

Vers un traitement du cancer par plasma guidé en injection (Plasma Needle)

Frédéric PERISSE¹, Imen GHZAIEL¹, Maxime MOREAU¹, Myriam KOSSAI³, Swapnil Ganesh SANMUKH², Jean-Marc A. LOBACCARO², Silvère BARON², Sébastien MENECHIER¹

¹Université Clermont Auvergne, Clermont Auvergne INP, CNRS, Institut Pascal, F-63000, Clermont-Ferrand, France

²Université Clermont Auvergne, iGReD, CNRS UMR 6293, INSERM U1103, 28, place Henri Dunant, BP38, 63001 Clermont-Ferrand, France.

³Centre Jean Perrin, Université Clermont Auvergne, INSERM, U1240 Imagerie Moléculaire et Stratégies Théranostiques, F-63000 Clermont Ferrand, France

RESUME – Le traitement du cancer est un enjeu sociétal majeur ; de nouvelles opportunités de thérapies se développent autour des plasmas froids depuis quelques années. Des essais *in-vitro* et *in-vivo* montrent l'efficacité de ces dispositifs à plasma froid, toutefois à ce jour, aucun dispositif ne montre une profondeur de traitement permettant d'atteindre l'ensemble d'une tumeur. Nous proposons ici un système innovant appelé « Plasma Needle » pouvant permettre d'atteindre des cellules cancéreuses en profondeur. Nous présentons le système de génération électrique du plasma froid pour ensuite comparer les caractéristiques d'un plasma jet avec le Plasma Needle. Des essais *in-vitro* sont ensuite réalisés pour comparer l'efficacité des deux systèmes.

Mots-clés— Plasma Froid, Cancer, Haute tension pulsée.

1. INTRODUCTION

Les traitements du cancer varient en fonction du type et du stade de la maladie, et peuvent inclure la chirurgie, la radiothérapie, la chimiothérapie, l'immunothérapie ou des thérapies ciblées. L'utilisation du plasma froid dans le domaine de l'oncologie ouvre de nouvelles perspectives [1,2] car il peut être appliqué sur les tissus biologiques sans les endommager. De plus, il a déjà été montré qu'un traitement par plasma froid induit une mort des cellules tumorales avec une certaine sélectivité qui préserve les cellules saines [3]. En effet, un plasma froid génère des espèces réactives de l'oxygène (ROS) et des espèces réactives de l'azote (RNS) qui endommagent les cellules cancéreuses. Ces espèces chimiques perturbent le fonctionnement des cellules pouvant aller jusqu'à l'arrêt du cycle cellulaire ou l'apoptose.

Actuellement, les traitements par plasma froid s'appliquent directement sur les tumeurs, ce qui est facilement réalisable pour un cancer de la peau par exemple mais dans le cas de tumeurs profondes, une intervention chirurgicale est nécessaire.

Le Plasma Jet (PJ) a montré son efficacité sur le cancer *in-vitro* et *in-vivo* [4,5], toutefois, *in-vivo*, l'effet du plasma s'avère efficace en surface mais ne montre pas de pénétration importante au sein d'une tumeur [6]. Pour pallier cette limitation, nous présentons ici un système breveté, appelé Plasma Needle (PN) permettant un traitement direct au cœur d'une tumeur cancéreuse [7].

Dans cette communication, nous détaillons :

- Le système Plasma Needle en comparaison avec le Plasma Jet.
- La caractérisation électrique et spectroscopique du Plasma Needle comparé aux Plasma Jets.
- La comparaison d'essai *in vitro* du Plasma Needle et du Plasma Jet.
- Les objectifs à plus long terme notamment la mise en œuvre du dispositif Plasma Needle sur un modèle murin.

