plus de sens physique direct. Nous conserverons sa définition liée uniquement à l'indice réel ($\kappa = 0$). Au terme de réflexion interne totale (TIR en anglais), on préfèrera alors celui de réflexion interne totale atténuée (ATR en anglais). Il est à noter que la réflectivité est malgré tout très vite supérieure à celle obtenue aux angles inférieurs à l'angle critique.

Concernant notre volonté d'optimisation du signal, l'effet de réflexion interne totale atténuée est donc intéressant, par l'existence de cette onde évanescente réduisant l'interaction avec le milieu biologique à une épaisseur restreinte par sa nature non propagative. Pour de l'eau pure, à 1 THz nous obtenons une onde évanescente d'épaisseur 21 µm. Le gain en signal réfléchi sera d'autant plus marqué que l'on augmentera l'angle d'incidence au-delà de l'angle critique.

2.2.3 Influence des variations réalistes d'indice - Optimisation du contraste

Prenons le cas d'un milieu de référence $\hat{n}_2 = 2{,}1 - i * 0{,}6$ comme défini plus haut, et un milieu biologique $\hat{n}_3 = \hat{n}_2 \pm \delta\hat{n}_2$, avec les variations $\delta\hat{n}_2$ telles que $\delta n = 0{,}007$ et $\delta\kappa = 0{,}06$. Ces variations correspondent aux variations typiques observées dans le tableau 2.2. Les paramètres de modélisation sont rappelés en figure 2.5.

On observe en figure 2.6 que les variations d'indice ont un impact sur la réflectivité, comme attendu d'après l'équation 2.3. Dans le cas des variations de n (figure 2.6a), la variation de la réflectivité est assez faible. On note qu'une variation positive de n amène une diminution de $|r_p|$

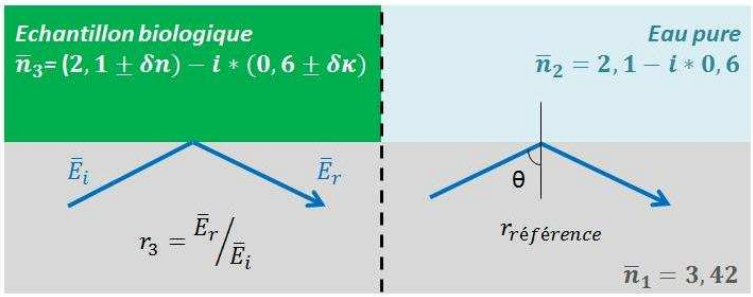
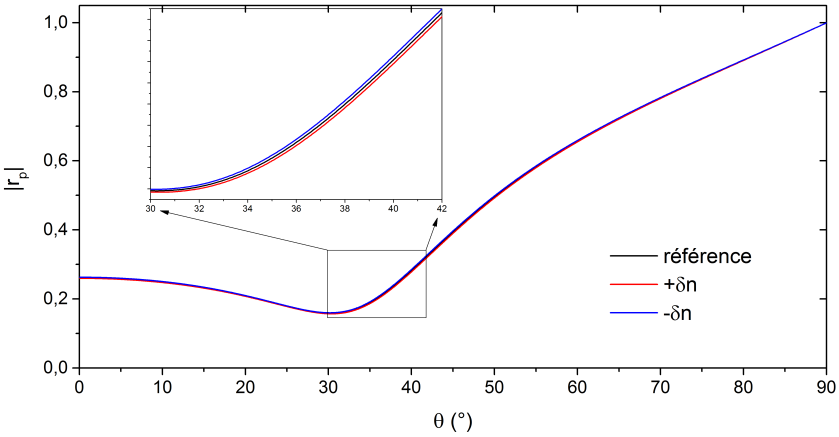
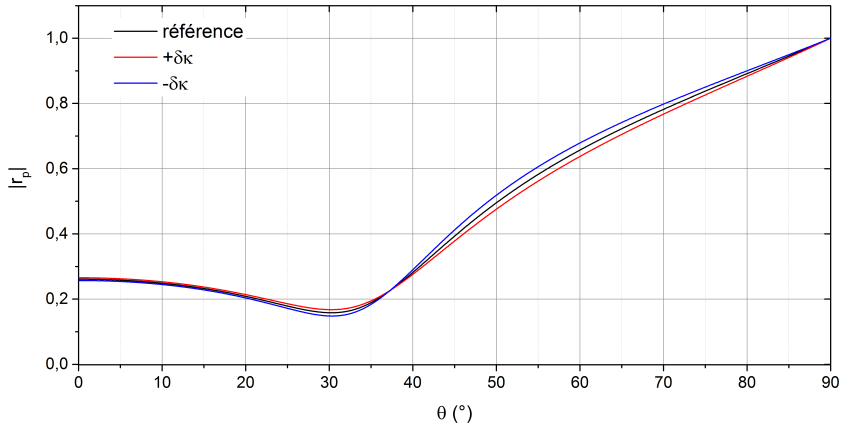


Figure 2.5 – Schéma de modélisation en 2 couches semi-infinies, pour obtenir le contraste de réflectivité entre une référence et un milieu biologique.

et inversement, et ce sur toute la gamme des θ. Les variations typiques de κ ont, elles, un plus fort impact sur la réflectivité. Une augmentation de l'absorbance (variation positive de κ) diminue la réflectivité au-delà de l'angle critique, alors qu'une diminution la fera augmenter. Cependant, on observe qu'en deçà de l'angle critique, la relation entre le signe de $\delta\kappa$ et le sens de variation de la réflectivité s'inverse. A l'angle critique, la variation de κ a un impact nul sur la réflectivité. Il est intéressant de noter que même si l'angle critique n'est plus marqué par une réflectivité maximale en ATR, perdant sa définition première, il se manifeste toujours dans les propriétés du montage en réflexion dans cette « inversion » de l'effet d'une variation de κ.



(a) Variation absolue de réflectivité lorsque $\hat{n}_3$ diffère de $\hat{n}_2$ par $\pm\delta n$



(b) Variation absolue de réflectivité lorsque $\hat{n}_3$ diffère de $\hat{n}_2$ par $\pm\delta\kappa$

Figure 2.6 – Variations de la réflectivité pour les variations d'indice du milieu étudié.

Une conséquence de ces impacts de δn et $\delta\kappa$ sur la réflectivité est qu'une variation de même signe aura une résultante constructive au-delà de l'angle critique, mais destructive en deçà. Ainsi, si l'on prend l'exemple de variations négatives ($-\delta n$ et $-\delta\kappa$), la réflectivité sera diminuée de façon plus importante que dans le cas de $-\delta\kappa$ et $-\delta n$ seuls au-delà de l'angle critique. Au contraire, en deçà de l'angle critique, les variations liées à $-\delta\kappa$ et $-\delta n$ ont des participations opposées, et la résultante sera une variation de réflectivité plus faible que dans le cas de $-\delta\kappa$ et $-\delta n$ seuls. Or, d'après le peu de données spectroscopiques qui existent en térahertz pour les objets biologiques, ceux-ci présentent toujours des variations de $\delta\kappa$ et δn de même signe comparativement à l'eau pure ou à du milieu physiologique (cf tableau 2.2).

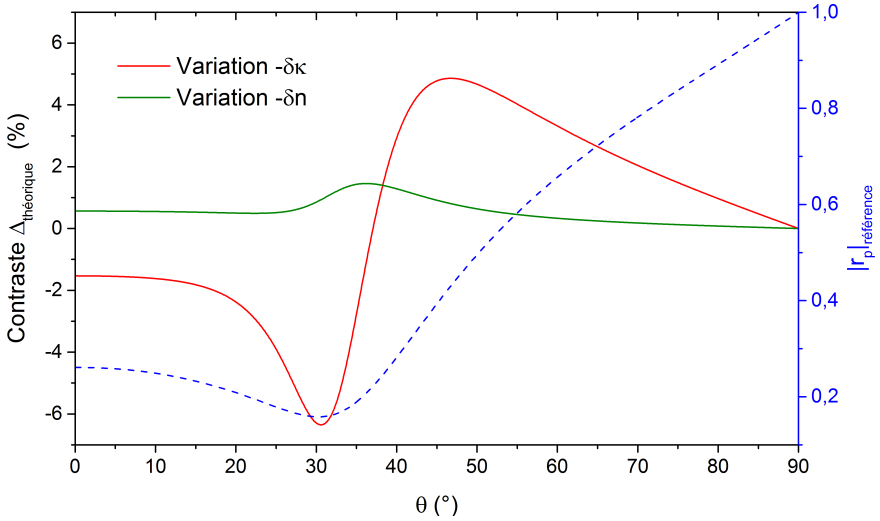


Figure 2.7 – Variation du contraste théorique en amplitude selon l'angle d'incidence.

Regardons la valeur du contraste $\Delta_{théorique}$ pour des variations négatives de n et κ, en figure 2.7. On retrouve bien les participations de signe opposé en deçà de l'angle critique et de même signe au-delà de l'angle critique. La participation au contraste de la variation de n se fait proche de l'angle critique, alors que la participation de la variation de κ se fait au dessus et en dessous mais s'annule à son niveau. Par ailleurs les deux pics de contraste résultants de la variation de κ ont des extremas de valeur proche, mais le pic au-delà de l'angle critique est plus large.

En combinant les deux, nous obtenons le contraste théorique final qu'un objet biologique pourrait donner comparativement à l'eau pure, à 1 térahertz et en terme de variation d'amplitude. Celui-ci est exposé en figure 2.8.

Les participations constructives au-delà de l'angle critique et destructives en deçà amènent un maximum de contraste à presque 6 % attendus au-delà de l'angle critique, vers 45°. En deçà de l'angle critique, le contraste est presque aussi important mais pour une gamme d'angles plus restreinte, reflet des variations liées à κ atténuées par la participation destructive des variations de n. Cette étroitesse de zone de contraste combinée à un contraste risquant d'être atténué par les participations destructives en cas de variations de même signe de n et k fait de la zone en deçà de l'angle critique une zone plus délicate à utiliser que celle au-delà de l'angle critique.

Dans le cas de notre application, la zone d'intérêt du contraste pour l'imagerie se situe donc théoriquement autour de et sur l'angle critique, avec une nette préférence pour la zone

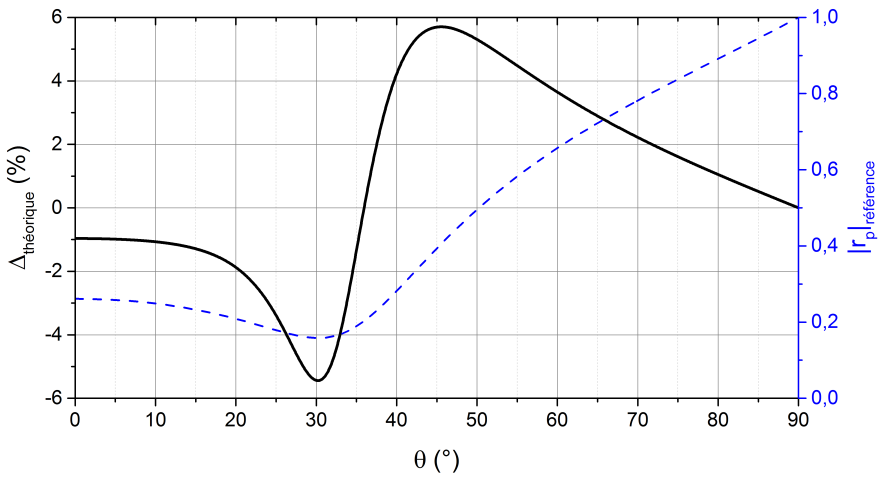


Figure 2.8 – Contraste théorique final pour une variation d'indice complexe réaliste dans le second milieu, comparativement à l'eau pure.

au-delà de l'angle critique, c'est à dire la zone ATR. Au sein de la zone ATR, l'optimisation du contraste implique des valeurs de θ relativement proches de l'angle critique (gamme [40 ; 60]°), contrairement à la réflectivité pour laquelle l'optimisation se fait aux angles les plus importants.

2.2.4 L'équilibre signal/contraste - Optimisation de la sensibilité

Dans le cas du contraste comme celui de la quantité de signal récupéré, la zone d'ATR est donc la plus intéressante pour un montage d'imagerie en réflexion. Cependant, dans cette zone ATR, le contraste sera favorisé aux angles proches de l'angle critique, au contraire de la force de signal croissante avec l'angle. Il y a donc un équilibre entre signal et contraste à trouver.

Pour définir cet équilibre, considérons la sensibilité absolue, variation absolue de la grandeur de sortie r pour une variation de la grandeur d'entrée $\hat{n}$. Cette sensibilité absolue est définie par l'équation (2.9).

$$|S| = |\frac{\delta r}{\delta n} + \frac{\delta r}{\delta k}| \tag{2.9}$$

La figure 2.9 nous permet alors de définir la zone de sensibilité maximale dans le cas de variations typiques de -δn et -δk combinées.

Le contraste intéressant observé en deçà de l'angle critique en 2.2.3 est complètement écarté par la trop faible réflectivité de cette zone (en polarisation p), qui fournit au final une sensibilité trop faible. La zone d'intérêt est donc dans la zone d'ATR, à l'équilibre entre force de signal croissante et contraste décroissant ; approximativement à une dizaine de degrés au dessus de l'angle critique. Il est intéressant de noter que la sensibilité attendue dans les mêmes conditions mais pour la polarisation s (courbe bleue en figure 2.9) montre un maxima proche de celui de la polarisation p. Il serait donc possible, sur un même montage, de récupérer les deux composantes du signal et de les utiliser ensemble pour imager des échantillons avec une bonne sensibilité. Par ailleurs le choix de la zone ATR pour la polarisation s est moins critique en ce qui concerne la sensibilité absolue. Ceci peut être attribué à l'absence d'annulation de la réflectivité en polari-

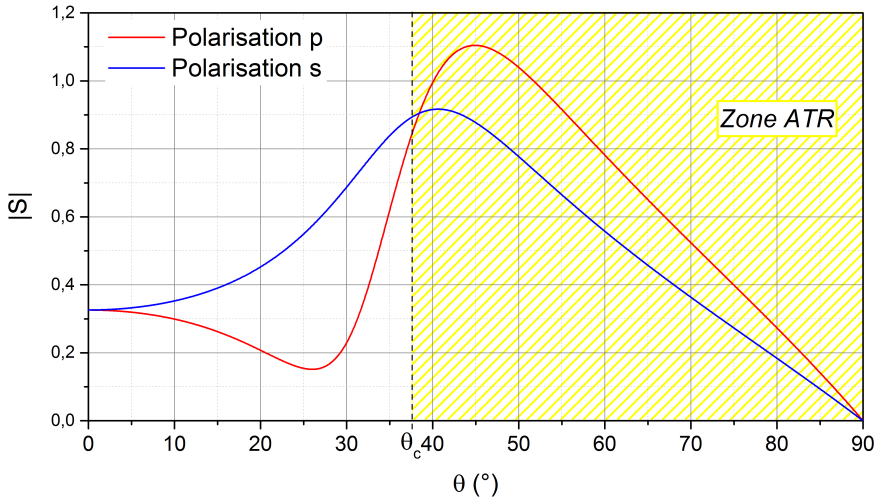


Figure 2.9 – Variation de la sensibilité absolue |S| pour une variation d'indice de $-\delta n$ et $-\delta\kappa$ et selon l'angle d'incidence θ, pour la polarisation p (rouge) et la polarisation s (bleu). La position de l'angle critique est signalée en pointillés.

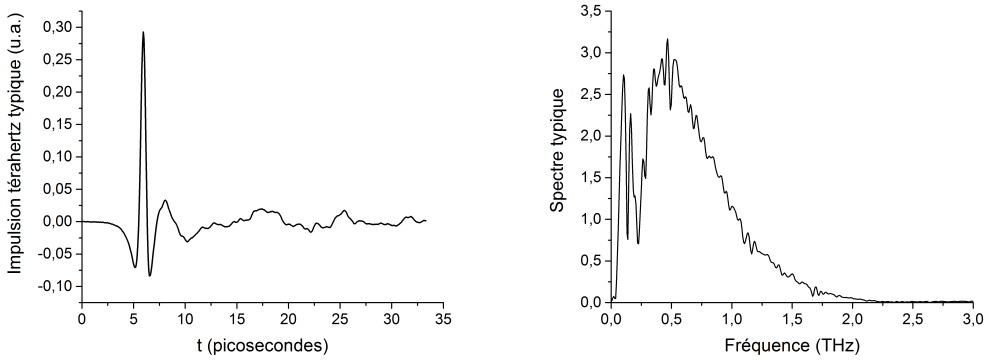
sation s, contrairement à la polarisation p, au niveau de l'angle de Brewster (inférieur à l'angle critique), comme nous pouvons le voir en Annexe, en figure A.1 (page 123).

2.2.5 Optimisation sur notre propre montage

Antoine Wojdyla, étudiant en thèse de 2009 à 2011, a mis en place un montage d'imagerie térahertz ATR basé sur une génération de type impulsionnel (TDS, Time Domain Spectroscopy) et proposant une solution originale pour pouvoir explorer l'échantillon observé en réflexion interne totale. Le montage complet étant détaillé plus loin en 2.3.2, nous n'en présenterons ici que les propriétés optiques du module d'imagerie ATR. Le montage était initialement dimensionné pour des mesures en imagerie de contraste de phase, avec récupération des 2 composantes orthogonales du signal. Pour des raisons pratiques explicitées en 2.3.2, l'exploration des échantillons biologiques se fait uniquement en récupérant la composante p, en contraste d'amplitude. Tous les résultats sont ici pour cette polarisation.

Le milieu d'incidence a été choisi d'indice le plus important disponible dans des matériaux à faible perte : le Silicium haute résistivité, d'indice $\hat{n}_1 = n_1 = 3{,}42$. Ainsi, l'angle critique avoisinera 38°, comme dans les simulations précédentes, et les pertes seront très faibles au sein du prisme (absorbance négligeable). L'objet d'étude dans notre cas consistera en des cellules adhérentes baignant dans un milieu physiologique tamponné dont l'indice est supposé proche de l'eau ; nous utiliserons les données spectroscopiques de Shiraga et al. ([81], tableau 2.2) donnant l'indice de l'eau et des cellules.

Connaissant l'impulsion térahertz obtenue expérimentalement sur notre montage (figure 2.10a) nous pouvons connaitre sa composition fréquentielle (figure 2.10b). Les composantes fréquentielles majeures sont compris entre 0,2 et 1,6 THz ; nous pouvons récupérer les indices complexes pour quelques unes de ces fréquences, obtenir la courbe de sensibilité correspondante, puis pondérer chacune de ces courbes par la participation de leur fréquence au signal final. On établit



(a) (b)

Figure 2.10 – Impulsion térahertz typique (a) et sa composition fréquentielle (b).

alors la courbe finale de sensibilité théorique, exposée en figure 2.11.

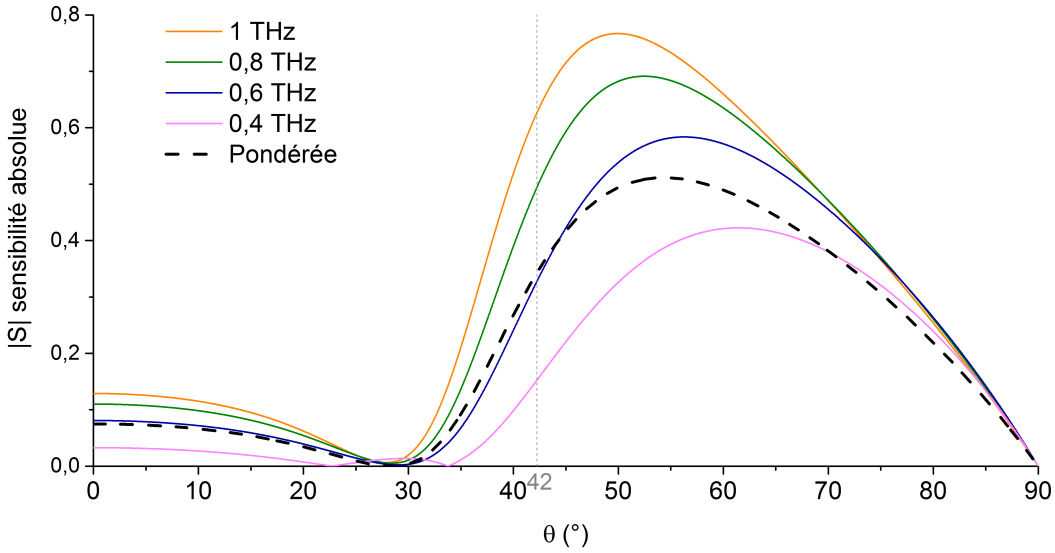


Figure 2.11 – Courbes théoriques de sensibilité absolue pour notre montage expérimental à "large" composition spectrale.

La sensibilité finale montre une plage d'intérêt relativement large, avec un pic autour de 55° et une largeur à mi-hauteur de 35°. Pour l'imagerie en contraste de phase, l'angle d'incidence avait été choisi à un angle très particulier, 42°. A cet angle, les composantes s et p présentent un déphasage de $\pi/2$, et ce déphasage est très sensible aux petites variations d'indice. Théoriquement cet angle reste dans la zone de sensibilité intéressante pour notre utilisation en simple contraste d'amplitude, comme on peut le voir en figure 2.11 (trait noir vertical à 42°). Ce montage est donc particulièrement adapté à l'exploration d'objets biologiques. Mais c'est aussi une autre raison supplémentaire qui a mené à opter pour un montage en ATR dans le cas de l'étude de cellules : la sensibilité améliorée aux petits objets grâce à l'onde évanescente.

2.2.6 Un autre avantage de l'ATR : une meilleure sensibilité aux petits objets

Jusqu'à présent, les modélisations réalisées reposaient sur l'hypothèse d'un milieu biologique d'épaisseur semi-infinie, cas dans lequel l'ATR a un avantage fort par la réduction de l'interaction avec le milieu à l'épaisseur de l'onde évanescente (quelques dizaines de micromètres). Cependant, dans notre cas d'exploration de cellules adhérentes, l'épaisseur d'objet à étudier est plus fine ; de l'ordre de 6 à 12 µm. L'avantage de l'ATR pour les épaisseurs importantes reste vrai, car le milieu dans lequel baigneront les cellules, lui, sera toujours très absorbant et d'une grande épaisseur. Nous allons montrer ici son second avantage : sonder des objets petits avec une bien meilleure sensibilité aux faibles épaisseurs qu'en réflexion simple.

Reprenons le modèle précédent, mais en établissant cette fois 3 couches (voir la figure 2.12) : le prisme (semi-infini), la couche de cellules (épaisseur L) et le milieu de culture autour (épaisseur semi-infinie). Rappelons qu'au delà de l'angle critique, l'onde évanescente prendra place telle qu'exposé précédemment en figure 2.4. Faisant varier L et θ, on obtient une carte de sensibilité absolue, montrée en figure 2.13.

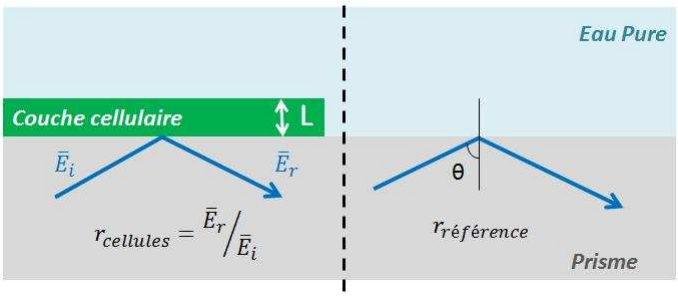


Figure 2.12 – Rappel schématique des caractéristiques de modélisation 3 couches.

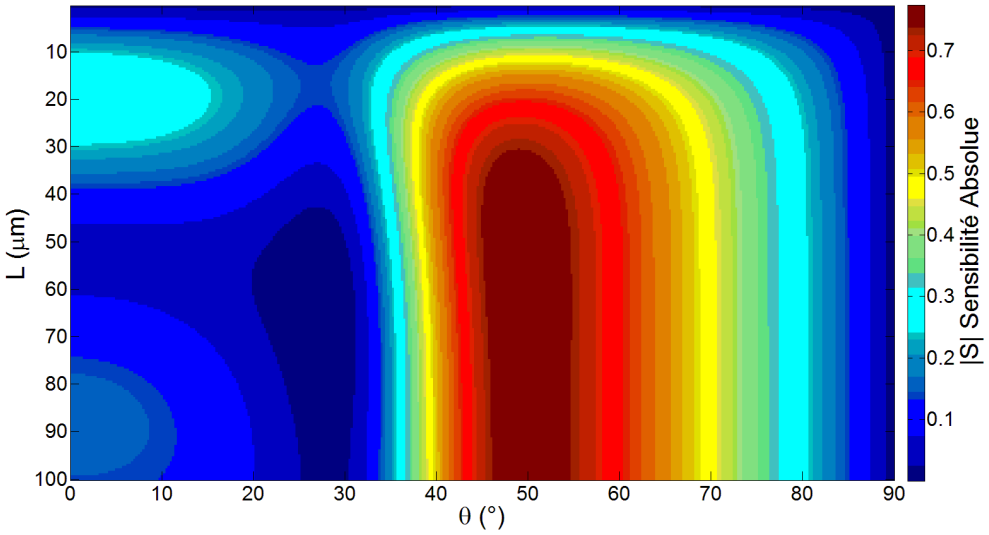


Figure 2.13 – Sensibilité absolue selon L, épaisseur de la couche cellulaire, et θ l'angle d'incidence.

Pratiquant une coupe en 2 angles d'intérêt, le maximum de sensibilité en ATR ($\theta \approx 50°$) et celui en réflexion simple ($\theta \approx 10°$), on obtient la figure 2.14. La sensibilité est bien plus importante en ATR, comme explicité précédemment, et l'augmentation de la sensibilité pour des objets de petites dimensions diffère entre ATR et réflexion simple.

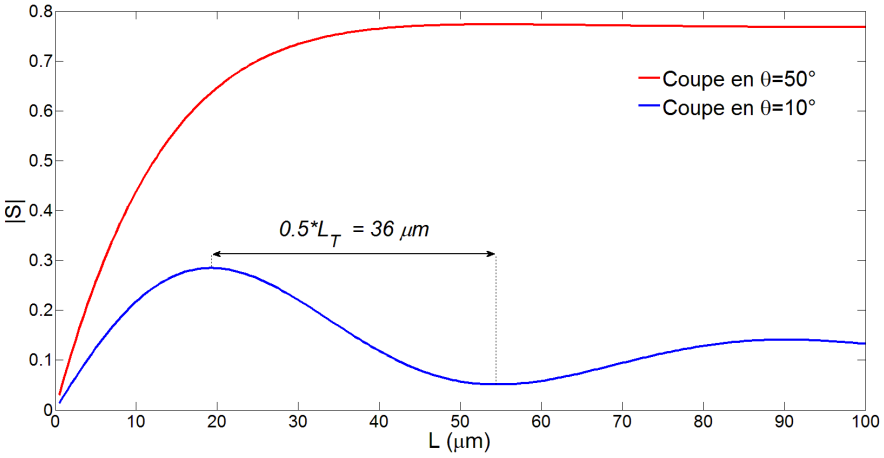


Figure 2.14 – Coupes en $\theta = 10°$ (bleue, réflexion simple) et 50° (rouge, réflexion interne totale atténuée) de la sensibilité absolue en fonction de l'épaisseur L de la couche cellulaire.

Pour de petits objets étudiés en réflexion simple (figure 2.14, courbe bleue), la loi suivie montre un phénomène d'oscillation atténuée. Ceci est le reflet de la modulation du signal réfléchi à l'interface prisme-cellules par le signal (bien plus faible) réfléchi à l'interface cellules-eau. Prenons le cas simple d'une réflexion en incidence normale avec des milieux sans absorbance, représenté en figure 2.15.

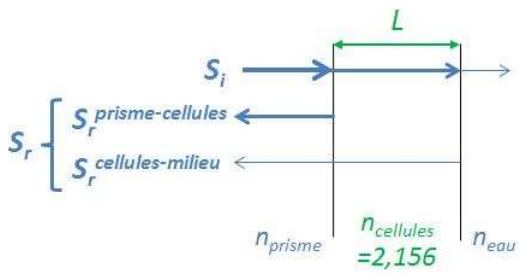


Figure 2.15

Le signal réfléchi total S_r est la modulation de $S_r^{prisme-cellules}$ par le plus faible signal $S_r^{cellules-eau}$, et peut s'écrire :

$$S_r = S_r^{prisme-cellules} + S_r^{cellules-eau}$$

$$S_r = S_r^{prisme-cellules}(1 + r_p^{cellules-eau} cos(\Delta\varphi))$$

Avec $\Delta\varphi$ le déphasage induit entre $S_r^{prisme-cellules}$ et $S_r^{cellules-eau}$par le trajet supplémentaire aller-retour du second dans la couche de cellules. On a donc $\Delta\varphi = 2\frac{2\pi}{\lambda} n_{cellules} L$.

Nous devrions alors observer une période de modulation telle que :

$$\Delta\varphi = 2\pi \iff 2\pi = 2\frac{2\pi}{\lambda} n_{cellules} L_T$$

$$\iff L_T = \frac{\lambda}{2n_{cellules}}$$

C'est à dire, pour 1 térahertz ($\lambda = 300$ µm), $L_T \approx 70$ µm. On retrouve graphiquement une valeur extrêmement proche, dont l'écart est très facilement attribuable aux simplifications appliquées (particulièrement l'incidence normale, contre une incidence à 10°) pour la valeur de L_T lue. Le

phénomène est donc bien lié à la modulation par le signal réfléchi à la seconde interface du signal réfléchi à la première interface. La forme non monotone et les faibles valeurs des sensibilités engagées interdisent l'étude de petits objets en réflexion simple dans notre cas.

En ATR (figure 2.14, courbe rouge), la sensibilité selon L suit une loi exponentielle, reflet de l'onde évanescente comme "sonde" dans l'objet biologique, elle même décroissant de façon exponentielle avec la distance à l'interface [106]. Ceci est également vrai pour la polarisation s. On retrouve aisément sa profondeur de pénétration e (amplitude d'onde évanescente à 37% de son amplitude maximale initiale), donnée théoriquement par l'équation (2.8), autour de $e = 21\ \mu m$. Autrement dit, à 21 µm d'épaisseur, une couche de cellules adhérentes atteindrait 63% de la hauteur de l'onde évanescente, assurant un fort impact de l'objet sur la réflectivité, donc sur la sensibilité. Le confinement de cet onde en fait une donc une sonde idéale pour les objets de 5-25 µm, en plus de diminuer l'interaction du rayonnement térahertz à une zone petite et contrôlée pour diminuer les pertes par absorption.

Pour conclure, l'ATR présente un fort avantage en terme de sensibilité absolue (polarisation p) et de sensibilité aux objets de petite taille (polarisations s comme p).

2.3 La réalisation de notre montage expérimental ATR

2.3.1 Un montage TDS classique pour la génération et détection du térahertz

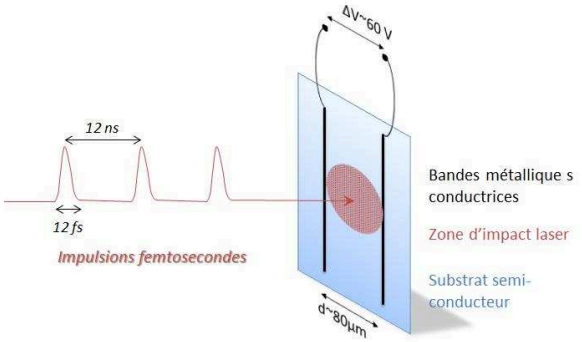
Le montage utilisé en laboratoire pour générer et détecter le térahertz est un montage dit « TDS », pour « Time Domain Spectroscopy » en anglais. Il s'agit d'une émission sous forme d'impulsions dont la fréquence est dans le domaine térahertz. Elle est ensuite détectée de façon résolue en temps, méthode très courante en génération de rayonnement térahertz large bande.

L'émission et la réception sont réalisées grâce à des antennes photoconductrices (« PCA » dans la figure 1.3 de l'introduction aux différentes sources térahertz). Ces antennes sont réalisées par dépôt d'un semi-conducteur (arséniure de gallium, GaAs) sur un substrat isolant, ensuite gravé de paires de lignes métalliques parallèles.

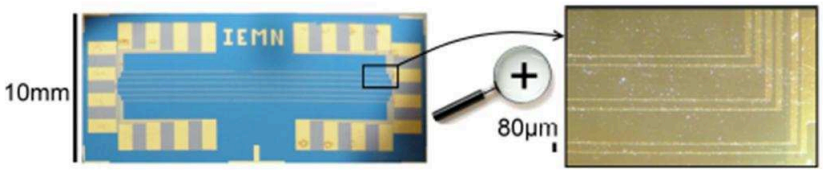
Détaillons ici l'émission. Une impulsion femtoseconde venant d'un laser impulsionnel (800 nm) focalisée arrive sur le substrat semi-conducteur entre les deux lignes métalliques, créant des paires d'électron-trous. Les électrons ainsi formés sont accélérés par une différence de potentiel constante imposée entre les lignes métalliques, créant un courant transitoire i avant que les électrons ne soient à nouveau piégés dans le substrat. Un champs électromagnétique est ainsi rayonné par ces porteurs de charge accélérés, proportionnellement à la dérivée du courant transitoire qui les aura animés :

$$E_{térahertz}(t) \propto \frac{\delta i}{\delta t}(t) \tag{2.10}$$

On obtient ainsi un rayonnement térahertz sous forme impulsionnelle. Les ordres de grandeur temporels sont exposées en figure 2.17, adaptée de Duvillaret et al. [110] : on y visualise l'impulsion femtoseconde (pointillés) générant le photocourant (trait plein, ronds blancs) et l'impulsion térahertz proportionnelle à sa dérivée (trait plein, ronds noirs).



(a) Principe de fonctionnement d'une antenne émettrice.



(b) Photo de l'antenne et agrandissement sur 3 paires de lignes.

Figure 2.16 – Principe de génération d'une impulsion térahertz par une antenne photoconductrice.

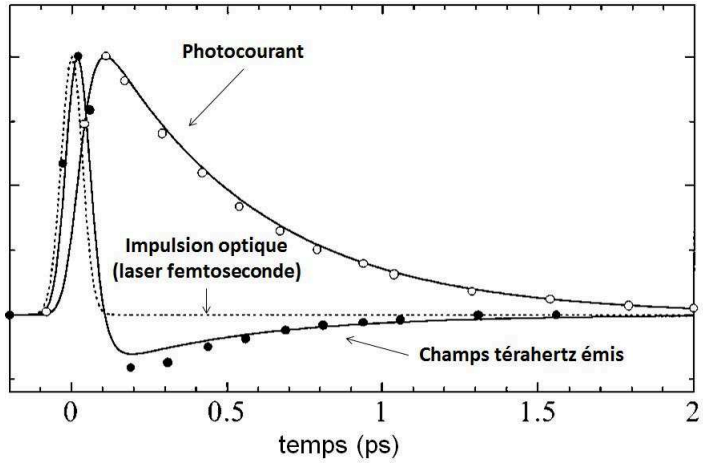


Figure 2.17 – Grandeurs temporelles de la génération de l'impulsion térahertz, simulation traduite de [110].

La détection s'appuie sur le même principe de photoconduction, mais diffère en deux points : l'origine du mouvement des porteurs de charge, et leur temps d'existence avant recombinaison. Lorsqu'une impulsion femtoseconde crée les porteurs de charge dans l'antenne de réception, ils ne sont pas accélérés par une tension constante imposée entre 2 lignes métalliques, mais directement par le champs térahertz à détecter. Ils se recombinent par ailleurs beaucoup plus vite que dans le cas d'antenne émettrice en GaAs intrinsèque, grâce à un dépôt supplémentaire sur le GaAs. En effet, une fine couche de GaAs-BT (GaAs à croissance à basse température) est déposée sur le substrat en GaAS. Cette couche concède une durée de vie aux porteurs de charge beaucoup plus faible ; de l'ordre de 400 fs. En modifiant ainsi les propriétés du substrat, et en accélérant

les porteurs uniquement par le champs térahertz, on récupère un courant qui reflète le champs térahertz échantillonné sur un temps très court. On peut ainsi connaitre en un point temporel la valeur du champs électromagnétique de l'impulsion. Il suffit alors de faire varier le temps d'arrivée des impulsions femtosecondes, grâce à une ligne à retard, pour échantillonner point par point l'impulsion térahertz. Sa forme typique et sa composition fréquentielle obtenue par une transformée de Fourier sont celles déjà exposées en figure 2.10a et figure 2.10b respectivement.

Du fait de sa géométrie, l'antenne réceptrice ne détecte qu'une composante du champs : la composante dans le plan parallèle à la table optique. L'émission génère des impulsions naturellement polarisées linéairement dans ce même plan parallèle à la table optique.

Ces éléments sont assemblés comme montré schématiquement en figure 2.18. Le module contenant le montage pour l'imagerie (détaillé en 2.3.2) s'insère sur le chemin du faisceau collimaté. Une version plus complexe de ce montage existe, pour récupérer les deux composantes orthogonales s et p du champs, mais n'a pas été utilisée pour les résultats montrés dans ce manuscrit. La seule polarisation utilisée ici correspond à la composante p du rayonnement réfléchi en ATR, dont nous avons illustré précédemment les propriétés.

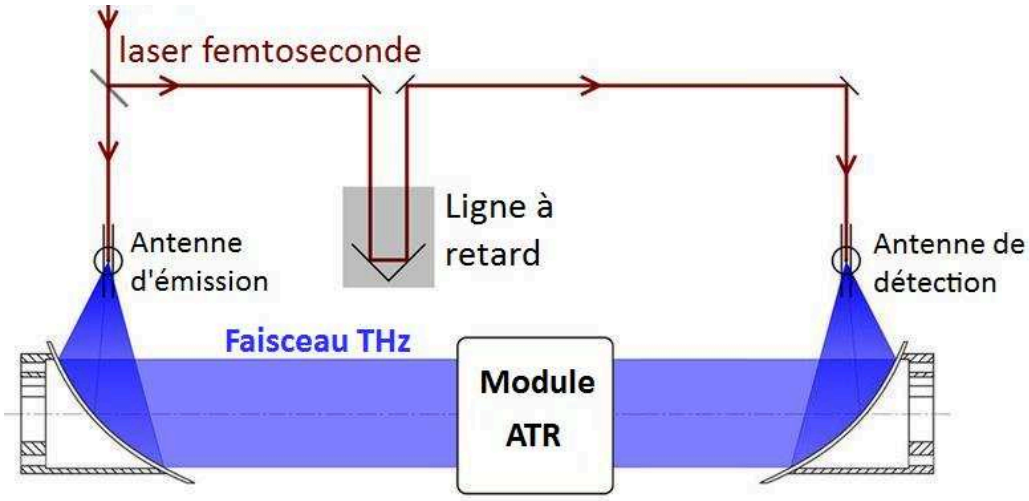


Figure 2.18 – Schéma simplifié du montage TDS.

Sur le plan pratique, quelques ajouts permettent une diminution des pertes de signal et du bruit : un hacheur optique modulant le faisceau à 280 Hz pour une amplification à détection synchrone, des lentilles hyper-hémisphériques en silicium haute résistivité disposées sur les antennes pour focaliser et éviter les pertes par réflexion interne totale dans l'antenne. Enfin, un miroir à actionnement piézoélectrique est disposé au début du chemin du faisceau laser et permet par une boucle rétroactive de stabiliser son pointé en temps réel.

2.3.2 Caractéristiques réelles d'acquisition

A présent que les conditions théoriques d'étude de la couche cellulaire ont été détaillées, nous développons ici les conditions expérimentales réelles d'acquisition d'une image en ATR d'un tapis cellulaire.

Au montage TDS du schéma en figure 2.18, on ajoute le module constitué du prisme ATR et du matériel nécessaire pour focaliser le faisceau et réaliser une image. Ce module est détaillé en

figure 2.19 et présenté en photographies en figure 2.20.

On retrouve un prisme isocèle en silicium haute résistivité (Si-HR), qui sera le milieu d'incidence pour réaliser la réflexion interne totale, dimensionné tel que l'angle de réflexion soit de 42°. L'échantillon biologique est supposé être disposé à sa surface, là où se situe l'onde évanescente.

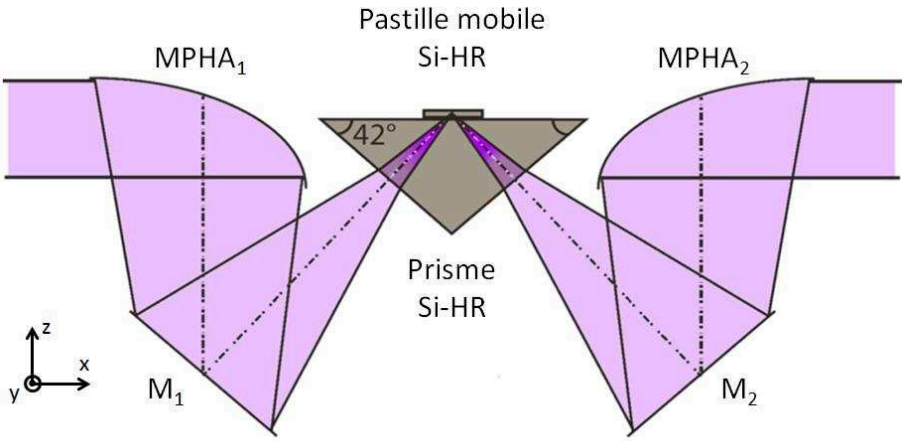


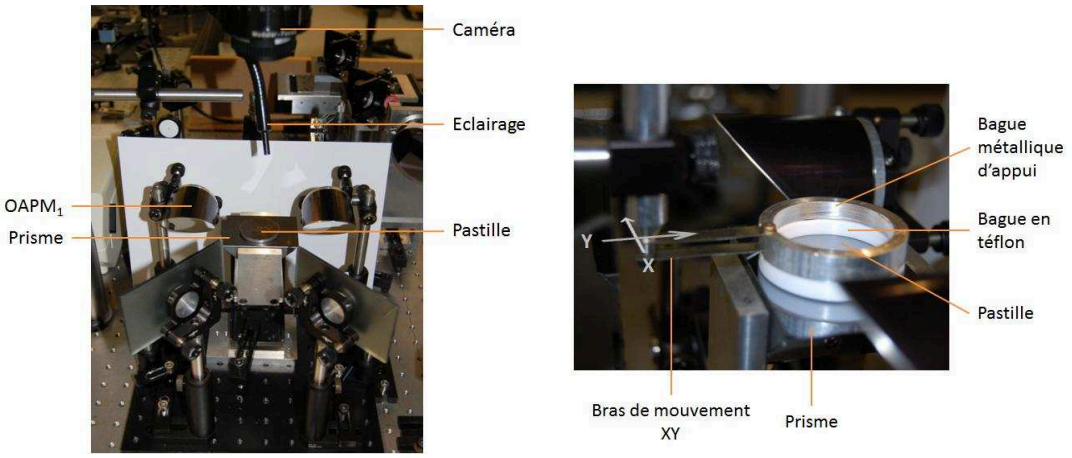
Figure 2.19 – Schéma du module d'imagerie ATR, avec le prisme et la pastille en silicium haute résistivité (Si-HR), les miroirs plans M et les miroirs paraboliques hors d'axe MPHA.

Si nous voulions réaliser une image avec le prisme seul, il faudrait que le faisceau térahertz soit focalisé en différents points de sa surface. Cependant, la modification du trajet du faisceau est trop délicate, car elle modifierait profondément la synchronisation avec le détecteur : c'est donc l'échantillon que nous devons déplacer afin de l'imager en plusieurs points. Pour ce faire on ajoute à la surface du prisme une « pastille » de même composition que le prisme, mais mobile. Ce sera le support de croissance des cellules. Grâce à une bague en téflon qui la ceint et un bras monté sur platine XYZ, nous plaquons la pastille sur la surface du prisme (axe Z) et nous pouvons réaliser des mouvements en XY (voir figure 2.20). Le faisceau térahertz traversera le prisme *et* la pastille ; l'onde évanescente sera localisée à la surface de la pastille, là où seront les cellules et leur milieu physiologique. L'onde évanescente étant fixe dans le repère du laboratoire, le mouvement de la pastille permet de sonder plusieurs points de l'échantillon, pixel par pixel, et ainsi de réaliser une image.

Le faisceau est focalisé à la surface de la pastille grâce à un miroir parabolique hors axe ($MPHA_1$, f=152.4 mm) ; après réflexion le faisceau suit un traitement inverse pour en ressortir collimaté comme à son arrivée et continuer dans le montage TDS vers l'antenne de détection.

La construction d'une image se fera selon un balayage de trame simple, coordonné par un programme C# sur le poste de travail.

Les caractéristiques générales d'acquisition en une position XY dépendent du nombre de points temporels acquis sur l'impulsion térahertz. Lors de l'implémentation du montage, Antoine Wojdyla avait montré la possibilité de travailler en imagerie de contraste de phase pour des objets inertes, nécessitant une acquisition de l'impulsion suffisamment longue pour une résolution fréquentielle correcte. Cependant, pour le suivi de dynamiques biologiques, et étant donné la perte de signal rencontrée, nous avons choisi de travailler sur une seule antenne (polarisation p) et en ne faisant l'acquisition que du pic d'amplitude de l'impulsion. La polarisation p (relativement à



(a) Vue d'ensemble du module d'imagerie ATR sans le système de mouvement de la pastille.

(b) Pastille mise en place avec son système de mouvement XY complet.

Figure 2.20 – Photographies annotées du module d'imagerie ATR.

l'interface de réflexion) correspond sur notre montage à la polarisation spontanée du rayonnement fourni par l'antenne d'émission ; on s'affranchit ainsi de tout polariseur supplémentaire causant des pertes de signal. Le pic d'amplitude de l'impulsion a montré la plus grande sensibilité aux changements entre les zones avec et sans cellules, et ne demande que 6 à 8 points temporels de 30 ms d'intégration chacun. De plus, nous verrons que l'on peut mettre à profit à la fois les variations d'amplitude du maximum du signal, mais aussi sa position temporelle.

Dans ces conditions, et prenant en compte tous les mouvements des platines (retard du TDS, platine XY), une image sur une plage maximale de 20x16 mm est prise à une moyenne de 2 à 4 secondes par pixels. Il est possible de réduire cette moyenne en prenant moins de points temporels et en travaillant sur des plages XY plus restreintes - diminuant ainsi les temps pris par la platine pour déplacer la pastille fortement plaquée sur le prisme, donc délicate à mouvoir.