2. DESCRIPTION DES SYSTEMES EXPERIMENTAUX

2.1. L'alimentation électrique

Le système d'alimentation électrique est commun au Plasma Jet et Plasma Needle. Il est constitué d'une alimentation continue haute tension (Spellman SLM 1200 W 10 kV) couplée à des semi-conducteurs haute tension (RLC Electronic, Nanogen 1 10 kV). Ce système permet de générer des impulsions haute tension jusqu'à 10 kV, la fréquence pouvant varier de 1 Hz à 100 kHz, le rapport cyclique est également réglable et permet des impulsions de tension de 150 ns à 50 μ s. Le signal de tension appliqué ici à les caractéristiques suivantes : tension continue 9kV, fréquence de répétition du signal 20kHz, rapport cyclique de l'impulsion 20%, il est représenté sur la Fig. 7.

Le schéma de principe du dispositif de génération électrique est décrit sur la Fig. 1.

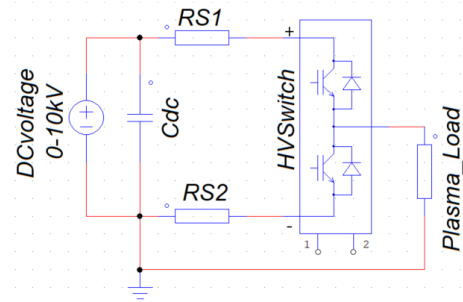


Fig. 1 : Schéma de principe de l'alimentation impulsionnelle.

2.2. Le Plasma Jet

La Fig. 2 représente le Plasma Jet avec deux électrodes de cuivre agencées autour d'un tube diélectrique en pyrex de diamètre intérieur 4 mm (diamètre extérieur 6 mm). Il est alimenté par le générateur d'impulsions décrit précédemment. Une sonde de courant (Stanges Model 0.5-1.5) placée entre l'alimentation et l'électrode HT ainsi que deux sondes de tension (Testec TT-HVP-2739) placées au niveau de cette même électrode et de la cible permettent de mesurer le courant Igene, la tension V1 de la source et la tension du plasma V2 sur une cible. L'acquisition des signaux est réalisée avec un oscilloscope Tektronix 2 Series MSO (200 MHz). Le gaz plasmagène utilisé dans cette étude est de l'hélium (Alphagaz 1, Air Liquide), le débit est contrôlé grâce à un débitmètre Bronkhorst 0,2 à 10 L/min avec une précision de 0,5 %.

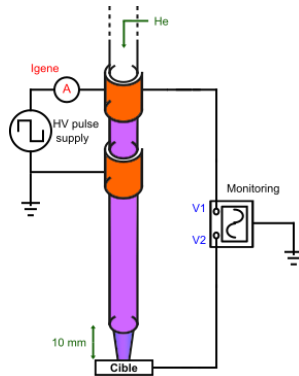


Fig. 2 : Schéma du plasma jet avec l'instrumentation.

2.3. Le Plasma Needle

Une variante du plasma jet décrit précédemment est utilisé pour la création du plasma d'hélium, la différence est un diamètre intérieur du tube de 2mm. Le tube diélectrique est connecté à un tuyau flexible contenant un fil guide en métal permettant de véhiculer le plasma d'hélium sur une distance de plusieurs dizaines de centimètres. Afin de créer un plasma Hélium/Air au sein du système d'aiguille, un cathéter de petite dimension contenant l'air est inséré dans le tube. Le plasma Hélium/Air servant au traitement est présent en sortie du système d'aiguilles, avec une conception qui permet l'évacuation des gaz lorsque le dispositif est au sein des tissus à traiter. Compte tenu des diamètres du cathéter et de l'aiguille les débits sont plus faibles que pour le plasma jet, nous avons fixé 0,2l/min pour le débit d'Hélium, et 0,02L/min pour le débit d'air dans l'aiguille.

La Fig. 3 : représente le dispositif complet (brevet FR2413309) qui permet de créer des ROS directement dans la tumeur tout en gérant l'évacuation des gaz. La Fig. 4 détaille le système d'aiguilles inséré dans la tumeur.