Chapitre 3

La nature du contraste en imagerie térahertz ATR de cellules

Sommaire

3.1 L'objet biologique d'étude : les cellules MDCK, une lignée de cellules adhérentes **50**

3.1.1 Petit aperçu de la cellules animale 50

3.1.2 Les cellules MDCK 52

3.1.3 La culture des MDCK pour leur étude sur notre montage d'imagerie ATR 53

3.2 Observation d'un contraste térahertz entre les cellules et leur milieu **55**

3.2.1 Acquisition des images térahertz 55

3.2.2 Caractéristiques du contraste 56

3.2.3 Variabilité du contraste d'une expérience à l'autre 59

3.3 Nature du contraste observé **62**

3.3.1 Conditions d'acquisition 62

3.3.2 Perméabilisations chimiques 63

3.3.3 Quantification des protéines extracellulaires (BCA) et données qualitatives sur leur taille (Bleu de Coomassie) 65

3.3.4 Tests complémentaires et discussion 69

3.4 Conclusion **72**

Au cours du chapitre 2, nous avons pu voir comment les choix de géométrie d'imagerie en ATR permettaient théoriquement d'imager avec la meilleure sensibilité un tapis de cellules baignant dans leur milieu. Le contraste attendu, quantifiable théoriquement grâce aux indices fournis par des études spectroscopiques, n'a en revanche pas d'origine biologique démontrée. Ce chapitre 3 sera découpé selon les étapes successives qui ont été nécessaires à la première démonstration d'une origine protéique de ce contraste. Cette démonstration a par ailleurs fait l'objet d'une publication [111].

Après une présentation des caractéristiques et conditions de culture des cellules que nous utilisons (3.1), la première étape sera la démonstration de l'existence expérimentale de ce contraste comme attendu théoriquement, en section 3.2. La seconde étape, abordée en section 3.3, sera de présenter comment la nature du contraste a été cernée, par l'application de perturbations différentes sur les cellules et l'observation de leurs effets sur le contraste. Des tests supplémentaires, complétant les expériences montrant la variation corrélée du contraste et du contenu intracellulaire en protéines, clôturent cette section 3.3. Nous terminerons alors en section 3.4 par une conclusion en discussion autour de la nature protéique du contraste, la place de cette démonstration par rapport aux résultats précédents de l'équipe, les avantages et limites, puis l'ouverture à des applications qui feront l'objet des chapitres 4 et 5.

3.1 L'objet biologique d'étude : les cellules MDCK, une lignée de cellules adhérentes

L'utilisation des données spectroscopiques des cellules nous a suffi à dégager les paramètres nécessaires pour les imager correctement, dans des conditions amenant un bon contraste. A présent, pour aborder ce chapitre majoritairement expérimental, il parait important de redéfinir rapidement ce que sont nos cellules d'étude, en esquisser les caractéristiques et la composition, pour mieux pouvoir comprendre ce que le térahertz va imager, et ainsi plus facilement chercher et comprendre la nature du contraste.

3.1.1 Petit aperçu de la cellules animale

Avant de détailler les cellules choisies, redéfinissons quelques termes qui leur sont liés et utiles dans ce manuscrit, en s'appuyant sur le schéma en figure 3.1. Une cellule animale est composée d'une fine membrane (1), assemblage stable de lipides enrichi de divers autres composés, entourant le contenu cellulaire : le cytoplasme et le noyau. Le cytoplasme (2) est un milieu liquide riche en biomolécules de tous genres, dans lequel baignent des sous-unités structurelles spécialisées délimitées par une autre membrane au moins : les organites (5 à 10). On peut citer comme exemples connus d'organites le noyau (9) ou la mitochondrie (5). L'ensemble de la cellule est organisé et structuré de l'intérieur par un réseau de protéines assemblées en de complexes échafaudages et réseaux : le cytosquelette (4). Le liquide baignant l'ensemble des organites et du cytosquelette est nommé cytosol ; l'ensemble cytosol et cytosquelette est nommé hyaloplasme.

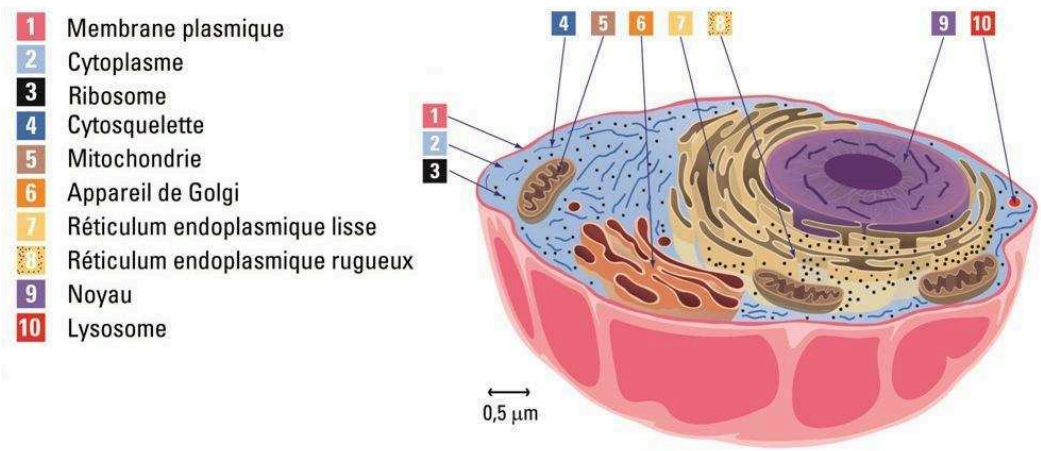


Figure 3.1 – Aperçu schématique de la compartimentation et composition d'une cellule animale "moyenne", adapté de [112].

Globalement, en pourcentage de masse, une cellule est composée de 70 % d'eau et 18 % de protéines, puis bien en dessous viennent les phospholipides (composants des membranes, 3 %), les polysaccharides (2 %), l'ADN et l'ARN (1,35 %) et d'autres petits composés variés [113]. L'ensemble est montré graphiquement dans la figure 3.2 ; on retiendra la prépondérance de l'eau et des protéines. Ces dernières ont une multitudes de rôles, de l'enzyme au cytosquelette.

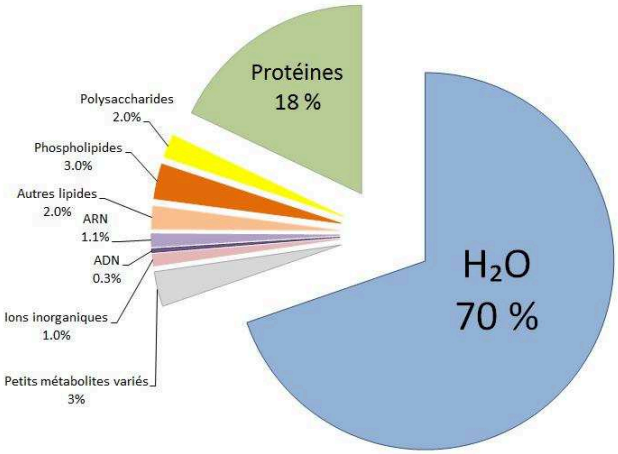


Figure 3.2 – Composition massique classique d'une cellule mammifère, sur les données issues de [113].

A ces données moyennes il faut ajouter que le vivant montre souvent des types cellulaires hautement spécialisés déviant de ces valeurs. Les fibres musculaires (figure 3.3 B), par exemple, sont de longues cellules pouvant aisément dépasser quelques millimètres, voire atteindre plusieurs dizaines de centimètres, en constituant le muscle sur toute sa longueur. Leur contenu est extrêmement riche en protéines dédiées à la contraction, et montre par ailleurs plusieurs noyaux par cellule. Les globules rouges (figure 3.3, A) de notre sang ont eux une forme biconcave, n'excédant pas les 10 µm, et sont dépourvus de noyau. Dans un autre type de spécialisation, le neurone (figure 3.3, C) montre aussi des dimensions très variables, avec une polarisation forte entre un corps cellulaire contenant la plus grande partie de la machinerie cellulaire, et une ou plusieurs

« élongations » conduisant le signal nerveux, pauvres en composants protéiques.

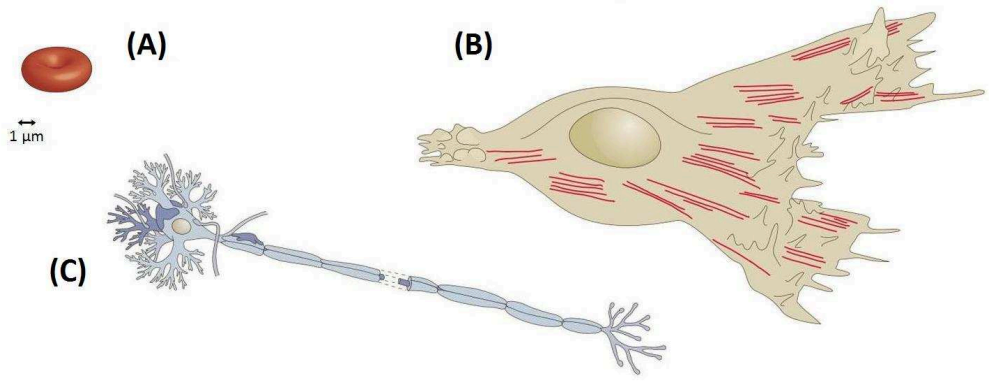


Figure 3.3 – Dessins schématiques comparatifs de quelques différents types cellulaires animaux.(A) Un globule rouge (érythrocyte). (B) Un fibroblaste. (C) Un neurone. Issu de [114].

Il sera important pour la partie discussion (section 3.4) de garder en tête la grande variabilité possible entre différents types cellulaire. Les cellules que nous utiliserons sont, elles, assez proches de ce qui a été présenté de façon schématique au début de cette partie, à l'exception de leur forme. En effet, elles sont de type épithéliale simple, c'est à dire formant un tapis monostratifié sur un support auquel elles adhèrent. On peut voir différents types d'épithéliums illustrés en figure 3.4 ; les cellules que nous utiliseront sont du type épithélium cuboïdal simple (a).

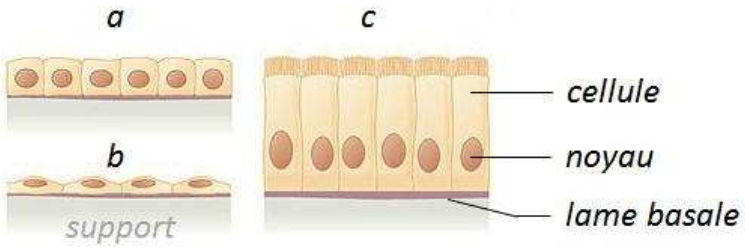


Figure 3.4 – Différents exemples schématiques d'épithéliums simples : cuboïdal (a) squameux (b) et colonnaire (c). Schéma dapté de [115].

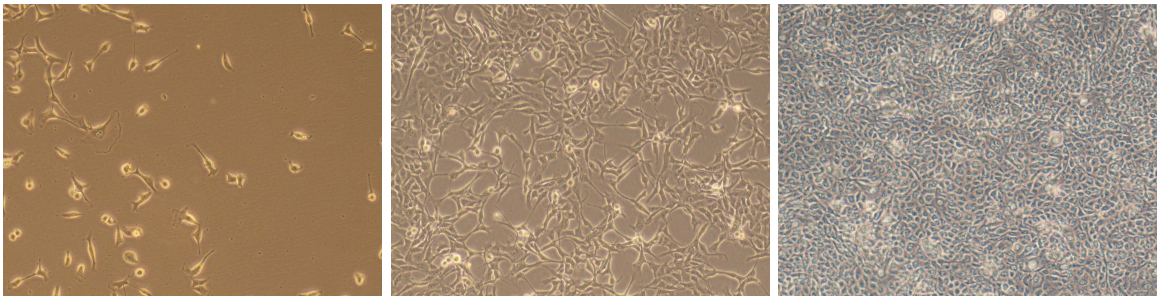
3.1.2 Les cellules MDCK

Au cours de nos travaux, les cellules MDCK ont été choisies pour leur résistance, leur disponibilité dans le laboratoire, leurs bonnes capacités d'adhérence, la géométrie homogène du tapis cellulaire formé et le foisonnement d'études à leur propos dans la littérature.

Les MDCK, acronyme de Madin-Darby Canine Kidney, forment une lignée de cellules intensivement étudiées en biologie depuis leur isolation en 1958 par Madin et Darby du rein d'une chienne. Une lignée est une population de cellules capables de se reproduire théoriquement à l'infini et de façon à présenter les mêmes caractéristiques d'une génération à l'autre. Concernant les MDCK, ces caractéristiques sont celles de cellules mammifères adhérentes à leur support de culture. Lorsque l'on dispose plusieurs MDCK sur une surface et dans un milieu adéquats, ces cellules vont se diviser rapidement jusqu'à former un tapis continu composé de cellules étroitement

jointes et adhérentes sur la surface. Une fois ce tapis formé, elle réduiront drastiquement leur vitesse de réplication pour atteindre une phase "stationnaire" : on parle de confluence. Plusieurs études ont détaillé leur caractéristiques morphologiques, variables au cours du développement du tapis ; ici [116] [117] lorsque non précisé.

Après ensemencement les cellules individuelles se déposent par gravité puis entrent en division : la densité cellulaire augmente rapidement (figure 3.5a). Les cellules montrent d'importantes surfaces (en coupe parallèle à la surface de culture), autour de 400 μm^2, mais de faibles hauteurs (ordre de quelques µm). Alors que la densité des cellules sur la surface augmente, les cellules sont de plus en plus en contact avec leurs voisines (figure 3.5b). Leur surface individuelle diminue, mais elles gagnent en hauteur. Une inhibition par contact apparait progressivement. A confluence (figure 3.5c), le tapis est formé de cellules parallélépipédiques, hautes d'une dizaine de micromètres (7 à 12 µm selon les sources) et de faible surface (<200 μm^2). Le tapis est dit "simple" car monostratifié et homogène. Une variabilité d'épaisseur existe, de l'ordre de 1 à 3 μm [118] dans un même tapis. A confluence trop avancée cependant, le tapis ne sera plus monostratifié : des amas, des dômes et structures de plusieurs cellules peuvent apparaitre localement.



(a) (b) (c)

Figure 3.5 – Étapes de développement du tapis cellulaire, de la faible densité de cellules (a) qui s'interconnectent de plus en plus (b) jusqu'à atteindre la confluence (c). Images au microscope à contraste de phase (x20).

D'autres lignées ont été envisagées mais mises de coté après quelques essais expérimentaux :

— Les DC-3F, lignée de fibroblastes cancéreux issus des poumons de hamster chinois, adhérentes mais formant des tapis bien moins homogènes, moins épais et plus longs à cultiver.
— Les HeLa, lignée humaine cancéreuse du col de l'utérus, formant un tapis homogène plus épais que les MDCK mais montrant une légèrement moins bonne adhérence.

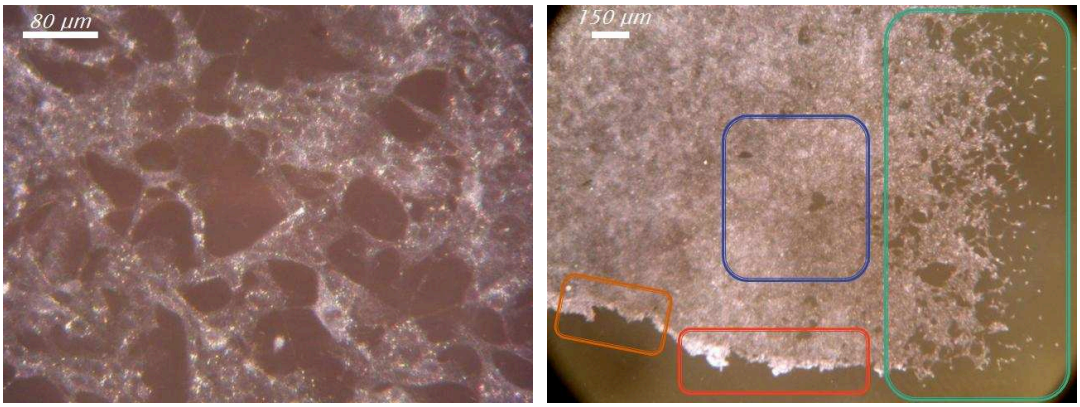
3.1.3 La culture des MDCK pour leur étude sur notre montage d'imagerie ATR

Au quotidien, les MDCK sont cultivées en flasques selon le protocole donné en Annexe A.2 (page 125), dans un milieu de culture complet (DMEM + 10 % SVF) en incubateur à 37°C et 5 % CO_2. Pour notre expérience, après confluence en flasque, les cellules étaient détachées par trypsination et ensemencées sur les supports en silicium dans leur milieu de culture, comme détaillé en Annexe A.3 [1] (page 127). Après un temps d'incubation de l'ordre de 2 jours, les cellules

1. La mise en place de ce protocole a demandé un certain temps, de par la surface très lisse du support de culture qui y complique l'adhérence des cellules et l'opacité qui empêche des observations simples au microscope.

atteignent la confluence ; le tapis cellulaire est rincé puis coupé en son milieu et la moitié enlevée afin de libérer une surface de référence.

On voit en figure 3.6a un support en pleine colonisation, et en figure 3.6b un résumé des principaux défauts du tapis cellulaire à éliminer. La découpe à l'aide d'un rasoir du tapis déjà à confluence forme souvent des décollements et irrégularités (zones orange et rouge). Pour circonvenir à ce problème, les cellules sont enlevées de la surface destinée à la référence alors qu'elles ne sont qu'en début de colonisation (une dizaine d'heure après ensemencement), afin de n'avoir qu'un tapis encore lâche (type zone verte) à découper au rasoir sur cette moitié de pastille lorsque que l'autre est à bonne confluence. L'irrégularité la plus délicate à éviter est la présence de zones quasi-confluentes mais inhomogènes (zone bleue) ; l'attente d'une confluence marquée et l'ajout d'une caméra au dessus du montage (développé plus loin) permettent d'assurer que les trous éventuels soient rares et jamais supérieurs à 1 % de la surface moyennée en un point de l'image térahertz.



(a) Tapis sub-confluent. Les cellules montrent des interconnexions nombreuses et des formes triangulaires aplaties.

(b) Principaux défauts à éliminer lors de la culture de tapis cellulaire : les défauts de découpe de la bordure du tapis (orange et rouge), les zones quasi-confluentes mais inhomogènes (bleu) et les zones encore en pleine colonisation (vert).

Figure 3.6 – Observations au microscope optique de cellules MDCK.

Un support de culture, vu du dessus, après insertion sur le montage, est montré en figure 3.7. On y voit le tapis cellulaire à droite, d'apparence blanchâtre, et la surface de référence à gauche, le tout baignant dans du milieu (rosé sur cette photo, mais en pratique incolore).

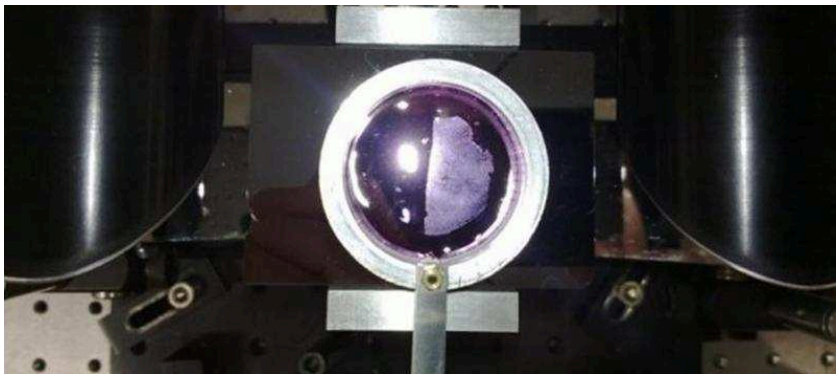


Figure 3.7 – Support de culture final inséré sur le montage, vu du dessus, avant acquisition.

Une fois le support en silicium inséré dans le montage, les cellules baignent dans 3 ml de solution tampon (HBSS tamponné à 10 mM d'HEPES) ; ce milieu permet aux cellules de survivre de nombreuses heures en conditions ambiantes (21°C). Le volume extracellulaire a été choisis de sorte à être à minima 1000 fois plus important que le volume intracellulaire attendu, afin de pouvoir considérer le milieu extracellulaire comme une référence stable même en cas de fuite de contenu intracellulaire.

Une caméra CCD (1024x768 pixels), installée au dessus du support, permet d'enregistrer sur une zone d'environ 10x7,5 mm l'état du tapis. Elle est centrée sur le point de mesure (zone de focalisation de l'onde évanescente) par des réglages préalables aux expériences. Cette caméra permet de simplifier la mise en place exacte de la pastille, support de culture, mais surtout de surveiller au cours des acquisitions d'éventuels décollements de tapis qui invalideraient toute la mesure (les cellules n'étant alors plus sondées par l'onde évanescente).

Ainsi disposé, sans préparation spécifique et en conditions physiologiques (exception faite de la température), le tapis de MDCK vivantes va pouvoir être imagé.

3.2 Observation d'un contraste térahertz entre les cellules et leur milieu

Cette section a pour objectif principal de démontrer l'existence d'un contraste stable en térahertz, entre les cellules et leur milieu tamponné, et de le caractériser, avant d'en chercher l'origine en section 3.3.

3.2.1 Acquisition des images térahertz

Une fois la pastille positionnée dans le montage et emboitée pour pouvoir être déplacée, quelques mouvements en XY sont nécessaires pour s'assurer de chasser tout l'air entre pastille et prisme. Dans le cas contraire, une fine couche d'air entrainerait une modification de la réflectivité de l'onde térahertz incidente, et donc une altération du signal mesuré. Le positionnement sur le dispositif expérimental est rappelé schématiquement en figure 3.8.

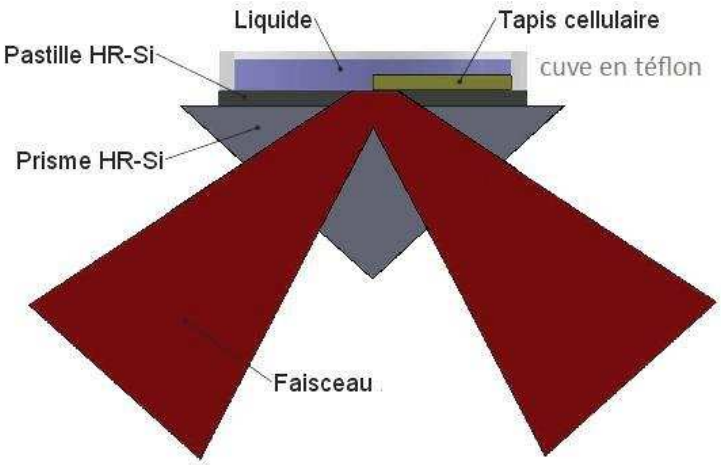


Figure 3.8 – Rappel schématique en coupe du positionnement de la pastille, couverte de l'échantillon, sur le montage ATR.

En chaque pixel, on acquiert la valeur du champs térahertz pour 6 à 8 retards centrés autour du maximum d'amplitude, puis la valeur du maximum (PA, en unité arbitraire) est obtenue par un ajustement à une courbe parabolique, tel que montré dans l'insert de la figure 3.9.

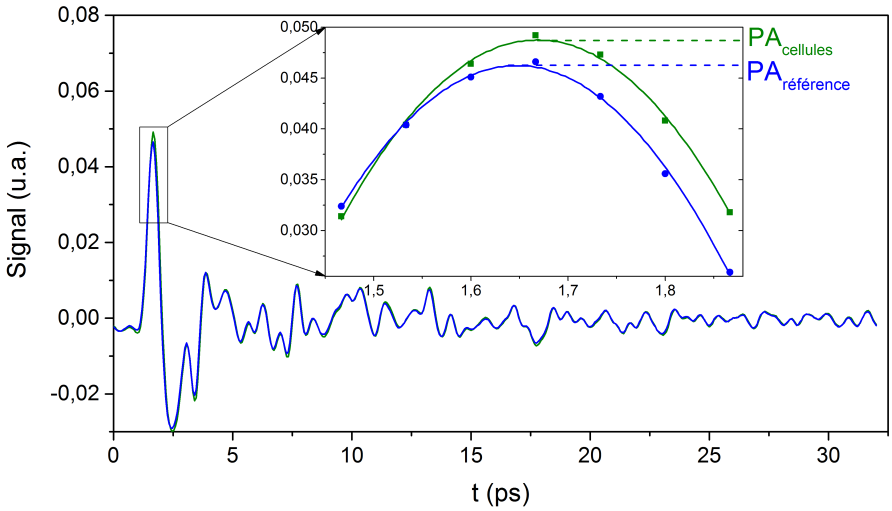


Figure 3.9 – Signal typique complet et la zone d'amplitude maximale en insert, acquise lors d'une expérience d'imagerie, pour des cellules (vert) ou leur référence (bleu).

Au cours des premières expériences portant sur la démonstration de l'existence d'un contraste, de grandes images et coupes de plusieurs dizaines de pixels sont réalisées, avec les valeurs "brutes" de PA. On parlera ensuite du contraste entre les zones cellules/référence en définissant Δ_{rel}, le contraste relatif : les PA des 2 zones respectives sont moyennés sur plusieurs pixels, puis Δ_{rel} est donné par l'équation (3.1).

$$\Delta_{rel} = \frac{PA_{cellules} - PA_{référence}}{PA_{référence}} \tag{3.1}$$

Un Δ_{rel} positif correspond donc à une référence moins réfléchissante que la zone du tapis cellulaire, et inversement pour un Δ_{rel} négatif.

3.2.2 Caractéristiques du contraste

Lors de la réalisation d'une image centrée sur la délimitation entre le tapis cellulaire et la zone de référence, un contraste est observé. On obtient ainsi une image complète comme montré dans la figure 3.10, reflet de la position du tapis cellulaire. La variation de signal entre les cellules et leur milieu (Δ_{rel}) est de l'ordre de 5,5 à 8 % d'une expérience à l'autre. Un exemple expérimental est montré en figure 3.11, en coupe le long du même axe X que dans l'image térahertz en figure 3.10 (pointillés noirs), mais pour une expérience distincte.

La coupe en figure 3.11 montre une valeur moyenne de Δ_{rel} = 5,6 % pour 3 acquisitions successives réalisées à 15 minutes d'intervalle. Cette durée totale de 30 minutes est intéressante car elle correspondra plus tard à la durée de suivi de contraste après diverses perturbations.

Le bruit pour un pixel donné est indépendant de sa position dans la référence ou dans le tapis cellulaire, et est de l'ordre de ±0,3 % avec des extrémums de 0,1 et 0,6 %. Le moyennage

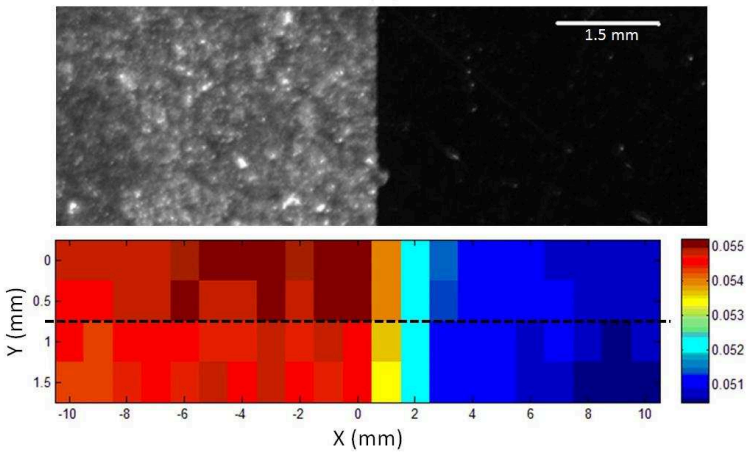


Figure 3.10 – Images du tapis cellulaire (gauche) et du milieu tampon (droite) à la surface de la pastille selon 2 modalités : caméra visible au dessus du montage (haut) et image térahertz (bas). L'image térahertz est présentée telle qu'acquise, en unité arbitraire du maximum d'amplitude de l'impulsion.

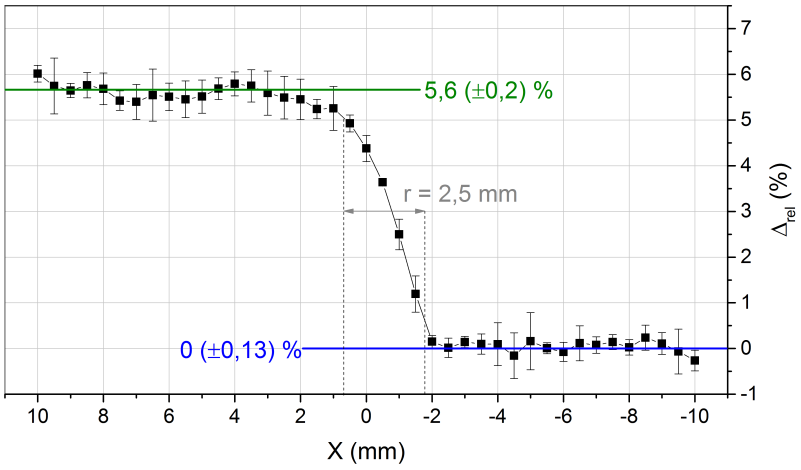
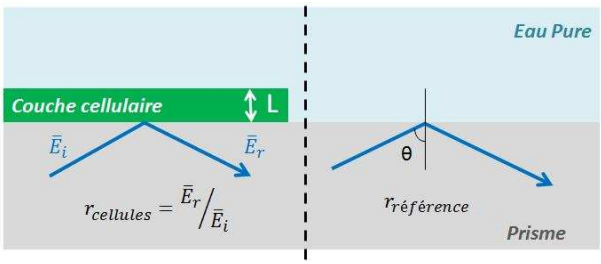


Figure 3.11 – Exemple typique de coupe à la perpendiculaire de la limite entre cellules et référence, pour 3 acquisitions à 15 minutes d'intervalle. Les annotations donnent les valeurs moyennes de contraste pour les deux zones et leur bruit respectif (vert et bleu). La résolution latérale r est lue graphiquement à 2,5 mm.

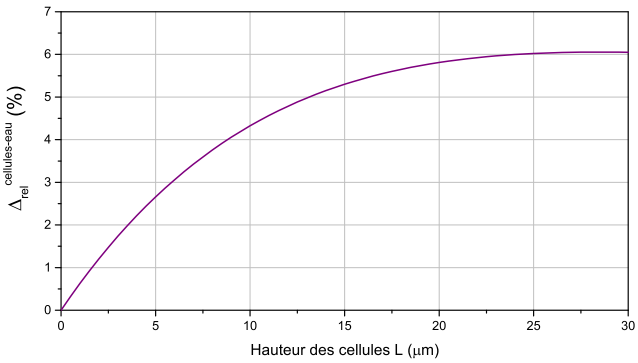
par zone respective permet d'atténuer le risque d'avoir un bruit trop important sur la mesure finale du Δ_{rel} global . En revanche, le bruit associé à la moyenne des points par zone est presque doublé entre la référence et la zone du tapis cellulaire (de ±0,13 % à ±0,2 % en figure 3.11). On interprète cette plus grande variabilité par l'irrégularité du tapis cellulaire comparativement à la référence (le milieu liquide). On voit bien sur la courbe typique que le plateau dû au tapis cellulaire (zone verte) est plus irrégulier que le plateau référence (zone bleue). Biologiquement, ceci peut-être attribué à la légère dispersion des hauteurs de cellules (de l'ordre de 1 à 3 µm selon la littérature [118]) et la répartition imparfaite des cellules ménageant localement des zones plus ou moins denses. Il est donc intéressant de multiplier les points de mesure dans le tapis pour avoir une meilleure idée de la valeur de Δ_{rel} globale, plutôt que dans la référence.

La résolution du dispositif, au sens de la distance nécessaire pour passer de 10% à 90% d'élévation du Δ_{rel} entre la référence et le tapis cellulaire, est également mesurable sur la figure 3.11. On y lit la résolution $r = 2,5$ mm. Autrement dit, dans l'approximation d'un faisceau gaussien, la tache de focalisation du faisceau térahertz est d'une largeur à mi-hauteur $FWHM = 2,3$ mm . Supposant une tâche de focalisation circulaire, la surface moyennée en une acquisition (un pixel) est donc de dimension $s = 4,1$ mm^2. Cette surface est très grande relativement aux dimensions des cellules à confluence (inférieure à 200 µm^2 = 2.10^{-4} mm^2) ; en première approximation on peut estimer qu'une mesure sonde plus de vingt mille cellules simultanément. Ainsi, bien que la résolution latérale soit très basse, inhérente aux longueurs d'onde térahertz (*cf* section §1.1), ont peut ici y voir un avantage assurant des mesure reflétant en quelques points un état global, moyenné, des cellules.

Le signe et la valeur du contraste sont en bon accord avec les résultats de modélisation. Prenant le modèle développé en chapitre 2 (figure 2.12) et utilisant les valeurs d'indice de cellules (type HeLa), fournies pour la première fois en 2014 par l'équipe de Shiraga [81], nous pouvons estimer le contraste Δ_{rel} théorique entre cellules et eau pure ($\Delta_{rel}^{cellules-eau}$). Ce contraste théorique, en fonction de la hauteur du tapis cellulaire, est montré en figure 3.12.



(a) Rappel de la configuration du modèle utilisée



(b) Contraste $\Delta_{rel}^{cellules-eau}$ attendu en fonction de la hauteur du tapis cellulaire L.

Figure 3.12 – Modélisation du système et contraste théorique attendu entre cellule et eau pure, en fonction de la hauteur du tapis cellulaire.

Pour des hauteurs de 7 à 12 µm comme attendu pour nos cellules MDCK, le contraste entre cellules et eau pure serait théoriquement d'environ 3,5 à 5 %. Sachant, par essai expérimental simple, que la différence de contraste entre eau pure et le milieu dans lequel baignent les cellules est d'environ 1%, nous parvenons à un contraste entre cellules et milieu théorique de 4,5 % à 6

% avec l'indice des cellules HeLa. Ces valeurs sont en très bon accord, tant sur le signe que sur l'ordre de grandeur, avec les 5,5 % à 8 % observés expérimentalement sur les cellules MDCK. Les légers écarts peuvent être compris comme étant issus des variabilités d'indice entre types cellulaires (HeLa versus MDCK) ; variabilités d'ores et déjà soulignées par les auteurs de [81] entre le type HeLa et deux autres types cellulaires.

La stabilité du contraste sur une demi-heure, comme vu en figure 3.11, nous permet d'envisager des expériences sur cette échelle. Le milieu tamponné choisi permet aux cellules de tenir à minima plusieurs heures, même si elles sont à 21°C et non 37°C. Une vérification de l'intégrité des cellules et de la stabilité du contraste sur plusieurs heures, au microscope optique et sur le montage térahertz, a été réalisée. Les cellules ne montrent aucune altération visible au microscope, et aucune variation de Δ_{rel} supérieure à ±0,4 %. sur une plage de 4h40.

3.2.3 Variabilité du contraste d'une expérience à l'autre

Par ailleurs, entre différentes acquisitions térahertz, la variation possible de Δ_{rel} entre 5,5 et 8 % est comprise comme le fait que nous n'avons pas toujours exactement le même état de confluence ; une différence dans l'avancement de la confluence ayant -selon la littérature- un impact sur la hauteur moyenne des cellules du tapis et leur disposition les unes par rapport aux autres.

Pour vérifier le lien entre valeur du contraste et développement du tapis cellulaire, nous avons réalisé un suivi de la valeur du contraste après ensemencement, et imagé le tapis en cours de développement par microscopie confocale.

Le suivi de la valeur du contraste s'étale de 1 à 5 jours après ensemencement à basse confluence (environ 1,5.10^3 cellules.cm^{-2}). Une telle concentration initiale correspond à une confluence attendue après approximativement 3 à 4 jours. La valeur de Δ_{rel} moyenne en chaque temps est donnée pour un ensemble d'à minima 3 acquisitions successives en térahertz (figure 3.13).

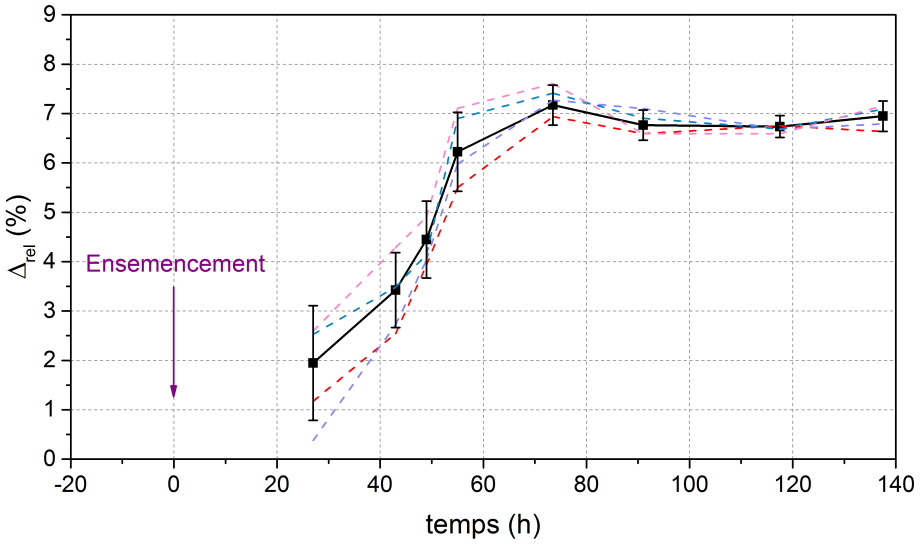


Figure 3.13 – Évolution du contraste selon le temps après ensemencement. La courbe noire est la moyenne des valeurs de contraste en différentes zones du tapis, tracées en pointillés colorés.

Les acquisition d'images confocales nous permettent d'estimer la hauteur des cellules au cours du développement du tapis cellulaire. Les cellules MDCK ont été ensemencées à faible concentration sur une lamelle de microscope, puis observées à 3 moments aisément distingables au microscope optique : peu après ensemencement, puis au tout début de la confluence, lorsque les cellules sont en contact entre elles mais encore peu denses, et enfin à confluence avancée. Les cellules ont été observées par marquage par 2 fluorochromes différents. Le premier, la Calcéine-AM (Sigma), est une molécule initialement non fluorescente, naturellement perméante grâce à son groupement acétoxyméthylique (AM). Une fois dans les cellules vivantes, celles-ci hydrolysent la molécule en calcéine simple, fluorescente. Le second fluorochrome utilisé est le CellTracker™ Red CMTPX (ThermoFisher), naturellement perméant et fluorescent. Les protocoles sont détaillés en Annexe A.4 (page 129). La Calcéine-AM se localise dans toute la cellule, alors que le CellTracker™ Red n'est pas perméant du noyau, ce qui permet de le distinguer du corps cellulaire. Ceci est un avantage pour rendre compte de la surface occupée par une cellule. En revanche, pour la visualisation en coupe de l'épaisseur du tapis cellulaire, le marquage complet de l'intérieur de la cellule est préférable.

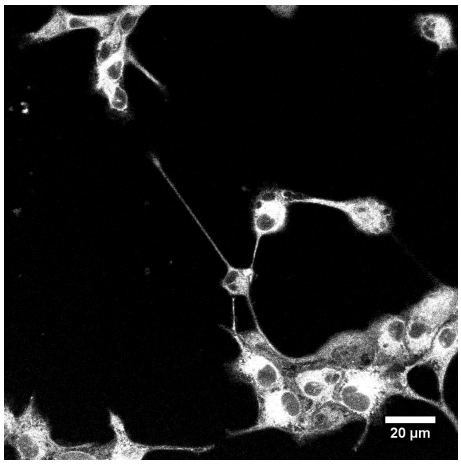


Figure 3.14 – Coupe dans un plan parallèle à la lamelle de microscope, une dizaine d'heures après ensemencement à faible concentration. Les cellules sont marquées par le CellTracker™ Red.

On observe en figure 3.14 que peu après ensemencement les cellules sont éparses. Observons à présent en figure 3.15 la confluence à son tout début ou à son état plus avancé. En tout début de confluence, les cellules ont des surfaces encore importantes, comme on peut le voir en figure 3.14, et d'épaisseur assez faible (figure 3.15c). On lit sur les coupes une hauteur inférieure à 5 µm. En état de confluence très avancée, supposément stationnaire selon [116], la surface par cellule a bien diminué (figure 3.15b) alors que la hauteur du tapis cellulaire a augmenté (figure 3.15d). On lit alors, pour un ensemble de 6 coupes dont celles exposées en figure 3.15d sont représentatives, une hauteur moyenne de 9,2 µm (±2,2 µm).

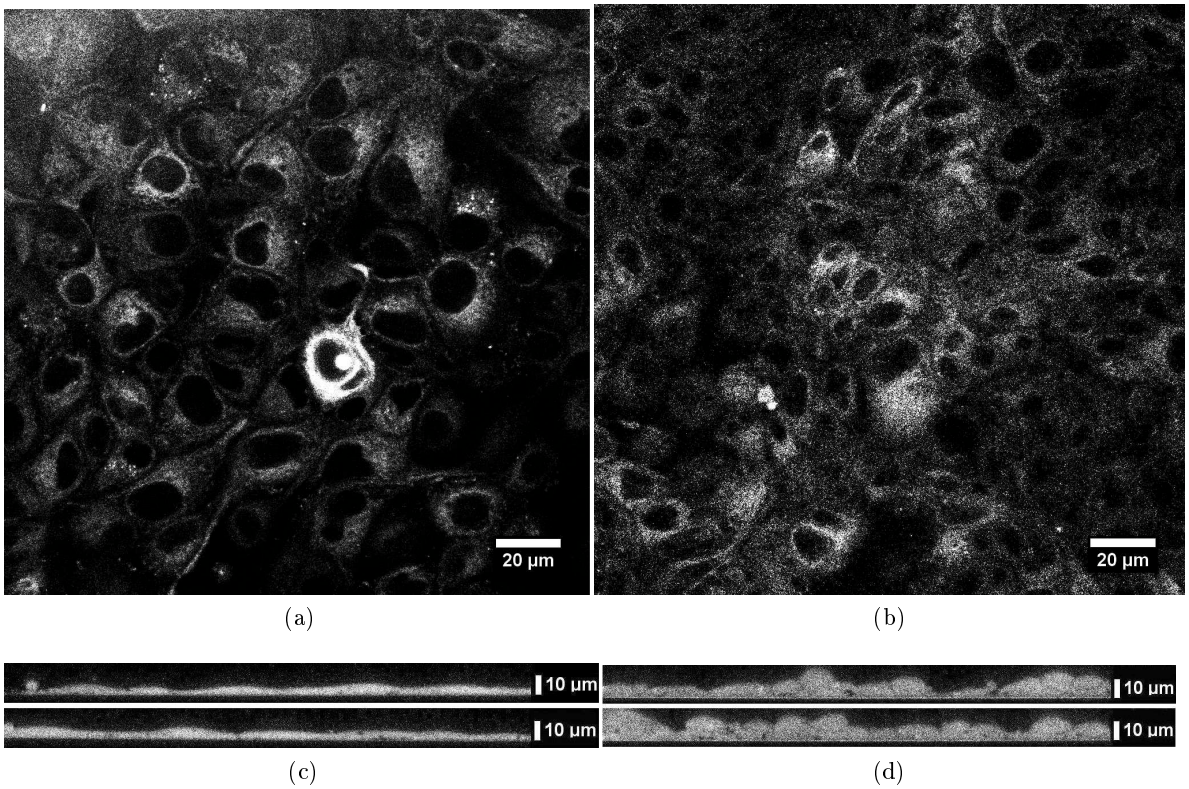


Figure 3.15 – Coupes dans un plan parallèle (a, b) ou perpendiculaire (c, d) à la lamelle, en début (a, c) ou stade avancé (b, d) de confluence. Les cellules sont marquées par la calcéine-AM (a, b) ou par le CellTracker™ Red (c, d).

Ces coupes sont en très bon accord avec les descriptions faites dans la littérature, détaillées en partie 3.1.2.

La compréhension de l'évolution du contraste montrée en figure 3.13 est donc confirmée par l'imagerie confocale. On lie la première phase de très faible et irrégulier contraste à la phase sub-confluente, ou les cellules sont éparses, de faible épaisseur et ne recouvrant pas encore toute la surface. La variabilité du contraste décroit sensiblement alors que les cellules se multiplient suffisamment pour recouvrir le support de culture. On comprend ensuite l'augmentation du contraste comme le reflet de l'augmentation de l'épaisseur du tapis cellulaire à présent confluent, jusqu'à une phase stationnaire ou les cellules ont atteint leur hauteur maximale.

La variabilité de Δ_{rel} d'une expérience à l'autre s'explique donc bien par l'état d'avancement de la confluence du tapis. Nous normaliserons par la suite le contraste, mais il contient intrinsèquement une information potentiellement utile. Par exemple, une vérification de la valeur de Δ_{rel} en début d'acquisition permet de vérifier que le tapis est à confluence suffisante. Ceci est une aide non négligeable car l'opacité du support en silicium cristallin ne permet pas d'observation simple au microscope. De façon plus générale, la possibilité de travailler sur des échantillons à la même étape de confluence (juste avant avant que la hauteur maximale soit atteinte) peut être un atout pour diminuer la variabilité ou pour distinguer des comportements différents selon l'état de confluence.

3.3 Nature du contraste observé

Afin de comprendre le contraste que nous avons caractérisé, une approche expérimentale est ici proposée. Nous partons de l'hypothèse que l'agent source de contraste est intracellulaire. En réalisant la perméabilisation de la membrane cellulaire, c'est à dire en augmentant les transferts de molécules à travers elle, un rééquilibrage de la quantité des molécules concernées entre milieux intra- et extra-cellulaires est attendu. Si les molécules concernées par la perméabilisation sont source du contraste, celui-ci devrait diminuer car les molécules, en passant vers le milieu extracellulaire où elles sont très diluées (donc n'influencent pas la référence), sortent de la zone de tapis cellulaire sondée par l'onde évanescente.

Il s'agit dans cette partie de montrer que grâce à des conditions d'acquisition adaptées aux dynamiques attendues (sous-section 3.3.1), nous pouvons observer une telle chute de contraste pour un des agents de perméabilisation testés (3.3.2). Cet agent s'avérant être un perméabilisant "global", permettant la fuite de tout le hyaloplasme hors des cellules, nous chercherons ensuite les molécules dont l'apparition en milieu extracellulaire est corrélée à la diminution du contraste (3.3.3), pour ensuite confirmer la cohérence de nos déductions par plusieurs tests complémentaires (3.3.4).

3.3.1 Conditions d'acquisition

Au cours des expériences précédentes démontrant l'existence d'un contraste, de grandes images et coupes de plusieurs dizaines de pixels ont été réalisées, prenant plusieurs minutes chacune. A présent, l'information extraite est la valeur de ce contraste, Δ_{rel}, selon un mode d'acquisition devant être plus rapide.

En effet, les dynamiques biologiques adressées lors des perméabilisations chimiques réalisées sont attendues sur des plages de valeurs de quelques minutes à plusieurs dizaines de minutes. Le suivi sur plusieurs dizaines de minutes impose de conserver une mesure comportant à chaque fois la référence, pour contrer les dérives lentes du montage. A l'opposé, la volonté d'adresser des dynamiques de l'ordre de la minute ($f_{observée}$≈0,02 Hz) impose une mesure de Δ_{rel} la plus rapide possible, au maximum toutes les 30 secondes si l'on veut respecter le critère de Shannon ($f_{échantillonage} \geq 2 * f_{observée}$). Par ailleurs rappelons que dans la partie précédente (3.2.2), il a été souligné l'intérêt du moyennage des points sur chaque zone, et la nécessité d'un plus grand nombre de points dans la zone du tapis cellulaire pour contrer une variabilité des valeurs un peu plus importante (due aux inégalités du tapis).

De ces contraintes découlent les paramètres suivants. Pour acquérir rapidement Δ_{rel}, seule une ligne de 5 pixels le long de X est acquise ; 3 sont situés dans la couche cellulaire, 2 sur la référence. Une valeur de Δ_{rel} est alors acquise en 15 à 17 secondes ; la mesure est répétée toutes les minutes.

Par ailleurs, les expériences ne sont pas directement comparables du fait des différentes valeurs de Δ_{rel} initiales. En normalisant ce contraste relatif sur sa valeur à un temps t=0 défini, on peut obtenir sa valeur normalisée Δ (équation (3.2)) et en observer ses variations sous différentes conditions, au cours d'expériences distinctes.

$$\Delta(\mathrm{t}) = \frac{\Delta_{rel}(t)}{\Delta_{rel}(t=0)} \tag{3.2}$$

Dans notre cas, la normalisation se fera sur la valeur moyenne de 5 acquisitions avant la perturbation à un instant t=0. En figure 3.16 est montrée la stabilité de Δ sur plusieurs heures, comme évoqué en fin de section 3.2, pour un tapis baignant simplement dans son milieu et sans aucune perturbation. L'interprétation des différentes plages de valeurs de Δ est également indiquée.

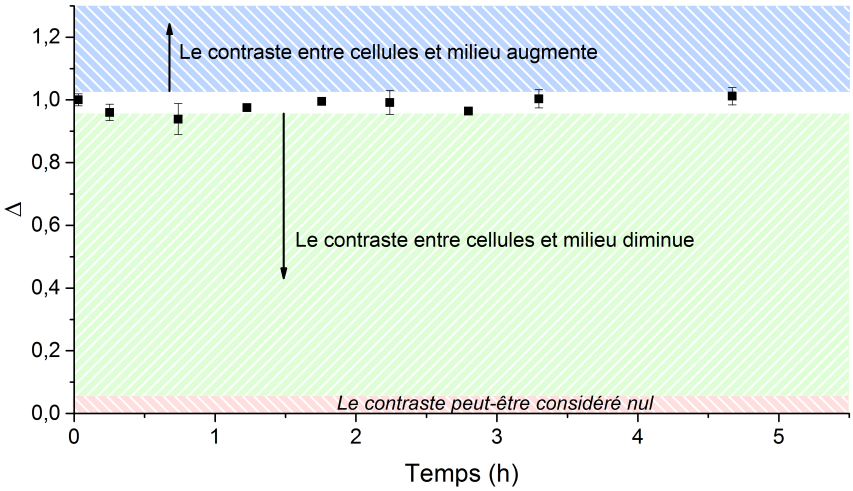


Figure 3.16 – Stabilité du contraste normalisé sur 4h40 et détail de la signification des zones de valeurs de Δ.

3.3.2 Perméabilisations chimiques

Les cellules MDCK ont été soumises à différents types de perméabilisation. La membrane plasmique et les endomembranes ont des perméabilités différentielles aux composés ; leur rôle est à la fois de délimiter et contenir, mais aussi d'assurer les échanges nécessaires entre différents compartiments. Les membranes cellulaires sont de véritables interfaces aux propriétés complexes ; les perméabiliser consiste à augmenter les transferts de biomolécules à travers elles. En biologie, on utilise souvent des perméabilisations pour introduire des molécules d'intérêt [119–122] (fluorophores pour l'imagerie, drogues diverses à action intracellulaire, transfection...) ou au contraire pour accéder aux molécules intracellulaires [123, 124] (caractérisation de cascades réactionnelles en enzymologie, étude de l'ADN...). Dans le cas de cellules vivantes, l'objectif est de perméabiliser de façon douce afin de ne pas perdre immédiatement la structure cellulaire, et sur notre montage d'être certains de sonder durant toute l'expérience un tapis cellulaire d'épaisseur constante dans la zone de l'onde évanescente.

Dans notre cas, deux types de perméabilisation ont été réalisées séparément : une perméabilisation sélective aux ions, et une perméabilisation générale non sélective.

Perméabilisation spécifique aux ions

La perméabilisation sélective aux ions K^+ a été réalisée par la valinomycine. Cet agent se loge dans les membranes cellulaires et y aménage des canaux très sélectifs aux ions K^+. Ceux-ci vont pouvoir passer dans les deux sens, et in fine équilibrer leur concentration par diffusion simple entre les compartiments intra et extracellulaires, contrairement à l'état physiologique naturel où la partie intracellulaire présente une concentration presque 40 fois supérieure à celle extracellulaire [125].

La valinomycine a été choisie à 10 µM, pour une action perméabilisante rapide sur les MDCK (ordre de la dizaine de minute) [126–128] sans problème de toxicité, détachement ou gonflement excessif dans le même temps (pour des traitements d'au moins une heure [129], vérifié au microscope sur nos cultures pour 1h sous 100 µM). Cette perméabilisation a été la première envisagée, car les travaux précédents de l'équipe (cf section 1.4) démontraient une origine ionique au contraste d'imagerie térahertz dans les axones de neurones.

Aucune des acquisitions n'a montré de variation de Δ hors du bruit, même sur plus de 2h d'acquisition. La ouabaïne [130–132], autre perturbateur de l'équilibre ionique, a également été testée, plus rapidement, mais aucune variation de Δ significative n'a pu être montrée non plus. Le déséquilibre ionique entre l'intérieur et l'extérieur de la cellule ne semble donc pas, dans notre cas d'étude, être la source du contraste observé. Ces résultats seront corroborés en sous-section 3.3.4 par d'autres approches, et en section 3.4 sera proposée une explication à un tel écart aux conclusions des expériences sur les neurones.

Perméabilisation non sélective

La perméabilisation non sélective a été réalisée par la saponine [2]. La saponine est un détergent doux qui, selon l'interprétation actuelle la plus répandue, crée des trous dans la membrane plasmique (mais pas dans les endomembranes) en se liant fortement à un de ses composants, les molécules de cholestérol, puis en les arrachant [133]. Les trous observés seraient de l'ordre de 100 nm à 1 µm [134], c'est à dire d'un éventail si vaste que la perméabilisation n'est que peu sélective en taille et pas du tout en type moléculaire. Tout le hyaloplasme peut fuir vers le milieu extracellulaire.

La saponine a été choisie à 75 µg/ml, avec des tests complémentaires dans la gamme de [5 ;100] µg/ml, pour son action perméabilisante rapide (ordre de quelques minutes) sans altération de la morphologie cellulaire globale [135]. Les détachements observés en culture apparaissaient toujours au moins au-delà de 30 minutes pour une concentration de 75 µg/ml ; un suivi minute par minute a été réalisé à 80 µg/ml au microscope optique et a montré une modification nette de la forme des cellules et des décollements locaux vers 35 minutes. Toutes les expériences étaient par ailleurs suivies par la caméra située au dessus du montage, pour vérifier l'absence de grands décollements.

On observe en figure 3.17 que la saponine induit une chute du contraste au cours des 30 minutes suivant son introduction. Une telle chute est interprétée comme la diminution de la concentration intracellulaire des éléments créant le contraste, par leur fuite vers le milieu extracellulaire via les pores membranaires créés. Il est important de noter que c'est plus exactement une asymé-

2. La saponine regroupe sous son nom plusieurs saponosides, hétérosides complexe souvent extrait de plante. Dans notre cas il s'agit de la saponine (les saponosides) issue de l'écorce de Quillaja Saponaria.

trie de répartition entre les deux compartiments qui serait source de contraste ; on peut imaginer en sens inverse que c'est un élément du milieu tamponné, absent de l'intérieur des cellules qui crée le contraste. Cependant, cette hypothèse est moins crédible car le milieu tamponné n'est constitué que d'ions (qui ne semblent pas participer suffisamment au contraste, compte tenu des résultats précédents de perméabilisation sélective, et comme nous le verrons également en partie 3.3.4), de glucose et d'HEPES en très faible quantité (1 g/l et 2,4 g/l respectivement). Nous suivront donc l'interprétation principale, celle de la diminution de la concentration intracellulaire des éléments créant le contraste, par leur fuite vers le milieu extracellulaire via les pores membranaires créés par la saponine.

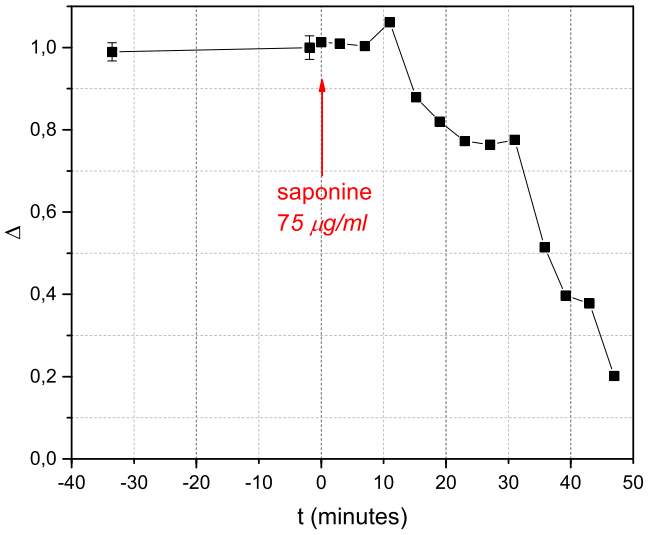


Figure 3.17 – Variations de Δ lors de la perméabilisation non sélective par la saponine.

Dans le cas de perméabilisation spécifique (comme la valinomycine) à un seul type de molécule, si le contraste avait diminué, alors l'origine du contraste aurait été directement déduite. Dans le cas d'une perméabilisation non spécifique comme la saponine, la diminution du contraste indique la présence d'agents créant le contraste dans le hyaloplasme qui "fuient" vers l'extérieur mais sans détail supplémentaire sur sa nature. Il faut alors affiner la recherche, dans le hyaloplasme sortis de la cellule, du type moléculaire source de contraste.

3.3.3 Quantification des protéines extracellulaires (BCA) et données qualitatives sur leur taille (Bleu de Coomassie)

La méthode que nous avons choisie pour affiner la connaissance de la nature du contraste est d'essayer de chercher dans le milieu extracellulaire les molécules dont la sortie est directement corrélée à la baisse du contraste lors de la perméabilisation non sélective. La première hypothèse remplaçant celle d'un contraste ionique fût celle d'un contraste d'origine protéique. En effet, ce sont les protéines qui constituent la plus grande portion du hyaloplasme après l'eau, loin devant l'ADN (majoritairement dans le noyau), l'ARN, les phospholipides (majoritairement dans la membrane) et les autres petits composés, comme évoqué dans la partie 3.1.1.

Il s'agit donc ici de quantifier les protéines dans le milieu extracellulaire au fil du temps lorsque les cellules sont perméabilisées. Pour ce faire, deux méthodes différentes ont été utilisées dans le même objectif de quantification des protéines : le test BCA et le SDS-PAGE au Bleu de Coomassie.

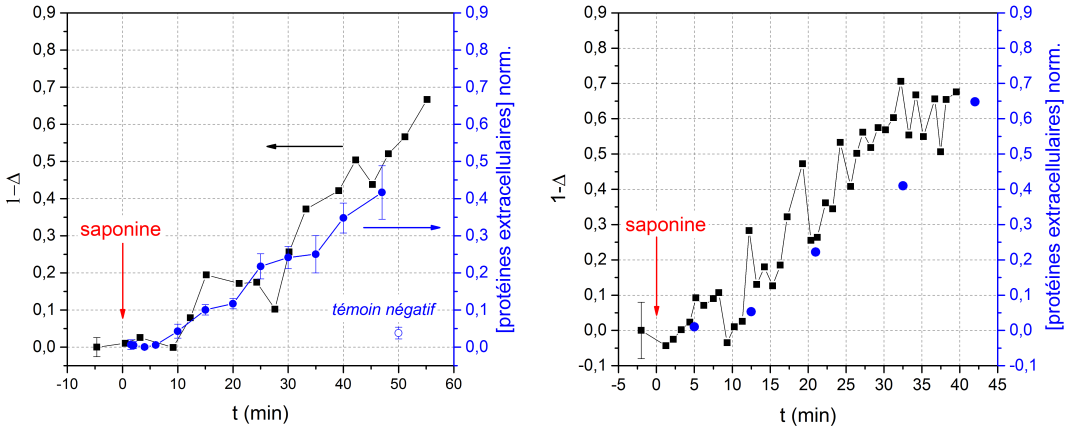
BiCinchoninic acid Assay

Pour **doser la quantité totale de protéines et de peptides présents dans le milieu extracellulaire**, nous avons utilisé un kit BCA (Thermo Fisher), pour BiCinchonininc acid Assay [136]. Ce test est un test colorimétrique, basé sur la formation hautement spécifique d'un complexe de couleur violette de l'acide BiCinchoninic avec les ions Cu^{+}. Or, les protéines (et les peptides de plus de 3 acides aminés environ) réduisent les ions Cu^{2+} en Cu^{+}en milieu alcalin : la quantification des ions Cu^{+}(par absorbance vers 560 nm) est proportionnelle à leur concentration. Ce test est classique, bien que moins utilisé que le Bradford, standard de laboratoire. Il a été choisi car contrairement au Bradford, il est moins sensible aux détergents et aux composés non protéiques issus de lysats de cellules [136]. Par ailleurs, nous parlerons toujours des protéines ET des peptides, mais par souci de clarté ne sera évoqué que le terme de « protéines » par la suite.

Pour notre expérience, le BCA est réalisé sur une plaque 24 puits dans lesquels des MDCK sont à confluence et dans un milieu tamponné simple (sans ajout de protéines) de faible volume. La saponine (75 µg/ml) est introduite à t=0 dans tous les puits exceptés ceux de contrôles négatifs (pas de traitement), puis le milieu extracellulaire est retiré puits par puits à des temps différents. Chaque prélèvement de puits est dosé trois fois. On obtient ainsi au fil du temps la variation de la quantité extracellulaire de protéines, larguées par les cellules suite à leur perméabilisation. Les témoins négatifs (tapis sans traitement et puits sans cellules) et positifs (tapis traités et désagrégés pour récupérer l'ensemble des protéines) permettent respectivement de vérifier qu'en l'absence de perméabilisation la quantité de protéines libérées est négligeable et de normaliser la courbe obtenue. Le protocole détaillé est disponible en Annexe A.5 (page 130).

Les résultats sont exposés en figure 3.18a. Ils montrent que la concentration extracellulaire de protéines, signalée en bleu, augmente de façon significative après perméabilisation, comparativement au puits témoin ; cette variation signe la "fuite" des protéines intracellulaires vers le milieu extracellulaire, permise par la création de pores dans la membrane plasmique. En parallèle, les variations de 1-Δ pour une autre expérience sont indiquées en noir. On retrouve une forme de plateau suivi d'une augmentation de 1-Δ (c'est à dire une diminution de Δ). Il semble que les variations de 1-Δ et de la concentration protéique extracellulaire normalisée soient directement corrélées, au bruit des deux mesures près.

Pour confirmer les observations faites sur plaques 24 puits, un BCA a été effectué en 4 temps différents sur le milieu extracellulaire d'une pastille en parallèle d'acquisitions térahertz sur une autre pastille ensemencée et traitée à l'identique. Le résultat est montré en figure 3.18b. Ces mesures ont valeur de contrôle, mais sont limitées par l'impossibilité d'effectuer des triplicats ou plus de points, de par les volumes et concentrations rencontrés. Les prélèvements étant réalisés sur de plus grand volume (plusieurs ml) ils sont plus bruités, mais l'absence de triplicat empêche l'estimation de ce bruit. Ces mesures sont donc moins fiables, mais nécessaires pour s'assurer que les différences de conditions de culture entre plaques 24 puits et pastilles n'influencent pas



(a) Comparaison de la concentration protéique extracellulaire normalisée (dosée par BCA) et de la variation de 1-Δ, réalisés séparément.

(b) Contrôle : Comparaison de la concentration protéique extracellulaire normalisée et des variations de 1-Δ, réalisés sur 2 pastilles identiques, simultanément.

Figure 3.18 – Corrélation de la perte de contraste en térahertz avec la fuite des protéines vers le milieu extracellulaire.

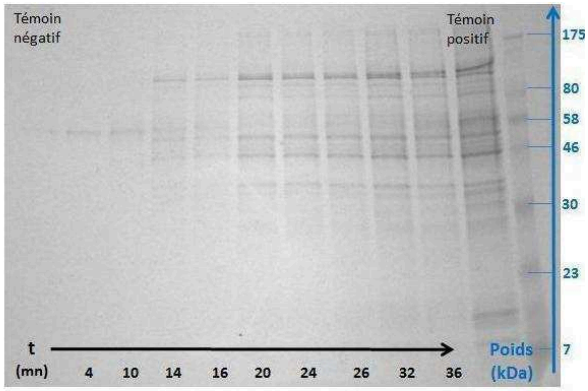
de façon drastique leur réaction à la perméabilisation chimique. Ce contrôle montre aussi une bonne corrélation entre le BCA et 1-Δ, même si la mesure de chaque point du BCA est entachée d'une plus grande erreur potentielle par l'absence de réplicats, et que la mesure térahertz était assez bruitée ce jour là (sauts de valeurs liés à des instabilités du laser).

Pour résumer, lorsque la perméabilisation permet la sortie des protéines vers l'extérieur de la cellule, 1-Δ augmente avec la concentration protéique extracellulaire, et ce de façon étroitement corrélée. La compréhension de cette corrélation est que le contraste Δ est majoritairement dû à la concentration intracellulaire en protéines. Notons plus précisément que c'est à la concentration massique que Δ semble sensible, puisque la corrélation est faite avec le BCA qui donne une concentration massique (normalisée).

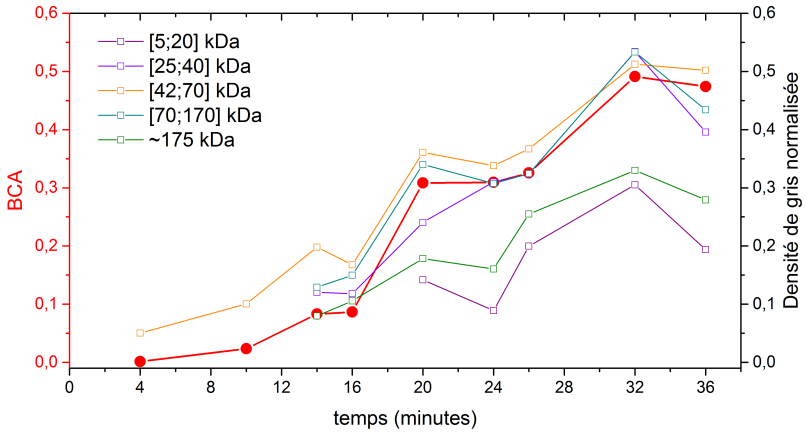
Électrophorèse sur gel de polyacrylamide colorées au Bleu de Coomassie

Pour **visualiser la taille des protéines dosées par le BCA et obtenir une seconde mesure de la concentration protéique extracellulaire**, des électrophorèses sur gel de polyacrylamide (SDS-PAGE) colorées au Bleu de Coomassie ont été réalisées. L'électrophorèse est une technique physique de séparation de composants (ici, des protéines) par migration différentielle au sein d'un gel aux bornes duquel est appliquée une tension électrique. Les protéines, chargées, migreront à des vitesses variables selon leur taille. En arrêtant la migration au bon moment, on obtient un étalage graduel des protéines le long du gel, qu'un bain dans un colorant spécifique aux protéines, le Bleu de Coomassie, permettra de visualiser sous forme de bandes. Un mélange composé de protéines de tailles connues est utilisé en parallèle pour pouvoir comparer la position de chaque bande aux bandes de ces marqueurs de poids moléculaire, et ainsi « étalonner » la mesure. Ce test permet surtout un apport qualitatif sur la taille des protéines engagées, mais aussi semi-quantitatif en renfort des mesure BCA, par visualisation de l'intensité des bandes pour différentes durées de perméabilisation.

Le gel obtenu par SDS-PAGE montre une nette augmentation de la quantité de protéines présentes dans le milieu extracellulaire. Elles sont de tailles très variées, visibles par les bandes au nombre et à l'intensité croissants (bleu de plus en plus foncé) . La photographie du gel en noir et blanc est donnée en figure 3.19a. A partir de celle-ci, nous pouvons exprimer le niveau de gris moyen pour chaque temps (c'est à dire chaque colonne), normalisé sur le témoin positif (tout le contenu cellulaire), et ce pour plusieurs plages de tailles moléculaires.



(a) Photographie annotée d'un gel complet.



(b) Analyse des niveaux de gris moyens normalisés selon la gamme de taille de protéine (analyse densitométrique) et comparaison au BCA réalisé sur les même extraits.

Figure 3.19 – Résultat du SDS-PAGE au Bleu de Coomassie (a) et son analyse densitométrique comparée au résultat de BCA (b).

Malgré le caractère imprécis de la méthode de densitométrie, on peut observer plusieurs points :

— la sortie de protéines de toutes tailles, signant une perméabilisation au spectre large, selon une dynamique globalement très proche du BCA. On observe que la quantité de protéines dans le compartiment extracellulaire suit bien les résultats du BCA. Parmi les bandes intenses, on peut penser retrouver les éléments les plus abondants[3] du cytosquelette :

3. Pour affirmer le caractère abondant attendu d'une protéine, nous nous appuyons sur le site Proteomaps, qui propose la visualisation des participations relatives de chaque protéine au protéome d'une cellule. L'affichage va de la fonction générale (métabolisme, cytosquelette etc..) jusqu'au noms individuels des protéines. Les protéomaps utilisées ici sont données en figure A.2, issues des données de cellules HeLa ; le site est consultable à www.proteomaps.net.

actine G (42 kDa), cytokératines (44 et 53 kDa) et autres filaments intermédiaires tels que la vimentine (53 kDa), ou encore de la tubuline (53-57 kDa).

— 2 exceptions à cette tendance : pour les protéines de petite taille ([5 ;20] kDa) et au contraire celles de tailles supérieures à 170 kDa. Ces deux gammes montrent une sortie plus lente comparativement à leur niveau total dans les cellules. Entre 7 et 20 kDa, une gamme de protéines attendues en quantité importante sont les histones (13-15 kDa environ), protéines permettant la compaction de l'ADN dans le noyau. Ce seraient a priori elles qui constitueraient les bandes les plus sombres entre 7 et 23 kDa ; leur faible sortie signerait une spécificité partielle (attendue) de la saponine pour la membrane plasmique (perméabilisant peu les endomembranes, dont celle du noyau). Pour les tailles au dessus de 170 kDa, on peut envisager que les protéines sortent moins facilement, au point de compenser le fait qu'un petit nombre de grosses molécules suffit à participer de façon importante à la coloration du gel.

— Quelques bandes de protéines entre 46 et 58 kDa, présentes plus rapidement que les autres dans le milieu extracellulaire, croissant au cours du temps de perméabilisation. Une de ces bandes est déjà présente dans le témoin négatif (cellules non perméabilisées). Le témoin présente des protéines extracellulaires en quantité suffisante pour que leur trace soit visible sur le gel (vers 55 kDa) ; on retrouve ici le résultat déjà observé en BCA sur le témoin négatif d'une légère augmentation de la concentration protéique extracellulaire à la fin de l'expérience (figure 3.18a). On retrouve cette molécule, à priori extracellulaire, dans tous les puits. Aucune interprétation supplémentaire n'en est proposée, mais sa présence dans les résultats de SDS-PAGE confirment la cohérence des valeurs témoins du BCA.

Au final, le SDS-PAGE nous permet de consolider les résultats du BCA, et de les compléter d'une vérification des tailles engagées ainsi que quelques détails comme la confirmation de sortie du cytosquelette avec le cytoplasme.

3.3.4 Tests complémentaires et discussion

Le contraste ne saurait être ionique

La perméabilisation par la valinomycine n'a montré aucune variation significativement plus grande que le bruit. Ce résultat expérimental est renforcé par une estimation théorique à partir du modèle utilisé en Chapitre 2 et les données spectroscopiques connues pour des solutions d'ions inorganiques issus du travail de thèse d'un précédent doctorant, Jean-Baptiste Masson [84, 102, 109].

Entre le milieu extracellulaire et intracellulaire existe une asymétrie forte de répartition ionique, illustrée par ses valeurs typiques dans le tableau 3.1a. Les ions Na^+ et Cl^- sont respectivement 10 et 30 fois plus concentrés dans le compartiment extracellulaire, et les ions K^+ sont eux environ 40 fois plus concentrés dans le milieu intracellulaire. Cette asymétrie est entretenue activement par la cellule, et génère une différence de potentiel transmembranaire à l'état de repos. L'équilibre des charges total, malgré l'asymétrie des charges ioniques totales, est permis par la participation globale en charges négatives des macromolécules, plus particulièrement dans le compartiment intracellulaire.

Lors de la réalisation d'images térahertz en transmission d'un neurone, le contraste visible avait été interprété comme d'origine ionique. Plus exactement, c'est l'asymétrie de répartition entre les ions K^+ et Na^+qui avait été interprétée comme source du contraste. La substitution de Na^+ par des K^+ dans la partie intracellulaire, et inversement du coté extracellulaire, serait la source majeure de contraste, indépendamment des autres espèces ioniques. Nous ne pouvons connaitre individuellement la participation des ions aux variations d'indice, en revanche l'indice de solutions K^++Cl^- et Na^++Cl^- selon leur concentration est connu. Sous l'hypothèse d'une variation de contraste due à l'asymétrie seule des ions Na^+et K^+, indépendamment des ions Cl^- (ne remplissant alors qu'un rôle d'équilibre des charges), nous pouvons établir un modèle simplifié comme montré dans le tableau 3.1b. Nous estimons dans ces conditions une participation théorique au contraste des éléments ioniques de l'ordre de -0.33% (1Thz) à -0.16% (0.5 THz) dans les 5,5 à 8 % de Δ_{rel}. Ce modèle reste très restreint, car en réalité les charges négatives sont en partie fournies par les macromolécules (que nous voulons exclure du modèle pour n'avoir que la participation des ions inorganiques), et non uniquement le Cl^- ; les résultats de ce modèle simplifié ne sont valables que si la participation au contraste de l'asymétrie de répartition des ions Cl^- dans le cas réel est négligeable. Cependant, même si la participation d'un type d'ion sur trois n'a pas été prise en compte, l'ordre de grandeur des variations alors obtenues (moins de 0.5%) renforce l'hypothèse d'une participation négligeable des ions au contraste.

Ion	Concentration Extracellulaire (mM)	Concentration Intracellulaire (mM)
Na^+	145	12
K^+	4	155
Ca^{2+}	1.5	0.1
Cl^-	123	4.2

(a) Répartition biologique ionique typique de part et d'autre de la membrane cellulaire d'une cellule de mammifère, extrait de [125].

Ions	Concentration Extracellulaire (mM)	Concentration Intracellulaire (mM)
Na^++ Cl^-	145	12
K^++ Cl^-	4	155

(b) Paramètres de modélisation simplifiée.

Tableau 3.1 – Répartitions ioniques typique réelle (a) et simplifiée pour notre modèle (b).

Des solutions simples de protéines montrent un contraste du même ordre de grandeur

Pour appuyer l'interprétation d'une nature protéique du contraste, des expériences comparant le contraste Δ_{rel} entre des solutions simples de protéines et de l'eau pure ont été réalisées. La méthode expérimentale et les résultats d'analyse de contraste selon la concentration protéique sont développés dans le Chapitre 4, il ne s'agit ici que de souligner la cohérence de l'hypothèse de la nature protéique du contraste. Nous savons que la concentration en protéines de tous types est estimée dans les MDCK à 185(±45) g/l (selon les données reprises dans [117]).

Le tracé de Δ_{rel} en fonction de la concentration de 2 protéines différentes est montré en figure 3.20. Les deux protéines, albumine (66,3 kDa) et lysozyme (14,3 kDa) ont été choisies ici car elles se situent de part et d'autre de la taille moyenne estimée des protéines dans les cellules eucaryotes (estimée entre 35-50 kDa, [114]). La gamme de contraste obtenue pour une concentration de 185 g/l de ces deux protéines, comparativement à de l'eau pure, est de 7 à 9 %. Connaissant l'écart de 1% entre eau pure et milieu de culture, cela correspond à 8 à 10 % de contraste entre solutions de protéines de taille moyenne et le milieu tamponné. Comparativement au Δ_{rel} obtenu expérimentalement entre cellules et milieu tamponné, l'agrément est bon à la fois sur le signe et l'ordre de grandeur.

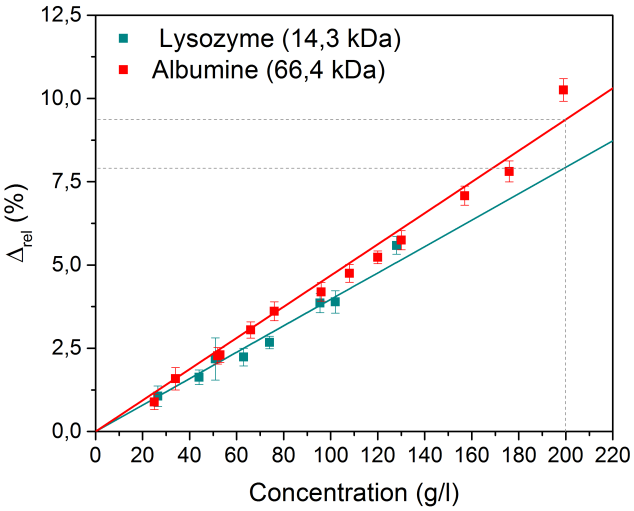


Figure 3.20 – Contraste relatif pour une gamme de concentration de deux protéines de taille différente : l'albumine (66,4 kDa, rouge) et le lysozyme (14,3 kDa, vert d'eau), comparativement à une référence d'eau pure. Les pointillés indiquent la valeur de contraste pour la concentration interne moyenne des MDCK.

Ce résultat, malgré l'écart de quelques points, est un fort argument en faveur de l'hypothèse d'origine protéique du contraste dans les images térahertz que nous avons obtenue. Ces quelques points d'écarts restent négligeables, à la vue des approximations utilisées, plus particulièrement sur :

— la concentration protéique intracellulaire. En effet, la concentration protéique de 180 g/l issue de la publication est estimée avec une erreur standard de ±45 g/l. Cette forte incertitude élargit la gamme théorique de Δ_{rel} d'environ 2 % de part et d'autre de la gamme estimée [8 ;10] %, l'étendant à [6 ;12] % attendu pour une solution de protéines de taille comprise dans [14,3 ;66,4] kDa, à 185(±45) g/l, comparativement au milieu utilisé pour notre référence.

— l'utilisation de la seule taille moyenne et non de la répartition globale (non gaussienne) de taille des protéines et peptides dans la cellule.

Toutes les expériences avec d'autres protéines que l'albumine ou le lysozyme ont montré des contrastes, différents mais d'un ordre de grandeur proche. Tout ceci sera détaillé en chapitre 4, mais retenons ici est que le contraste ne parait absolument pas spécifique à une protéine ou une

autre.

Pour conclure, par corrélation de la baisse du contraste avec l'apparition de protéines dans le milieu extracellulaire, nous proposons l'interprétation d'un contraste d'origine protéique en térahertz sur des cellules épithéliales. L'absence de variations du contraste lors de perméabilisations sélectives aux ions nous a permis de rejeter l'hypothèse initiale d'un contraste ionique comme obtenu dans les expériences précédentes de l'équipe sur des axones. Ce rejet d'hypothèse est étayé par une estimation théorique de signe négatif et de faible amplitude de la participation au contraste des ions Na^+ et K^+. L'hypothèse d'une origine protéique du contraste est quand à elle renforcée par le signe et l'ordre de grandeur des contrastes obtenus entre des solutions simples de protéines et de l'eau pure.

3.4 Conclusion

Ce chapitre nous a permis de démontrer successivement 3 points.

— La possibilité d'observer en térahertz, grâce à le géométrie ATR du montage, un tapis de cellules épithéliales en contraste avec son milieu extérieur, et ce suivant des caractéristiques de sensibilité proches de celles attendues théoriquement (cf chapitre 2), dans des conditions physiologiques, non invasives, et sans aucun traitement préalable.

— La nature protéique et peptidique du contraste térahertz observé, en termes de variation du pic d'amplitude du champs détecté. Cette démonstration repose sur l'excellente corrélation entre la diminution du signal térahertz lors de la perméabilisation et l'augmentation parallèle du contenu extracellulaire en protéines, et ce en utilisant deux techniques de quantification protéique distinctes : le BCA et le SDS-PAGE au Bleu de Coomassie. La seconde conforte la première et y ajoute des renseignements complémentaires en bon accord avec l'action attendue de la saponine. L'origine protéique du contraste, basée sur un mécanisme non spécifique, semble cohérente au vu de la prépondérance des protéines dans les composants cellulaires, comme esquissé en figure 3.2.

— Cette démonstration est appuyée par diverses approches secondaires : l'estimation théorique d'une participation ionique négligeable, et l'estimation du contraste généré par des protéines en solutions simples comparativement à l'eau pure, du même ordre de grandeur et signe que Δ_{rel}.

Ces résultats semblent au premier abord en contradiction avec les résultats précédents de l'équipe, ayant caractérisé un contraste ionique du térahertz sur les montages d'imagerie précédents. Néanmoins, il est important de souligner que l'objet d'étude était alors un axone (longue partie tubulaire d'un neurone) géant. Or, les neurones sont des cellules extrêmement polarisées (*cf* figure 3.3 c), avec de fortes asymétries de répartition entre leur axone et leur corps cellulaire. Dans le cas d'axones géants proches des axones utilisés par l'équipe, la composition protéique massique de l'axoplasme seul (cytoplasme de l'axone) est de l'ordre de 3 % [137,138], contre environ 19 % dans les MDCK. Cette forte différence peut parfaitement expliquer le renversement des participations majoritaires entre ions et protéines.

L'objectif est désormais de proposer ce contraste térahertz comme un outil pour la biologie ; ce sera le sujet du chapitre 5. L'information de perte protéique est un indice a priori intéressant pour le suivi des dynamiques de perméabilisation de cellules vivantes (en nous donnant la vitesse

de fuite du cytoplasme riche en protéines vers l'extérieur). C'est aussi une information sur l'état global complet de la cellule qui pourrait nous permettre d'accéder à la viabilité attendue après arrêt de la perméabilisation, les protéines et peptides composants la machinerie cellulaire des cellules.

Cependant, il semble nécessaire de d'abord chercher à mieux caractériser et comprendre l'origine -apparemment non spécifique- de ce contraste. Ce sera l'objet du chapitre 4, où une étude expérimentale de nombreuses protéines de toutes tailles sera présentée, suivi d'un modèle théorique affinant la compréhension de la participation de chacune au contraste total. Ceci devrait nous permettre de mieux comprendre l'outil, avant de pouvoir l'utiliser et le comparer aux outils actuels de la biologie !

Chapitre 4

Spectroscopie térahertz des protéines en solution

Sommaire

4.1 Travaux actuels sur la spectroscopie des biomolécules en solution **76**
4.2 Acquisitions sur le montage ATR pour une large gamme de protéines **78**
4.2.1 Choix des acides aminés peptides et protéines 78
4.2.2 Schéma des acquisitions 78
4.2.3 Données brutes obtenues 79
4.3 Modélisation du comportement **82**
4.3.1 Démarche et notations 82
4.3.2 Calcul du modèle volumique 83
4.4 Extraction de données spectroscopiques **86**
4.4.1 Des modifications du pic d'amplitude aux variations de l'indice complexe effectif 86
4.4.2 Extraction des variations moyennes d'indice et d'absorbance 89
4.4.3 Discussion 92
4.5 Application à la caractérisation de notre outil térahertz **94**
4.5.1 Ajustement du modèle à la sensibilité du contraste térahertz 94
4.5.2 Résumé des propriétés de Δ_{rel} 96

Afin de mieux comprendre les variations spectroscopiques sous-jacentes au contraste d'amplitude étudié jusqu'ici, nous proposons dans ce chapitre une étude spectroscopique large de protéines, peptides et acides aminés en solution. Cette étude débutera avec l'extraction des variations d'amplitude (ΔA [1]) et de temps (Δt) de l'impulsion térahertz pour une solution, relativement à celle pour l'eau pure, et ce pour un grand nombre de molécules sur une grande gamme de concentrations. Ce sera, après un rappel bibliographiques en 4.1, le sujet de la section 4.2. Comme déjà entraperçu en figure 3.20, la relation entre concentration et contraste en amplitude (ΔA) est linéaire (sur la gamme de concentration étudiée) et dépendante de la protéine ; nous verrons qu'il en est de même pour les variations de Δt. Nous développerons ensuite en section 4.3 un modèle de participation volumique de la protéine, de sa couche de solvatation et de l'eau pure aux caractéristiques spectroscopique générale de la solution. Ce modèle nous permettra en section 4.4, à partir des données brutes (ΔA et Δt), d'accéder aux caractéristiques spectroscopiques moyennes de l'intérieur d'une protéine et de sa couche de solvatation, relativement à l'eau pure. Ces résultats dépassent largement l'étude de Δ_{rel} et apportent des renseignements spectroscopiques complémentaires aux études actuelles abordées en premier lieu (section 4.1). Revenant enfin en section 4.5 à la caractérisation de notre outil d'imagerie térahertz des cellules, nous nous appuierons sur une partie du travail précédent pour mieux en comprendre les propriétés et les limites lorsque ΔA (Δ_{rel}) est utilisé pour quantifier la perméabilisation cellulaire.

4.1 Travaux actuels sur la spectroscopie des biomolécules en solution

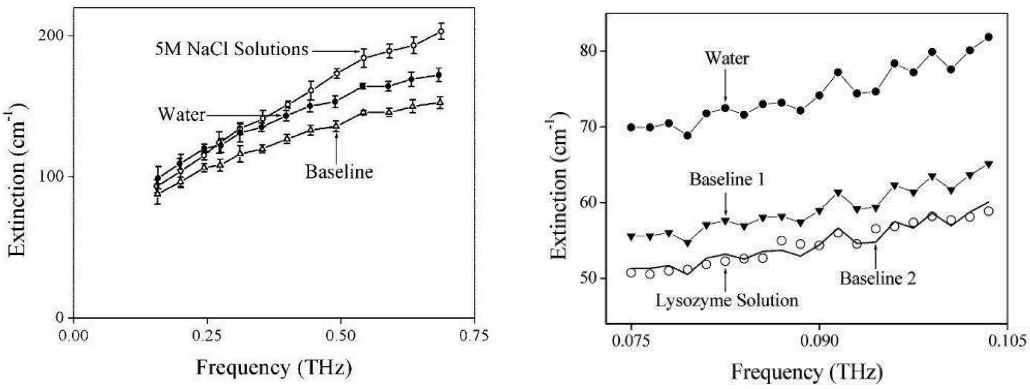
Comme nous l'avons vu dans le chapitre 1 (1.2.4), la spectroscopie térahertz des biomolécules permet d'accéder à des renseignements structurels inédits (conformation, dénaturation..). Cependant, de par la forte absorbance de l'eau, la spectroscopie térahertz est longtemps restée appliquée à des échantillons lyophilisés, cristallins, en poudre compressée ou en film fin. Or la solvatation est capitale pour la conformation d'une molécule et la réalisation de sa fonction [139, 140]. On voudrait donc accéder aux renseignements spectroscopiques des biomolécules quand elles sont dans leur état physiologique, sachant que leur solvant va avoir une importante influence sur leur état. Au cours des dix dernières années, un effort particulier a été porté à la réalisation de mesures pour des biomolécules en solution.

C'est en 2006 que plusieurs publications concomitantes [45–47, 141, 142] démontrent la possibilité d'explorer les effets de solvatation, grâce à la sensibilité du térahertz à l'état (perturbé) de l'eau dans le voisinage immédiat des biomolécules qu'elle solvate. Dans ces publications, les auteurs démontrent d'abord que les propriétés d'absorbance des solutions ne peuvent être simplement comprise comme la somme des propriétés spectroscopiques des molécules et celle de l'eau pure. Les molécules explorées étaient aussi bien des sucres [45] que des acides aminés [141] et des protéines [46,47,141,142]. Ils proposent alors que l'eau interfacielle, c'est-à-dire à l'interface entre la molécule et l'eau pure, présente une altération de comportement telle que le térahertz y soit sensible. Le modèle classique utilisé est la description de l'absorbance effective totale de la solu-

1. Afin de désambigüiser, nous parlons dans ce chapitre de Δ_{rel} (contraste en amplitude utilisé pour l'imagerie térahertz) en tant que ΔA

tion comme la somme des absorbances de chaque compartiment pondérées par leur participation volumique respective.

Cette couche d'eau dite « couche d'hydratation », aux propriétés différentes de celle de l'eau pure, a été étudiée par un grand nombre d'autres méthodes : les simulations numériques [143–148], la RMN (Résonance Magnétique Nucléaire) [149, 150], la spectroscopie infrarouge 2D [151], des expériences pompe-sonde femtoseconde résolues en polarisation [152], etc. Mais la spectroscopie térahertz, non invasive, intrinsèquement sensible à l'état de l'eau et ne nécessitant aucune préparation d'échantillon, pourrait apporter de nouvelles données et s'insérer comme un élément important de telles investigations. Sur ces motivations, de nombreux travaux [38] ont utilisé la spectroscopie térahertz résolue en temps (THz-TDS) pour acquérir les propriétés diélectriques de solutions d'ions, de sucres, de peptides et protéines [43, 102, 153–157] et en extraire des renseignements sur les propriétés vibrationnelles des molécules d'eau dans la couche d'hydratation et son épaisseur par exemple. Cependant, la compréhension globale des propriétés spectroscopiques de ces solutions en térahertz est encore limitée, chaque travail se portant sur une ou quelques molécules différentes seulement. Ces propriétés ont montré une variabilité importante selon la taille de la molécule. Ainsi, par exemple, une solution de protéines montre une diminution d'absorbance [46, 111], à l'opposé d'une solution de certains acides aminés ou d'ions [102, 158, 159]. Ceci est illustré en figure 4.1.



(a) (b)

Figure 4.1 – Exemples de propriétés d'absorbance pour une solution ionique (NaCl, a) et pour une solution de protéine (Lysozyme, b) respectivement issus de [159] et [46]. On observe une absorbance supérieure à l'eau pour la solution de NaCl, et une absorbance inférieure à l'eau pour une solution de lysozyme. Les « baseline » signalées correspondent à l'absorbance théorique selon si l'on néglige l'effet de la couche de solvatation (baseline et baseline 1) ou non (baseline 2).

Un modèle global caractérisant les propriétés moyennes de l'eau solvatée et des biomolécules dissoutes, ainsi qu'une rationalisation des variations observées selon le poids moléculaire, seraient très utiles. Ils permettraient de donner possibilités et limites d'extension des résultats obtenus dans les études fines menées sur une ou quelques molécules.

4.2 Acquisitions sur le montage ATR pour une large gamme de protéines

Notre étude spectroscopique débute par l'observation des variations de ΔA et Δt, données brutes, pour différentes solutions d'acides aminés, de peptides ou protéines.

4.2.1 Choix des acides aminés peptides et protéines

Une très large gamme de tailles a été explorée, du plus petit acide aminé (la glycine) à une très grosse protéine (la catalase). Les acides aminés (AA), peptides et protéines choisis rassemblent plusieurs critères : une forte solubilité afin d'explorer la plus grande gamme possible de concentrations ; conditionnés sous forme de poudre hautement purifiée ($>$ 90 % *a minima*, sans sels) ; dans des gammes de prix abordables pour pouvoir réaliser des solutions de plusieurs millilitres à concentrations importantes. Les molécules choisies sont données dans le tableau 4.1. Lorsque cela est possible, les dilutions sont faites par pesées et la concentration en est directement déduite. Dans le cas des protéines délicates à dissoudre, particulièrement aux grandes concentrations, la solution est filtrée pour éliminer tout agrégat puis la concentration déterminée par spectrophotométrie (NanoDrop™ 2000c).

	Nom	**Poids moléculaire (kDa)**
Protéines	Catalase	≈250
	Albumine	66
	Hémoglobine	64,5
	Ovalbumine	44,3
	Myoglobine	17,1
	Lysozyme	14,3
Peptides	Leu-ser-lys-leu-NH_2 (« petit peptide »)	0,458
	Glutathione	0,307
AA	Lysine	0,146
	Sérine	0,105
	Glycine	0,075

Tableau 4.1 – Acides Aminées (AA), peptides et protéines utilisés, par ordre décroissant de taille moléculaire.

4.2.2 Schéma des acquisitions

Les acquisitions ont toutes été réalisées selon le même protocole. Les solutions d'AA/peptides/protéines sont préparées la veille ou le jour même, par dilution dans de l'eau MilliQ qui sera notre référence de mesure.