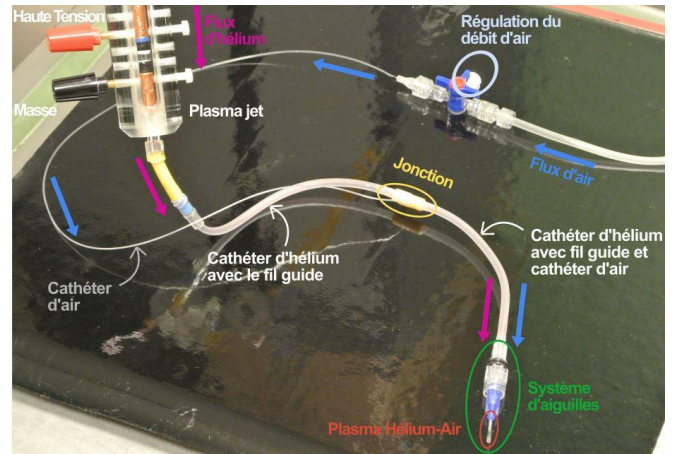


Fig. 3 : Système plasma Needle complet.

3. CARACTERISATIONS DES DISPOSITIFS

Les caractérisations électriques sont présentées pour le Plasma Jet et le Plasma Needle afin de comparer les puissances fournies aux dispositifs.

Une étude spectroscopique permet de contrôler la présence d'espèces d'intérêt pour les deux dispositifs.

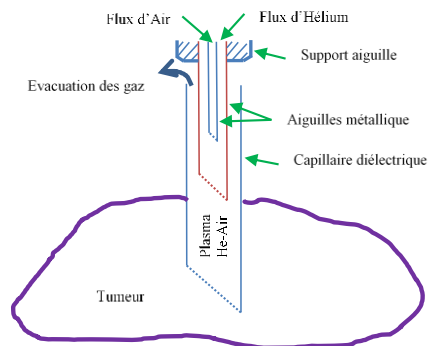


Fig. 4 : Détail de l'injection du plasma dans une tumeur.

Pour chaque dispositif trois cibles ont été utilisées pour la caractérisation afin de vérifier comment la cible interagit sur le plasma. Nous disposons donc d'essai dans l'air, sur une surface d'eau et sur une cible modèle qui est dans notre cas un morceau de poulet. La Fig. 5 représente ces trois configurations dans le cas du plasma jet et la Fig. 6 représente dans le cas du Plasma Needle la cible eau et modèle, la photo du Plasma Needle à l'air libre n'est pas montrée car le plasma n'est pas suffisamment visible de plus l'objectif du Needle est d'être en contact ou inséré dans une matière à traiter.

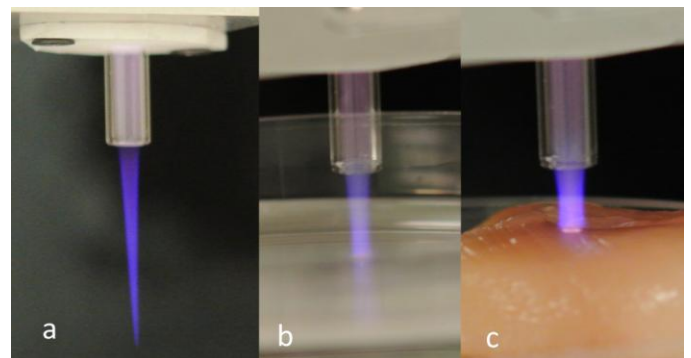


Fig. 5 : Plasma Jet, a) à l'air libre, b) sur de l'eau, c) sur modèle.

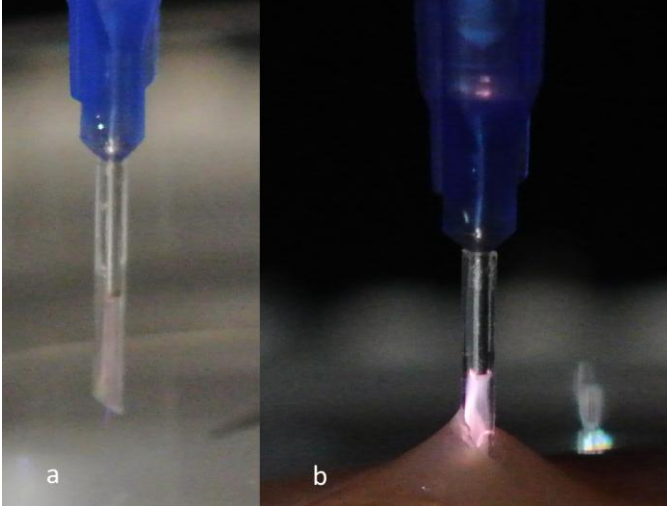


Fig. 6 : Plasma Needle, a) sur de l'eau, b) aiguille dans le modèle poulet.