Sur le montage, un puits plastique sans fond, collé sur la surface de la pastille par ses bords, permet de restreindre l'acquisition à des volumes de 500 μL par échantillon. La pastille est positionnée de sorte à ce que la zone sondée soit dans le puits. Le puits est rempli de la solution référence (eau MilliQ) et une série d'acquisition est réalisée. Une série d'acquisition correspond à l'acquisition répétée 15 fois autour du maximum de l'impulsion térahertz. Tout comme pour

la réalisation d'images térahertz, le pic d'amplitude est ajusté par une courbe parabolique, ce qui nous donne une solution analytique pour la valeur du maximum et sa position temporelle. L'ajustement est réalisé sur 6 points acquis ; exemples en figure 4.2. On alterne ensuite séries d'acquisition sur référence et sur solution, de sorte à obtenir *a minima* 3 séries d'acquisition sur solution chacune encadrée de 2 séries d'acquisition sur référence. Le temps d'acquisition d'une série est supérieur au temps nécessaire au rinçage du puits entre deux séries.

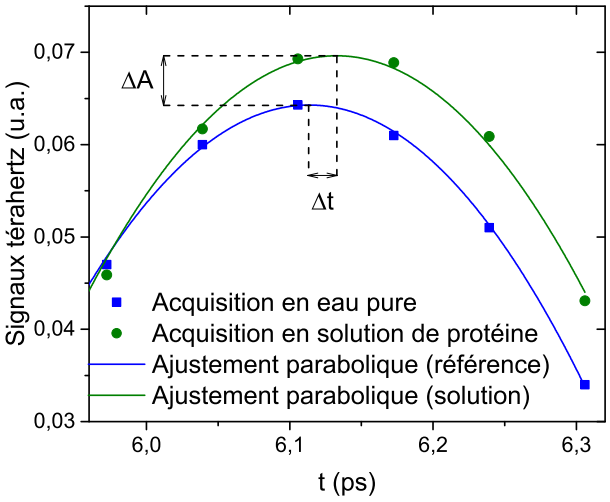


Figure 4.2 – Exemple de courbes acquises et ajustées, pour l'eau (référence, bleue) et une solution de protéines concentrées (verte).

La moyenne du maximum d'amplitude des deux séries de référence A_{ref} encadrant une série sur solution permet de calculer le contraste en amplitude tel que :

$$\Delta A = \frac{A_{solution} - A_{ref}}{A_{ref}}$$

De même pour l'écart temporel entre les deux maxima, solution et référence :

$$\Delta t = t_{solution} - t_{ref}$$

Réaliser une référence avant et après chaque série sur solution nous permet de nous assurer une bonne compensation des dérives lentes du système. On moyenne ensuite les mesures de toutes ces séries. Chaque point donnant la relation pour une molécule entre une concentration et ΔA ou Δt est la moyenne d'au moins 3 séries.

4.2.3 Données brutes obtenues

On obtient des données dont quelques exemples sont exposés en figure 4.3 et figure 4.4. Pour chaque molécule testée, une relation proportionnelle simple entre la concentration massique et les Δ (ΔA ou Δt) se dessine ; le facteur de proportionnalité est dépendant de la molécule. On observe en figure 4.3 pour ΔA que ce facteur de proportionnalité, c'est-à-dire la pente des droites en pointillées, augmente avec la taille de la molécule. Ainsi, débutant dans les nombres négatifs

avec le plus petit acide aminé, la glycine, il augmente progressivement jusqu'à atteindre une valeur positive pour les protéines jusqu'à un maximum pour la plus grosse protéine.

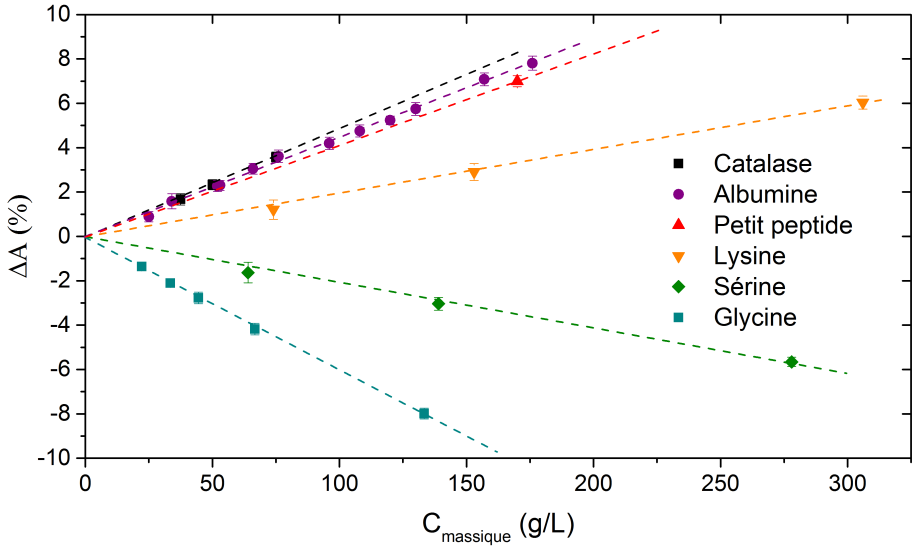


Figure 4.3 – Exemples de contraste en amplitude obtenus selon la concentration de plusieurs AA, peptides et protéines. La relation linéaire à la concentration est matérialisée par les droites en pointillés, dont la pente donnera la sensibilité de ΔA à la concentration.

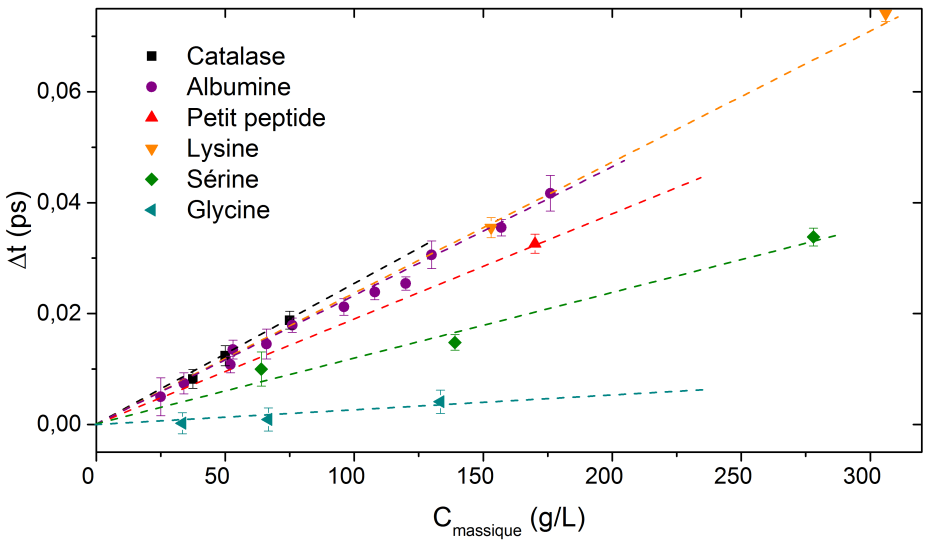


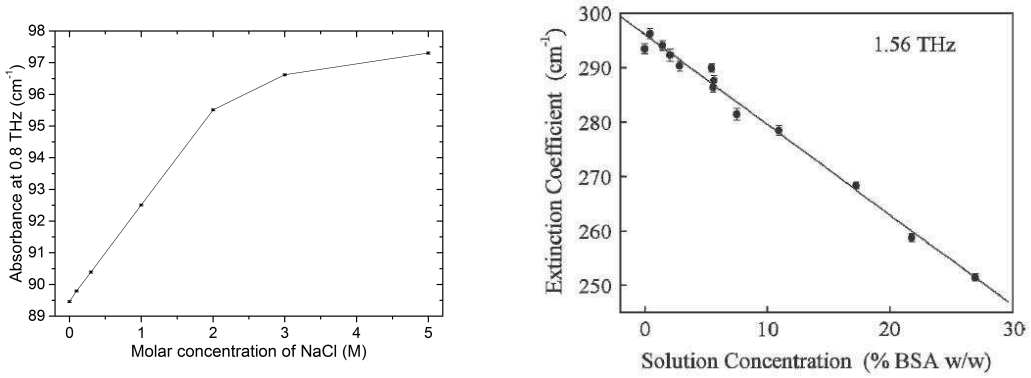
Figure 4.4 – Exemples d'écart temporel obtenus selon la concentration de plusieurs AA, peptides et protéines. La relation linéaire à la concentration est matérialisée par les droites en pointillés, dont la pente donnera la sensibilité de Δt à la concentration.

Ce facteur, pente de la droite, est en fait la sensibilité de la mesure pour chacune de ces molécules : la variation de ΔA pour 1 g/L. On observe déjà que la sensibilité varie énormément pour les molécules de petites tailles, la glycine et la lysine étant séparées d'une centaine de

Daltons seulement, alors que pour les grosses molécules elle est très proche, malgré plusieurs centaines de kDa de différence entre le petit peptide et la catalase par exemple.

Pour les variations de Δt avec la concentration massique, exposées en figure 4.4, l'effet reste proche bien que plus bruité, et avec une exception quant à l'augmentation de la pente avec le poids moléculaire : la lysine (146 Da) présente une plus forte pente que l'albumine (66 kDa). Par ailleurs, aucune pente négative n'a été relevée.

Des effets de saturation sont connus concernant l'absorbance selon la concentration : par exemple pour les solutions ioniques, la relation linéaire de l'absorbance à la concentration n'est vraie qu'en deçà de quelques molaires (mol/L) avant un seuil de saturation. Un exemple pour le NaCl est montré en figure 4.5a, avec une saturation atteinte à partir de 2 molaires (2 M=117 g/L pour le NaCl). Dans la littérature, un comportement linéaire a été relevé pour de l'albumine en solution, comme exposé en figure 4.5b, pour des concentrations jusqu'à 270 g/L (27 % w/w, ou encore 4,2 mM). Aucun effet de saturation n'a été relevé dans nos mesures de 0 à 200 g/L au moins, comme le montrent les relations linéaires observées entre les Δ et $C_{massique}$. Les protéines en solution, dans ces gammes de concentrations, sont *a priori* indépendantes car bien moins nombreuses que des ions à même concentration massique [2].



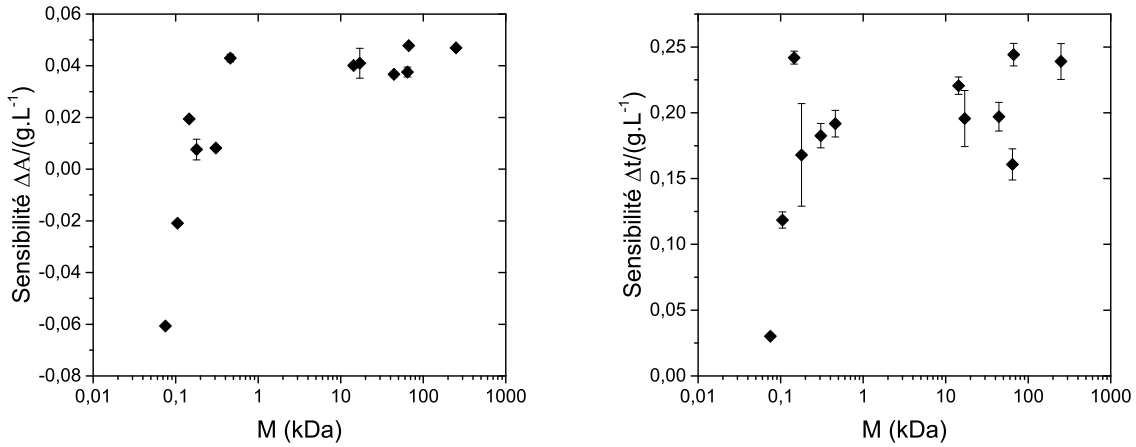
(a) (b)

Figure 4.5 – Illustration de la relation linéaire entre absorbance d'une solution et concentration d'ions (NaCl, a, données non publiées du travail de thèse d'A. Podzorov) ou de protéine (Albumine, b, [47]).

L'absence d'effets observables de saturation sur notre gamme de mesure nous permet de relever la pente des droites exposées en figure 4.3 et figure 4.4 pour refléter directement les variations de ΔA et Δt avec la concentration. Si l'on relève chacune de ces pentes, pour ΔA comme Δt, nous pouvons observer leurs valeurs en fonction du poids moléculaire de la molécule respectivement en figure 4.6a et figure 4.6b.

Ces valeurs sont la sensibilité de la mesure en fonction de la concentration massique. Il semblerait qu'une relation lie la sensibilité des mesures ΔA et Δt au poids moléculaire des acides aminés, peptides et protéines. Nous allons donc chercher à modéliser les variations de la sensibilité des mesures réalisées sur le montage en fonction du poids moléculaire M au cours de la partie suivante.

2. 100 g/L de NaCl correspond à 1,7 mol/L contre 1,5 mmol/L pour l'albumine à même concentration massique, de par leur fort écart de masse molaire.



(a) (b)

Figure 4.6 – Sensibilités des variations de ΔA (a) et Δt (b) avec la concentration massique de la molécule, en fonction de son poids moléculaire M.

4.3 Modélisation du comportement

Après l'observation des variations de ΔA et Δt qui semblent liées à la concentration et au poids moléculaire, nous essayons d'établir un modèle liant le comportement spectroscopique global de la solution aux participations respectives des protéines, de leur couche d'hydratation et de l'eau pure composant la solution. Ce modèle concerne d'abord n et κ, et nous verrons dans la section suivante (4.4) comment lier ces informations spectroscopiques aux variations des ΔA et Δt .

4.3.1 Démarche et notations

Le modèle volumique classique utilisé dans les publications abordées en 4.1 est utilisé lors de la mesure de l'absorbance d'un échantillon. Cependant, il peut *a priori* être appliqué à tout l'indice complexe. Le résultat de la mesure peut être décomposé en participation des trois même compartiments : la protéine, la couche d'hydratation et l'eau non affectée par la présence de la molécule (l'eau « brute »), schématiquement représentées en figure 4.7. Ces compartiments ont chacun une participation unitaire x_i constante, pondérée par le ratio du volume qu'il occupe sur le volume total de la solution. On formalise alors la mesure effective x_{eff} comme étant la somme de ces participations unitaires pondérées :

$$x_{eff} = \frac{V_p}{V}x_p + \frac{V_s}{V}x_s + \frac{V_w}{V}x_w$$

Les x représentent n ou κ, composants de l'indice complexe $\hat{n} = n - i\kappa$. x_p représente la participation unitaire de l'intérieur des protéines, x_s celle de la couche de solvatation et x_w celle de l'eau dite « brute », c'est-à-dire identique à l'eau pure. Pour pouvoir modéliser le comportement spectroscopique des solutions et en extraire les données sur la couche de solvatation et les protéines, il faut pouvoir exprimer les différents ratios volumiques. C'est ce que nous ferons en

partie 4.3.2, à partir des hypothèses de modélisation suivantes, résumées de façon schématique en figure 4.7.

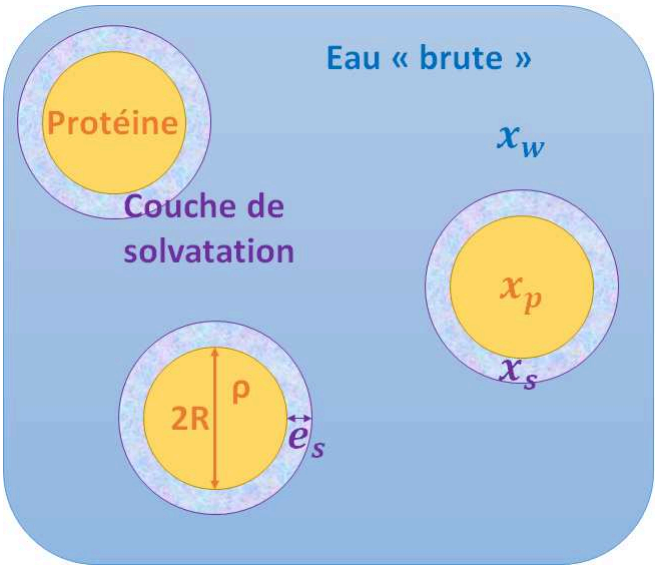


Figure 4.7 – Schéma et notations utilisées pour notre modélisation.

La protéine est décrite comme une sphère de rayon R et de masse volumique moléculaire ρ homogène et constante. Sa valeur moyenne est 1,37.10^3 kg/m^3, et présente une variabilité extrêmement restreinte d'une protéine ou d'un peptide à l'autre [160]. La couche de solvatation d'épaisseur e_s est considérée comme constante. Plusieurs travaux soulignent que la valeur d'e_s n'est que peu dépendante de la protéines dans son ensemble [143,161], mais est liée à la topologie (repliements, groupements hydrophiles/hydrophobes...) de son enveloppe extérieure [162]. Une influence de la polarisabilité de la molécule a aussi été évoquée [163]. Dans le cas de protéines très solubles comme celles que nous utilisons, leurs dimensions sont relativement globulaires, leurs surfaces globalement hydrophiles et nous pouvons nous attendre à très peu d'écarts d'une protéines à l'autre, comme il a été démontré dans le cas de 4 protéines globulairesen référence [161].

4.3.2 Calcul du modèle volumique

La participation volumique de l'ensemble des protéines V_p s'obtient à partir du volume d'une protéine V_{1p} et de leur concentration dans la solution.

Pour une protéine, le volume est donné par sa masse m_{1p} divisée par sa masse volumique :

$$V_{1p} = \frac{m_{1p}}{\rho}$$

Pour une solution contenant N protéines on a : $V_p = NV_{1p}$. Si l'on rapporte ce volume au volume total de la solution V, dans lequel on trouve une masse totale de protéine m, on a :

$$\frac{V_p}{V} = N\frac{m_{1p}}{\rho V} = \frac{m}{\rho V}$$

Ou encore, exprimé selon la concentration massique $C_{massique} = m/V$:

$$\frac{V_p}{V} = \frac{C_{massique}}{\rho} \tag{4.1}$$

La participation volumique des couches d'hydratation se calcule à partir du volume d'une couche et de la concentration protéique dans la solution.

Pour une protéine, le volume d'une couche d'hydratation V_{1s} s'obtient par déduction du volume V_{1p} de la protéine sphérique (rayon R) au volume total V_{1p+1s} occupé par la protéine et sa couche d'hydratation (rayon $R + e_s$). On a ainsi :

$$V_{1s} = V_{1p+1s} - V_{1p} = \frac{4\pi}{3}(R + e_s)^3 - \frac{4\pi}{3}R^3 = 4\pi e_s(R^2 + Re_s + \frac{e_s^2}{3})$$

Sachant que $m_{1p} = M/N_A$ avec N_A constante d'Avogadro (nombre de molécules dans une mole) et M le poids moléculaire. Alors $V_{1p} = \frac{M}{\rho N_A} = \frac{4\pi}{3}R^3$, d'où on exprime $R = (\frac{3M}{4\pi\rho N_A})^{1/3}$ que l'on injecte dans l'expression de V_{1s} précédente.

$$V_{1s} = 4\pi e_s((\frac{3M}{4\pi\rho N_A})^{2/3} + (\frac{3M}{4\pi\rho N_A})^{1/3}e_s + \frac{e_s^2}{3}) \tag{4.2}$$

Sous forme simplifiée, sachant ρ et N_A connus, on peut exprimer V_{1s} tel que :

$$V_{1s} = Ae_sM^{2/3} + Be_s^2M^{1/3} + Ce_s^3 \tag{4.3}$$

Avec A, B et C constantes appartenant à $\mathbb{R}^+$, telles que :

$$A = 4\pi(\frac{3}{4\pi\rho N_A})^{2/3} \approx 4,84(N_A\rho)^{-2/3}$$

$$B = 4\pi(\frac{3}{4\pi\rho N_A})^{1/3} \approx 7,79(N_A\rho)^{-1/3}$$

$$C = \frac{4\pi}{3} \approx 4,19$$

Comme pour les protéines, le volume total occupé par les couches de solvatation est obtenu par : $V_s = V_{1s}N$. Par ailleurs, N (nombre de molécules) est le nombre de moles n multipliée par N_A, et n s'exprime par la masse totale divisée par la masse molaire $n = m/M$, donc $N = mN_A/M$. Nous exprimons alors le ratio V_s/V en fonction de la concentration massique $C_{massique}$ tel que :

$$\frac{V_s}{V} = \frac{V_{1s}N}{V} = V_{1s}\frac{N_A}{M}C_{massique} \tag{4.4}$$

Le volume restant d'eau dite « brute », c'est-à-dire identique à de l'eau en absence de toute molécule dissoute est obtenu simplement par :

$$\frac{V_w}{V} = 1 - \frac{V_p}{V} - \frac{V_s}{V} \tag{4.5}$$

Pour un modèle de participation de chacun de ces compartiments proportionnel à leur volume, la mesure térahertz effective totale se décomposera donc telle que :

$$x_{eff} = \frac{V_p}{V}x_p + \frac{V_s}{V}x_c + (1 - \frac{V_p}{V} - \frac{V_s}{V})x_w = x_w + x_w\left[\frac{V_p}{V}(\frac{x_p}{x_w} - 1) + \frac{V_s}{V}(\frac{x_s}{x_w} - 1)\right]$$

Lors de la réalisation de la mesure, c'est l'écart entre la mesure effective et la mesure dans l'eau pure qui est quantifiée, c'est-à-dire :

$$\frac{x_{eff} - x_w}{x_w} = \frac{V_p}{V}(\frac{x_p}{x_w} - 1) + \frac{V_s}{V}(\frac{x_s}{x_w} - 1)$$

En remplaçant les ratios volumiques par leurs expressions (équation (4.1), équation (4.4)), on obtient l'expression de la mesure effective rapportée à la concentration massique :

$$\frac{1}{C_{massique}}\frac{x_{eff} - x_w}{x_w} = \frac{1}{\rho}(\frac{x_p}{x_w} - 1) + V_{1s}\frac{N_A}{M}(\frac{x_s}{x_w} - 1) \tag{4.6}$$

$$\frac{1}{C_{massique}}\frac{x_{eff} - x_w}{x_w} = \frac{1}{\rho}(\frac{x_p}{x_w} - 1) + [Ae_sM^{2/3} + Be_s^2M^{1/3} + Ce_s^3]\frac{N_A}{M}(\frac{x_s}{x_w} - 1) \tag{4.7}$$

Cette expression en équation (4.7) permet idéalement un calcul d'ajustement complet sur les données qui permettrait d'estimer e_s en plus des participations respectives de chaque compartiment à la mesure. Cependant, comme nous l'avons vu en figure 4.6a et figure 4.6b, les données brutes sont assez dispersées, notamment concernant Δt. La répercussion sur les mesures x_{eff} déduites sera une dispersion non négligeable. Les degrés de liberté pour un ajustement prenant en compte les paramètres dans $[Ae_sM^{2/3} + Be_s^2M^{1/3} + Ce_s^3]$ sont trop importants relativement à cette dispersion des données expérimentales. Il faut fixer la valeur de $[Ae_sM^{2/3} + Be_s^2M^{1/3} + Ce_s^3]$ c'est-à-dire fixer V_{1s} pour chaque poids moléculaire considéré. Nous devons pour ce faire nous affranchir de l'inconnue e_s en fixant sa valeur (A, B et C étant déjà connus). La valeur de e_s pour les peptides et les protéines est souvent considérée comme appartenant à une gamme relativement restreinte, centrée sur 8-12 Ångströms par calcul de dynamique moléculaire [164, 165] bien que quelques publications observent un effet plus lointain entre 11-17 [166] et jusqu'à 17-20 Å [163, 165]. Nous choisissons *in fine* de travailler avec $e_s = 10$ Å. Cette hypothèse très forte sera discutée en fin de section 4.4. On calcule ainsi la valeur de V_{1s} uniquement dépendante de M telle que :

$$V_{1s} \approx 5,5M^{2/3}e_s + 8,31M^{1/3}e_s^2 + 4,19e_s^3 \quad en\ \text{Å}^3$$

On injectera alors cette expression de V_{1s} dans équation (4.6), ce qui nous permet d'obtenir un modèle aux paramètres uniquement dépendants de M et des participations respectives x_i des différents compartiments à la mesure x_{eff}, relativement à l'eau pure. Nous pouvons alors espérer obtenir les informations spectroscopiques de ces compartiments relativement à l'eau si nous avons accès aux informations spectroscopiques efficaces (également relativement à l'eau) de la solution.

4.4 Extraction de données spectroscopiques

En section 4.2, nous avons pu relever le couple de données (ΔA, Δt) pour un grand nombre de molécules et de concentrations. En section 4.3 nous avons proposé un modèle du comportement spectroscopique applicable aux solution de protéines, liant l'indice complexe effectif aux indices des différents compartiments (protéine, couche de solvatation) qui sont l'information finale désirée. Comment faire le lien entre (ΔA, Δt) et les données spectroscopiques sur les protéines et la couche de solvatation ? Nous suivront dans cette section une démarche en deux étapes. D'abord le passage de (ΔA, Δt) à l'information de variation de l'indice complexe effectif de la solution relativement à l'eau pure, en partie 4.4.1. Puis le passage de l'information de cette variation d'indice effectif aux informations spectroscopiques de l'intérieur de la protéine et de la couche de solvatation grâce au modèle théorique de la section 4.3, en partie 4.4.2.

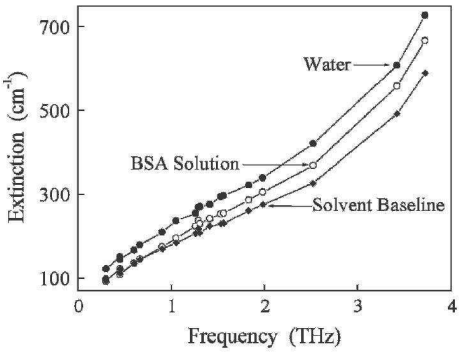
4.4.1 Des modifications du pic d'amplitude aux variations de l'indice complexe effectif

En première approximation, Δt (retard entre les deux pics) peut être compris comme le retard de phase du signal, alors que ΔA est la variation normalisée de l'amplitude. Les formules de Fresnel (vues en 2.2.1, équation (2.3)) nous assurent que les variations d'indice complexe du milieu (solution de protéines ou eau pure) auront une influence sur l'amplitude et la phase du signal réfléchit. Nous allons donc chercher à trouver la relation entre le couple de données (ΔA, Δt) et le couple (n_{eff}, κ_{eff}) caractérisant l'indice complexe effectif de la solution testée. Plus exactement, puisque le couple de Δ est rapporté à l'eau pure, on ne peut en déduire directement que le couple de variation de l'indice complexe relativement à l'eau, c'est-à-dire que l'on cherchera la relation entre (ΔA, Δt) et (ε_n,ε_κ) avec :

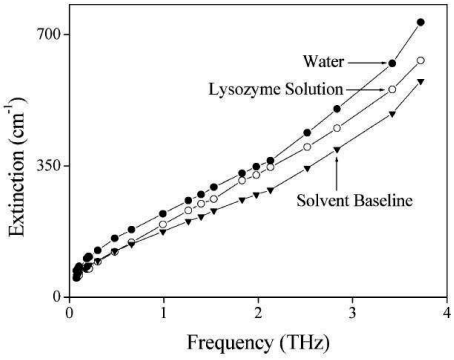
$$\varepsilon_n = \frac{n_{eff} - n_w}{n_w} \quad \text{et} \quad \varepsilon_\kappa = \frac{\kappa_{eff} - \kappa_w}{\kappa_w}$$

Cependant, n et κ sont des variables dépendantes de la fréquence. Or, l'impulsion térahertz est par nature multifréquentielle. Nos mesures (ΔA, Δt) sur l'impulsion térahertz émergent des participations des propriétés spectroscopiques à plusieurs fréquences, « combinées » en une seule mesure ΔA ou Δt. En réduisant le temps d'acquisition à l'acquisition du pic de l'impulsion seul, nous perdons la résolution en fréquence que la spectroscopie classique permet d'avoir. Les ε que nous en déduirons seront donc le résultat d'une moyenne pondérée sur toutes ces fréquences. Plus exactement, ils seront l'écart moyen normalisé des ($n_{eff}(\nu)$, $\kappa_{eff}(\nu)$) par rapport aux valeurs spectroscopiques de l'eau pure ($n_w(\nu)$, $\kappa_w(\nu)$). Cet écart moyen sur la gamme 0,2 à 1,6 THz ne peut être une information réelle que si les courbes $n_{eff}(\nu)$ et $\kappa_{eff}(\nu)$ sont une homothétie de $n_w(\nu)$ et $\kappa_w(\nu)$ respectivement. Cette hypothèse est clairement soutenue par les quelques publications ayant pu fournir des données spectroscopiques des peptides et protéines en solutions ; des exemples sont donnés en figure 4.8.

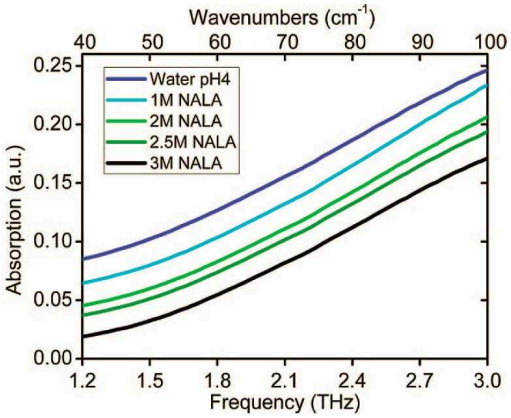
Dans l'espace de Fourier, passer d'un signal initial (incident, en polarisation p dans notre cas) à celui réfléchi correspond à multiplier ce premier par le coefficient de réflexion de Fresnel r_p. Comme nous l'avons vu en équation (2.3), ce coefficient est dépendant de l'indice complexe des milieux à l'interface de réflexion. Nous pouvons appliquer r_p pour l'indice de l'eau et pour



(a)



(b)



(c)

Figure 4.8 – Exemples de données sur l'absorbance d'une solution d'albumine (a, [46]), de lysozyme (b, [47]) et d'un peptide synthétique (c, [167]) comparée à l'absorbance de l'eau pure. On note une homothétie des courbes, *a minima* sur la zone utilisée dans notre travail de 0,2 à 1,6 THz environ.

une variation de celui-ci, en obtenir les deux signaux résultants, puis comparer après retour dans l'espace temporel les deux impulsions et en extraire (ΔA, Δt). Si l'on répète l'opération pour plusieurs couples (ε_n, ε_κ) on peut donc définir la relation théorique de variation entre (ΔA, Δt) et (ε_n, ε_κ). Cette démarche est explicitée graphiquement en figure 4.9.

Les relations obtenues, tirées directement de la démarche résumée graphiquement en figure 4.9, sont données en figure 4.10. Ces graphiques nous permettent en particulier de vérifier la linéarité des relations entre Δ et ε pour des petites variations ε.

On résume alors sous la forme des combinaison linéaires les participations de ΔA et Δt à chacun des ε. c'est-à-dire que l'on pourra obtenir la matrice de transfert T telle que :

$$\begin{pmatrix} \varepsilon_n \\ \varepsilon_k \end{pmatrix} = T \begin{pmatrix} \Delta A \\ \Delta t \end{pmatrix} \tag{4.8}$$

Les coefficient de la matrice T^{-1}, inverse de T dans l'équation (4.8), correspondent aux pentes des relations respectives de ΔA et Δt à chacun des ε (lorsque l'autre ε est égal à 0) exposées en figure 4.10. Cependant, notons bien que cette détermination est théorique. Notre montage, lui, est nécessairement imparfait. Il va imposer un filtre supplémentaire au signal, en plus du

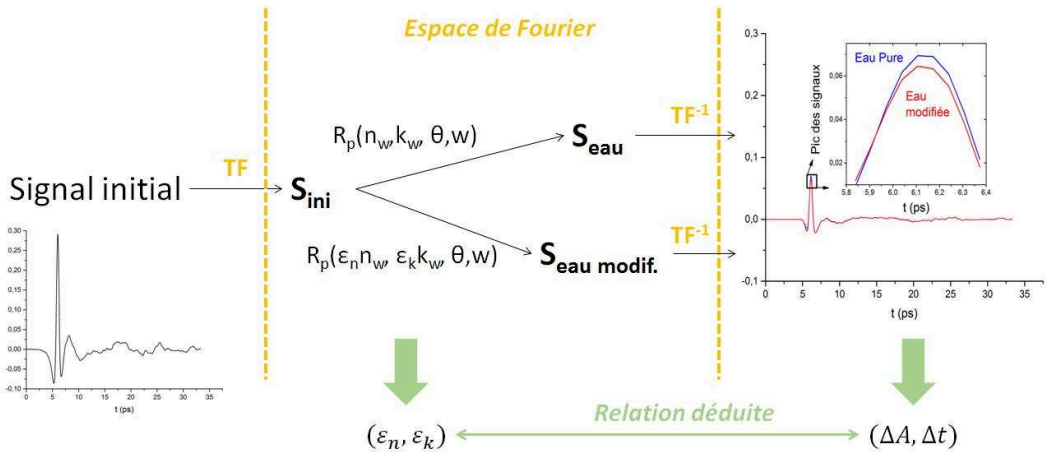
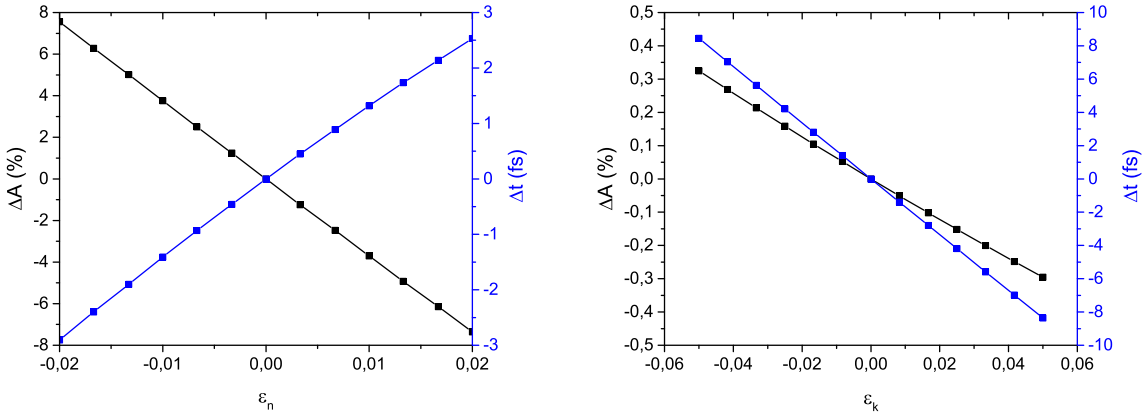


Figure 4.9 – Démarche théorique pour obtenir la relation entre $(\varepsilon_n, \varepsilon_k)$ et $(\Delta A, \Delta t)$.



(a) (b)

Figure 4.10 – Relations théoriques entre ΔA, Δt et ε_n pour $\varepsilon_\kappa = 0$ (a) et entre ΔA, Δt et ε_κ pour $\varepsilon_n = 0$ (b). Les pentes de ces droites seront les coefficients de T^{-1}, et T en sera déduite par inversion.

filtre de réponse théorique lié aux variations d'indice complexe lors de sa réflexion à l'interface prisme/solution, que nous connaissons par les formules de Fresnel. La matrice obtenue par la méthode théorique développée ci-dessus a d'ailleurs donné des résultats quantitativement faux sur des solutions d'ions à l'indice complexe connu. Ceci souligne la nécessité d'un étalonnage expérimental, que nous pouvons réaliser grâce à la démonstration théorique ci-dessus prouvant la possibilité d'utiliser la relation en équation (4.8).

Nous avons effectué un étalonnage grâce à des solutions d'ions à l'indice connu grâce à des expériences spectroscopiques réalisées par un doctorant précédent, Alexander Podzorov. Sur un montage en transmission, il a effectué des mesures spectroscopiques complètes [168] notamment sur des solutions de KCl, KI et $Ca(NO_3)_2$. Ces ions en particuliers sont d'intérêt pour nous car ce sont eux qui présentent des courbes d'indice et d'absorbance les plus proches d'une homothétie aux courbes de l'eau pure sur la large gamme d'ions qu'Alexander à étudiée. Connaissant donc les couples $(\varepsilon_n, \varepsilon_k)$ pour chaque ion à une concentration donnée et réalisant des mesures

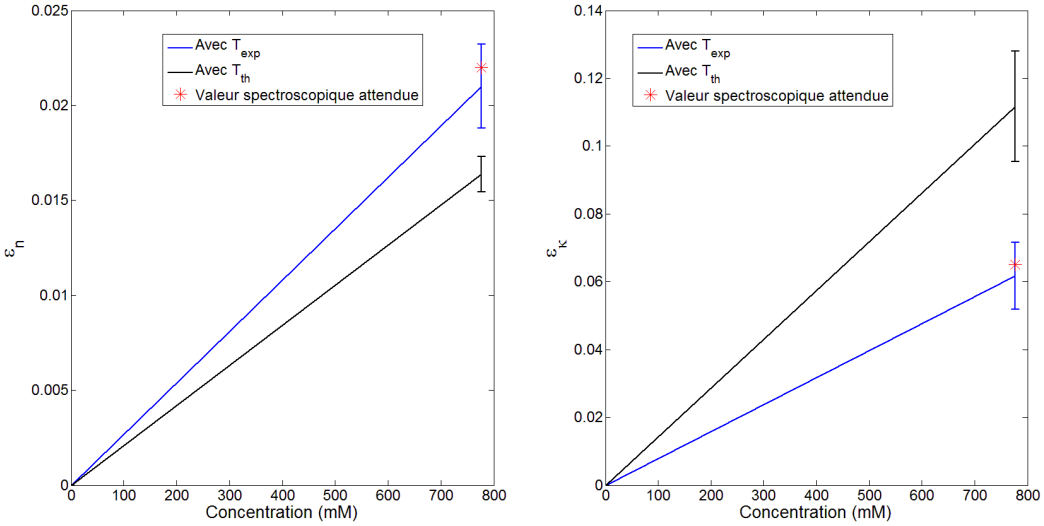


Figure 4.11 – Comparaison des valeurs de $(\varepsilon_n, \varepsilon_k)$, obtenues à partir du couple $(\Delta A, \Delta t)$ mesuré pour une solution de KCl à 777 mM, via la matrice de transfert théorique $\mathrm{T_{th}}$ ou celle déterminée par étalonnage $\mathrm{T_{exp}}$. Les valeurs sont à comparer au couple $(\varepsilon_n, \varepsilon_k)$ attendu d'après les données spectroscopiques complètes (✳) issues de [168].

expérimentales de ΔA et Δt pour ces mêmes concentrations, on peut résoudre les valeurs de T par un système de 4 équations à 4 inconnues. Il faut deux solutions ioniques différentes pour ce faire, puis nous utilisons une troisième solution pour vérifier l'étalonnage réalisé. Procédant ainsi, et après s'être assuré que les concentrations utilisées étaient dans la gamme de concentration sans saturation (typiquement inférieures à 1 M), nous obtenons une matrice de transfert $\mathrm{T_{exp}}$ aux coefficients de même signe mais de valeurs un peu différentes des coefficients théoriques dans $\mathrm{T_{th}}$. Appliquant ces deux matrices à des mesures expérimentales de $(\Delta A, \Delta t)$ réalisées sur une solution de KCl, on observe en figure 4.11 que la détermination des coefficients $(\varepsilon_n, \varepsilon_k)$ est meilleure avec la matrice de transfert $\mathrm{T_{exp}}$, c'est à dire que l'estimation des coefficients est plus proche de la valeur théorique attendue. La matrice de transfert utilisée par la suite sera donc celle-ci.

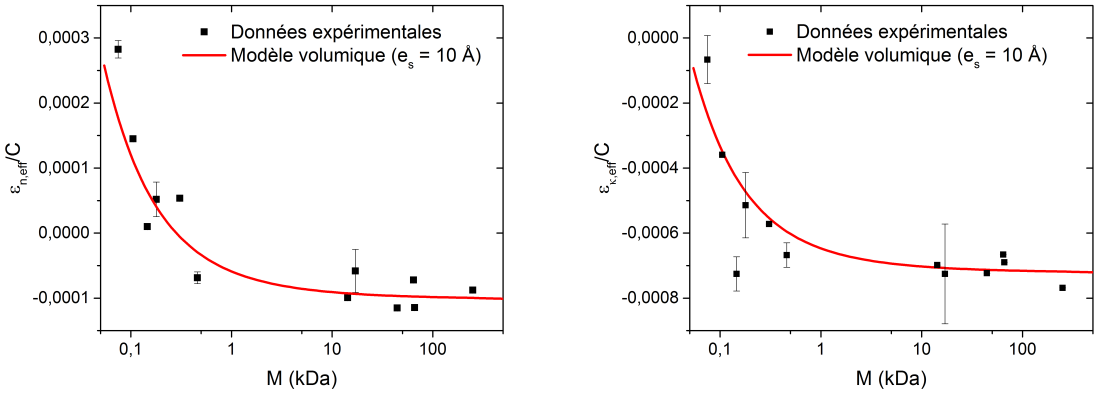
4.4.2 Extraction des variations moyennes d'indice et d'absorbance

Connaissant à présent la relation liant $(\Delta A, \Delta t)$ à $(\varepsilon_n, \varepsilon_\kappa)$ grâce à la matrice de transfert T (, on peut exprimer à partir des données expérimentales l'évolution de $\varepsilon_{n,eff}$ et $\varepsilon_{\kappa,eff}$ en fonction de la concentration, pour chaque molécule. Les données $\varepsilon_{eff} = f(C_{massique})$ auront la même forme linéaire que les données brutes $\Delta = f(C_{massique})$, que nous avons vues en figure 4.6a et figure 4.6b. On en extrait directement les pentes, comme nous l'avons fait pour les données sur ΔA et Δt. Le modèle développé précédemment pour toute mesure x_{eff} et résumé dans l'équation (4.7) est applicable à la mesure de l'indice complexe effectif, c'est-à-dire à $\bar{n}_{eff} = n_{eff} - i\kappa_{eff}$. On exprime alors l'équation du modèle telle que :

$$\frac{1}{C_{massique}}\varepsilon_{n,eff} = \frac{1}{\rho}\varepsilon_{n,p} + V_{1s}\frac{N_A}{M}\varepsilon_{n,s} \tag{4.9}$$

$$\frac{1}{C_{massique}}\varepsilon_{\kappa,eff} = \frac{1}{\rho}\varepsilon_{\kappa,p} + V_{1s}\frac{N_A}{M}\varepsilon_{\kappa,s} \tag{4.10}$$

Rappelons que V_{1s} dépend de M, e_s et ρ. Il est nécessaire de fixer e_s pour pouvoir ajuster notre modèle aux données, comme expliqué lors du calcul du modèle en partie 4.3.2. On injecte alors V_{1s} dans les équations 4.9 et 4.10. Regardons les valeurs issues des données expérimentales et les ajustements ainsi obtenus, en figure 4.12.



(a) (b)

Figure 4.12 – Variations expérimentales des ε par unité de concentration massique de n (a) et κ (b) selon le poids moléculaire (■), et ajustement sur ces données (-)

Notre modèle volumique suit à nouveau bien les données expérimentales extraites, plus particulièrement pour n et avec une dispersion plus notable pour κ. Grâce à la simplification sur V_{1s}, les quatre paramètres extractibles sont ceux donnant les valeurs spectroscopiques moyennes à l'intérieur de l'eau solvatée et à l'intérieur des protéines, relativement à l'eau. Ces propriétés sont résumées en tableau 4.2. On peut, grâce à cette adéquation avec les données expérimentales, donner une rationalisation de l'indice complexe effectif pour des solutions d'acides aminés, de peptides et de protéines selon les participations des différents compartiments avec la taille et la concentration. Réfléchissons ici pour l'indice n ; la rationalisation sera strictement la même pour κ (puisque les deux sont interchangeables dans l'expression de la mesure x_{eff}). Notons d'abord que les signes des paramètres extraits nous indiquent que $n_s > n_w > n_p$ (et $\kappa_s > \kappa_w > \kappa_p$). Comment comprendre les variations spectroscopiques effectives vues en figure 4.12 ?

Réfléchissons en termes de concentration constante. Puisqu'on considère la densité constante, avoir la même concentration massique mais augmenter la taille des molécules, c'est en fait passer d'un très grand nombre de petits éléments indépendants solvatés à quelques très gros éléments solvatés : les deux cas possèdent le même volume (et donc poids) de protéine mais le volume de solvatation est plus faible dans le second cas, la diminution profitant à l'augmentation du volume d'eau brute. Donc lorsque M croit, la participation de n_s diminue, la participation de n_p est identique et la participation de n_w augmente mais comme $n_s > n_w$ cela se traduit par un n_{eff} total qui décroit. On passe ainsi d'un $\varepsilon_{n,eff}$ important pour les petits éléments où la couche d'hydratation a une participation prépondérante à cause de son important volume, à un $\varepsilon_{n,eff}$ plus faible lorsque M augmente et que la participation de la couche d'hydratation diminue

car son volume total diminue. Quand M augmente encore, le volume de la couche de solvatation devient négligeable devant celui, constant pour une concentration constante, du volume des protéines. $\varepsilon_{n,eff}$ tend alors vers un plateau correspondant à la seule participation de l'intérieur de la protéine. Et comme $n_p < n_w$, ce plateau de $\varepsilon_{n,eff}$ est négatif.

Si l'on réfléchit maintenant en terme de taille de molécule constante, l'augmentation de la concentration indique une augmentation du nombre de molécules. La molécule ayant un ratio « volume intrinsèque sur volume de solvatation » constant, l'augmentation de la concentration ne fait qu'ajouter des molécules avec le même ratio, et l'indice final effectif augmente linéairement avec le nombre de molécules ajoutées. Ceci explique bien la forme linéaire des courbes en figure 4.3.

	ε_n	ε_κ
protéines, peptides et acides aminés	-0,14	-0,99
couche de solvatation	0,004	0,007

Tableau 4.2 – Paramètres spectroscopiques moyens, relatifs à l'eau pure, extraits à partir des ajustements aux données, exposées en figure 4.12.

Une fois les paramètres du tableau 4.2 connus, il suffit d'exprimer les indices et les absorbances relativement à l'eau, dont les propriétés sont très bien connues [169]. Par exemple, à partir des données ci-dessus, on pourrait proposer les courbes des données spectroscopiques de l'eau de solvatation exposées en figure 4.13. Une augmentation de l'absorbance de l'eau lorsqu'elle participe à la solvatation est cohérent avec la littérature ; [45] donne une variation de +2% (autour de 2.5 THz) contre les +0,7% que nous obtenons ici.

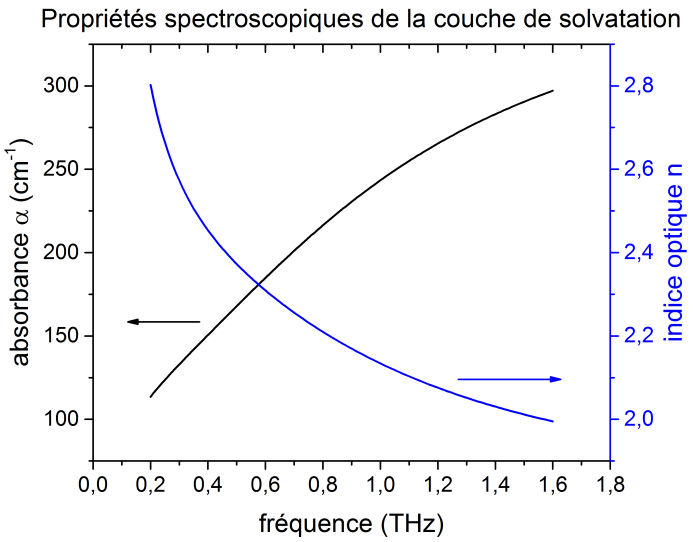
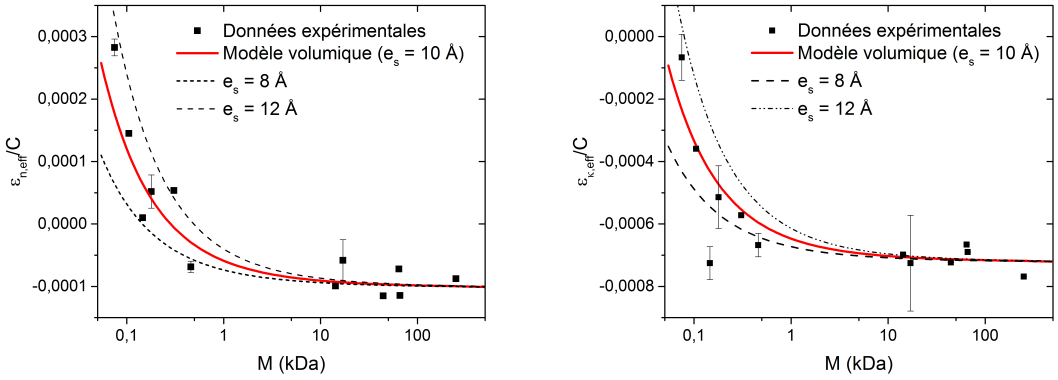


Figure 4.13 – Exemple de données spectroscopiques découlant des $\varepsilon_{n,s}$ et $\varepsilon_{\kappa,s}$ du tableau 4.2 et de la connaissance des données spectroscopiques de l'eau .

4.4.3 Discussion

Ces résultats sont nouveaux et extrêmement utiles comme le montrent les informations spectroscopiques que l'ont peut obtenir *in fine*. Cependant, pour le moment, c'est surtout la compréhension globale des variations spectroscopiques des solutions de différents acides aminés/peptides/protéines, grâce à une rationalisation par un modèle simple, qui est valorisable. En effet, plusieurs points limitent encore la possibilité d'avancer des résultats quantitatifs comme ceux proposés en figure 4.13.

Une première limite se trouve dans l'hypothèse forte de l'existence d'une homothétie entre les valeurs spectroscopiques de l'eau pure et celles des autres compartiments. Nous avons pu voir que les publications supportaient assez bien cette hypothèse quand aux valeurs spectroscopiques effectives de solutions de protéines (lysozyme, albumine). Cette limite est intrinsèque et nécessaire à l'utilisation de notre modèle.



(a) (b)

Figure 4.14 – Impact d'une variation d'épaisseur de couche de solvatation de ±2 Å (courbes rouges claires) relativement à la valeur $e_s = 10$ Å utilisée pour l'ajustement aux données.

Une seconde limite se trouve dans la détermination d'une épaisseur de couche de solvatation constante d'une molécule à l'autre, mais surtout son utilisation à une valeur déterminée de 10 Å. Pour une variation de ±2 Å, on peut observer un fort impact sur les courbes $\varepsilon_{eff} = f(M)$, comme exposé en figure 4.14. Si l'on prenait ces valeurs, les coefficients extraits relativement à la couche de solvatation seraient changés ; par exemple le coefficient $\varepsilon_{n,s}$ passerait de 0,004 à 0,006 (pour 8 Å) ou 0,003 (12 Å), soit des variations de 50 et 25 % respectivement. Notons cependant que les informations spectroscopiques relatives aux protéines ne seront, elles, pas influencées par cette hypothèse puisque leur valeur est déterminée sur une zone où la participation de la couche d'hydratation est négligeable devant celle de la protéine.

Une troisième limite, importante pour l'extraction de valeurs spectroscopiques quantitatives, se situe dans notre méthode d'étalonnage pour établir la relation $(\Delta A,\ \Delta t) \Rightarrow (\varepsilon_{n,eff},\ \varepsilon_{\kappa,eff})$. D'une part, la qualité homotéthique des données spectroscopiques des solutions ioniques relativement à l'eau pure peut être discutée, et donc la valeur exacte des ε utilisés comme valeurs étalons. Les graphiques sont fournis en annexe (figure A.3, page 124) pour illustrer les écarts existants entre cette hypothèse et les données réelles. Cependant cette approximation est incontournable

et reste très crédible. D'autre part, et ce sera ici l'objet de la discussion, la matrice de transfert T est déterminée en s'appuyant sur des données spectroscopiques expérimentales sur lesquelles une variation de ±10% serait facilement envisageable. En effet, en configuration de transmission, un faible écart d'épaisseur (ordre du micromètre) de la cuve utilisée à celle renseignée dans l'algorithme d'extraction des valeurs spectroscopiques peut avoir un impact important sur le résultat final. La vérification faite avec le KCl n'assure pas la totale validité de l'étalonnage puisque les valeurs spectroscopiques attendues sont issues de la même série d'expériences avec le même écart d'épaisseur de cuve possible à celui renseigné dans l'algorithme. Ainsi, pour une simple variation du paramètre le plus sensible dans notre étalonnage (la valeur d'absorbance attendue pour une solution de KI) de ±10%, nous obtenons un décalage des valeurs expérimentales (et donc de l'ajustement) non négligeable. Une estimation de premier ordre du bruit sur l'ajustement dû à cette incertitude d'étalonnage est présentée en figure 4.15.

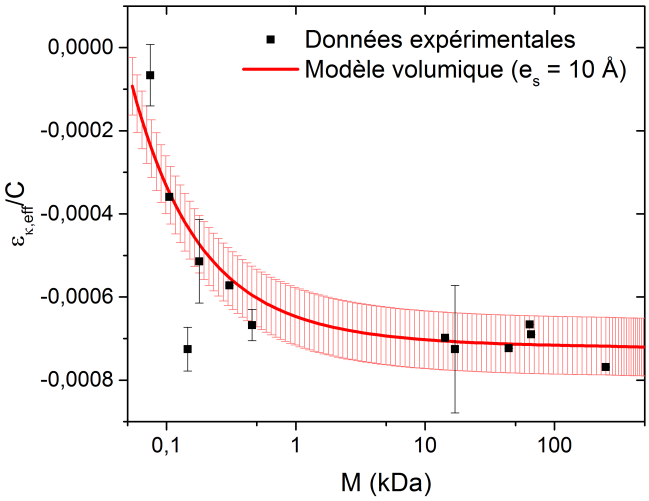


Figure 4.15 – Estimation du bruit dû à l'étalonnage sur l'ajustement aux données relatives à l'absorbance.

Une publication s'est déjà intéressé aux variations de α d'une solution d'albumine selon la concentration massique. Un de leurs résultats, exposé en figure 4.16, permet d'estimer le paramètre $\alpha_{eff}/C_{massique}$ à une fréquence connue ainsi que $\alpha_{eau} = \alpha_{c=0}$, et donc $\varepsilon_{\kappa,eff}/C_{massique}$. On en extrait une valeur de $\varepsilon_{\kappa,eff}/C_{massique} = -5,7.10^{-4}$, contre le $\varepsilon_{\kappa,eff}/C_{massique} = -7,4.10^{-4}$ de nos propres mesures sur l'albumine. Ces résultats sont très proches, d'autant plus si l'on prend en compte l'erreur estimée dû à l'étalonnage de l'ordre de $\pm 1,5.10^{-4}$. Bien que nos données soient entachées d'une erreur possible importante, les ordres de grandeur obtenus par la conversion $(\Delta A, \Delta t) \Rightarrow (\varepsilon_{n,eff}, \varepsilon_{\kappa,eff})$ restent donc excellemment réalistes si on les compare aux très rares données actuelles.

Pour résumer, le modèle développé et son ajustement aux données donnent une rationalisation qualitative de l'évolution des données spectroscopiques d'une solution selon sa composition. Par ailleurs, malgré des hypothèses de travail fortes, il est possible d'extraire des informations quantitatives si nous disposons d'un étalonnage fiable. L'inconnue de la valeur absolue d'épaisseur de la couche de solvatation reste un élément supplémentaire déterminant pour la quantification

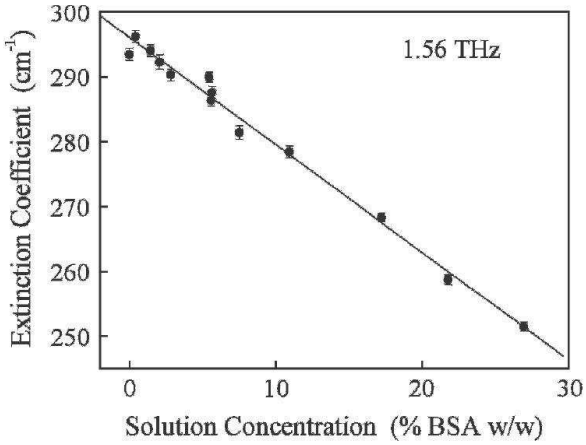


Figure 4.16 – Données d'absorbance pour une solution d'albumine à 1,56 THz selon sa concentration (1 % w/w ≡10 g/L), tirées de [47].

de l'indice complexe de l'eau de la couche de solvatation. Ce ne sera en revanche pas un souci supplémentaire pour les données sur les protéines, indépendantes de e_s. Ce travail, bien qu'encore inachevé, est donc un pas important vers une meilleure définition des valeurs moyennes comme « guide » pour les études plus fines qui ne portent que sur une molécule à la fois. Par exemple, des écarts aux valeurs moyennes pourront indiquer une molécule à la topologie distincte ou présentant une couche d'hydratation aux propriétés originales. A l'inverse, une idée du comportement spectroscopique moyen peut être utile lors de l'application ou lors des études de faisabilité de différents capteurs de biomolécules, nouveau secteur très dynamique de la recherche térahertz (comme nous l'avons vu en 1.3.2).

4.5 Application à la caractérisation de notre outil térahertz

4.5.1 Ajustement du modèle à la sensibilité du contraste térahertz

Revenons à l'étude de notre contraste térahertz $\Delta_{rel} = \Delta A$, utilisé comme outil de mesure de la perméabilisation cellulaire après sa normalisation donnant Δ. Dans le cas de nos acquisitions pour le suivi de la perméabilisation, la mesure x_{eff} est l'amplitude du signal térahertz, x_w la mesure d'amplitude de la référence et $(x_{eff}-x_w)/x_w$ est le contraste ΔA. Nous pouvons appliquer une telle équation à ΔA grâce à la démonstration théorique de linéarité entre les Δet ε montrée en figure 4.10(impliquant la linéarité observée dans les données brutes entre ΔA et la concentration massique, en partie 4.2.3). L'expression en équation (4.7) devient alors :

$$\frac{\Delta A}{C_{massique}} = \frac{\Delta_{rel}}{C_{massique}} = \frac{1}{\rho}\Delta_p + V_{1s}\frac{N_A}{M}\Delta_s \tag{4.11}$$

Avec Δ_p et Δ_s participations respectives des protéines et de la couche de solvatation au contraste total. Ces valeurs sont supposées constantes, ainsi que la masse volumique moléculaire ρ et l'épaisseur de la couche de solvatation e_s. L'expression du contraste normalisée par la concentration massique, c'est-à-dire la sensibilité du contraste, ne varie alors plus qu'avec le poids moléculaire M. Appliquons notre modélisation à la variation expérimentale de $\Delta_{rel}/C_{massique}$

obtenue à partir des courbes brutes montrées en 4.2.3 . On obtient les données et leur ajustement au modèle exposés en figure 4.17.

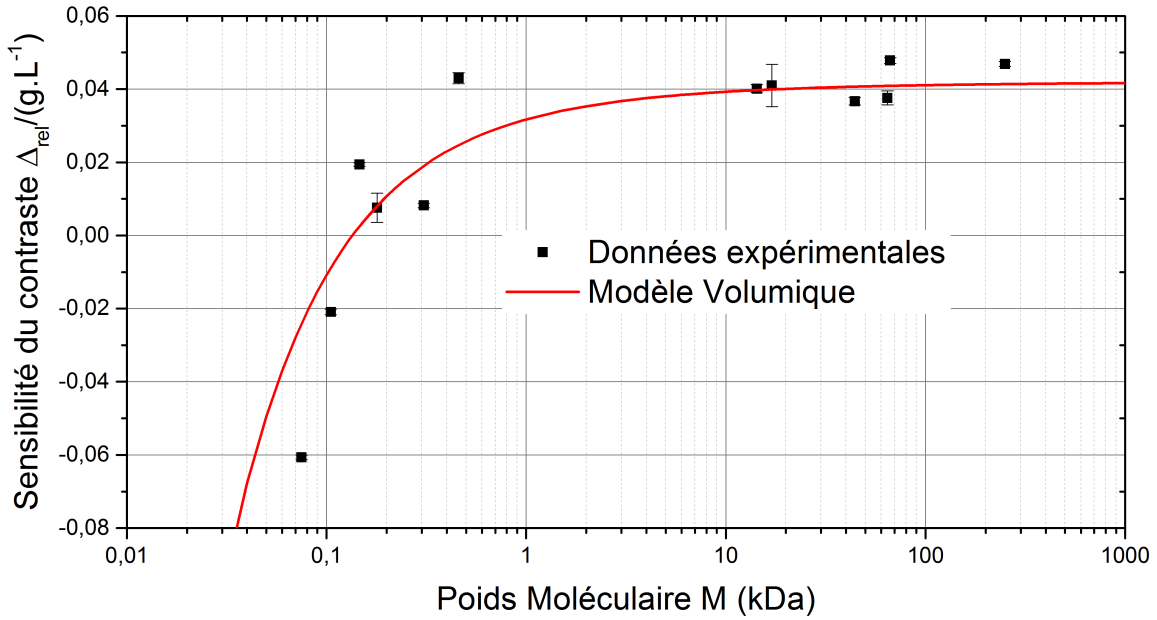


Figure 4.17 – Données expérimentales de la sensibilité du contraste à plusieurs acides aminés, peptides et protéines, et ajustement obtenu d'après l'équation (4.11).

Le comportement attendu par le modèle s'ajuste très bien aux données expérimentales, malgré les approximations utilisées. Nous n'avons ici pas préoccupation à avoir quant aux valeurs absolues des données puisque Δ_{rel} (ΔA) est une données brute sans conversion ultérieure, et peu bruitée (comparativement à Δt).

L'équation du meilleur ajustement est d'expression :

$$\frac{\Delta_{rel}}{C_{massique}} = 0,042 - 0,95\frac{V_s N_A}{M} \tag{4.12}$$

Ce résultat est très cohérent. Le signe de la participation constante, indépendante de M, montre une participation positive de l'intérieur de la protéine au contraste. A l'inverse, le signe négatif du second terme ne peut que provenir du signe négatif de la participation de la couche de solvatation au contraste global. Le mécanisme du contraste selon le poids moléculaire est le même que celui expliquant les données spectroscopiques. Si nous réfléchissons à concentration massique constante : pour de nombreuses petites molécules, la participation (négative) de la couche d'hydratation est prépondérante. Alors que la taille augmente, et que le nombre de molécules diminue pour conserver une même concentration massique, la participation de la couche d'hydratation diminue, jusqu'à devenir négligeable devant la participation positive de la protéine. On atteint alors le plateau de valeurs à $\Delta_{rel}/C_{massique} \approx \Delta_p/\rho = 0,042$. Ce plateau est la gamme pour laquelle la sensibilité de la mesure sera constante, donnant un contraste Δ_{rel} de 4,2 % pour 100 g/L.

4.5.2 Résumé des propriétés de Δ_{rel}

Le modèle développé est adéquat pour la description du contraste térahertz. Concernant notre outil térahertz, on peut donc définir les propriétés suivantes :

— Le contraste est non spécifique au type d'acide aminé, peptide ou protéique. Nous pouvons donc exclure des sensibilités de type indirect, comme celle à un acide aminé précis, à une structure particulière. Il n'est globalement lié qu'à leur taille moléculaire.

— L'origine intrinsèque de ce contraste est la différence entre les caractéristiques spectroscopiques à l'intérieur des protéines et les caractéristiques de l'eau qu'elles remplacent. On peut voir cet effet comme un « défaut d'eau », celle-ci étant remplacée par la molécule bien moins absorbante.

— La limite de ce contraste est la participation négative de la couche d'hydratation nécessaire à la solvatation de la molécule. Si cette couche est de volume total trop important, sa participation négative diminuera le contraste, voir même l'annulera ou le rendra négatif.

— La gamme de poids moléculaires dans laquelle le comportement de Δ_{rel} est peu dépendant de M s'étend sur $M \in [330; \infty[\ Da$, si l'on définit « peu dépendant » comme moins de 50 % d'écart de sensibilité. Si l'on restreint à moins de 10 % d'écart de sensibilité, $M \in [2; \infty[\ kDa$. Ce point est primordial et très intéressant pour notre quantification. En effet, lors de la perméabilisation, on peut s'attendre à une perturbation de certaines macromolécules, et peut-être leur désorganisation partielle de laquelle résulterait la libération de leurs sous-unités. On sait cependant qu'il faudrait que ces sous-unités soient de la taille de quelques acides aminés seulement et que cet évènement de dépolymérisation touche une portion importante de molécules pour que d'*éventuelles* variations de Δ apparaissent malgré une concentration en grammes par litre inchangée. Si l'on prend l'exemple (le plus abondant dans le cytoplasme) des macromolécules du cytosquelette, leurs sous-unités sont de l'ordre de 40 à 50 kDa, ce qui garantit absolument aucune variation sensible de Δ même en cas de dépolymérisation totale du cytosquelette, et donc une mesure totale en grammes par litre fidèle.

A présent que nous avons affiné notre compréhension du contraste, nous pouvons l'utiliser comme un outil, mieux compris, de quantification de contenu cellulaire protéique et donc du suivi de sa sortie lors de la perméabilisation cellulaire.

Chapitre 5

Application de l'imagerie térahertz au suivi de la perméabilisation cellulaire

Sommaire

5.1 Motivations et méthodes actuelles autour de la quantification de la perméabilisation cellulaire . . . **98**
5.1.1 Pourquoi perméabiliser une cellule ? . . . 98
5.1.2 Méthodes de perméabilisation cellulaire réversible . . . 99
5.1.3 Les outils actuels de quantification de la perméabilisation . . . 101
5.2 Comparaison de l'imagerie térahertz aux méthodes classiques en biologie . . . **103**
5.2.1 Méthode au bleu de trypan comparée au BCA . . . 103
5.2.2 Méthode au iodure de propidium comparée au BCA . . . 105
5.2.3 Bilan comparatif . . . 107
5.3 Application à l'étude de la perméabilisation chimique . . . **109**
5.3.1 Suivi de la dynamique de perméabilisation . . . 109
5.3.2 Comparaison d'action de deux saponosides . . . 111
5.3.3 Étude de réversibilité de la perméabilisation . . . 112
5.4 Application à l'étude de l'électroporation . . . **114**
5.4.1 Problématique et adaptations au montage térahertz . . . 114
5.4.2 Conditions d'acquisition . . . 116
5.4.3 Résultats et premières interprétations . . . 117
5.5 Conclusion . . . **120**

A présent que le contraste Δ_{rel} est mieux compris dans son origine physique et spectroscopique, nous pouvons le proposer comme un outil pour la biologie, pour le suivi quantitatif de la perméabilisation cellulaire. Pour ce faire nous allons d'ores et déjà expliciter les motivations existantes derrière le suivi de la perméabilisation de cellules vivantes au cours de la section 5.1, ainsi que les outils classiquement utilisés pour ce faire. Nous soulignerons les avantages de Δ devant deux de ces méthodes classiques, par comparaison expérimentale simple en section 5.2. Puis nous entreprendrons d'exposer la multitude de possibilités offertes par le suivi de Δ, en l'appliquant à l'étude de perméabilisations chimiques (section 5.3) et électriques (section 5.4).

5.1 Motivations et méthodes actuelles autour de la quantification de la perméabilisation cellulaire

5.1.1 Pourquoi perméabiliser une cellule ?

La perméabilisation cellulaire est l'augmentation des transferts de molécules à travers ses membranes. Un rapide aperçu schématique de la membrane plasmique est proposé en figure 5.1.

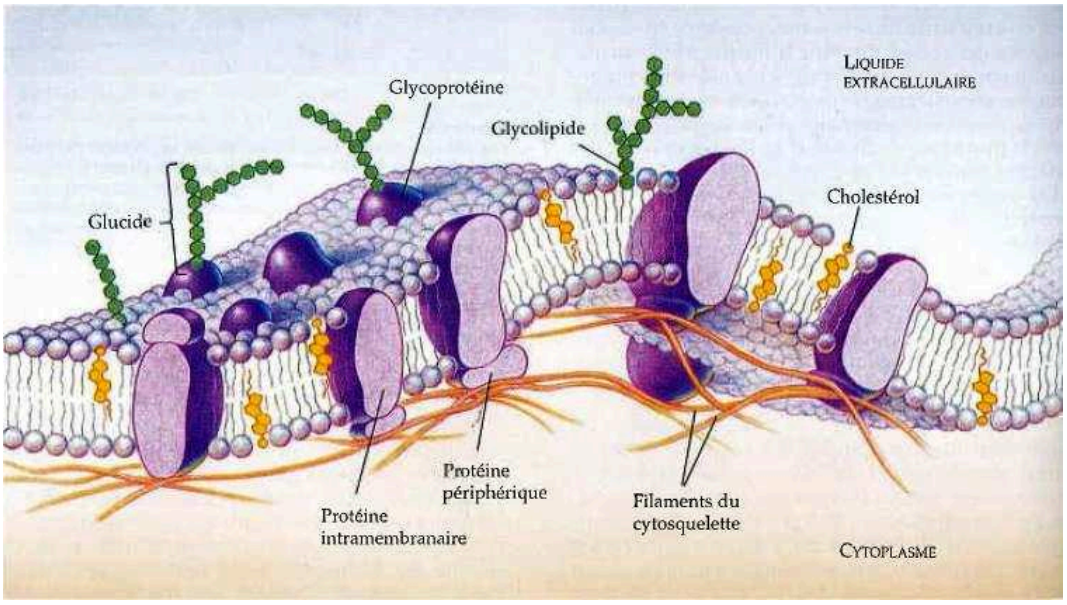
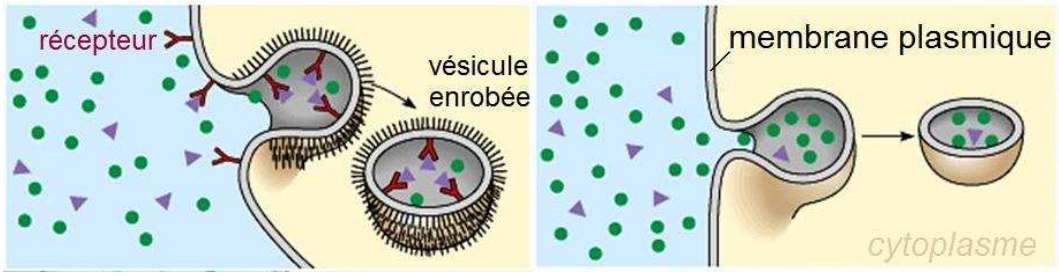


Figure 5.1 – Schéma structurel détaillé de la membrane plasmique d'une cellule animale. Tiré de [170].

On y voit les lipides, composants fondamentaux de la membrane, dans leur organisation en bicouche : leurs têtes hydrophiles tournées vers les milieux intra ou extracellulaires, leurs parties hydrophobes au centre. Fichées dans cette bicouche lipidique, de nombreuses protéines aux rôles variés (transports, régulations, communication...) sont également présentes ; elles peuvent présenter des relations par liaisons faibles ou fortes avec d'autres molécules hors de la membrane, comme par exemple le cytosquelette dans le cytoplasme ou des glycosylations vers l'extérieur. Des molécules de cholestérol libres se trouvent dans la partie centrale, hydrophobe, de la bicouche lipidique. La membrane est souvent comparée à une mosaïque fluide, de par la diffusion rapide et la réorganisation permanentes de ses divers composants.

Les membranes d'une cellule, que ce soit la membrane plasmique qui la délimite ou ses endomembranes, présentent des perméabilités sélectives. Ceci est lié à leur nature lipidique (hydrophobe) mais aussi à leur composition en différentes molécules transmembranaires facilitant des transferts spécifiques. Seules les petites molécules non chargées et lipophiles (O_2, N_2..) passent librement par diffusion à travers les membranes. Les molécules polaires (eau, peptides, sucres...) et les ions, hydrophiles, ne vont pouvoir passer que par transports via des protéines implantées dans la membrane, sous forme de canaux ou de molécules plus complexes (transporteurs). Les plus grosses molécules ne peuvent tout simplement pas passer la membrane plasmique. Les cellules dégradent souvent ces molécules avant de les importer dans leur cytoplasme. La seule solution naturelle d'entrée intacte est l'endocytose, c'est à dire que la membrane s'invagine autour des molécules, les englobe et forme une vésicule intracellulaire. Ce processus d'internalisation est très majoritairement spécifique. Deux représentations schématiques d'endocytose spécifique (a) et non spécifique (pinocytose, b) sont proposées en figure 5.2.



(a) (b)

Figure 5.2 – Deux mécanismes d'entrée de grosses molécules dans la membrane : l'endocytose spécifique (a) et la pinocytose (b). Extrait de [170].

On peut vouloir dépasser ces propriétés pour faire entrer (ou plus rarement sortir) des biomolécules d'intérêt, trop lourdes, trop lipophobes et/ou sans mécanisme de passage de la membrane existant. Dans le cas de cellules fixées, la perméabilisation est un processus bien établit, pour les marquages en immunocytochimie par exemple. Cependant le travail sur des cellules fixées n'est pas toujours adapté (exemple : *in vivo*) et des artéfacts dus à la fixation ont été signalés [171]. Dans le cas de cellules vivantes, il s'agira souvent de provoquer l'entrée d'agents de contraste pour l'imagerie (quantum dots, fluorophores...), de médicaments ou d'ADN (thérapie génique, génie génétique..), puis d'arrêter la perméabilisation et permettre à la cellule de se « réparer ». On cherche donc une perméabilisation réversible. Des applications en biologie métabolique et biologie génétique utilisent aussi la perméabilisation pour obtenir des systèmes « ouverts », dans lesquels on accède librement aux organites et réactions cytoplasmiques [123,124]. Dans ce cas, la perméabilisation est douce, sur cellules vivantes, mais non nécessairement réversible.

5.1.2 Méthodes de perméabilisation cellulaire réversible

Il existe une pléthore de méthodes utilisées pour la perméabilisation cellulaire réversible à différentes biomolécules. Certaines méthodes utilisées pour l'ADN (vecteurs viraux, par médiation de peptide...), complexes et spécifiques [172], ne seront pas abordées ici par souci de simplicité.

Survolons les plus connues :

■ La technique de micro-injection, qui consiste tout simplement à injecter à l'aide d'une très fine aiguille ce que l'on souhaite insérer dans les cellules, cellule par cellule [173].

■ Les méthodes d'insertion de canaux dans la membrane plasmique. Citons par exemple la streptolysine-O, qui s'insère spontanément dans les membranes et permet le passage de molécules en aménageant des pores non spécifiques dans la membrane (jusqu'à 35 nm) [174]. Des porations spécifiques sont possibles, surtout pour les ions (ionoporation), avec par exemple la valinomycine [175] hautement spécifique aux ions potassium.

■ Les méthodes par utilisation de détergents doux (non ioniques), tels que le Triton-X100 [176, 177], la digitonine [124,178] ou la saponine [133,134,179]. Leurs modes d'actions sont légèrement différents mais reposent sur la capacité du détergent à s'insérer dans la membrane, et en altérer ses propriétés (stabilité, composition en cholestérol..). Ils vont être utilisés à faibles concentrations dans le cas de cellules vivantes pour éviter que leurs propriétés tensio-actives ne solubilisent les membranes. Ces détergents sont par ailleurs très utilisés à plus forte concentration pour perméabiliser les cellules fixées [119], et sont donc assez connus des biologistes. Ces détergents doux furent la première méthode proposée pour la perméabilisation de cellules vivantes, dans le cadre d'études en enzymologie dans les années 70.

■ La méthode d'électroporation. Elle consiste à appliquer un champs électrique déstabilisant les membranes et rendant transitoirement la cellule plus perméable, l'effet variant avec les caractéristiques du champs [180, 181]. Les mécanismes élémentaires n'en sont pas encore très bien compris [182, 183], amenant à l'appellation électroperméabilisation ou électroporation selon l'hypothèse de fonctionnement sous-jacente. C'est malgré tout une technique très utilisée en clinique [184] comme en recherche, pour l'entrée d'ADN ou de médicaments par exemple [185]. L'application la plus répandue est la transfection de cellules et de bactéries *in vitro*, souvent pour créer des modèles modifiés génétiquement. Des applications *in vivo* et cliniques émergent dans le traitement de zones cancéreuses. Nous y reviendrons en section 5.4.

■ Les méthodes reposant sur un choc osmotique. Appliquer un choc osmotique permet une brusque rééquilibration de l'eau entre intérieur et extérieur. Si le milieu extracellulaire est hypo-osmotique, l'eau extracellulaire va brusquement entrer dans la cellule, entrainant avec elle une partie des molécules à faire entrer dans la cellule. On retrouve parfois cette méthode utilisée en parallèle d'autres techniques perméabilisantes pour en améliorer l'effet [186, 187].

■ La méthode la plus simple reste certainement d'attendre l'entrée des molécules d'intérêt par pinocytose. La pinocytose est une endocytose spontanée (dans la plupart des cellules) et non spécifique : la membrane s'invagine vers l'intérieur de la cellule, emprisonne une petite partie du milieu extracellulaire, et forme une vésicule intracellulaire (figure 5.2). Cette entrée ne causera aucun dommage à la cellule, mais permettra l'entrée uniquement d'une petite quantité de molécules d'intérêt. Les utilisations sont donc plus restreintes mais sans souci de viabilité cellulaire : par exemple pour de l'imagerie de particule unique, ne nécessitant pas une forte concentration intracellulaire de la molécule d'intérêt [188].

■ Les méthodes par stress mécanique. Des solutions de perméabilisation de cellules vivantes ont été proposées avec des jets de gaz inerte [189] ou de plasma [190]. Ces solutions restent très marginales et ne sont pas utilisées en laboratoire de biologie.

La méthode adéquate sera choisie selon le mode de délivrance intracellulaire, le type de molécule, la rapidité, l'efficacité, etc... Le défi commun à toutes ces méthodes est de trouver l'équilibre entre une entrée/sortie efficace des molécules d'intérêt et la conservation de la viabilité cellulaire ; autrement dit altérer les propriétés de la membrane, *mais pas trop.*

5.1.3 Les outils actuels de quantification de la perméabilisation

Avant d'utiliser une méthode de perméabilisation réversible, ou d'en proposer une nouvelle, l'idéal est de vérifier systématiquement son efficacité et sa relative innocuité. Ceci se fait par la démonstration de la perméabilisation, parallèlement à une étude de viabilité cellulaire post-perméabilisation. Si la perméabilisation est spécifique, c'est prioritairement la quantification directe de la molécule d'intérêt dans les cellules qui est réalisée. Cependant, bien souvent cette molécule n'est pas facilement quantifiable en intracellulaire ou bien la perméabilisation se veut non spécifique : de nombreuses méthodes de quantification sont alors disponibles, dont les plus courantes ont été synthétisées dans le tableau 5.1.

Entrée de molécules naturellement non perméantes = « Test d'exclusion »	Colorant			**Trypan Blue**
	Marqueurs Fluorescents	Fluorochrome seul	Se liant de façon covalente avec des composants intracellulaires	FITC (protéines) **Iodure de propidium** (ADN)
			Sans cible particulières, soluble dans le cytosol	Lucifer Yellow Calcéine QD
		Marqueur + molécule d'une taille connue		FITC-dextrans Rhodamine-dextrans FITC-albumine AlexaFluor647- IgG
		Marqueur + Anticorps avec cible interne		*Mêmes marqueurs*
	Molécules fonctionnelles			Enzyme (β galactosidase) Toxine Bléomycine Gene
	Détection par molécules exprimées par la cellule modifiée			ATP Ca^{2+}
Quantification de sortie de molécules	Naturelles			ATP LDH Protéines totales
	Marquées			LDH Noradrénaline
Quantification intracellulaire de molécules	*Idem Quantification de sortie de mol.*			*Idem Quantification de sortie de mol.*

Tableau 5.1 – Résumé des principales méthodes et molécules utilisées pour la quantification de la perméabilisation cellulaire.

Le principe le plus répandu est celui du test d'exclusion : une molécule, normalement non perméante, rentrera dans la cellule si et seulement si celle-ci est rendue perméable. Ces molécules sont présentes dans le milieu extracellulaire quand les cellule sont supposées être perméabilisées, puis le milieu extracellulaire est souvent rincé avant que ne commence la quantification des

molécules intracellulaires. Le test d'exclusion de première intention est le bleu de trypan (0,87 kDa), simple colorant bleu. D'autres molécules, fluorescentes, peuvent être utilisées pour être ensuite quantifiées par lecteur de fluorescence, fluoro-cytométrie en flux (CMF) ou imagerie de fluorescence. Certains fluorochromes ont la particularité de se fixer spécifiquement à l'intérieur de la cellule et d'y changer leurs caractéristiques fluorescentes (pics d'émission/absorption) : on peut les détecter directement sans se soucier des molécules extracellulaires restantes. Le plus utilisé est l'iodure de propidium (0,67 kDa) [174, 180, 191, 192], agent intercalant de l'ADN (et en moindre mesure de l'ARN). C'est, avec le bleu de trypan, le test le plus répandu dans les publications.

Des possibilités assez intéressantes sont offertes par les fluorochromes fixés à d'autres molécules. En effet, ces molécules peuvent être de taille contrôlée pour connaitre la gamme de taille de molécules capables de passer la membrane suite à la perméabilisation, citons ici les dextrans [176,193]. Ces molécules liées au fluorochrome peuvent aussi être des marqueurs spécifiques, pour par exemple ne se lier que dans certaines organites et ainsi tester l'effet perméabilisant non seulement sur la membrane plasmique mais aussi sur les endomembranes. Tout dépend de l'objectif de la perméabilisation !

Le test d'exclusion de molécules fonctionnelles, bien que moins utilisé, peut être très pratique. Par exemple la bléomycine, qui est sans effet en extracellulaire, aura une activité hautement toxique si elle parvient à franchir la membrane plasmique [181]. On parle d'activité cytotoxique. Il suffit alors de faire le ratio entre cellules vivantes et mortes pour obtenir l'efficacité de la perméabilisation (à la taille moléculaire de la bléomycine, ∼1,4 kDa). Le dosage de l'activité intracellulaire de l'enzyme β-galactosidase est un autre test d'exclusion de molécule fonctionnelle, à signaler car ici l'enzyme normalement exclue est de taille importante : la perméabilisation suivie sera donc celle relative à une taille de 120 kDa.

La quantification de sortie de molécules est aussi utilisée [174,178,180]. La sortie de molécules typiquement intracellulaires (protéines, ATP, LDH...) est quantifiée, parfois directement, parfois par marquage préalable de ces molécules.

La quantification intracellulaire de molécules « restantes » est plus rare car souvent plus complexe à mettre en œuvre, notamment sur l'isolation du volume intracellulaire [174,178]. La mesure térahertz que nous développons correspond à une de ces méthodes, par quantification directe de la concentration intracellulaire de protéines, mais sans les contraintes d'isolation physique du volume intracellulaire.

5.2 Comparaison de l'imagerie térahertz aux méthodes classiques en biologie

L'objectif est ici de comparer notre méthode de suivi de perméabilisation en térahertz par rapport aux deux tests d'exclusion les plus utilisés. Afin de réduire la variabilité entre les échantillons, tous les tests sont réalisés sur les mêmes plaques de culture au même état de confluence. Il n'est pas possible de choisir les supports en silicium du montage térahertz pour y appliquer les différentes méthodes, car les méthodes des tests d'exclusion sont incompatibles avec un support opaque, et nécessitent un trop grand nombre d'échantillons (invasivité, échantillons témoins...). Ceci empêche un suivi térahertz parallèle aux autres méthodes. Pour contourner le problème nous proposons de comparer ces méthodes classiques de biologie au test BCA, que l'on sait fournir une information très proche de notre méthode térahertz : l'information de fuite des protéines et peptides intracellulaires (voir figure 3.18). La comparaison se fait donc en 2 étapes : comparaison des tests d'exclusion au test BCA, puis comparaison du BCA à notre méthode térahertz.

La comparaison se fera pour une perméabilisation à la saponine. Le BCA est comparé respectivement au test d'exclusion du bleu de trypan (5.2.1) et au test d'exclusion du iodure de propidium (5.2.2). La perméabilisation sur cellules vivantes a souvent pour objectif d'être réversible. C'est pourquoi un test de viabilité cellulaire a été réalisé en parallèle d'une de ces comparaisons afin de souligner la sensibilité nécessaire pour la détection de perméabilisation aux étapes encore réversibles.

5.2.1 Méthode au bleu de trypan comparée au BCA

Le Bleu de Trypan (BT) est un simple colorant, connu depuis le début du vingtième siècle. En sa présence dans le milieu extracellulaire, les cellules dont la membrane est altérée sont teintées en bleu, alors que les cellules non perméabilisées restent incolores [194]. Le test d'exclusion est réalisé en plaçant le BT dans le milieu extracellulaire puis en ajoutant l'agent perméabilisant à un temps t=0. Pour chaque temps t, le milieu est retiré d'un puit, celui-ci est délicatement rincé puis 3 photographies du tapis cellulaire sont prises au microscope optique à contraste de phase. Sur ces photographies, les cellules (bleues ou transparentes) sont dénombrées à l'œil et le taux T de perméabilisation en est déduit suivant : $T = {}^{cellules\ bleues}/_{cellules\ totales}$.

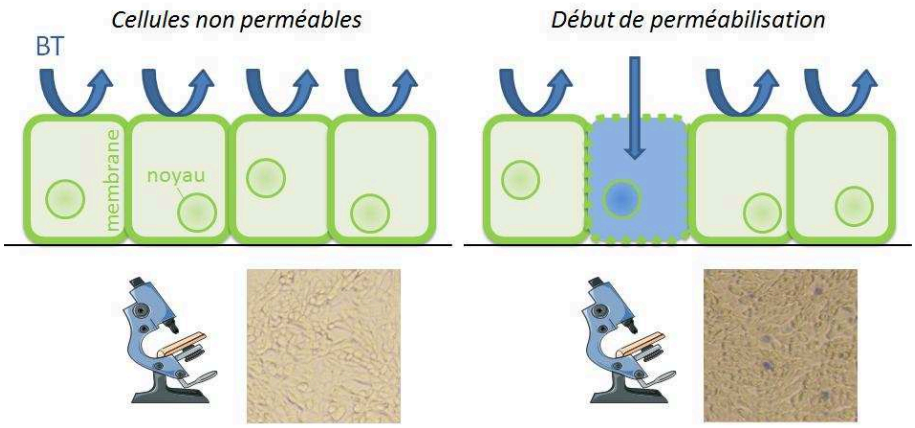


Figure 5.3 – Principe du test d'exclusion du bleu de trypan.

Le BT étant toxique pour les cellules à moyen et long terme, les échantillons ne peuvent être réutilisés. Un témoin négatif est réalisé et montre l'absence d'entrée détectable de BT sur la durée de l'expérience si aucun agent perméabilisant n'est ajouté. Le protocole complet est détaillé en Annexe A.6 (page 133).

Le test de viabilité utilisé est un test colorimétrique utilisant la molécule MTS [1] [195], dérivé simplifié du test classique au MTT (molécule proche mais non hydrosoluble). Le MTS est un sel rendu soluble dans l'eau, de couleur jaune pâle, que la cellule réduira spontanément en proportion de son activité métabolique. Le produit formé par cette réduction (un formazan) est brun sombre et peut être quantifié par son absorbance à 490 nm. Le taux de viabilité cellulaire (en réalité, d'activité métabolique totale) est donné par l'absorbance de chaque puit, normalisée par un témoin négatif (0 %, aucun cellule dans le puit) et un témoin positif (100 %, cellules non perméabilisées). Le protocole complet est détaillé en Annexe A.7 (page 134).

La comparaison est réalisée sur une plaque 24 puits ; 12 sont attribués au BCA suivi du test de viabilité 20h plus tard, 12 au test d'exclusion du BT (figure 5.4).

Figure 5.4 – Résumé du schéma d'expérience sur la plaque 24 puits utilisée après ajout de la saponine au t=0.

On observe en figure 5.5 que le BCA et le bleu de trypan ne donnent pas la même dynamique de perméabilisation. Alors que le BCA est sensible dès les premières minutes à la sortie de peptides et protéines, le bleu de trypan n'indiquera une perméabilisation effective qu'au delà de 10 minutes. En deçà de ces dix minutes, aucune cellule ne se teinte en bleu. Ceci peut être compris soit comme le fait que la perméabilisation ne concerne d'abord que les molécules plus petites que le BT (0,87 kDa), soit comme un effet seuil de détection à l'œil. Au-delà, leur nombre augmente très rapidement mais le bruit ne donne pas accès à des renseignements quantitatifs. Ce bruit est dû au comptage, mais aussi à l'inhomogénéité de perméabilisation observée entre les zones du tapis cellulaire. Après 30 minutes de perméabilisation, les tapis de cellules sont trop abimés et ne résistent pas aux rinçages intensifs nécessaires pour ôter le BT extracellulaire et permettre l'observation au microscope.

1. 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium, de son doux nom.

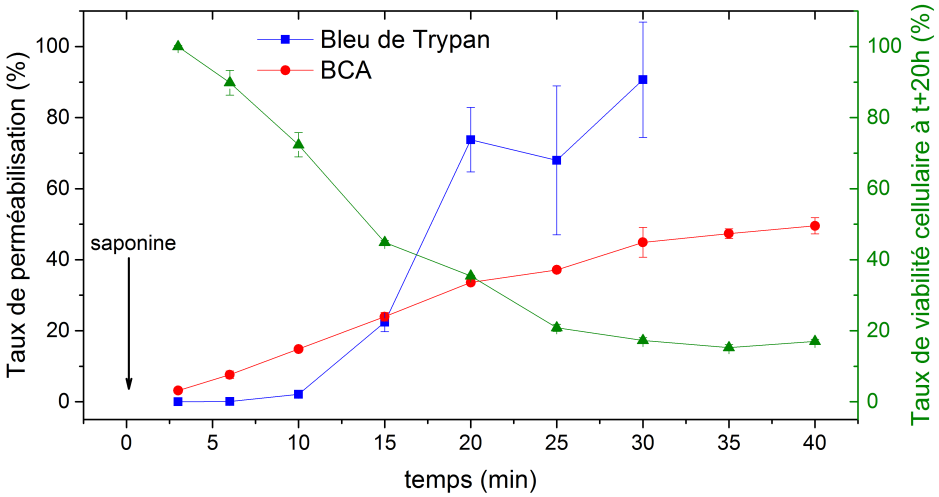


Figure 5.5 – Comparaison du taux de perméabilisation obtenu par le test d'exclusion du bleu de trypan (■) et celui obtenu par le BCA (●). Un test de viabilité cellulaire sur les mêmes puits que ceux utilisés pour le BCA est réalisé à t+20h après la perméabilisation et le rinçage (▲). Il donne accès au pourcentage de survie cellulaire pour les différents temps d'exposition à la saponine.

Le suivi du taux de viabilité 20h après perméabilisation montre une chute rapide de la survie cellulaire lorsque les temps d'exposition à la saponine, avant rinçage et remise de milieu propre, augmentent. Pour un temps d'exposition de 15 minutes à la saponine avant rinçage et remise de milieu de culture propre, plus de la moitié des cellules perméabilisées ne survivront pas. Or le test du bleu de trypan ne détecte la perméabilisation qu'au delà de 10 minutes. L'importance de la détection des premiers évènements de perméabilisation est donc critique, et l'information donnée par la sortie de protéines (et peptides) intracellulaires semble très avantageuse au regard de la méthode au BT.

5.2.2 Méthode au iodure de propidium comparée au BCA

L'iodure de propidium est un agent intercalant des acides nucléiques (ADN, ARN), c'est à dire se plaçant spontanément et irréversiblement dans ces molécules. Naturellement fluorescent en solution, ses propriétés changent lorsqu'il est intercalé dans un acide nucléique : ses pics d'excitation et d'émission sont décalés, et l'intensité de sa fluorescence augmente fortement (ordre de 20 à 30 fois plus). Pour le test d'exclusion, le iodure de propidium (IP) est placé dans le milieu extracellulaire, et la quantification de son état intercalé est réalisée au fil de la perméabilisation. C'est très majoritairement l'IP ayant pu pénétrer dans la cellule et son noyau qui fluorescera pour des longueurs d'onde Excitation/Emisson de 595/620 nm [191,192]. Grâce à sa petite taille, il passera librement à travers les pores nucléaires. On réalise un témoin négatif (aucun agent perméabilisant) donnant la participation au signal fluorescent de l'IP non intercalé F_-, et un témoin positif (perméabilisation totale) donnant l'émission maximale F_+. On peut ainsi établir en pourcentage le taux T de perméabilisation à l'IP induit par l'agent perméabilisant avec : $T = {}^{(F-F_-)}/_{(F_+-F_-)}$. Son principe est résumé en figure 5.6.

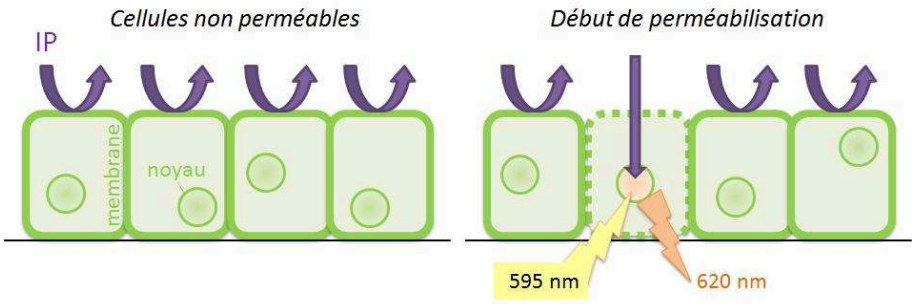


Figure 5.6 – Principe du test d'exclusion du iodure de propidium.

En pratique, les 24 puits d'une plaque de culture sont séparés en 2 groupes : 6 puits sont dévolus au BCA, les autres au test d'exclusion de l'IP (figure 5.7). Le test d'exclusion est réalisé par suivi fluorimétrique avec un lecteur de plaque automatisant l'injection et l'agitation de l'agent perméabilisant (saponine) à t=0. Les témoins positifs sont des puits de cellules perméabilisées deux à trois heures auparavant au Triton X-100 (0,2 %). Les témoins négatifs sont des puits pour lesquels l'IP est présent dans le milieu extracellulaire mais la saponine n'est pas introduite. Le protocole complet est détaillé en Annexe A.8 (page 136).

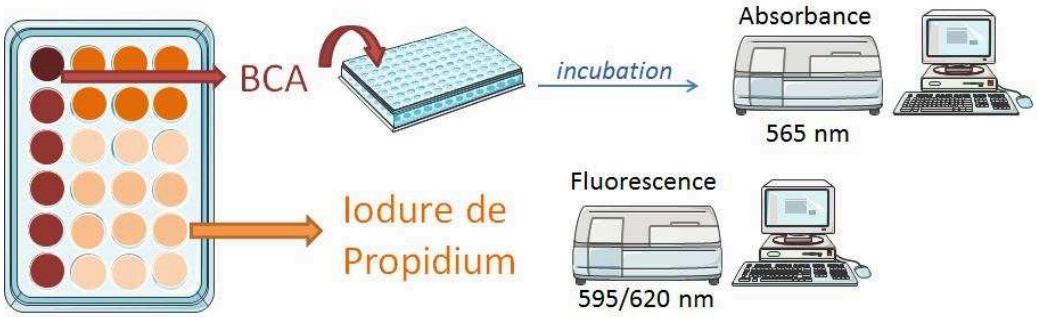


Figure 5.7 – Résumé du schéma d'expérience sur la plaque 24 puits utilisée. Dans chaque code couleur, les puits les plus foncés correspondent aux témoins positifs, les plus clairs aux témoins négatifs.

On observe en figure 5.8 que le BCA est à nouveau plus sensible que le test d'exclusion, plus particulièrement au cours des 15 à 20 premières minutes. Ce délai peut être compris comme un retard d'entrée de l'IP dû à sa taille de 0,668 kDa plus importante que les premiers peptides (ordre de 0,3 kDa) détectés par le BCA. Pourtant, la différence de poids n'est pas très importante ; un décalage dû à l'intercalation lente dans l'ADN pourrait aussi être envisagé. Notons que l'utilisation d'un témoin positif pour complètement normaliser la mesure (entre un 0% et un 100%) est assez inhabituelle, la plupart des publications choisissant une mesure uniquement rapportée à un témoin négatif. Nous avons choisi d'utiliser aussi un témoin positif pour pouvoir comparer la forme mais aussi l'amplitude (obtenue grâce à la normalisation complète). Même si l'on envisage dans nos données de ne pas utiliser le témoin positif, le plateau initial ne se démarquera pas suffisamment du témoin négatif et la mesure sera toujours moins sensible.

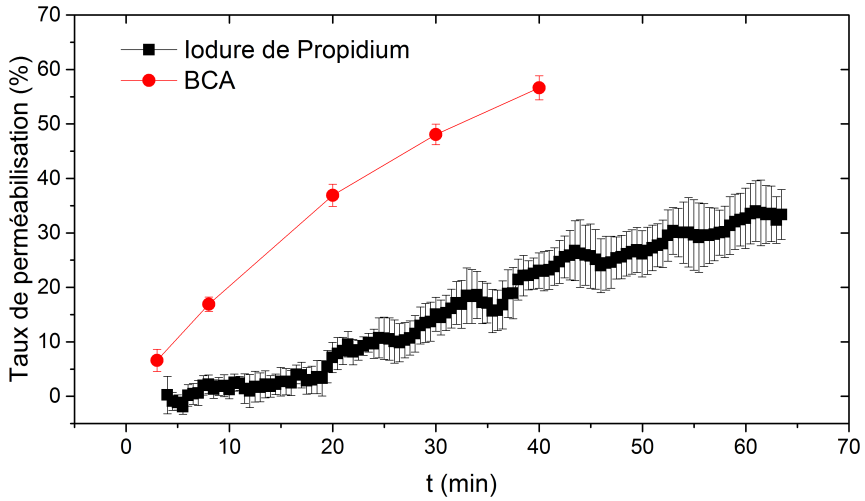


Figure 5.8 – Comparaison du taux de perméabilisation obtenu par le test d'exclusion du iodure de propidium (■) et celui obtenu par le BCA (●).

L'entrée et l'intercalation de l'IP ont ici l'avantage de pouvoir être suivies en temps réel et avec un bruit raisonnable comparativement au test du BT. Le BCA est cependant à nouveau plus sensible à l'évènement de perméabilisation.

5.2.3 Bilan comparatif

Le tableau 5.2 récapitule les caractéristiques de chacun des tests proposés pour quantifier la perméabilisation de cellules vivantes par la saponine. L'information de fuite protéique et peptidique donnée par le BCA est bien plus sensible au cours des 10 premières minutes au moins, ce qui est critique pour la détection des évènements de perméabilisation réversibles. Les caractéristiques de sensibilité des tests d'exclusion peuvent être améliorées par l'utilisation de sondes plus récentes telle que le Yo-Pro-1 (proche de l'IP), moins répandues et plus chères que les deux méthodes présentées ici. En revanche, les inconvénients d'invasivité et de nécessité de plusieurs échantillons pour la normalisation complète sont intrinsèques aux méthodes comparées au BCA. Bien souvent d'ailleurs, les tests d'exclusion -tel que celui de l'IP- sont réalisées en semi-quantitatif, sans témoin positif ; seule la variation relative à un témoin négatif est utilisée. Les comparaisons multiples sont alors compromises entre plusieurs expériences.

	Bleu de Trypan	Iodure de Propidium	BCA	Térahertz
Non invasivité	✗	✗	✓	✓
Sensibilité	✗	✗	✓	✓
Temps réel	✗	✓	✗	✓
Échantillon unique	✗	✗	✗	✓
Précision	✗	✓	✓	✓

Tableau 5.2 – Comparaison des différents tests utilisés pour quantifier la perméabilisation de cellules vivantes par la saponine.

Le BCA est un meilleure indicateur de perméabilisation que les deux tests classiques abordés

ici. L'information obtenue avec le BCA étant de même nature et excellemment corrélée avec celle du térahertz, nous pouvons nous attendre à la même sensibilité pour ce dernier. Les deux tests sont non invasifs mais le térahertz à l'avantage de donner l'information en temps réel contrairement au BCA, qui nécessite la réalisation de prélèvements puis une incubation de près d'une heure avant lecture de l'absorbance. Par ailleurs, la méthode térahertz se réalise sur échantillon unique, puisqu'elle est intrinsèquement quantitative. Le BCA au contraire nécessite la réalisation de témoins positifs et négatifs et au moins autant d'échantillons que de mesures voulues. De plus la description du test BCA signale une différence de sensibilité de la mesure entre deux grosses protéines de référence (albumine et γ-globuline), de l'ordre de 20 % de variation de sensibilité, sans que des études approfondies n'existent. Le térahertz présente donc l'avantage d'avoir une sensibilité plus stable ($[2\,;\,\infty[$ kDa pour 10 % de variation de sensibilité) et surtout de variation caractérisée, selon la taille moléculaire quasi-exclusivement. Un autre avantage du térahertz est qu'il sonde directement les cellules et non le milieu extracellulaire : ce dernier n'a donc pas besoin d'être finement contrôlé en volume pour s'assurer d'une bonne détection et répétabilité, contrairement au BCA. Ceci représente un gain de praticité mais aussi de rigueur dans la mesure car un volume extracellulaire très restreint aura une influence sur les dynamiques de diffusion entre l'intérieur et l'extérieur des cellules.

Pour conclure cette comparaison, notre méthode térahertz présente de nombreux avantages pour le suivi de perméabilisation de cellules en conditions physiologiques. Pour corroborer la démonstration de l'intérêt de cette technique, nous allons à présent l'appliquer à deux types de perméabilisation (chimique, électrique). Nous démontrerons ainsi que les avantages dégagés ci-dessus permettent d'accéder à des renseignements jusqu'ici difficilement atteignables par les autres méthodes utilisées en biologie.

5.3 Application à l'étude de la perméabilisation chimique

Le premier type de perméabilisation étudié est la perméabilisation chimique par détergent doux, que nous avons préalablement utilisée pour la démonstration de la nature du contraste en chapitre 3. Les deux détergents doux les plus rencontrés pour la perméabilisation sur cellules vivantes sont vendus sous les noms de saponine et digitonine. Nous montrons ici les différentes informations accessibles grâce à notre méthode térahertz : il ne s'agit aucunement d'une étude exhaustive mais d'un éventail des possibilités et leur premières réalisations proposées.

5.3.1 Suivi de la dynamique de perméabilisation

Le renseignement le plus directement accessible grâce à notre méthode est la dynamique de perméabilisation. Un premier exemple pour deux concentrations de saponine est donné en figure 5.9. Les deux tapis cellulaires sont issue de la même série d'ensemencement et les acquisitions sont réalisées l'une après l'autre. On y observe qu'entre 50 et 75 µg/mL, les dynamiques de perméabilisation diffèrent mais montrent la même forme générale : un plateau, suivi d'une chute linéaire (dans la précision du bruit) de Δ. Le plateau dure respectivement environ 10 et 20 minutes selon la concentration, avant une décroissance apparemment linéaire de Δ plus importante pour 75 que pour 50 µg/mL. On peut donc clairement distinguer des dynamiques différentes, même pour des concentrations proches.

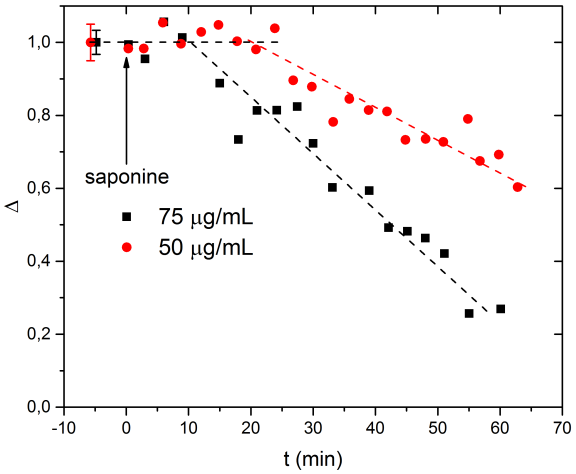


Figure 5.9 – Dynamiques de perméabilisation pour des perméabilisations par la saponine à deux concentrations différentes : 75 µg/mL (■) et 50 µg/mL (●). En pointillés, le plateau initial puis les approximations linéaires de la diminution de Δ.

Cette décroissance linéaire peut intriguer. On s'attend à une sortie brusque, puis une ralentissement progressif alors que les gradients de diffusion diminuent. Cependant, une décroissance linéaire ne veut pas dire une sortie de molécules en nombre constant mais une sortie en terme de masse constante. Nous pouvons comprendre cette forme linéaire par la sortie progressive de protéines de plus en plus grosses, représentant une forte participation massique, malgré un ralentissement global du nombre de molécules passant la membrane.

Lors de la réalisation de comparaisons de dynamiques, il est important d'effectuer les manipulations sur la même série de supports en silicium (ensemencés au même moment), dans la

mesure du possible. En effet, pour la perméabilisation à la saponine, nous avons observé une influence de l'état d'avancement de la confluence. En figure 5.10 on observe 3 courbes extrêmes relevées sur des séries d'ensemencement différentes mais pour la même concentration de saponine à 75 µg/mL. Les contrastes initiaux de ces trois acquisitions étaient toujours entre 6 et 7 %, c'est à dire difficilement distingables.

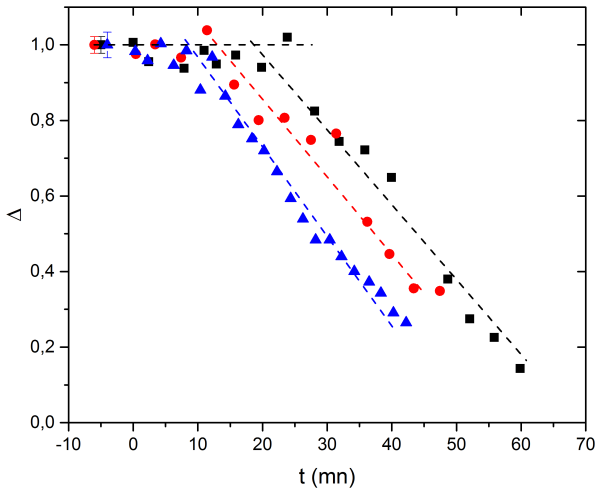


Figure 5.10 – Dynamiques extrêmes observées pour des perméabilisation à même concentration de saponine (75 µg/mL) sur des séries de tapis cellulaires issus de différents ensemencements.

Cet effet a été confirmé sur 3 plaques 24 puits ensemencées au même moment, par la réalisation de BCA au début de confluence puis 18h et 42h après. Le résultat est exposé en figure 5.11.

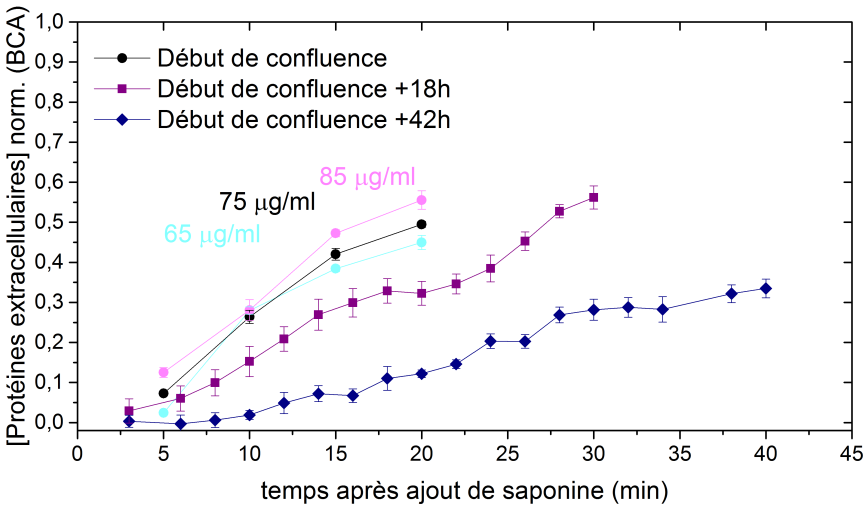


Figure 5.11 – Dynamiques de perméabilisation relevées par BCA sur trois plaques 24 puits successives, à tout début de confluence (t=0h) puis à confluence avancée (t=18h et 42h). Un test supplémentaire pour voir l'influence d'une incertitude d'environ $^{+}$/-13 % sur la concentration est proposé en parallèle de la courbe en tout début de confluence (t=0h). Toutes les autres courbes sont pour une perméabilisation à 75 μg/ml de saponine.

Le tapis cellulaire semble donc plus résistant à la perméabilisation lorsqu'il est à confluence plus avancée. Ce point est une limite importante pour la comparaison de résultats d'une série à l'autre et nous mènera par ailleurs à favoriser la caractérisation de la perméabilisation, non pas en terme de temps mais en terme de valeur de Δ. Cet effet lié à la confluence souligne l'intérêt d'un suivi en temps réel de la perméabilisation de l'échantillon, en vue d'un contrôle fin du niveau de perméabilisation à atteindre avant arrêt.

5.3.2 Comparaison d'action de deux saponosides

La saponine est un terme générique regroupant plusieurs saponosides. Les saponosides sont des sucres (osides) complexes adjoints à des groupements stéroïdiques ou terpéniques. Nous utilisons dans ce travail de thèse la saponine (les saponosides) issus de la plante Quillaja Saponaria, provenant du même stock vendu par Sigma. La digitonine est, elle, une molécule précise, cas particulier de saponoside stéroïdien, obtenu à partir d'un type de digitale. Leurs structures sont donc très proches, et leur action perméabilisante à faibles concentrations repose sur leur capacité à se lier au cholestérol présent dans les membranes, ce qui les déstabilise jusqu'à créer des pores de tailles variées. Ces deux saponosides étant les plus présents commercialement, nous avons voulu comparer leur action perméabilisante.

La digitonine est utilisée dans la gamme de 10 à 100 µg/ml pour la perméabilisation de cellules vivantes [124, 196–200]. Nous avons choisi de travailler ici à la concentration intermédiaire de 40 µg/ml.

Pour ce faire, 4 supports en silicium recouverts pour moitié d'un tapis de MDCK ont été préparés simultanément. L'un d'eux est sujet à une perméabilisation à la saponine (75 µg/ml) et les trois autres à une perméabilisation à la digitonine (40 µg/ml). La perméabilisation à la digitonine a été préalablement étudiée au microscope à contraste de phase, tout comme l'avait été celle à la saponine, pour vérifier qu'une telle concentration mène à une perméabilisation douce. Les premiers décrochements étaient effectivement observés après plus de 50 minutes.

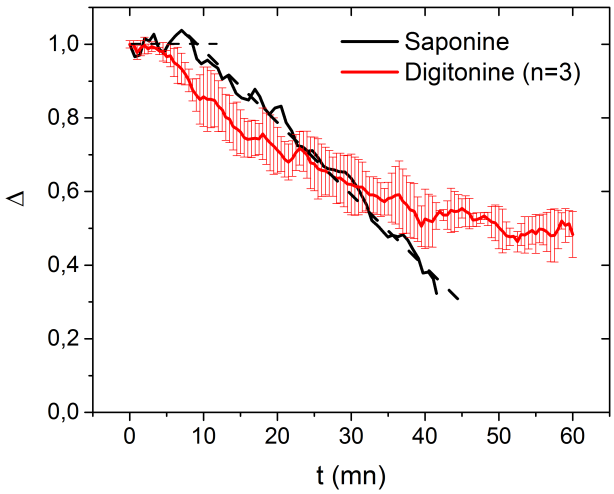


Figure 5.12 – Comparaison des dynamiques de perméabilisation à la saponine (75 µg/ml) ou à la digitonine (40 µg/ml).

Le résultat de ces 4 perméabilisations est exposé en figure 5.12. On observe pour la saponine la forme classique d'un plateau suivi d'une décroissance linéaire, comme vu précédemment. La perméabilisation à la digitonine montre une dynamique légèrement différente, bien que les ordres de grandeur soient les mêmes. Tout d'abord, le temps de plateau est plus court (environ de 5 min contre 10), avant une chute de Δ non linéaire. La sortie du contenu cellulaire est plus rapide au début de la perméabilisation, puis elle ralentit, contrairement à la saponine. Le temps avant décrochement du tapis est d'ailleurs plus long pour les cellules perméabilisées à la digitonine (ordre de l'heure), comparativement aux cellules perméabilisées à la saponine (ordre de 45 minutes ici). Cette différence de dynamique est intrigante, car leur mode d'action est supposément le même. Il pourrait s'agir d'une différence de perméabilisation des endomembranes : la digitonine serait alors meilleure pour conserver leur intégrité, leur contenu fuirait moins dans le milieu extracellulaire que dans le cas de la saponine. La saponine a été caractérisée comme beaucoup moins efficace sur les endomembranes que sur la membrane plasmique [179], cependant nous avons pu observer un début de sortie des protéines typiques de la composition du noyau lorsque la perméabilisation se prolonge, en figure 3.19b. A l'inverse, des études fines sur des cellules HeLa ont démontré que le noyau restait intègre même après une longue perméabilisation à la digitonine, pour la concentration que nous utilisons [197]. Ces observations vont dans le sens d'une telle hypothèse mais ne la valident pas. Une autre hypothèse serait que la digitonine crée des pores de grande taille mais ayant une coupure à un poids moléculaire plus bas que ceux créés par la saponine. Le ralentissement observé serait alors dû à l'absence de participation des protéines les plus massives sortant en fin de perméabilisation, que nous suspections d'être à l'origine de la forme linéaire jusqu'en fin de perméabilisation par la saponine (partie précédente).

Afin de poursuivre cette étude, il serait nécessaire de comparer le contenu protéique extracellulaire en fin de perméabilisation par ces deux molécules (par exemple par SDS-PAGE au Bleu de Coomassie, ou des méthodes électrophorétiques plus spécifiques). Une telle différence d'action pourrait être critique dans la détermination de la meilleure méthode de perméabilisation par détergent doux. Il serait également intéressant d'adjoindre à cette étude la filipine, qui n'est pas un saponoside mais qui agit également par liaison au cholestérol des membranes [124, 201].

5.3.3 Étude de réversibilité de la perméabilisation

Notre outil présente une possibilité très intéressante pour la caractérisation de la réversibilité d'un type de perméabilisation. En effet, la première caractéristique nécessaire pour une perméabilisation réversible est l'arrêt rapide de la fuite du contenu intracellulaire (réversibilité sur le court terme). La cellule pourra alors enclencher des mécanismes de réparation et de synthèse, pour éventuellement ne pas mourir (réversibilité sur le long terme). Notre méthode permet de voir en quasi temps réel si la perméabilisation est réversible à court terme (arrêt de la chute de Δ) et à long terme (remontée de Δ jusqu'à 1 après incubation).

Un premier exemple de ce type d'étude de la réversibilité à court terme a été réalisée. Pour deux tapis cellulaires, l'un est soumis à une perméabilisation à la saponine (75 µg/ml) sur toute la durée de l'acquisition, alors que l'on retire la saponine par rinçages et remise de milieu propre lorsque Δ=0,7 est dépassé sur le second. On obtient respectivement la courbe témoin et la courbe illustrant la réversibilité ou non de la perméabilisation, exposées en figure 5.13.

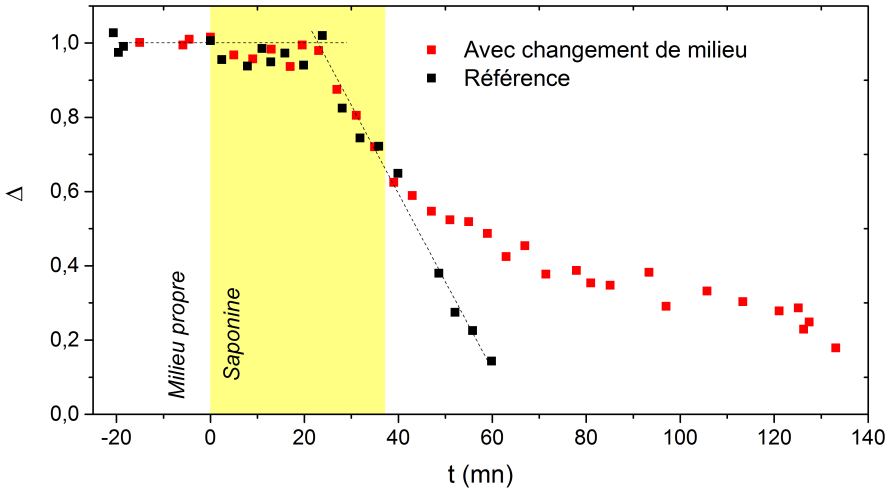


Figure 5.13 – Dynamiques de perméabilisation pour un tapis cellulaire sous action constante de la saponine (référence, ■) et d'un tapis cellulaire sous l'action de la saponine jusqu'à rinçage et remise de milieu propre après Δ=0,7 (■) .

Nous observons un net effet du retrait de la saponine sur l'évolution de Δ. Alors que sa chute est linéaire pour une perméabilisation constante, le retrait de la saponine induit un fort ralentissement de la sortie des protéines et peptides. Cependant, la sortie n'est pas complètement arrêtée et Δ fini par atteindre la même valeur qu'en cas de perméabilisation sans interruption. On peut donc dire que la perméabilisation est non réversible après un tel temps d'exposition à la saponine. Au regard de la variabilité de l'effet perméabilisant de la saponine, que nous avons mis en avant en 5.3.1, il serait plus rigoureux de caractériser la limite de réversibilité sur le critère de la valeur de Δ seuil, c'est à dire $\Delta < 0,7$ ici. On peut supposer que les membranes sont trop déstabilisées ou encore que les cellules entrent dans un processus d'apoptose (mort cellulaire programmée), malgré le retrait de la saponine. Un tel usage serait utile pour caractériser directement la réversibilité à court terme sous différentes conditions. On peut aussi penser à une étude de réversibilité à plus long terme en reprenant des mesures après des temps de remise en incubateur, mettant à profit l'origine intrinsèque et quantitative du contraste.

5.4 Application à l'étude de l'électroporation

L'électroporation, également appelée électroperméabilisation, est une des méthodes de perméabilisation de cellules vivantes évoquées en 5.1.2. Elle se définit par une déstabilisation de la membrane plasmique suite à l'exposition des cellules à un champs électrique impulsionnel. Cette déstabilisation induit la perméabilisation de la membrane plasmique. Nous avons cherché ici à caractériser la dynamique de cette perméabilisation selon les champs appliqués, en collaboration avec l'équipe du Dr. Lluis Mir, du laboratoire CNRS UMR8203 à l'Institut Gustave Roussy.

5.4.1 Problématique et adaptations au montage térahertz

Le phénomène d'électroporation est actuellement compris comme suit [182]. Lors de l'application d'une ou plusieurs impulsions électriques (de la nanoseconde à la milliseconde), un champs électrique important se crée de part et d'autre des membranes. Cette différence de potentiel induite se superpose au potentiel transmembranaire de repos des cellules. Il est communément admis que lorsque le nouveau potentiel transmembranaire dépasse un certain seuil (qui dépend du type cellulaire), l'électroperméabilisation est induite. Sous certaines conditions et après arrêt du champs, la membrane pourra se réparer. Cependant, à l'heure actuelle, les détails sur les évènements pendant l'application des impulsions et sur les dynamiques de réparation de la membrane post-impulsions ne sont pas bien connus [183]. Une des hypothèses proposées, mais pas démontrée, est la création de pores au cours de l'application du champs, se refermant juste après la fin des impulsions mais modifiant durablement les propriétés des têtes hydrophiles des phospholipides constituant la membrane, rendant celle-ci encore perméable jusqu'à dissémination suffisante des phospholipides modifiés (diffusion et internalisation dans les endomembranes) ou la mort cellulaire. On ne devrait alors, sous cette hypothèse encore non démontrée, ne parler d'électroporation que pendant l'application des impulsions électriques, puis utiliser le terme d'électroperméabilisation. Nous garderons ici le terme au sens large de toute perméabilisation pendant et après les impulsions.

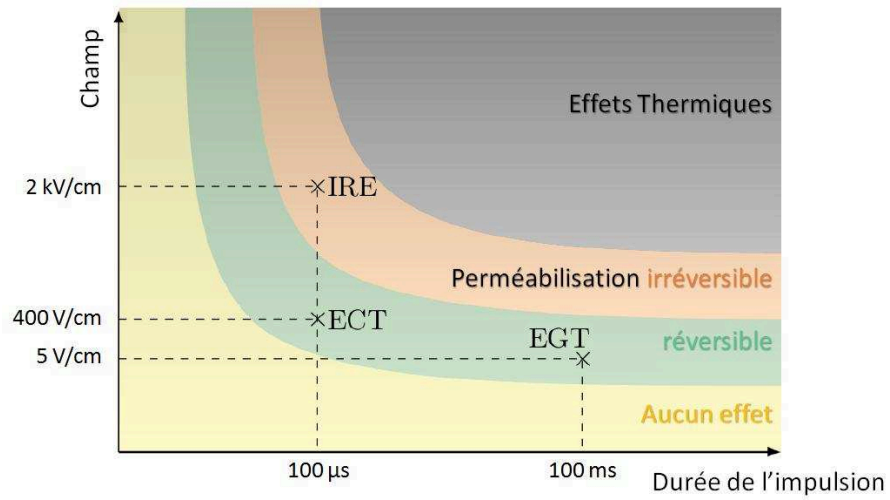


Figure 5.14 – Différents régimes d'électroporation, fonction du champs électrique et de la durée de la/les impulsion(s), sans échelle. Issu et adapté de [202].

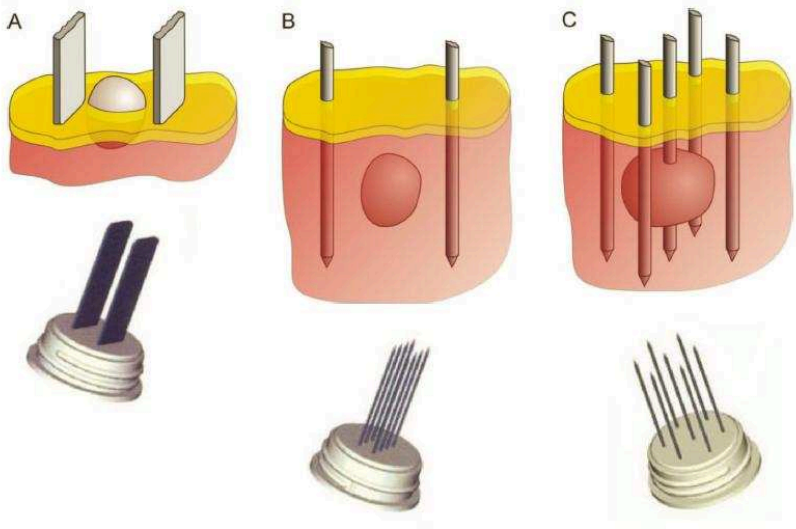


Figure 5.15 – Différents types d'électrodes utilisées et schéma de leur application *in vivo* autour de la zone tumorale. Ces électrodes sont invasives (B, C) ou non (A). Images tirées de [206].

Plusieurs régimes d'électroporation existent, selon la durée et l'intensité des impulsions appliquées. Si le champs électrique ou la durée sont trop faibles, aucun effet n'apparait. Au dessus d'un certain seuil, une perméabilisation effective de la membrane cellulaire apparait, d'abord réversible puis irréversible si l'on continue à augmenter le champs et/ou la durée des impulsions. Les ordres de grandeur de ces différents régimes sont indiqués en figure 5.14. Les seuils exacts entre différents régimes dépendent beaucoup du type cellulaire, de la densité, des conditions d'environnement, des paramètres des impulsions électriques (amplitude du champs, durée de l'impulsion, nombre d'impulsions et fréquence de répétition), etc...

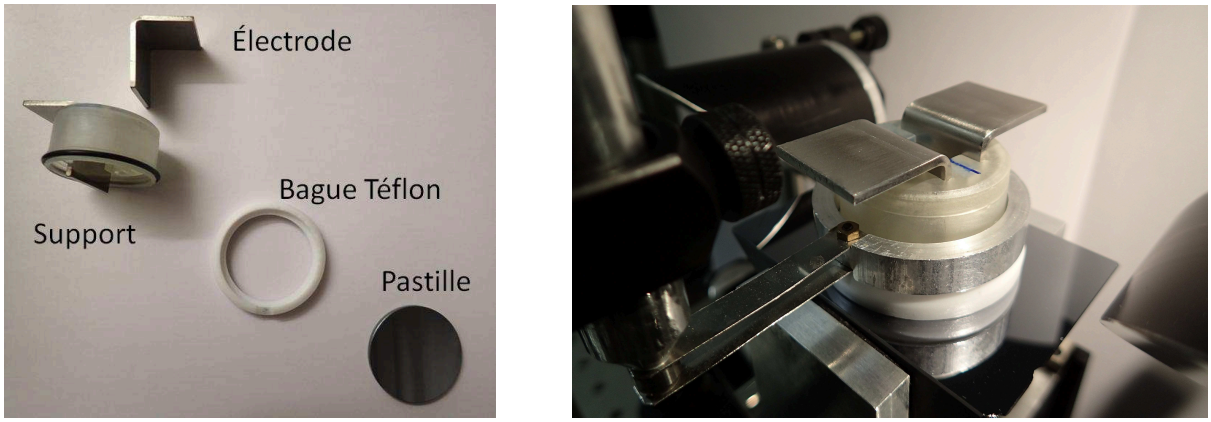
Différentes applications ont émergé, selon le régime d'électroporation utilisé. Pour des régimes de perméabilisation réversible, l'entrée de médicaments en électrochimiothérapie (ECT) ou d'ADN en électrotransfert de gènes (EGT) peut être réalisée. L'entrée de médicaments dans la cellules est la seule de ces applications validée et utilisée en routine clinique : on injecte une molécule cytotoxique non-perméante par intraveineuse, puis on électropore la zone tumorale à traiter : cela provoquera l'entrée des molécules dans les cellules électroporées (et elles seules), conduisant à leur mort. L'électrochimiothérapie ainsi réalisée a l'avantage d'être locale et de diminuer les effets secondaires comparativement aux chimiothérapies classiques. L'inconvénient principal est l'accessibilité aux électrodes de la zone à traiter ; différents types d'électrodes sont en développement pour permettre un accès à des zones plus profondes que les régions cutanées et sous-cutanées traitées actuellement. Sont exposés en figure 5.15 quelques exemples d'électrodes utilisées ; pour notre part, l'accessibilité in vitro des cellules en tapis cellulaire nous permet d'utiliser des électrodes simples non invasives (figure 5.15, électrodes en A). L'électrotransfert de gène est une méthode courante in vitro pour la transfection de souches [203], mais reste à l'étape pré-clinique pour son application en thérapie génique [122, 204, 205].

L'électroporation en régime de perméabilisation irréversible (IRE) est une technique d'ablation tumorale [207–209], encore au stade pré-clinique. Elle est avantageuse grâce à spécificité et son innocuité aux tissus environnants comparativement aux techniques d'ablations courantes

par rayons. D'autres applications existent en agroalimentaire, par exemple la stérilisation de nourriture ou d'eau par application de champs en régime de perméabilisation irréversible [210].

5.4.2 Conditions d'acquisition

Les expériences réalisées ont été conçues en conjointement avec l'équipe de Lluis Mir. Nous nous intéressons ici aux dynamiques post-impulsions. Comme nous l'avons vu (5.3.3) le térahertz peut fournir une information quantitative sur la dynamique de la perméabilisation et donc sur les caractéristiques de réversibilité de celle-ci.



(a) (b)

Figure 5.16 – Adaptations sur la bague de téflon pour l'insertion d'un support d'électrodes. Les photos montrent l'ensemble démonté (a) et en situation (b) où ne manquent plus que les câbles électriques pour relier les électrodes au Cliniporator.

Pour étudier ces dynamiques, nous avons tiré partie de l'espace libre au dessus du support de culture, comme nous pouvons voir en figure 5.16. Pour réaliser l'électroporation de cellules adhérentes, deux électrodes en contact avec la surface de croissance, parallèles et écartées de 8 mm dans notre cas, sont nécessaires. Elles sont reliées à du matériel clinique spécifique (machine Cliniporator). Cette machine dispose d'une capacité suffisante pour délivrer durant les impulsions plusieurs ampères et des tensions de plusieurs centaines de volts entre les électrodes. Un support pour les électrodes a donc été ajouté sur la bague de téflon tenant la pastille en silicium, et les câbles reliant électrodes au Cliniporator passent librement au dessus du montage. Les cellules sont toujours observables via la caméra au dessus du montage.

Les conditions d'électroporation choisies étaient classiques : 8 impulsions successives, de 100 µs chacune, espacées de 100 µs. Seul le champs appliqué entre les deux électrodes varie, de 500 V/cm à 1250 V/cm selon l'expérience. Des tests préalables en microscopie de fluorescence, réalisés à l'IGR, avaient permis de vérifier que les conditions de champs envisagées étaient suffisantes pour créer une perméabilisation de nos cellules MDCK. Ces tests préalables étaient en fait un test d'exclusion d'une molécule aux propriétés proches du iodure de propidium : un agent intercalant (Yo-Pro®-1), présent pendant et après électroporation dans le milieu extracellulaire et ne fluoresçant significativement qu'en cas d'entrée dans les cellules. Bien que non quantitatifs ni dynamiques, ils ont permis de vérifier la perméabilisation effective du tapis de cellules entre 500 et 1250 V/cm sans aucun détachement du tapis cellulaire observé, pour une observation faite 30

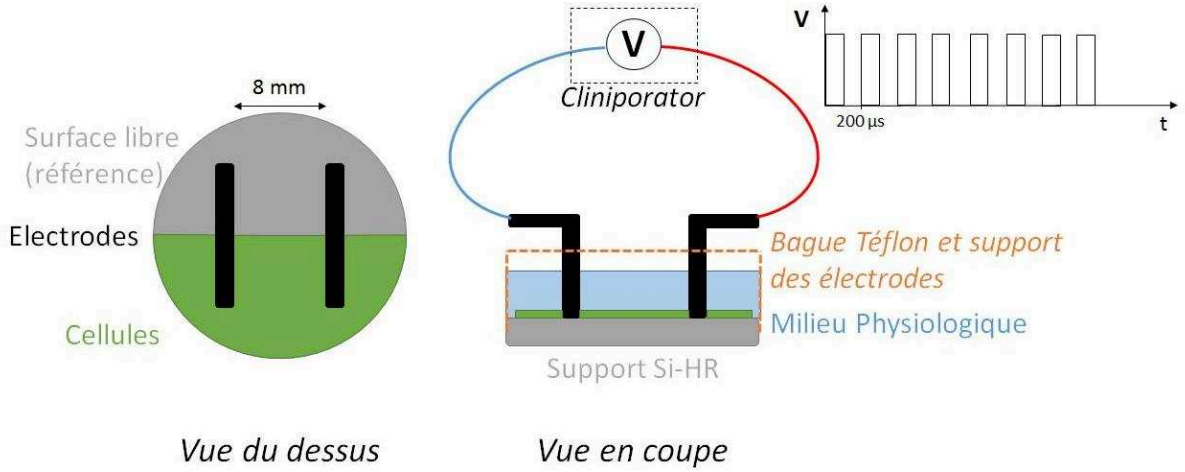


Figure 5.17 – Schématisation du positionnement des cellules et des électrodes sur le montage térahertz.

minutes après pulse.

La disposition schématique des cellules et des électrodes sur le support en silicium est représentée en figure 5.17. Le milieu extracellulaire est composé d'HBSS tamponné à l'HEPES, mais sans ions Ca^{2+}. Le volume extracellulaire a été ajusté à 2 ml (contre les 3 usuels) pour permettre au Cliniporator de pouvoir délivrer les tensions demandées ; le milieu étant conducteur, diminuer le volume a permis de diminuer l'intensité nécessaire à l'imposition d'un même voltage, en restant ainsi dans la gamme d'intensité délivrable. L'acquisition de Δ_{rel} sur le montage ATR est toujours réalisée par mesure du maximum d'amplitude entre les zones avec et sans cellules (référence), et est ici d'une durée approximative de 30 secondes. La valeur référence de Δ_{rel} était relevée en au moins 6 acquisitions préalables à l'envoi des impulsions, ceci afin de normaliser la mesure et d'obtenir Δ. Les mesures étaient réalisées sur 45 à 60 minutes après envoi des impulsions, l'intégrité du tapis étant toujours vérifiée pendant et en fin d'acquisition. Les mesures n'ont pas pu être réalisées sur un même ensemble de tapis cellulaires ensemencés au même moment, en raison du nombre réduit de supports en silicium disponibles, relativement aux nombre important de mesures effectuées.

5.4.3 Résultats et premières interprétations

Les acquisitions pour différents champs montraient toutes une forme générale proche (dans le bruit) d'une décroissance exponentielle après pulse. On peut extraire de chacune des acquisitions la constante de temps τ et la constante d'amplitude C pour un fit de la forme $\Delta = 1 + C(\exp^{(-t/\tau)} - 1)$. C est l'écart entre $\Delta_{t=0} = 1$ et la valeur plateau atteinte après un long temps, τ caractérise le temps de décroissance pour lequel 63% de cet écart est parcouru après électroporation. Les données expérimentales typiques d'une acquisition après des impulsions à 1250 V/cm sont montrées en figure 5.18, avec toutes les courbes d'ajustement sur les données collectées de 500 à 1250 V/cm.

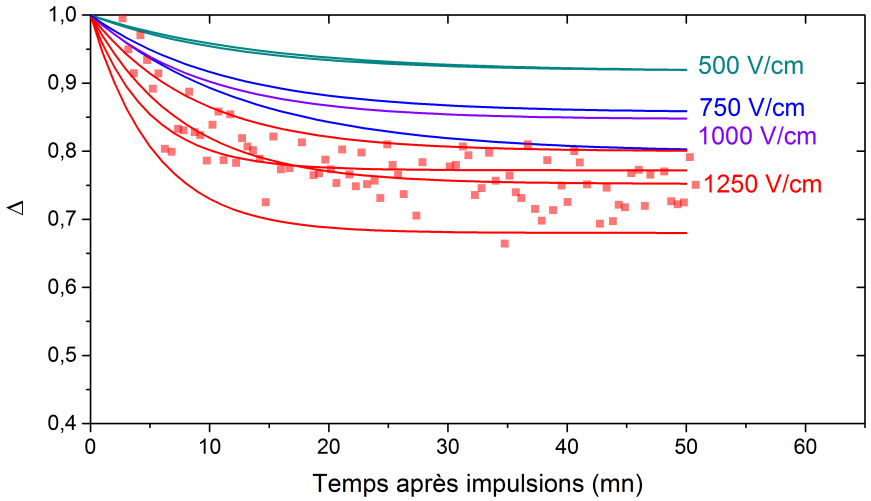
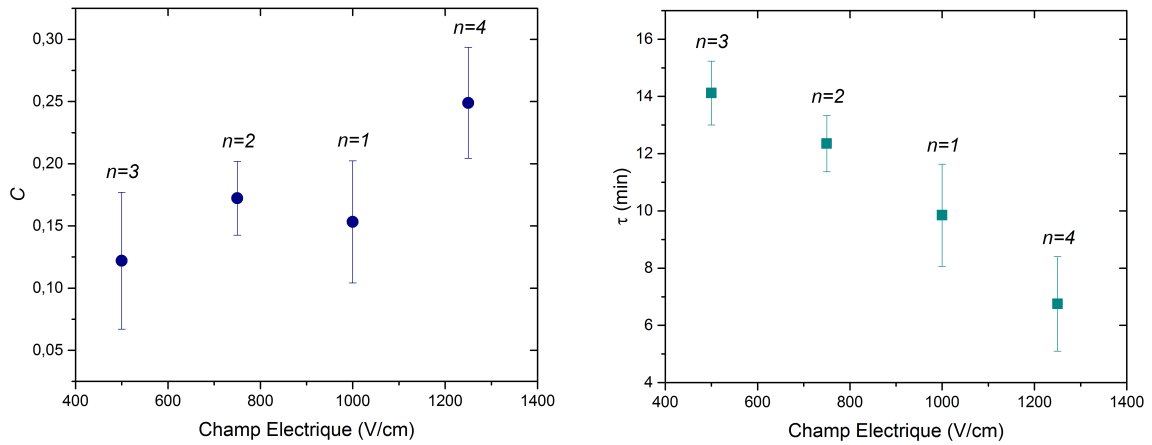


Figure 5.18 – Courbes des ajustements pour toutes les mesures de Δ, réalisées après impulsions de 500 à 1250 V/cm. Un exemple de données expérimentales pour une acquisition après 1250 V/cm est également représenté (carrés rouges).

Les valeurs de C et τ extraites pour tous les champs testés sont montrées en figure 5.19, avec n le nombre d'acquisitions indépendantes pour chaque condition. L'amplitude donne la perte finale de contenu cellulaire, alors que τ en indique la vitesse. La forme générale d'une décroissance exponentielle est cohérente avec l'hypothèse de la diffusion des phospholipides de la membrane perturbés après la poration ; diffusion rendant l'évènement de passage de la membrane de plus en plus improbable. Le bruit lors de l'acquisition limite l'application d'un modèle plus fin. Par ailleurs, des écarts sont notés entre des acquisitions à même champs électrique mais réalisées à des jours différents (au total, les données sont étalées sur 5 séries différentes d'ensemencement des support en silicium) . On peut comprendre une telle variabilité comme l'influence de l'état d'avancement de la confluence, influence déjà notée pour l'effet de la saponine. L'idéal, pour une étude plus fine des caractéristiques, serait la réalisation en une seule journée (donc pour une seule série d'ensemencement) des mesures pour différents champs.

On observe en figure 5.19 un effet dose du paramètre de champs électrique quand à la perméabilisation cellulaire. En effet, plus le champs augmente, plus la perméabilisation sera importante et rapide, puisqu'avec le champs C augmente et τ diminue. La forme de plateau indique que la perméabilisation réalisée est globalement réversible, c'est à dire que les fuites deviennent négligeables et la cellule est capable de conserver son intégrité -au moins à court terme. Notons que C est compris entre 0,1 et 0,3. Nous pouvons en déduire la gamme de tailles moléculaires minimale concernée par la fuite vers le milieu extracellulaire. En effet, dans l'approximation extrême que tous les éléments de petites tailles sortent, il n'est pas possible d'obtenir une perte de contraste de 0,1 ou 0,25 si l'on atteint pas respectivement 25 kDa et 39 kDa [2]. Ce seuil bas est une sous-estimation car tous les petits éléments ne sortiront pas. Le calcul est basé sur la participation relative des peptides et protéines au contraste selon leur taille, pour un tissu de rein de souris, en figure 5.20.

2. Équivalent à des diamètres d'environ 3,9 et 4,5 nm respectivement [160].



(a) (b)

Figure 5.19 – Paramètres des ajustements pour une approximation d'exponentielle décroissante sur les variations de Δ, pour des champs électriques différents.

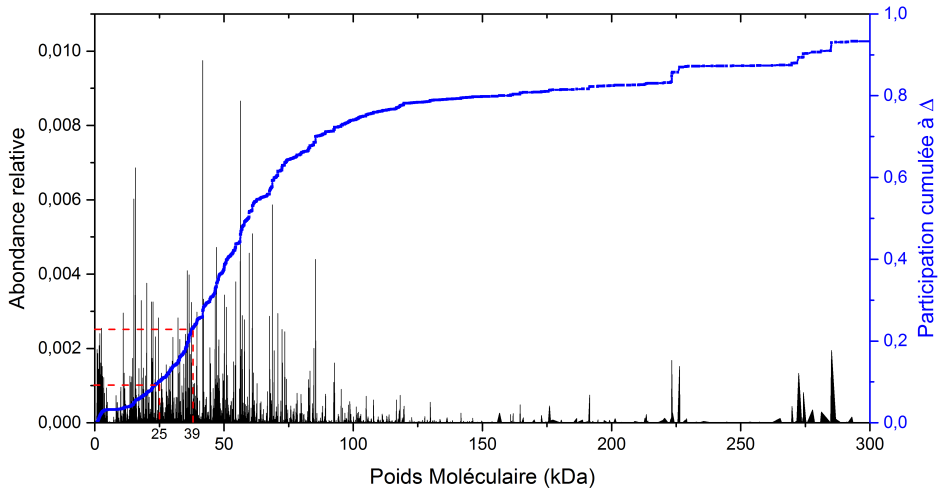


Figure 5.20 – Abondance relative des peptides ou protéines (barres noires) et participation relative cumulée au contraste Δ pour les poids moléculaires croissants (courbe bleue). Les données d'abondance relatives sont issues de tissus de rein de souris, obtenues depuis la base de données MaxQB [211]. On observe que les très faibles poids moléculaires, malgré une abondance relative importante, ne participent que peu au contraste térahertz Δ. Celui-ci atteint 10% de sa valeur totale pour la participation cumulée de toutes les molécules jusqu'à 25 kDa.

Le bruit est encore trop important pour pouvoir dégager des dynamiques plus fines qu'un ajustement exponentiel, mais cette quantification de l'évolution du contenu cellulaire sur toute la gamme de taille de protéines est inédit. La microscopie de fluorescence ne permet qu'un suivi semi-quantitatif (ligne de base et variation relative sans normalisation) sur le tapis cellulaire, et limité à quelques poids moléculaires. Des acquisitions comparatives sont actuellement réalisées pour pouvoir mettre en regard les deux types d'informations et pouvoir pousser plus loin l'analyse de l'effet dose observé.

5.5 Conclusion

Au fil de ce chapitre, nous avons pu ébaucher les possibilités d'utilisation du contraste térahertz Δ pour quantifier la perméabilisation sur cellules vivantes, et étudier ses avantages devant deux méthodes très classiques. L'originalité de notre méthode est la quantification totale du contenu cellulaire, de façon non invasive. C'est intrinsèquement un renseignement différent de celui donné par les tests d'exclusion classiques, invasifs et centrés sur une taille donnée. Il existe la possibilité d'ajouter à ces tests d'exclusion des fluorophores de taille contrôlée mais on ne peut tout au plus suivre les dynamiques que pour trois ou quatre tailles. L'avantage majeur supplémentaire de Δ est d'être intrinsèquement quantitatif, entre un 0 et un 100 % connus dès le début, sans avoir besoin d'autres échantillons témoins. En suivant les évolutions de Δ, nous avons pu évoquer les possibilités de suivis de dynamiques, d'études d'effet dose, de comparaison d'action de différentes molécules ou méthodes et de caractérisation de la réversibilité.

Tout ceci a été rendu possible par les travaux des chapitres précédents. La caractérisation préalable de l'outil térahertz et les premiers travaux applicatifs de ce chapitre ont permis la caractérisation indispensable des limites de notre méthode. Tout d'abord, revers de la médaille de la sensibilité à tout le contenu, les fuites de petits peptides et acides aminés seront difficilement distingables. En effet, notre quantification étant en terme de masse (g/L) normalisée, il faut un grand nombre d'éléments de petite taille pour égaler la participation de quelques éléments de grande taille. En ce sens, Δ sera complémentaire des tests classiques utilisant des petites molécules sondes ($<$1 kDa) et la sensibilité que nous avons caractérisée ne vaudra pas pour les perméabilisations spécifiques aux petites tailles (typiquement inférieure à 10 ou 20 kDa). Enfin, rappelons que des variations de hauteur trop importantes du tapis cellulaire auront un impact sur le signal. Cet impact pourra être corrigé car nous en connaissons les caractéristiques, mais cela nécessite de caractériser les hauteurs avant et après perturbation. Il faut cependant pour cela des variations supérieures à plusieurs microns (c'est à dire près de 50 % de variation de hauteur), jusque là observées uniquement lors de forts chocs hypo/hypertoniques.

L'application de ces possibilités à l'étude de perméabilisations chimiques et à l'électroporation ont ici été amorcées, et seul le temps et les supports en silicium ont manqués. L'étude de l'électroporation a mis à profit l'espace disponible au dessus de l'échantillon ; les possibilités sont ouvertes à bien d'autres ajouts, par exemple une enceinte pour le contrôle des conditions de température, humidité, saturation en différents gaz ou encore l'installation de sondes spécifiques (échanges ioniques, impédance du tapis cellulaire...). Malgré les limites évoquées, nous voyons la possibilité d'extraire d'autres informations, prometteuses et riches en renseignements pour les biologistes, que ce soit sur les mécanismes intrinsèques encore incomplètement élucidés ou pour l'utilisation dans des travaux sur cellules vivantes nécessitant une perméabilisation réversible.

Conclusion générale

Le chapitre 1 nous a permis de voir l'émergence des applications du domaine térahertz, de l'astronomie jusqu'aux récentes incursions en biologie. Les études au cours des dix dernières années démontrant que le rayonnement térahertz est sensible à l'état et la quantité de biomolécules, micro-organismes et cellules présents dans l'eau ont particulièrement motivé notre travail d'imagerie térahertz de cellules vivantes. Nous avons ainsi pu expliciter la logique structant notre investigation : puisque le térahertz est sensible à l'état, la nature et la quantité de biomolécules en solution, on peut espérer obtenir des images térahertz caractérisant des asymétries de répartition de ces biomolécules, sources de contraste. Une telle asymétrie perturbée pourrait donner accès à des dynamiques d'échanges, dans notre cas entre intérieur et extérieur de cellules vivantes.

Le chapitre 2 a consisté en l'étude théorique des meilleures caractéristiques pour un montage d'imagerie en réflexion dans l'objectif étudier des échantillons biologiques, après avoir écarté l'imagerie de transmission et de champ proche. Le régime ATR, c'est à dire en réflexion interne totale atténuée, s'est avéré idéal pour sonder de tels échantillons. Nous avons ensuite détaillé notre propre montage d'imagerie ATR, et fourni ses caractéristiques théoriques attendues de sensibilité pour l'imagerie de cellules baignant dans leur milieu physiologique.

En chapitre 3, la réalisation expérimentale d'images térahertz a d'abord démontré l'existence d'un contraste. Les cellules reflètent plus le rayonnement térahertz que le milieu dans lequel elles baignent. Pour comprendre quelle était la source de ce contraste, nous avons expérimentalement perturbé et quantifié les répartitions de différentes biomolécules entre intérieur et extérieur des cellules. Nous avons ainsi pu démontrer que ce sont les peptides et les protéines, très présents dans les cellules mais quasiment absents du milieu extracellulaire, qui sont la source majeure de contraste.

Grâce au chapitre 4, nous avons pu caractériser au mieux ce contraste en proposant un modèle volumique conjointement à des acquisitions sur des acides aminés, des peptides et des protéines. Ainsi, le contraste a été quantitativement lié à leur concentration et à leur taille moléculaire. Ce chapitre a également montré la possibilité d'accéder à des renseignements spectroscopiques sur les protéines et leur couche d'hydratation (ou eau de solvatation). Ceci a été rendu possible par le lien établi entre nos acquisitions rapides et les propriétés spectroscopiques effectives de solutions de protéines, sur lesquelles notre modèle volumique a été appliqué.

En mettant à profit la bonne compréhension que nous avions désormais du contraste d'imagerie, le chapitre 5 fut l'aboutissement de notre démarche : nous y avons proposé un outil pour la biologie basé sur notre montage d'imagerie térahertz. Le contraste térahertz peut en effet être utilisé pour suivre la perméabilisation de cellules, en donnant accès aux dynamiques de sortie de tous les peptides et protéines des cellules. Cet outil est le seul capable actuellement de réaliser une

quantification de la perméabilisation en conditions physiologiques, non invasives, sur échantillon unique et sans aucune préparation nécessaire. Son application à l'étude de perméabilisations chimiques et électriques a permis d'esquisser son fort potentiel, ses avantages et ses limites.

Le développement de cet outil n'est pas encore achevé. Puisque notre travail exploratoire mené a montré que l'amplitude du signal était suffisante pour la réalisation d'images avec un bon contraste, que par ailleurs l'étude théorique a permis de proposer des angles de réflexion plus avantageux encore que celui utilisé, la suite du développement mènera certainement en la réalisation d'un nouveau montage ATR, simplifié et basé sur une source continue. Les aménagements possibles autour de l'échantillon grâce à la géométrie en réflexion autorisent un très grande nombre et type d'études biologiques différentes. Le travail pour améliorer la compréhension des mécanismes de l'électroporation se poursuit, mais les autres idées proposées au fil du chapitre 5 montrent un plus large champ des possible. Le choix reste ouvert à l'imagination et aux opportunités de collaboration, indispensables pour un tel travail pluridisciplinaire, que le contexte du laboratoire a permis de faire germer.

A

Annexes

A.1 Figures complémentaires

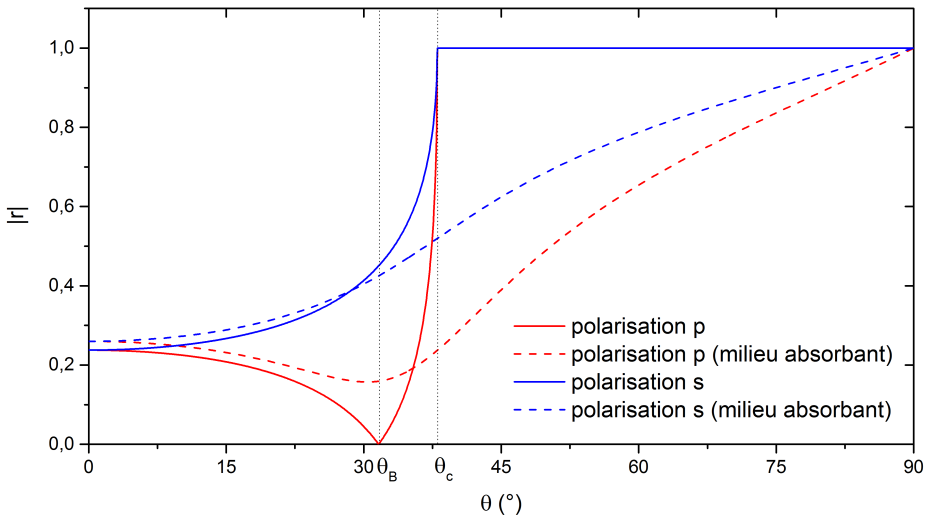
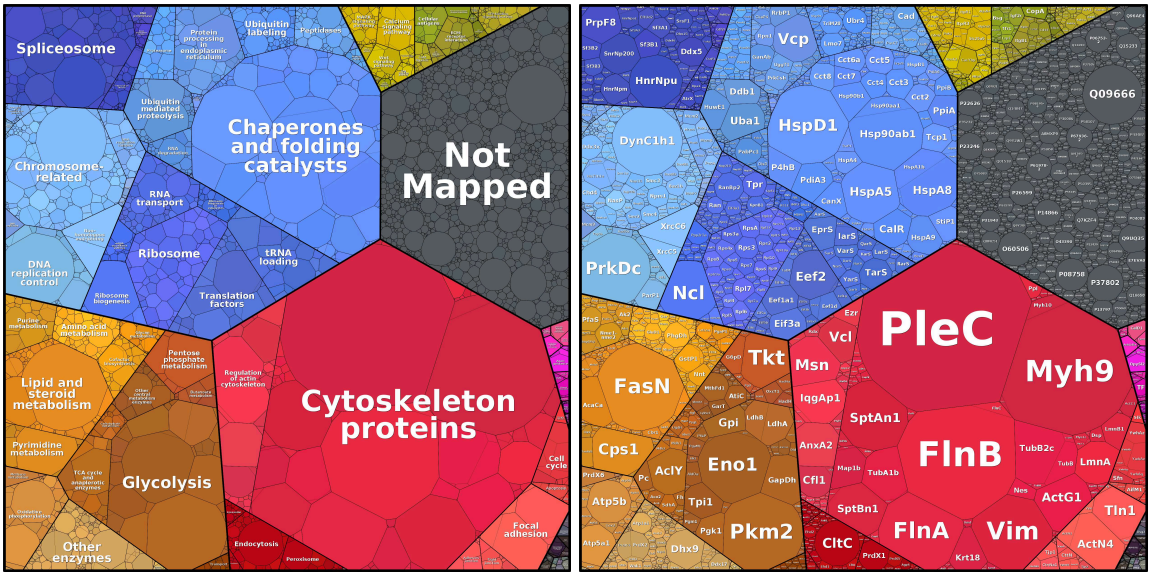


Figure A.1 – Réflectivité pour les polarisations s (courbes rouge) et p (courbes bleues) pour des conditions absorbantes (pointillés) ou non (traits pleins). Sont annotés l'angle critique θ_c et l'angle de Brewster θ_B. On observe plus particulièrement le passage par 0 dans le cas sans absorption pour la polarisation p, mais pas pour la polarisation s.



(a) (b)

Figure A.2 – Exemples de données protéomiques d'abondances relatives, disponibles sur le site proteomaps.net, pour les cellules épithéliales HeLa.

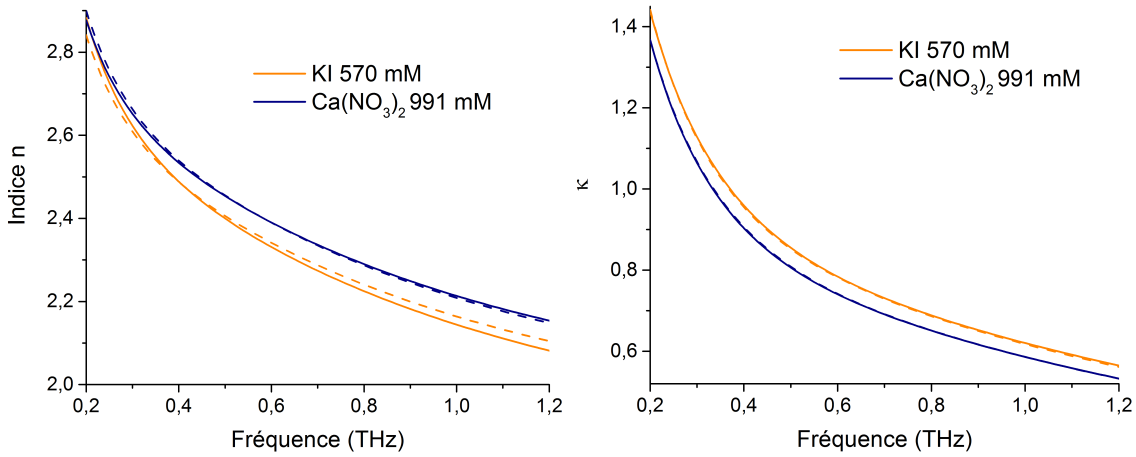


Figure A.3 – Exemple de valeurs spectroscopiques références pour des solutions ioniques de KI ou $Ca(NO_{3)2}$ à concentrations respectives de 570 mM et 991 mM, et illustration de l'écart aux valeurs homothétiques par représentation de ces dernières en pointillés pour chaque solution. Ces deux solutions ioniques ont été choisies pour leur adéquation correcte à l'hypothèse d'homothétie aux valeurs de l'eau, mais aussi pour la non proportionalité entre les deux couples (ε_n,ε_κ), afin de pouvoir résoudre correctement le système à 4 équations et 4 inconnues caractérisant les coefficients de la matrice de transfert T_{exp}.

A.2 Protocole de passage des MDCK

Matériel

16 mL minimum de Milieu de culture complet : DMEM + 10 % SVF + 1 % pénicilline-streptomycine

1 Flasque T-25 de cellules à confluence

Flasque(s) neuve(s) à ensemencer

1 tube Falcon (15 ou 50 mL)

5 mL environ de PBS ou HBSS

3 mL Trypsine-EDTA (1X)

Mode opératoire

Vider le milieu de la flasque à confluence.

Rincer à plusieurs reprises le tapis de cellules au PBS ou HBSS.

Placer 3 mL de trypsine dans la boite.

Fermer et placer à l'incubateur pendant 6 à 8 minutes.

Vérifier le début de décrochement du tapis à l'œil. Agiter pour tout décrocher. Taper la boite sur la paillasse si nécessaire.

Ajouter 3 mL de milieu aux 3 mL de trypsine, puis agiter.

Placer rapidement les 6 mL dans le falcon.

Centrifuger à 200 rcf pendant 4 minutes. Penser à équilibrer !

Récupérer le culot après avoir lentement vidé le surnageant.

Ajouter 3 mL de milieu. Resuspendre les cellules. La concentration à cette étape est de l'ordre de 1.5 million de cellules par mL.

Prélever le volume voulu (cf table ci dessous) et le placer dans la nouvelle T-25.

Ajouter 10 mL de milieu. Ferme le bouchon (attention à ne pas complètement fermer si c'est un bouchon sans filtre).

Placer à l'incubateur.

Concentration initiale (cellules par cm^2)	Volume équivalent lors du passage (vers T-25)	Confluence
600	10 µL	1 semaine
$1{,}8.10^4$	300 µL	3 jours
6.10^4	1 mL	1 jour

Tableau A.1 – Concentrations cellulaires d'ensemencement, volumes équivalents à prélever dans les 3 mL de solution après centrifugation et suspension pour une T-25, et temps de confluence associés.

Remarques

Les étapes de trypsination et d'agitation par pipettage sont critiques pour obtenir une solution finale où les MDCK sont relativement indépendantes (et non par « paquets »), et donc pour un ensemencement homogène.

Une variabilité des temps de confluence est observée selon le coating des flasques (ou du support d'ensemencement).

Une variabilité du nombre de cellules par flaque est observée entre le début de confluence et une confluence avancée (1 à 2 millions de cellules par mL final). Ne pas travailler sur flasque à confluence avancée.

Ne pas utiliser les cellules pour des expériences avant le deuxième passage ou au-delà de 15 passages.

A.3 Protocole d'ensemencement des MDCK pour acquisitions THz

Matériel

Idem que pour le protocole de passage de MDCK

Pastilles Si-HR (prévoir 1 mL de milieu supplémentaire par pastille minimum)

Éthanol 70 %, Éthanol 96 %

Mode opératoire

Nettoyer préalablement les pastilles (bains dans l'eau, éventuellement plasma cleaner OU nettoyage complet par alternance de bains de 10 minutes entre eau MilliQ et 0,1% Tween-20)

Avant ensemencement, nettoyage à l'éthanol 70 % puis 96 % sous le PSM. Ne pas négliger les bordures de pastilles.

Placer les pastilles dans des boites de pétri stériles.

Faire un passage habituel.

A la fin du passage, récupérer les cellules en suspension et les diluer comme indiqué dans le tableau ci dessous selon la date de confluence désirée.

Placer 1 mL de la suspension finale sur chaque pastille, en étalant sur toute sa surface.

Placer à l'incubateur.

Changer le milieu toutes les 24h.

Environ 2 jours après ensemencement, retirer les cellules sur la moitié de la pastille avec un grattoir à cellules. Entretenir la découpe aux changements de milieu suivants.

Concentration des 1 mL déposés sur la pastille	Confluence
$C_i/10$	6 jours
$C_i/8$	5 jours
$C_i/5$	3 jours

Tableau A.2 – Dilution de la solution post-passage (initialement à $C_i \approx 1.5 \times 10^6$ cellules/mL) et confluence associée, pour un ensemencement de chaque pastille avec 1 mL.

Remarques

Le retrait des cellules pour obtenir une surface de référence doit se faire bien avant confluence, et être entretenu, pour éviter de découper le jour même le tapis et de l'abimer sur une zone large (décollements/arrachements).

Les boites doivent être à l'horizontale dans l'incubateur pour un ensemencement le plus homogène possible.

Veiller à l'évaporation complète de l'éthanol avant ensemencement (même sous pastille).

Une **très** importante variabilité des temps de confluence est observée. Prévoir les expériences à +/-1 jour. Vérifier avant les expériences elles-même que le contraste en térahertz est entre 6 et 8 %.

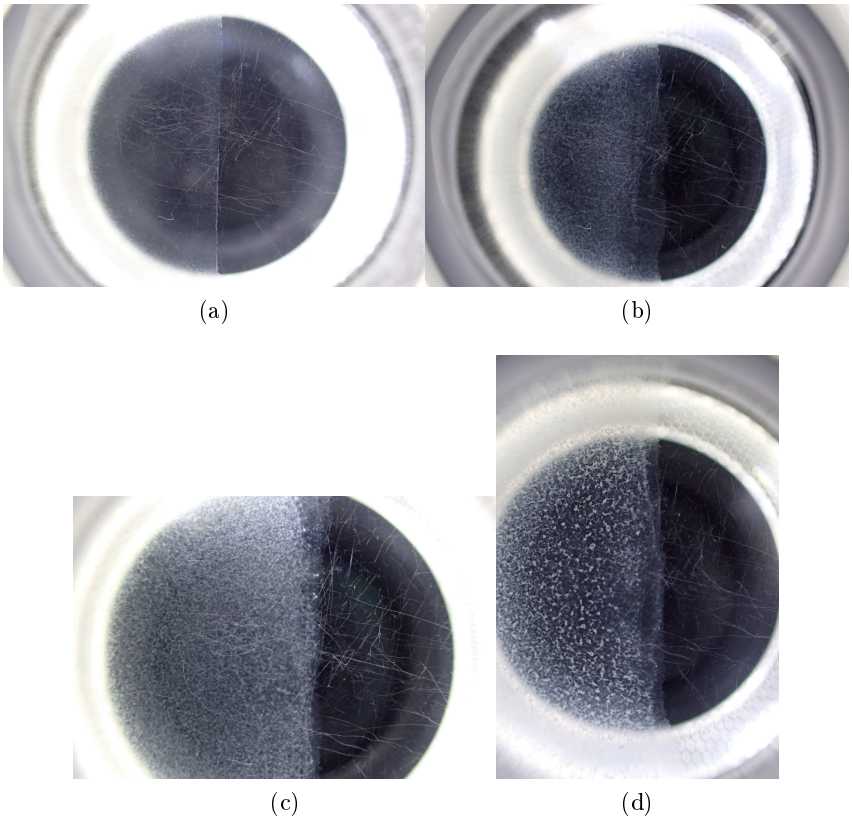


Figure A.4 – Exemples de pastilles vues du dessus (appareil personnel en mode macro) dans un état non confluent (a et b), confluent (c) et très/trop confluent (d). La surface blanche est la partie avec tapis cellulaire, la noire est libre. Sur la photographie b (et plus légèrement en d) on observe une bordure de cellules découpée mais non entretenue avec une recolonisation de cellules (voile blanc plus pâle).

Les concentrations initiales ne sont pas les mêmes que dans le cas de surface classiques (pétri, flasque) pour une même date de confluence, de par la surface très lisse, plus difficile à coloniser, de la pastille.

A.4 Protocole des marquages pour la microscopie confocale

Afin de réaliser les images au confocal, deux marqueurs différents ont été utilisés. Le premier teinte indifféremment tout l'intérieur de la cellule : la Calcéine-AM (Sigma). Le second pénètre dans toute la cellule sauf dans son noyau : le CellTracker™ Red CMTPX (ThermoFisher).

Matériel

Aliquot de solution stock de Calcéine-AM (Sigma) à 4 mM dans du DMSO

Aliquot de solution stock de CellTracker™ Red CMTPX (ThermoFisher) à 2 mM dans du DMSO

Solution de HBSS tamponné à 10 mM d'HEPES (HBSS+HEPES)

Boites de pétri (35 mm ici) à confluence

Mode opératoire

Préparer 2 mL de solution du fluorochrome à 1 µM dans du HBSS+HEPES par échantillon

Il s'agit simplement de rincer les échantillon au HBSS ou PBS, puis de mettre 2 mL de la solution dans chacun

Incubation : 15 minutes (Calcéine-AM) ou 45 minutes (Red CMTPX)

A nouveau, rincer le tapis abondement et remettre 2 mL d'HBSS+HEPES par boite.

Imagerie

Paramètres communs : objectif 63x1.4 avec de l'huile d'immersion type F

Paramètres d'excitation/émission : 495/505-565 nm pour la Calcéine-AM, 585/610-680 nm pour le Red CMTPX

A.5 Protocole du BCA

Le protocole suivant est celui utilisé pour un BCA au cours d'une perméabilisation par de la saponine à 75 µg/mL, sur une plaque 24 puits. D'autres BCA ont été réalisés au cours de la thèse, notamment sur un nombre plus restreint de puits, mais le principe est identique. Les quantités peuvent être rapportés au nombre de puit pour d'autres adaptations. Il est possible de réaliser ce protocole en quantifiant la concentration protéique réelle par comparaison à une courbe étalon tirée d'une solution d'albumine de concentration connue (fournie dans le kit utilisé). Cependant, grâce à la linéarité du test sur la plage d'utilisation, il suffit de normaliser l'absorbance relativement au maximum et au minimum pour connaitre la variation de la concentration protéique extracellulaire entre 0 % et 100 % de sortie du à la perméabilisation.

Utilisation de la plaque :

1 puit témoin négatif

3 puits témoins positifs

20 puits dévolus à la mesure au cours de la perméabilisation

Matériel

kit Pierce™ BCA Protein Assay (ThermoFisher Scientific)

Réactif A 25 mL, Réactif B 1 mL

Plaque 24 puit à confluence

Plaque 96 puits neuve, fond plat optique

HBSS ou PBS

HBSS tamponné à 10 mM d'HEPES (HBSS+HEPES)

Solution stock saponine (15 g/L)

Mode opératoire

Préparer 5 mL de solution de saponine à 150 µg/mL dans du HBSS+HEPES => solution Sapo+HBSS+HEPES

Préparer 26 mL de réactif (ratio A :B 50 :1)

Rincer tous les puits au PBS ou HBSS puis placer 150 µL de HBSS+HEPES par puit, dans tous les puits.

Ajouter 150 µL de la solution Sapo+HBSS+HEPES dans les puits de témoin positif.

Ajouter 150 µL de HBSS+HEPES dans le puit témoin négatif

Le plus rapidement possible : déclencher le chronomètre et injecter 150 µL de Sapo+HBSS+HEPES dans les 20 puits restants

Successivement, et pour chaque puit :

Prélever l'intégralité du liquide dans le puit (300 µL), en vérifiant toujours l'intégrité du tapis cellulaire (pas de décollement visible) et le placer dans un puit de la plaque 96 puits.

(Rincer doucement le tapis à plusieurs reprises et replacer du milieu de culture si un test de viabilité cellulaire doit être réalisé plus tard.)

Puis, après la fin des prélèvements chronométrés :

Prélever les 300 µL du témoin négatif.

Vérifier au microscope l'intégrité de chaque puit à la fin des prélèvements. Rejeter tous les puits présentant un décollement.

Attendre que l'agitation du milieu dans les puits de témoin positif suffise à décoller tout le tapis. Ne pas hésiter à gratter le fond pour récupérer intégralement le contenu.

Prélever l'intégralité des puits témoins positifs (tout le tapis doit avoir été décollé) et les placer dans des puits de la plaque 96 puits.

(Remettre la plaque 24 puits à l'incubateur si un test de viabilité cellulaire doit être réalisé plus tard.)

Prélever 300 µL de la solution Sapo+HBSS+HEPES et la placer dans un puit de la plaque 96 puits.

Une fois tous les prélèvements réalisés, sur la plaque 96 puits :

Pour chacun des prélèvements de 300 µL : prélever 3 fois 20 µL après agitation et les placer dans 3 puits.

A l'aide d'une pipette multicanaux, ajouter 200 µL de réactif à chacun des puits contenant 20 µL. Pour une homogénéité des résultats, cette étape doit être faite sans interruption ou attente intermédiaire.

Incuber 30 à 45 minutes à 37°C.

Après incubation :

Mettre la plaque à conditions ambiante une dizaine de minutes

Lire l'absorbance de chaque puit à 565 nm et exporter en fichier excel.

Analyse

Pour chaque puit, on lit l'absorbance A. On obtient la moyenne d'absorbance pour les puits de témoins positifs A_+, de contrôle $A_{\text{contrôle}}$ et les puits contenant uniquement le milieu Sapo+HBSS+HEPES A_-.

On calcule pour chaque ensemble de 3 puits liés au même prélèvement à un t donné la concentration protéique extracellulaire normalisée :

$$C_{norm.} = \frac{A_t - A_-}{A_+ - A_-}$$

Cette quantité est donnée en % de la concentration protéique maximale, c'est à dire si la cellule fuit complètement. Le 0% correspond à une concentration protéique extracellulaire nulle, le 100% correspond à la concentration protéique extracellulaire obtenue quand les cellules ont complètement perdu leur contenu.

Le puit contrôle peut aussi être utilisé comme référence pour le 0 %, c'est alors le pourcentage de sortie *provoquée par la perméabilisation* (c'est à dire excluant les sorties spontanées) qui est donnée. Dans les faits, les valeurs de A_-et $A_{contrôle}$ sont très proches. On utilise la première pour la comparaison du BCA aux variations de contraste térahertz, et la seconde pour les tests de quantification de la perméabilisation (comparativement aux tests d'exclusion).

Remarques

Le retrait de tout le milieu avant de placer les 150 µL sur la plaque 24 puits est critique pour la bonne réussite des dosages.

Lorsque la perméabilisation progresse, le tapis devient de plus en plus fragile. Les rinçages doivent être fait sans injecter directement sur le tapis, et par ajouts/retraits lents.

Les volumes utilisés dans les puits de la plaque 24 puits sont faibles pour permettre des concentrations dans la gamme de détection du BCA, avec un bruit raisonnable.

Les prélèvements de 300 µL ne sont utilisés qu'en partie en 1 BCA. On peut augmenter le nombre de puits (plus que le triplicat proposé) ou congeler la plaque et la conserver pour un test ultérieur (refaire le test en cas de doute, réaliser un dosage plus fin avec d'autres ratio réactif/prélèvement, l'utiliser pour une autre méthode de quantification...).

A.6 Protocole du test d'exclusion du Bleu de Trypan

Pour un ensemble de 12 puits sur une plaque 24 puits, à raison de 300 µL à 0,2% de bleu de trypan et 75 µg/mL de saponine final par puit.

Matériel

Bleu de trypan 0,4 % stérile filtré (Sigma)
PBS ou HBSS
20 mL d'HBSS tamponnée à 10 mM d'HEPES (HBSS+HEPES)
Solution stock de saponine (15 g/L)
Microscope à contraste de phase (objectif x20)

Mode opératoire

Préparer 5 mL de solution de saponine à 150 µg/mL dans le HBSS+HEPES (Sapo+HBSS+HEPES).

Rincer tous les puits au PBS ou HBSS.

Placer 150 µL de la solution à 0,4% de trypan dans chaque puit.

Ajouter 150 µL de HBSS+HEPES dans le puit du témoin négatif.

Le plus rapidement possible : déclencher le chronomètre et introduire 150 µL de la solution Sapo+HBSS+HEPES dans chacun des puits restants.

Aux temps voulus, retirer des puits leur milieu extracellulaire et RINCER, à plusieurs reprises. Placer 1 mL de solution d'HBSS+HEPES.

Le dernier puit rincé doit être celui du témoin négatif (non perméabilisé).

Une fois tous les puits rincés aux temps voulus :

Photographier 3 zones différentes de chaque puit, en privilégiant un éclairage fort et en contraste de phase pour une meilleure distinction des cellules entre elles.

Remarques

Lorsque la perméabilisation progresse, le tapis devient de plus en plus fragile. Les rinçages doivent être fait sans injecter directement sur le tapis, et par ajouts/retraits lents. Même à 0,2 % le bleu de trypan colore très fortement et est long à retirer pour que l'observation au microscope soit aisée.

A.7 Protocole du test de viabilité cellulaire (MTS)

Ce protocole est réalisé 20 h après les mesures de perméabilisation par le BCA au cours d'une perméabilisation à la saponine. Au cours du BCA, sachant que l'on voulait réaliser un test de viabilité, les puits étaient rincés après prélèvement, et du milieu complet était remis dans chaque puit. La plaque était replacée à l'incubateur à la fin des prélèvements.

Utilisation de la plaque :

1 puit témoin positif (équivalent du puit de témoin négatif du BCA) : le tapis cellulaire n'a pas été perméabilisé

3 puits témoins négatifs (qui étaient les puits de témoin positif du BCA) : le tapis cellulaire a été entièrement retiré et les puits bien rincés

X puits dévolus à la mesure de la viabilité pour un arrêt de perméabilisation à différents temps (qui sont les temps auquel le prélèvement pour le BCA a été réalisé)

Matériel

kit AQueous One Solution Cell Proliferation Assay (MTS) (Promega)
10 µL de solution CellTiter par puit
Milieu complet classique
une plaque 96 puit à fond optique

Mode opératoire

Vider les puits et remettre 1 mL de milieu dans chacun.

Placer directement 10 µL de solution dans chaque puit.

Faire agiter la plaque quelques instants.

Remettre à l'incubateur pour une incubation de 1h à 1h30 (la solution doit prendre une teinte brune sans être complètement opaque dans les puits de référence).

Agiter les 1 mL à la pipette puis pour chacun des puits de la plaque 24 puits, prélever 3x100 µL pour les placer dans 3 puits de la plaque 96 puits.

Remettre à l'incubateur la plaque 24 puits : en cas d'absorbance trop faible, on peut ainsi refaire les prélèvements pour une incubation plus longue.

Lire l'absorbance de chaque puit à 490 nm et exporter en fichier excel.

Analyse

La moyenne des puits témoins positifs (tapis non perméabilisé) A_+ et négatif (pas de cellules) A_- permettent de normaliser les réplicats des autres puits pour obtenir la viabilité cellulaire V telle que :

$$V = \frac{A - A_-}{A_+ - A_-}$$

Remarques

Le CellTiter AQueous solution est à conserver au congélateur et bien à l'abri de la lumière. Aliquots dans des tubes opaques.

A.8 Protocole du test d'exclusion de l'Iodure de Propidium

Pour un ensemble de 18 puits sur une plaque 24 puits, à raison de 400 µL à 20 µg/mL d'iodure de propidium et 75 µg/mL de saponine final par puit. 3 puits pour témoins négatifs (pas de perméabilisation), 9 pour la mesure de l'entrée d'IP au cours de la perméabilisation, et 6 pour témoins positifs (perméabilisés complètement au Triton-X100)

Matériel

Solution stock d'iodure de propidium (1 g/L, Sigma)
PBS ou HBSS
30 mL d'HBSS tamponnée à 10 mM d'HEPES (HBSS+HEPES)
Solution stock de saponine (15 g/L)
Triton X-100

Mode opératoire

2 à 3 heures avant :
Préparer 5 mL de Triton-X100 à 0,4% dans le HBSS+HEPES (Triton+HBSS+HEPES).
Préparer 10 mL de saponine à 150 µg/mL dans le HBSS+HEPES (Sapo+HBSS+HEPES).
Préparer 10 mL de d'iodure de propidium à 40 µg/mL dans le HBSS+HEPES (IP+HBSS+HEPES)
Rincer les puits témoins positifs au HBSS ou HEPES.
Placer 200 µL de HBSS+HEPES et 200 µL de Triton+HBSS+HEPES dans ces puits.
Remettre à l'incubateur.
Juste avant la perméabilisation :
Rincer tous les autres puits au PBS ou HBSS.
Placer 200 µL de IP+HBSS+HEPES dans tous ces puits.
Placer 200 µL de HBSS+HEPES dans les puits témoins négatifs.
Au lecteur de plaque :
Placer les 10 mL de Sapo+HBSS+HEPES dans le système d'injection après rinçage à l'eau distillée. Faire ensuite un rinçage avec cette solution.

Acquisitions successives de chaque puit, répétées sur 1h sans pause. Paramètres filtres Ex/Em = 595/620 nm.

Placer la plaque, sélectionner l'injection telle que 200 µL de Sapo+HBSS+HEPES soit mis dans les puits de mesure (tous sauf témoins).

Agiter les puits des témoins positif et faire immédiatement une mesure.
Acquérir une dizaine de minutes avant injection pour vérifier la stabilité.
Lancer l'injection et acquérir sur 1h les puits témoins positifs et les puits de mesure.
Agiter les puits des témoins positifs et faire immédiatement une mesure.

Analyse

Pour chaque puit on mesure le signal de fluorescence F. Les puits témoins négatifs moyennés donnent F_-, ceux dans lesquels la perméabilisation se déroule F_t et les témoins positifs F_+. Le taux T d'entrée de propidium dans la cellule est donné par :

$$T = \frac{F_t - F_-}{F_+ - F_-}$$

Remarques

Les témoins positifs ne peuvent être acquis pendant le suivi de perméabilisation car 1) ils ajoutent un grand nombre de puits donc rallongeraient l'acquisition et 2) ils nécessitent une attention particulière à une homogénéisation juste avant mesure. Ils sont pris avant et après.

La dose de Triton-X100 et le temps d'incubation (2 à 3h) ont été optimisés pour que la quantité de Triton-X100 ne modifie pas les valeurs de fluorescence d'une solution d'IP et que le signal obtenu dans les puits témoins positifs se soit stabilisé (suivi des puits sur 4h montrant une augmentation de la fluorescence puis un plateau après plus d'une heure / une heure et demi).

Un programme Matlab a été écrit pour récupérer les données obtenues sur le lecteur de plaque Chameleon.

Références bibliographiques

[1] A. I. McIntosh, B. Yang, S. M. Goldup, M. Watkinson, and R. S. Donnan. Terahertz spectroscopy : a powerful new tool for the chemical sciences ? *Chemicals Society Reviews*, 41(6) :2072–2082, 2012.

[2] G. E. Walrafen. Raman spectrum of water : transverse and longitudinal acoustic modes below approx. 300 cm-1 and optic modes above approx. 300 cm-1. *Journal of Physical Chemistry*, 94(6) :2237–2239, 1990.

[3] R. J. Falconer and A. G. Markelz. Terahertz Spectroscopic Analysis of Peptides and Proteins. *Journal of Infrared, Millimeter, and Terahertz Waves*, 33(10) :973–988, 2012.

[4] P. H. Siegel. THz Instruments for Space. *IEEE Transactions on Antennas and Propagation*, 55(11) :2957–2965, 2007.

[5] L'origine de l'Univers, http ://www.cnrs.fr/mysteres-univers/spip.php ?article95, 2016.

[6] E. Bründermann, H.-W. Hübers, and M. F. Kimmitt. *Terahertz techniques.* Number 151 in Springer series in optical sciences. Springer, Berlin, 2012. OCLC : 837064763.

[7] D. W. Faries, K. A. Gehring, P. L. Richards, and Y. R. Shen. Tunable far-infrared radiation generated from the difference frequency between two ruby lasers. *Physical Review*, 180(2) :363, 1969.

[8] J. R. Morris and Y. R. Shen. Far-Infrared generation by picosecond pulses in electro-optical materials. *Optics Communications*, 3(2) :81–84, 1971.

[9] K. H. Yang. Generation of Far-Infrared Radiation by Picosecond Light Pulses in LiNbO3. *Applied Physics Letters*, 19(9) :320, 1971.

[10] T. Yajima and N. Takeuchi. Far-infrared Differenc-frequency generation by picosecond laser pulses. *Japanes journal of applied physics*, 9(11) :1361–1371, 1970.

[11] G. Mourou. Picosecond microwave pulses generated with a subpicosecond laser-driven semiconductor switch. *Applied Physics Letters*, 39(4) :295, 1981.

[12] P. R. Smith, D. H. Auston, and M. C. Nuss. Subpicosecond photoconducting dipole antennas. *Quantum Electronics, IEEE Journal of*, 24(2) :255–260, 1988.

[13] D. H. Auston, K. P. Cheung, and P. R. Smith. Picosecond photoconducting Hertzian dipoles. *Applied Physics Letters*, 45(3) :284, 1984.

[14] C. Fattinger and D. Grischkowsky. Terahertz beams. *Applied Physics Letters*, 54(6) :490, 1989.

[15] D. Grischkowsky, S. Keiding, M. van Exter, and C. Fattinger. Far-infrared time-domain spectroscopy with terahertz beams of dielectrics and semiconductors. *Journal of the Optical Society of America B*, 1990.

[16] N. Katzenellenbogen and D. Grischkowsky. Efficient generation of 380 fs pulses of THz radiation by ultrafast laser pulse excitation of a biased metal-semiconductor interface. *Applied Physics Letters*, 58(3) :222, 1991.

[17] B. B. Hu, X.-C. Zhang, D. H. Auston, and P. R. Smith. Free-space radiation from electro-optic crystals. *Applied Physics Letters*, 56(6) :506, 1990.

[18] P. Shumyatsky and R. R. Alfano. Terahertz sources. *Journal of biomedical optics*, 16(3) :033001–033001, 2011.

[19] P. Mounaix. Spectro-imagerie térahertz Voir autrement. *Techniques de l'ingénieur CND : méthodes globales et volumiques*, base documentaire : TIB585DUO.(ref. article : re143), 2016. fre.

[20] M. van Exter and D. Grischkowsky. Carrier dynamics of electrons and holes in moderately doped silicon. *Phys. Rev. B*, 41(17) :12140–12149, 1990.

[21] N. Katzenellenbogen and D. Grischkowsky. Electrical characterization to 4 THz of N- and P-type GaAs using THz time-domain spectroscopy. *Applied Physics Letters*, 61(7) :840, 1992.

[22] R. Ulbricht, E. Hendry, J. Shan, T. F. Heinz, and M. Bonn. Carrier dynamics in semiconductors studied with time-resolved terahertz spectroscopy. *Reviews of Modern Physics*, 83(2) :543–586, 2011.

[23] A. G. Davies, A. D. Burnett, W. Fan, E. H. Linfield, and J. E. Cunningham. Terahertz spectroscopy of explosives and drugs. *Materials today*, 11(3) :18–26, 2008.

[24] Y.-C. Shen. Terahertz pulsed spectroscopy and imaging for pharmaceutical applications : A review. *International Journal of Pharmaceutics*, 417(1-2) :48–60, 2011.

[25] K. Kawase, Y. Ogawa, Y. Watanabe, and H. Inoue. Non-destructive terahertz imaging of illicit drugs using spectral fingerprints. *Optics express*, 11(20) :2549–2554, 2003.

[26] M. Kato, S. R. Tripathi, K. Murate, K. Imayama, and K. Kawase. Non-destructive drug inspection in covering materials using a terahertz spectral imaging system with injection-seeded terahertz parametric generation and detection. *Optics Express*, 24(6) :6425, 2016.

[27] L. Ho, Y. Cuppok, S. Muschert, K. C. Gordon, M. Pepper, Y. Shen, F. Siepmann, J. Siepmann, P. F. Taday, and T. Rades. Effects of film coating thickness and drug layer uniformity on in vitro drug release from sustained-release coated pellets : A case study using terahertz pulsed imaging. *International Journal of Pharmaceutics*, 382(1-2) :151–159, 2009.

[28] K. Fukunaga, I. Hosako, Y. Kohdzuma, T. Koezuka, M.-J. Kim, T. Ikari, and X. Du. Terahertz analysis of an East Asian historical mural painting. *Journal of the European Optical Society-Rapid publications*, 5, 2010.

[29] K. Fukunaga and I. Hosako. Innovative non-invasive analysis techniques for cultural heritage using terahertz technology. *Comptes Rendus Physique*, 11(7-8) :519–526, 2010.

[30] C. Seco Martorell, V. López-Domínguez, G. Arauz-Garofalo, A. Redo-Sanchez, J. Palacios, and J. Tejada. Goya's artwork imaging with Terahertz waves. *Optics Express*, 21(15) :17800, 2013.

[31] S. Wietzke, C. Jansen, C. Jördens, N. Krumbholz, N. Vieweg, M. Scheller, M. K. Shakfa, D. Romeike, T. Hochrein, M. Mikulics, and M. Koch. Industrial applications of THz systems. volume 7385, pages 738506–738506–13, 2009.

[32] P. Parasoglou, E. P. J. Parrott, J. A. Zeitler, J. Rasburn, H. Powell, L. F. Gladden, and M. L. Johns. Quantitative water content measurements in food wafers using terahertz radiation. *Terahertz Sci Technol*, 3(4) :176–82, 2010.

[33] L. Xie, Y. Yao, and Y. Ying. The Application of Terahertz Spectroscopy to Protein Detection : A Review. *Applied Spectroscopy Reviews*, 49(6) :448–461, 2014.

[34] P. Petrone and V. S. Pande. Can Conformational Change Be Described by Only a Few Normal Modes ? *Biophysical Journal*, 90(5) :1583–1593, 2006.

[35] F. Tama and Y.-H. Sanejouand. Conformational change of proteins arising from normal mode calculations. *Protein Engineering*, 14(1) :1–6, 2001.

[36] A. G. Markelz, A. Roitberg, and E. J. Heilweil. Pulsed terahertz spectroscopy of DNA, bovine serum albumin and collagen between 0.1 and 2.0 THz. *Chemical Physics Letters*, 320(1-2) :42–48, 2000.

[37] A. G. Markelz. Terahertz Dielectric Sensitivity to Biomolecular Structure and Function. *IEEE Journal of Selected Topics in Quantum Electronics*, 14(1) :180–190, 2008.

[38] X. Yang, X. Zhao, K. Yang, Y. Liu, Y. Liu, W. Fu, and Y. Luo. Biomedical Applications of Terahertz Spectroscopy and Imaging. *Trends in Biotechnology*, 2016.

[39] A. Markelz, S. Whitmire, J. Hillebrecht, and R. Birge. THz time domain spectroscopy of biomolecular conformational modes. *Physics in medicine and biology*, 47(21) :3797, 2002.

[40] R. Balu, H. Zhang, E. Zukowski, J.-Y. Chen, A.G. Markelz, and S.K. Gregurick. Terahertz Spectroscopy of Bacteriorhodopsin and Rhodopsin : Similarities and Differences. *Biophysical Journal*, 94(8) :3217–3226, 2008.

[41] J.-Y. Chen, J. R. Knab, J. Cerne, and A. G. Markelz. Large oxidation dependence observed in terahertz dielectric response for cytochrome c. *Physical Review E*, 72(4), 2005.

[42] M. Tang, Q. Huang, D. Wei, G. Zhao, T. Chang, K. Kou, M. Wang, C. Du, W.-L. Fu, and H.-L. Cui. Terahertz spectroscopy of oligonucleotides in aqueous solutions. *Journal of Biomedical Optics*, 20(9) :095009, 2015.

[43] J.-Y. Chen, J. R. Knab, S. Ye, Y. He, and A. G. Markelz. Terahertz dielectric assay of solution phase protein binding. *Applied Physics Letters*, 90(24) :243901, 2007.

[44] A. G. Markelz, J. R. Knab, J. Y. Chen, and Y. He. Protein dynamical transition in terahertz dielectric response. *Chemical Physics Letters*, 442(4-6) :413–417, 2007.

[45] U. Heugen, G. Schwaab, E. Bründermann, M. Heyden, X. Yu, D. M. Leitner, and M. Havenith. Solute-induced retardation of water dynamics probed directly by terahertz spectroscopy. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 103(33) :12301–12306, 2006.

[46] J. Xu, K. W. Plaxco, and S. J. Allen. Collective Dynamics of Lysozyme in Water : Terahertz Absorption Spectroscopy and Comparison with Theory. *The Journal of Physical Chemistry B*, 110(47) :24255–24259, 2006.

[47] 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*, 15(5) :1175–1181, 2006.

[48] K. Shiraga, T. Suzuki, N. Kondo, J. De Baerdemaeker, and Y. Ogawa. Quantitative characterization of hydration state and destructuring effect of monosaccharides and disaccharides on water hydrogen bond network. *Carbohydrate Research*, 406 :46–54, 2015.

[49] K. Shiraga, Y. Ogawa, N. Kondo, A. Irisawa, and M. Imamura. Evaluation of the hydration state of saccharides using terahertz time-domain attenuated total reflection spectroscopy. *Food Chemistry*, 140(1-2) :315–320, September 2013.

[50] D.M. Mittleman, M. Gupta, R. Neelamani, R.G. Baraniuk, J.V. Rudd, and M. Koch. Recent advances in terahertz imaging. *Applied Physics B*, 68(6) :1085–1094, 1999.

[51] A. J. Fitzgerald, E. Berry, N. N. Zinov'ev, S. Homer-Vanniasinkam, R. E. Miles, J. M. Chamberlain, and M. A. Smith. Catalogue of human tissue optical properties at terahertz frequencies. *Journal of Biological Physics*, 29(2-3) :123–128, 2003.

[52] S. W. Smye, J. M. Chamberlain, A. J. Fitzgerald, and E. Berry. The interaction between terahertz radiation and biological tissue. *Physics in medicine and biology*, 46(9) :R101, 2001.

[53] E. Pickwell, B. E. Cole, A. J. Fitzgerald, M. Pepper, and V. P. Wallace. In vivo study of human skin using pulsed terahertz radiation. *Physics in Medicine and Biology*, 49(9) :1595, 2004.

[54] R. M. Woodward, V. P. Wallace, D. D. Arnone, E. H. Linfield, and M. Pepper. Terahertz pulsed imaging of skin cancer in the time and frequency domain. *Journal of Biological Physics*, 29(2-3) :257–259, 2003.

[55] S. Sy, S. Huang, Y.-X. J. Wang, J. Yu, A. T. Ahuja, Y.-T. Zhang, and E. Pickwell-MacPherson. Terahertz spectroscopy of liver cirrhosis : investigating the origin of contrast. *Physics in Medicine and Biology*, 55(24) :7587–7596, 2010.

[56] C. Yu, S. Fan, Y. Sun, and E. Pickwell-MacPherson. The potential of terahertz imaging for cancer diagnosis : A review of investigations to date. *Quantitative imaging in medicine and surgery*, 2(1) :33, 2012.

[57] Y. B. Ji, C. H. Park, H. Kim, S.-H. Kim, G. M. Lee, S. K. Noh, T.-I. Jeon, J.-H. Son, Y.-M. Huh, S. Haam, S. J. Oh, S. K. Lee, and J.-S. Suh. Feasibility of terahertz reflectometry for discrimination of human early gastric cancers. *Biomedical Optics Express*, 6(4) :1398, 2015.

[58] H. Hoshina, A. Hayashi, N. Miyoshi, F. Miyamaru, and C. Otani. Terahertz pulsed imaging of frozen biological tissues. *Applied Physics Letters*, 94(12) :123901, 2009.

[59] F. Wahaia, G. Valusis, L. M. Bernardo, A. Almeida, J. A. Moreira, P. C. Lopes, J. Macutkevic, I. Kasalynas, D. Seliuta, R. Adomavicius, R. Henrique, and M. Lopes. Detection of colon cancer by terahertz techniques. *Journal of Molecular Structure*, 1006(1-3) :77–82, 2011.

[60] T. C. Bowman, M. El-Shenawee, and L. K. Campbell. Terahertz Imaging of Excised Breast Tumor Tissue on Paraffin Sections. *IEEE Transactions on Antennas and Propagation*, 63(5) :2088–2097, 2015.

[61] S. J. Oh, J. Kang, I. Maeng, J.-S. Suh, Y.-M. Huh, S. Haam, and J.-H. Son. Nanoparticle-enabled terahertz imaging for cancer diagnosis. *Optics express*, 17(5) :3469–3475, 2009.

[62] Y. B. Ji, S.-H. Kim, K. Jeong, Y. Choi, J.-H. Son, D. W. Park, S. K. Noh, T.-I. Jeon, Y.-M. Huh, S. Haam, S. K. Lee, S. J. Oh, and J.-S. Suh. Terahertz spectroscopic imaging and properties of gastrointestinal tract in a rat model. *Biomedical Optics Express*, 5(12) :4162, 2014.

[63] Benjamin St. Peter, S. Yngvesson, P. Siqueira, P. Kelly, A. Khan, S. Glick, and A. Karellas. Development and Testing of a Single Frequency Terahertz Imaging System for Breast Cancer Detection. *IEEE Journal of Biomedical and Health Informatics*, 17(4) :785–797, 2013.

[64] H. Chen, T.-H. Chen, T.-F. Tseng, J.-T. Lu, C.-C. Kuo, S.-C. Fu, W.-J. Lee, Y.-F. Tsai, Y.-Y. Huang, E.Y. Chuang, Y.-J. Hwang, and C.-K. Sun. High-sensitivity in vivo THz transmission imaging of early human breast cancer in a subcutaneous xenograft mouse model. *Opt. Express*, 19(22) :21552–21562, 2011.

[65] P. Tewari, C. P. Kealey, D. B. Bennett, N. Bajwa, K. S. Barnett, R. S. Singh, M. O. Culjat, A. Stojadinovic, W. S. Grundfest, and Z. D. Taylor. In vivo terahertz imaging of rat skin burns. *Journal of biomedical optics*, 17(4) :0405031–0405033, 2012.

[66] J. Y. Suen, P. Tewari, Z. D. Taylor, W. S. Grundfest, H. Lee, E. R. Brown, M. O. Culjat, and R. S. Singh. Towards medical terahertz sensing of skin hydration. *Stud. Health Technol. Inform*, 142 :364–368, 2009.

[67] K. W. Kim, K.-S. Kim, H. Kim, S. H. Lee, J.-H. Park, J.-H. Han, S.-H. Seok, J. Park, Y. S. Choi, Y. I. Kim, and others. Terahertz dynamic imaging of skin drug absorption. *Optics express*, 20(9) :9476–9484, 2012.

[68] T.-F. Tseng, S.-C. Yang, Y.-T. Shih, Y.-F. Tsai, T.-D. Wang, and C.-K. Sun. Near-field sub-THz transmission-type image system for vessel imaging in-vivo. *Optics Express*, 23(19) :25058, 2015.

[69] M. Bessou, B. Chassagne, J.-P. Caumes, C. Pradère, P. Maire, M. Tondusson, and E. Abraham. Three-dimensional terahertz computed tomography of human bones. *Applied optics*, 51(28) :6738–6744, 2012.

[70] W.-C. Kan, W.-S. Lee, W.-H. Cheung, V. P. Wallace, and E. Pickwell-MacPherson. Terahertz pulsed imaging of knee cartilage. *Biomedical optics express*, 1(3) :967–974, 2010.

[71] A. Arora, T. Q. Luong, M. Kruger, Y. J. Kim, C.H. Nam, A. Manz, and M. Havenith. Terahertz-time domain spectroscopy for the detection of PCR amplified DNA in aqueous solution. *Analyst*, 137(3) :575–579, 2012.

[72] M. Nagel, P. H. Bolivar, M. Brucherseifer, H. Kurz, A. Bosserhoff, and R. Büttner. Integrated planar terahertz resonators for femtomolar sensitivity label-free detection of DNA hybridization. *Applied optics*, 41(10) :2074–2078, 2002.

[73] T. Hasebe, S. Kawabe, H. Matsui, and H. Tabata. Metallic mesh-based terahertz biosensing of single- and double-stranded DNA. *Journal of Applied Physics*, 112(9) :094702, 2012.

[74] D.-K. Lee, J.-H. Kang, J.-S. Lee, H.-S. Kim, C. Kim, J. Hun Kim, T. Lee, J.-H. Son, Q-H. Park, and M. Seo. Highly sensitive and selective sugar detection by terahertz nano-antennas. *Scientific Reports*, 5 :15459, 2015.

[75] K. Jeong, Y.-M. Huh, S.-H. Kim, Y. Park, J.-H. Son, S. J. Oh, and J.-S. Suh. Characterization of blood using terahertz waves. *Journal of biomedical optics*, 18(10) :107008, 2013.

[76] C. B. Reid, G. Reese, A. P. Gibson, and V. P. Wallace. Terahertz Time-Domain Spectroscopy of Human Blood. *IEEE Transactions on Terahertz Science and Technology*, 3(4) :363–367, 2013.

[77] W. Zhang, E.R. Brown, L. Viveros, K. P. Burris, and C. N. Stewart Jr. Narrow terahertz attenuation signatures *in Bacillus thuringiensis* : Narrow terahertz attenuation signatures *in Bacillus thuringiensis*. *Journal of Biophotonics*, 7(10) :818–824, 2014.

[78] T. Globus, T. Dorofeeva, I. Sizov, B. Gelmont, M. Lvovska, T. Khromova, O. Chertihin, and Y. Koryakina. Sub-THz Vibrational Spectroscopy of Bacterial Cells and Molecular Components. *American Journal of Biomedical Engineering*, 2(4) :143–154, 2012.

[79] A. Mazhorova, A. Markov, A. Ng, R. Chinnappan, O. Skorobogata, M. Zourob, and M. Skorobogatiy. Label-free bacteria detection using evanescent mode of a suspended core terahertz fiber. *Optics express*, 20(5) :5344–5355, 2012.

[80] S. J. Park, J. T. Hong, S. J. Choi, H. S. Kim, W. K. Park, S. T. Han, J. Y. Park, S. Lee, D. S. Kim, and Y. H. Ahn. Detection of microorganisms using terahertz metamaterials. *Scientific Reports*, 4, 2014.

[81] K. Shiraga, Y. Ogawa, T. Suzuki, N. Kondo, A. Irisawa, and M. Imamura. Characterization of Dielectric Responses of Human Cancer Cells in the Terahertz Region. *Journal of Infrared, Millimeter, and Terahertz Waves*, 35(5) :493–502, 2014.

[82] K. Grenier, D. Dubuc, T. Chen, F. Artis, T. Chretiennot, M. Poupot, and J. J. Fournié. Recent Advances in Microwave-Based Dielectric Spectroscopy at the Cellular Level for Cancer Investigations. *IEEE Transactions on Microwave Theory and Techniques*, 61(5) :2023–2030, 2013.

[83] H.-B. Liu, G. Plopper, S. Earley, Y. Chen, B. Ferguson, and X.-C. Zhang. Sensing minute changes in biological cell monolayers with THz differential time-domain spectroscopy. *Biosensors and Bioelectronics*, 22(6) :1075–1080, 2007.

[84] J.-B. Masson, M.-P. Sauviat, and G. Gallot. Ionic contrast terahertz time resolved imaging of frog auricular heart muscle electrical activity. *Applied Physics Letters*, 89(15) :153904, 2006.

[85] D. R. Dalzell, J. McQuade, R. Vincelette, B. Ibey, J. Payne, R. Thomas, W. P. Roach, C. L. Roth, and G. J. Wilmink. Damage thresholds for terahertz radiation. page 75620M, 2010.

[86] G. J. Wilmink, B. L. Ibey, C. L. Roth, R. L. Vincelette, B. D. Rivest, C. B. Horn, J. Bernhard, D. Roberson, and W. P. Roach. Determination of death thresholds and identification of terahertz (THz)-specific gene expression signatures. page 75620K, February 2010.

[87] G. J. Wilmink, B. D. Rivest, C. C. Roth, B. L. Ibey, J. A. Payne, L. X. Cundin, J. E. Grundt, X. Peralta, D. G. Mixon, and W. P. Roach. In vitro investigation of the biological effects associated with human dermal fibroblasts exposed to 2.52 THz radiation. *Lasers in Surgery and Medicine*, 43(2) :152–163, 2011.

[88] G. J. Wilmink and J. E. Grundt. Invited Review Article : Current State of Research on Biological Effects of Terahertz Radiation. *Journal of Infrared, Millimeter, and Terahertz Waves*, 32(10) :1074–1122, 2011.

[89] N. V. Ostrovskiy, C. M. Nikituk, V. F. Kirichuk, and A. P. Krenitskiy. Application of the terahertz waves in therapy of burn wounds. volume 1, pages 301 – 302, IEEE, 2005.

[90] V. F. Kirichuck, A. N. Ivanov, O. N. Antipova, A. P. Krenickiy, A. V. Mayborodin, and V. D. Tupikin. Sex-specific differences in changes of disturbed functional activity of platelets in albino rats under the effect of terahertz electromagnetic radiation at nitric oxide frequencies. *Bulletin of experimental biology and medicine*, 145(1) :75–77, 2008.

[91] V. F. Kirichuk, A. N. Ivanov, and T. S. Kirijazi. Correction of Microcirculatory Disturbances with Terahertz Electromagnetic Radiation at Nitric Oxide Frequencies in Albino Rats under Conditions of Acute Stress. *Bulletin of Experimental Biology and Medicine*, 151(3) :288–291, 2011.

[92] V. F. Kirichuk, N. V. Efimova, and E. V. Andronov. Effect of high power terahertz irradiation on platelet aggregation and behavioral reactions of albino rats. *Bulletin of experimental biology and medicine*, 148(5) :746–749, 2009.

[93] V. F. Kirichuk and A. A. Tsymbal. Effects of terahertz irradiation at nitric oxide frequencies on intensity of lipoperoxidation and antioxidant properties of the blood under stress conditions. *Bulletin of experimental biology and medicine*, 148(2) :200–203, 2009.

[94] J. Bock, Y. Fukuyo, S. Kang, M. L. Phipps, L. B. Alexandrov, K. Rasmussen, A. R. Bishop, Evan D. Rosen, J. S. Martinez, H.-T. Chen, G. Rodriguez, B. S. Alexandrov, and A. Usheva. Mammalian Stem Cells Reprogramming in Response to Terahertz Radiation. *PLoS ONE*, 5(12) :e15806, 2010.

[95] A. Korenstein-Ilan, A. Barbul, P. Hasin, A. Eliran, A. Gover, and R. Korenstein. Terahertz Radiation Increases Genomic Instability in Human Lymphocytes. *Radiation Research*, 170(2) :224–234, 2008.

[96] B. S. Alexandrov, M. L. Phipps, L. B. Alexandrov, L. G. Booshehri, A. Erat, J. Zabolotny, C. H. Mielke, H.-T. Chen, G. Rodriguez, K. Rasmussen, J. S. Martinez, A. R. Bishop, and A. Usheva. Specificity and Heterogeneity of Terahertz Radiation Effect on Gene Expression in Mouse Mesenchymal Stem Cells. *Scientific Reports*, 3, 2013.

[97] O. Zeni, G. P. Gallerano, A. Perrotta, M. Romano, A. Sannino, M. Sarti, M. D'Arienzo, A. Doria, E. Giovenale, A. Lai, G. Messina, and M R. Scarfi. Cytogenetic observations in Human peripheral blood leukocytes following in vitro exposure to THz radiation : a pilot study. *Health Physics*, 92(4) :349–357, 2007.

[98] M. R. Scarfi, M. Romano, R. Di Pietro, O. Zeni, A. Doria, G. P. Gallerano, E. Giovenale, G. Messina, A. Lai, G. Campurra, and others. THz exposure of whole blood for the study of biological effects on human lymphocytes. *Journal of Biological Physics*, 29(2-3) :171–176, 2003.

[99] N. Bourne, R. H. Clothier, M. D'Arienzo, and P. Harrison. The effects of terahertz radiation on human keratinocyte primary cultures and neural cell cultures. *Alternatives to laboratory animals : ATLA*, 36(6) :667–684, 2008.

[100] R. H. Clothier and N. Bourne. Effects of THz exposure on human primary keratinocyte differentiation and viability. *Journal of Biological Physics*, 29(2-3) :179–185, 2003.

[101] H. Hintzsche, C. Jastrow, T. Kleine-Ostmann, U. Karst, T. Schrader, and H. Stopper. Terahertz Electromagnetic Fields (0.106 THz) Do Not Induce Manifest Genomic Damage In Vitro. *PLoS ONE*, 7(9) :e46397, 2012.

[102] J.-B. Masson, M.-P. Sauviat, J.-L. Martin, and G. Gallot. Ionic contrast terahertz near-field imaging of axonal water fluxes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103(13) :4808–4812, 2006.

[103] A. Wojdyla and G. Gallot. Attenuated internal reflection terahertz imaging. *Optics letters*, 38(2) :112–114, 2013.

[104] K.-E. Peiponen, A. Zeitler, and M. Kuwata-Gonokami. *Terahertz spectroscopy and imaging*, volume 171. Springer, 2012.

[105] A. Adam. Review of Near-Field Terahertz Measurement Methods and Their Applications : How to Achieve Sub-Wavelength Resolution at THz Frequencies. *Journal of Infrared, Millimeter, and Terahertz Waves*, 32(8-9) :976–1019, 2011.

[106] M. Born and E. Wolf. *Principles of Optics, 7th (expanded) ed.* Cambridge U. Press, 1999.

[107] A. Wojdyla. *Polarisation des impulsions térahertz et développement de l'imagerie par réflexion interne totale pour l'étude d'objets d'intérêt biologique.* Thèse, Ecole Polytechnique, 2011.

[108] S. J. Orfanidis. *Electromagnetic waves and antennas.* Rutgers University New Brunswick, NJ, 2002.

[109] J.-B. Masson. *Ionic contrast terahertz imaging Surface Plasmons polaritons statistical physics.* Thèse, Ecole Polytechnique, July 2007.

[110] L. Duvillaret, F. Garet, J.-F. Roux, and J.-L. Coutaz. Analytical modeling and optimization of terahertz time-domain spectroscopy experiments, using photoswitches as antennas. *Selected Topics in Quantum Electronics, IEEE Journal of*, 7(4) :615–623, 2001.

[111] M. Grognot and G. Gallot. Quantitative measurement of permeabilization of living cells by terahertz attenuated total reflection. *Applied Physics Letters*, 107(10) :103702, 2015.

[112] S. André, A. Delaguillaumie, M. Jidenko, and C. Bonnefoy. *Chimie, Biochimie, Sciences du Vivant : 1ère STL.* Biologie Technique. SCEREN-CNDP-CRDP Aquitaine, Bordeaux.

[113] A. Uzman. *Molecular biology of the cell (4th ed.) : Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., and Walter, P.*, volume 31. 2003.

[114] R. Milo and R. Phillips. *Cell biology by the numbers.* Garland Science, 2015.

[115] J. G. Betts, P. DeSaix, E. Johnson, and J. E. Johnson. *Anatomy and Physiology.* OpenStax College, 2013.

[116] A. Puliafito, L. Hufnagel, P. Neveu, S. Streichan, A. Sigal, D. K. Fygenson, and B. I. Shraiman. Collective and single cell behavior in epithelial contact inhibition. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 109(3) :739–744, 2012.

[117] S. Erlinger and M. H. Saier Jr. Decrease in protein content and cell volume of cultured dog kidney epithelial cells during growth. *In vitro*, 18(3) :196–202, 1982.

[118] J. H. Hoh and C.-A. Schoenenberger. Surface morphology and mechanical properties of MDCK monolayers by atomic force microscopy. *Journal of cell science*, 107(5) :1105–1114, 1994.

[119] C. M. Jamur and C. Oliver. Immunocytochemical Methods and Protocols. pages 63–66. Humana Press, Totowa, NJ, 2010.

[120] J. B. Delehanty, H. Mattoussi, and I. L. Medintz. Delivering quantum dots into cells : strategies, progress and remaining issues. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 393(4) :1091–1105, 2009.

[121] I. Hapala. Breaking the Barrier : Methods for Reversible Permeabilization of Cellular Membranes. *Critical Reviews in Biotechnology*, 17(2) :105–122, 1997.

[122] F. André and L. M. Mir. DNA electrotransfer : its principles and an updated review of its therapeutic applications. *Gene Therapy*, 11 :S33–S42, 2004.

[123] S. Keeney and S. Linn. A critical review of permeabilized cell systems for studying mammalian DNA repair. *Mutation Research/DNA Repair*, 236(2-3) :239–252, 1990.

[124] M. J. H. Geelen. The use of digitonin-permeabilized mammalian cells for measuring enzyme activities in the course of studies on lipid metabolism. *Analytical Biochemistry*, 347(1) :1–9, 2005.

[125] B. Hille and others. *Ion channels of excitable membranes*, volume 507. Sinauer Sunderland, MA, 2001.

[126] R. Calvello, V. Mitolo, A. Acquafredda, A. Cianciulli, and M. A. Panaro. Plasma membrane damage sensing and repairing. Role of heterotrimeric G-proteins and the cytoskeleton. *Toxicology in Vitro*, 25(5) :1067–1074, 2011.

[127] M. J. Rindler, M. Taub, and M. H. Saier. Uptake of 22na+ by cultured dog kidney cells (MDCK). *Journal of Biological Chemistry*, 254(22) :11431–11439, 1979.

[128] M. Paulmichl, G. Gstraunthaler, and F. Lang. Electrical properties of Madin-Darby canine kidney cells. *Pflügers Archiv*, 405(2) :102–107, 1985.

[129] S. A. Rajasekaran, L. G. Palmer, S. Y. Moon, A. P. Soler, G. L. Apodaca, J. F. Harper, Y. Zheng, and A. K. Rajasekaran. Na, K-ATPase activity is required for formation of tight junctions, desmosomes, and induction of polarity in epithelial cells. *Molecular biology of the cell*, 12(12) :3717–3732, 2001.

[130] A. Platonova, S. Koltsova, G. V. Maksimov, R. Grygorczyk, and S. N. Orlov. The Death of Ouabain-Treated Renal Epithelial C11-MDCK Cells is Not Mediated by Swelling-Induced Plasma Membrane Rupture. *The Journal of Membrane Biology*, 241(3) :145–154, 2011.

[131] I. Larre, A. Lazaro, R. G. Contreras, M. S. Balda, K. Matter, C. Flores-Maldonado, A. Ponce, D. Flores-Benitez, R. Rincon-Heredia, T. Padilla-Benavides, A. Castillo, L. Shoshani, and M. Cereijido. Ouabain modulates epithelial cell tight junction. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 107(25) :11387–11392, 2010.

[132] N. Abaza, J. Leighton, and S. Schultz. Effects of ouabain on the function and structure of a cell line (MDCK) derived from canine kidney. *In vitro*, 10(3-4) :172–183, 1974.

[133] G. Francis, Z. Kerem, H. P. S. Makkar, and K. Becker. The biological action of saponins in animal systems : a review. *British Journal of Nutrition*, 88(06) :587, 2002.

[134] J. C. Brooks and S. W. Carmichael. Ultrastructural demonstration of exocytosis in intact and saponin-permeabilized cultured bovine chromaffin cells. *American journal of anatomy*, 178(1) :85–89, 1987.

[135] M. Yamawaki, A. Zurbriggen, A. Richard, and M. Vandevelde. Saponin treatment for in situ hybridization maintains good morphological preservation. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*, 41(1) :105–109, 1993.

[136] J. M. Walker. The Bicinchoninic Acid (BCA) Assay for Protein Quantitation. In *The Protein Protocols Handbook*, Springer Protocols Handbooks, pages 11–15. Humana Press, 2009.

[137] D. S. Gilbert. Axoplasm chemical composition in Myxicola and solubility properties of its structural proteins. *The Journal of physiology*, 253(1) :303, 1975.

[138] N. R. Roberts, R. R. Coelho, O. H. Lowry, and E. J. Crawford. Enzyme activities of giant squid axoplasm and axon sheath. *Journal of neurochemistry*, 3(2) :109–115, 1958.

[139] B. Alberts, A. Johnson, J. Lewis, M. Raff, K. Roberts, and P. Walter. *Molecular biology of the cell.* Garland Science, New York, 2002.

[140] Y. Levy and J. N. Onuchic. Water mediation in protein folding and molecular recognition. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.*, 35 :389–415, 2006.

[141] J. Kitagawa, T. Ohkubo, M. Onuma, and Y. Kadoya. THz spectroscopic characterization of biomolecule/water systems by compact sensor chips. *Applied Physics Letters*, 89(4) :041114, 2006.

[142] C. Zhang and S. M. Durbin. Hydration-induced far-infrared absorption increase in myoglobin. *The Journal of Physical Chemistry B*, 110(46) :23607–23613, 2006.

[143] F. Sterpone, G. Stirnemann, and D. Laage. Magnitude and Molecular Origin of Water Slowdown Next to a Protein. *Journal of the American Chemical Society*, 134(9) :4116–4119, 2012.

[144] B. Halle and M. Davidovic. Biomolecular hydration : from water dynamics to hydrodynamics. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 100(21) :12135–40, 2003.

[145] J. G. de la Torre, M. L. Huertas, and B. Carrasco. Calculation of Hydrodynamic Properties of Globular Proteins from Their Atomic-Level Structure. *Biophys. J.*, 78 :719–730, 2000.

[146] M. Tarek and D. J. Tobias. Role of protein-water hydrogen bond dynamics in the protein dynamical transition. *Phys. Rev. Lett.*, 88(13) :138101, 2002.

[147] F. Pizzitutti, M. Marchi, F. Sterpone, and P. J. Rossky. How Protein Surfaces Induce Anomalous Dynamics of Hydration Water. *J. Phys. Chem. B*, 111 :7584–7590, 2007.

[148] R. H. Henchman and J. A. McCammon. Structural and dynamic properties of water around acetylcholinesterase. *Protein Sci.*, 11 :2080–2090, 2002.

[149] C. Mattea, J. Qvist, and B. Halle. Dynamics at the Protein-Water Interface from 17o Spin Relaxation in Deeply Supercooled Solutions. *Biophys. J.*, 95 :2951–2963., 2008.

[150] R. G. Bryant. Dynamics of water in and around proteins characterized by 1h-spin-lattice relaxometry. *C. R. Phys.*, 11 :128–135, 2010.

[151] P. Mukherjee, I. Kass, I. Arkin, and M. T. Zanni. Picosecond dynamics of a membrane protein revealed by 2d IR. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 103(10) :3528–3533, 2006.

[152] Z. F. Brotzakis, C. C. M. Groot, W. H. Brandeburgo, H. J. Bakker, and P. G. Bolhuis. Dynamics of Hydration Water around Native and Misfolded alpha-Lactalbumin. *Journal of Physical Chemistry B*, 120(21) :4756–4766, 2016.

[153] B. Born, S. J. Kim, S. Ebbinghaus, M. Gruebele, and M. Havenith. The terahertz dance of water with the proteins : the effect of protein flexibility on the dynamical hydration shell of ubiquitin. *Faraday Discuss.*, 141 :161–173, 2009.

[154] V. C. Nibali and M. Havenith. New Insights into the Role of Water in Biological Function : Studying Solvated Biomolecules Using Terahertz Absorption Spectroscopy in Conjunction with Molecular Dynamics Simulations. *Journal of the American Chemical Society*, 136(37) :12800–12807, 2014.

[155] N. Yamamoto, K. Ohta, A. Tamura, and K. Tominaga. Broadband Dielectric Spectroscopy on Lysozyme in the Sub-Gigahertz to Terahertz Frequency Regions : Effects of Hydration and Thermal Excitation. *J Phys Chem B*, 2016.

[156] H. Yoneyama, M. Yamashita, K. Kawase, R. Ueno, H. Ito, and T. Ouchi. Terahertz spectroscopy of native-conformation and thermally denaturated bovine serum albumin (BSA). *Phys. Med. Biol.*, 53 :3543–3549, 2008.

[157] T. Arikawa, M. Nagai, and K. Tanaka. Characterizing hydration state in solution using terahertz time-domain attenuated total reflection spectroscopy. *Chemical Physics Letters*, 457(1-3) :12–17, 2008.

[158] M. L. T. Asaki, A. Redondo, T. A. Zawodzinski, and A. J. Taylor. Dielectric relaxation of electrolyte solutions using terahertz transmission spectroscopy. *J. Chem. Phys.*, 116(19) :8469–8482, 2002.

[159] J. Xu, K. W. Plaxco, S. J. Allen, J. E. Bjarnason, and E. R. Brown. 0.15-3.72 THz absorption of aqueous salts and saline solutions. *Applied Physics Letters*, 90(3) :031908, 2007.

[160] H. P. Erickson. Size and shape of protein molecules at the nanometer level determined by sedimentation, gel filtration, and electron microscopy. *Biol Proced Online*, 11 :32–51, 2009.

[161] A. C. Fogarty and D. Laage. Water Dynamics in Protein Hydration Shells : The Molecular Origins of the Dynamical Perturbation. *Journal of Physical Chemistry B*, 118(28) :7715–7729, 2014.

[162] O. Rahaman, S. Melchionna, D. Laage, and F. Sterpone. The effect of protein composition on hydration dynamics. *Physical Chemistry Chemical Physics*, 15(10) :3570–3576, 2013.

[163] O. Sushko, R. Dubrovka, and R. S. Donnan. Sub-terahertz spectroscopy reveals that proteins influence the properties of water at greater distances than previously detected. *The Journal of Chemical Physics*, 142(5) :055101, 2015.

[164] O. Sushko, R. Dubrovka, and R. S. Donnan. Terahertz spectral domain computational analysis of hydration shell of proteins with increasingly complex tertiary structure. *J Phys Chem B*, 117(51) :16486–92, 2013.

[165] S. Ebbinghaus, S. J. Kim, M. Heyden, X. Yu, U. Heugen, M. Gruebele, D. M. Leitner, and M. Havenith. An extended dynamical hydration shell around proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 104(52) :20749–20752, 2007.

[166] T. Ding, R. Li, A. Zeitler, T. Huber, L. Gladden, A. Middelberg, and R. Falconer. Terahertz anf far infrared Spectroscopy of alanine-rich peptides having variable ellipticity. *Optics Express*, 18(26), 2010.

[167] B. Born, H. Weingärtner, E. Bründermann, and M. Havenith. Solvation Dynamics of Model Peptides Probed by Terahertz Spectroscopy. Observation of the Onset of Collective Network Motions. *Journal of the American Chemical Society*, 131(10) :3752–3755, 2009.

[168] A. Podzorov. *Spectroscopie et imagerie térahertz des systèmes d'intérêt biologique.* PhD thesis, Ecole Polytechnique, 2009.

[169] L. Thrane, R. H. Jacobsen, P. U. Jepsen, and S. R. Keiding. THz reflection spectroscopy of liquid water. 1995.

[170] N. A. Campbell and J. B. Reece. *Biologie.* De Boeck Université, 2004.

[171] U. Schnell, F. Dijk, K. A. Sjollema, and B. N. G. Giepmans. Immunolabeling artifacts and the need for live-cell imaging. *Nat Meth*, 9(2) :152–158, 2012.

[172] C. E. Thomas, A. Ehrhardt, and M. A. Kay. Progress and problems with the use of viral vectors for gene therapy. *Nature Reviews Genetics*, 4(5) :346–358, 2003.

[173] Y. Zhang and L.-C. Yu. Single-cell microinjection technology in cell biology. *BioEssays : news and reviews in molecular, cellular and developmental biology*, 30(6) :606–610, 2008.

[174] I. Walev, S. C. Bhakdi, F. Hofmann, N. Djonder, A. Valeva, K. Aktories, and S. Bhakdi. Delivery of proteins into living cells by reversible membrane permeabilization with streptolysin-O. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 98(6) :3185–3190, 2001.

[175] P. Bhattacharyya, W. Epstein, and S. Silver. Valinomycin-induced uptake of potassium in membrane vesicles from Escherichia coli. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 68(7) :1488–1492, 1971.

[176] A. L. van de Ven, K. Adler-Storthz, and R. Richards-Kortum. Delivery of optical contrast agents using Triton-X100, part 1 : reversible permeabilization of live cells for intracellular labeling. *Journal of Biomedical Optics*, 14(2) :021012, 2009.

[177] Dipankar Koley and Allen J. Bard. Triton X-100 concentration effects on membrane permeability of a single HeLa cell by scanning electrochemical microscopy (SECM). *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 107(39) :16783–16787, 2010.

[178] T. Sarafian, D. Aunis, and M.-F. Bader. Loss of proteins from digitonin-permeabilized adrenal chromaffin cells essential for exocytosis. *Journal of Biological Chemistry*, 262(34) :16671–16676, 1987.

[179] M. Wassler, I. Jonasson, R. Persson, and E. Fries. Differential permeabilization of membranes by saponin treatment of isolated rat hepatocytes. Release of secretory proteins. *Biochem. J*, 247 :407–415, 1987.

[180] M.-P. Rols and J. Teissié. Electropermeabilization of mammalian cells to macromolecules : control by pulse duration. *Biophysical journal*, 75(3) :1415–1423, 1998.

[181] T. Kotnik, G. Pucihar, M. Reberšek, D. Miklavcic, and L. M. Mir. Role of pulse shape in cell membrane electropermeabilization. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, 1614(2) :193–200, 2003.

[182] C. Chen, S.W. Smye, M.P. Robinson, and J.A. Evans. Membrane electroporation theories : a review. *Medical & Biological Engineering & Computing*, 44(1-2) :5–14, 2006.

[183] J.-M. Escoffre, T. Portet, L. Wasungu, J. Teissié, D. Dean, and M.-P. Rols. What is (Still not) Known of the Mechanism by Which Electroporation Mediates Gene Transfer and Expression in Cells and Tissues. *Molecular Biotechnology*, 41(3) :286–295, 2009.

[184] L. M. Mir. Therapeutic perspectives of in vivo cell electropermeabilization. *Bioelectrochemistry*, 53(1) :1–10, 2001.

[185] J. Gehl. Electroporation : theory and methods, perspectives for drug delivery, gene therapy and research. *Acta Physiologica Scandinavica*, 177(4) :437–447, 2003.

[186] M. Golzio, M.-P. Mora, C. Raynaud, C. Delteil, J. Teissié, and M.-P. Rols. Control by osmotic pressure of voltage-induced permeabilization and gene transfer in mammalian cells. *Biophysical journal*, 74(6) :3015–3022, 1998.

[187] K. Medepalli, B. W. Alphenaar, R. S. Keynton, and P. Sethu. A new technique for reversible permeabilization of live cells for intracellular delivery of quantum dots. *Nanotechnology*, 24(20), 2013.

[188] C. I. Bouzigues, T.-L. Nguyên, R. Ramodiharilafy, A. Claeson, P.-L. Tharaux, and A. Alexandrou. Regulation of the ROS response dynamics and organization to PDGF motile stimuli revealed by single nanoparticle imaging. *Chemistry & biology*, 21(5) :647–656, 2014.

[189] S. Cooper, P. Jonak, G. Chouinard-Pelletier, S. Coulombe, E. Jones, and R. L. Leask. Permeabilization of Adhered Cells Using an Inert Gas Jet. (79) :e50612, 2013.

[190] M Leduc, D Guay, R L Leask, and S Coulombe. Cell permeabilization using a non-thermal plasma. *New Journal of Physics*, 11(11) :115021, 2009.

[191] M. Cemazar, C. S. Parkins, A. L. Holder, D. J. Chaplin, G. M. Tozer, and G. Sersa. Electroporation of human microvascular endothelial cells : evidence for an anti-vascular mechanism of electrochemotherapy. *British journal of cancer*, 84(4) :565, 2001.

[192] M. Lewis, C. D. Weaver, and M. S. McClain. Identification of Small Molecule Inhibitors of Clostridium perfringens ε-Toxin Cytotoxicity Using a Cell-Based High-Throughput Screen. *Toxins*, 2(7) :1825–1847, 2010.

[193] J. Wegener, C. R. Keese, and I. Giaever. Recovery of adherent cells after in situ electroporation monitored electrically. *Biotechniques*, 33(2) :348–357, 2002.

[194] Kristine S. Louis and Andre C. Siegel. Cell Viability Analysis Using Trypan Blue : Manual and Automated Methods. In J. Martin Stoddart, editor, *Mammalian Cell Viability : Methods and Protocols*, pages 7–12. Humana Press, Totowa, NJ, 2011.

[195] Gregor Malich, Boban Markovic, and Chris Winder. The sensitivity and specificity of the MTS tetrazolium assay for detecting the in vitro cytotoxicity of 20 chemicals using human cell lines. *Toxicology*, 124(3) :179–192, 1997.

[196] S. Adam, R. Marr, and L. Gerace. Nuclear protein import in permeabilized mammalian cells requires soluble cytoplasmic factors. *The Journal of Cell Biology*, 111(3) :807–816, 1990.

[197] J. E. Hagstrom, J. J. Ludtke, M. C. Bassik, M. G. Sebestyén, S. A. Adam, and J. A. Wolff. Nuclear import of DNA in digitonin-permeabilized cells. *Journal of cell science*, 110(18) :2323–2331, 1997.

[198] J. Liu, N. Xiao, and D. B. DeFranco. Use of Digitonin-Permeabilized Cells in Studies of Steroid Receptor Subnuclear Trafficking. *Methods*, 19 :403–409, 1999.

[199] K. Miyamoto, T. Yamashita, T. Tsukiyama, N. Kitamura, N. Minami, M. Yamada, and H. Imai. Reversible Membrane Permeabilization of Mammalian Cells Treated with Digitonin and Its Use for Inducing Nuclear Reprogramming by *Xenopus* Egg Extracts. *Cloning and Stem Cells*, 10(4) :535–542, 2008.

[200] F. Tramontina, J. Karl, C. Gottfried, A. Mendez, D. Gonçalves, L. V. Portela, and C.-A. Gonçalves. Digitonin-permeabilization of astrocytes in culture monitored by trypan blue exclusion and loss of S100b by ELISA. *Brain Research Protocols*, 6(1) :86–90, 2000.

[201] H. S. Gankema, E. Laanen, A. K. Groen, and J. M. Tager. Characterization of Isolated Rat-Liver Cells Made Permeable with Filipin. *European Journal of Biochemistry*, 119(2) :409–414, 1981.

[202] Michael Leguèbe. *Modélisation de l'électroperméabilisation à l'échelle cellulaire.* PhD thesis, Université de Bordeaux, 2014.

[203] H. Potter. Transfection by Electroporation. In F. M. Ausubel, R. Brent, R. E. Kingston, D. D. Moore, J.G. Seidman, J. A. Smith, and K. Struhl, editors, *Current Protocols in Molecular Biology.* John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, NJ, USA, 2003.

[204] C. Y. Calvet, J. Thalmensi, C. Liard, E. Pliquet, T. Bestetti, T. Huet, P. Langlade-Demoyen, and L. M. Mir. Optimization of a gene electrotransfer procedure for efficient intradermal immunization with an hTERT-based DNA vaccine in mice. *Molecular Therapy - Methods & Clinical Development*, 1 :14045, 2014.

[205] E. Signori, S. Iurescia, E. Massi, D. Fioretti, P. Chiarella, M. De Robertis, M. Rinaldi, G. Tonon, and V. M. Fazio. DNA vaccination strategies for anti-tumour effective gene therapy protocols. *Cancer Immunology, Immunotherapy*, 59(10) :1583–1591, 2010.

[206] M. Rebersek, D. Miklavcic, C. Bertacchini, and M. Sack. Cell membrane electroporation - Part 3 : The equipment. *IEEE Electrical Insulation Magazine*, 30(3) :8–18, 2014.

[207] B. Rubinsky. Irreversible electroporation in medicine. *Technology in cancer research & treatment*, 6(4) :255–259, 2007.

[208] R. V. Davalos, L. M. Mir, and B. Rubinsky. Tissue Ablation with Irreversible Electroporation. *Annals of Biomedical Engineering*, 33(2) :223–231, 2005.

[209] M. Bower, L. Sherwood, Y. Li, and R. Martin. Irreversible electroporation of the pancreas : Definitive local therapy without systemic effects. *Journal of Surgical Oncology*, 104(1) :22–28, 2011.

[210] S. Mahnic-Kalamiza, E. Vorobiev, and D. Miklavcic. Electroporation in Food Processing and Biorefinery. *The Journal of Membrane Biology*, 247(12) :1279–1304, 2014.

[211] C. Schaab, T. Geiger, G. Stoehr, J. Cox, and M. Mann. Analysis of High Accuracy, Quantitative Proteomics Data in the MaxQB Database. *Molecular & Cellular Proteomics*, 11(3) :M111.014068, 2012.

Titre : Imagerie térahertz par réflexion interne totale pour la biologie. Application à l'étude de la perméabilisation cellulaire.

Résumé : Les ondes térahertz s'étendent de 0.1 à 10.10^{12} Hz, à la frontière entre les domaines de l'optique et des radiofréquences. Cette position intermédiaire originale en a longtemps rendu l'accès difficile : le domaine n'a pas encore atteint la maturité des domaines des microondes ou de l'infrarouge qui le jouxtent. Cependant, les motivations exploratoires sont fortes, de par la sensibilité spectroscopique du térahertz aux états moléculaires (rotationnels, vibrationnels..) et aux liaisons faibles établies dans et entre les molécules. Dans le cas des objets biologiques, le térahertz est particulièrement sensible à l'eau: sa quantité, son état physico-chimique et ses solutés.

Nous avons mis en œuvre un montage d'imagerie en réflexion interne totale atténuée (ATR) pour pouvoir distinguer des cellules vivantes de leur milieu physiologique. Au cours de ce travail, le montage d'imagerie ATR a été caractérisé théoriquement, puis expérimentalement. La première démonstration de l'origine du contraste sur ces images térahertz a été réalisée. Il provient du contenu intracellulaire, plus spécifiquement des protéines et peptides dissouts dans le cytoplasme. Une analyse fine des mécanismes sous-jacents à la nature protéique du contraste térahertz a également été développée. Elle donne accès à des informations spectroscopiques inédites sur l'eau, les protéines dissoutes et la couche de solvatation les entourant.

Mettant à profit cette compréhension de notre montage térahertz, nous l'avons proposé comme outil non invasif de suivi quantitatif de la perméabilisation de cellules en conditions physiologiques. Lors de la perméabilisation, augmentation des transferts moléculaires à travers la membrane, notre outil permet de quantifier le passage des peptides et protéines.

La perméabilisation de cellules vivantes a une gamme d'application vaste, de l'entrée de fluorochromes pour l'imagerie ou de médicaments à la thérapie génique. Afin d'assurer ces passages à travers la membrane des cellules, il est nécessaire d'altérer ses propriétés, sans pour autant compromettre la viabilité cellulaire. L'étude de deux types de perméabilisation avec notre outil térahertz est proposée : la perméabilisation chimique et l'électroporation. Dans les deux cas, des mécanismes d'effet dose ont été caractérisés quantitativement. Notre outil térahertz a démontré de grands avantages devant les méthodes actuellement utilisées pour quantifier ces dynamiques de perméabilisation et en caractériser la réversibilité.

Title : Terahertz imaging by total internal reflection for Biology. Application to live cell permeabilization study.

Abstract : Lying between 0.1 to 10.10^{12} Hz, the terahertz radiation occupies a middle ground between microwaves and infrared light waves, sometimes named "the terahertz gap" for technologies relevant to generation and detection have only risen at the beginning of the 90's and aren't fully developed yet. Nevertheless, there are strong exploratory incentives because of terahertz spectroscopic sensitivity to molecular states (rotational, vibrational…) and weak bounds in and between molecules. In the case of biological object, terahertz waves are especially sensitive to water: its quantity, physico-chemical state and solutes. We implemented an Attenuated Total internal Reflection (ATR) imaging setup in order to distinguish live cells from their physiological bathing medium. Throughout this work, we characterized both experimentally and experimentally the ATR setup. The first demonstration of the contrast origin in the terahertz images obtained was done. It arises from the intracellular content, more specifically the proteins and peptides dissolved in the cytoplasm.

A precise analysis of the underlying mechanism of this proteinaceous terahertz contrast has also been developed. It gives access to original spectroscopic information about water, dissolved proteins and the hydration shell around them.

Taking advantage of our whole setup comprehension, we proposed it as a non-invasive tool for quantitative live-cell permeabilization assessment in physiological conditions. During permeabilization, aka increased molecular transfers through the cell membrane, our tool allows to quantify the transfer of peptides and proteins. Live-cell permeabilization has a large application range, from fluorochrome entry in imaging, to drugs or gene therapy. In order to ensure molecules crossing the cell membrane, it's necessary to alter its properties without compromising cell viability.

A study of two permeabilization methods is proposed: chemical permeabilization and electroporation. In both cases dose effect mechanisms were quantitatively characterized. Our terahertz tool demonstrated great advantages over classical permeabilization quantification methods and permeabilization reversibility assessment methods.