3.1. Caractérisation électrique.

Les mesures électriques tension/courant sont effectuées afin de déterminer la puissance fournie au dispositif expérimental et la puissance au sein du jet de plasma. Nous comparerons les différences entre les deux systèmes afin d'évaluer les effets sur les traitements biologiques. Il est à noter que le câble entre l'alimentation et le système plasma est blindée, ce qui génère des pertes mais permet de limiter les perturbations CEM liées aux fortes variations en dv/dt de l'alimentation impulsionnelle.

Les mesures électriques sont effectuées au plus près de la génération du plasma, cela permet de ne pas prendre en compte les pertes dans le câble d'alimentation haute tension.

La Fig. 7 montre le signal tension et courant apporté au plasma jet sur une période. Les parties qui nous intéressent pour le calcul de puissance sont celles où le courant est non nul et compte tenu de la nature capacitive des dispositifs, ce sont donc les fronts de tension positifs et négatifs, la Fig. 8 montre le détail courant tension du front de tension positif pour le dispositif Plasma Jet. Deux calculs de puissance sont effectués, celui de la puissance totale fournie au Plasma Jet et la puissance injectée dans le plasma en ayant soustrait la partie dite capacitive du courant total. La puissance moyenne injectée dans le système (P_{tot}) est calculée à partir de l'énergie E dissipée lors des impulsions de courant (positives et négatives), la puissance moyenne est ensuite calculée avec la fréquence de répétition des impulsions selon les équations (1) et (2).

$$E_{tot} = \int_0^{tpulse} u(t) \cdot i(t) dt \quad (1)$$

$$P_{tot} = E * f \quad (2)$$

La puissance fournie au plasma est déterminée en enlevant la partie du courant capacitive du système à vide. Pour ce faire, nous avons mesuré la capacité intrinsèque des systèmes à vide avec un LCR Meter HP 4275A, les valeurs moyennes de capacité dans la gamme de fréquence 10kHz – 10MHz sont respectivement pour le Plasma Jet et le Plasma Needle : $C_{PJ}=5,25pF$, $C_{PN}=1,5pF$ ce qui permet de calculer le courant capacitif généré. Les équations (3) et (4) détaillent le calcul de puissance l'indice x correspond soit au Plasma Jet (PJ) soit au Plasma Needle (PN).

$$i_{cx}(t) = C_x \cdot \frac{dv(t)}{d(t)} \quad (3)$$

$$P_{Plasma} = f \int_0^{tpulse} u(t) \cdot (i(t) - i_{cx}(t)) dt \quad (4)$$

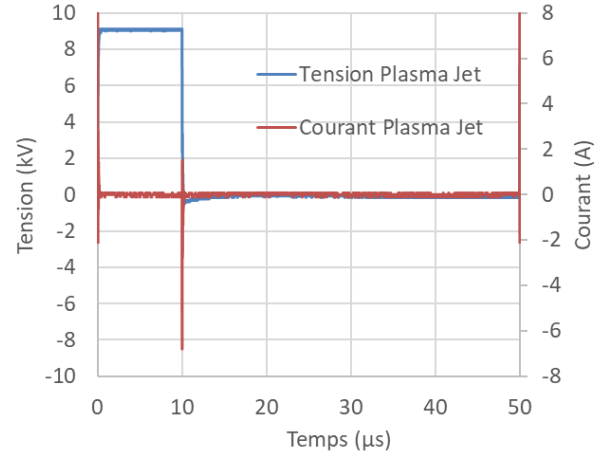


Fig. 7 : Tension et courant total pour le dispositif Plasma Jet.

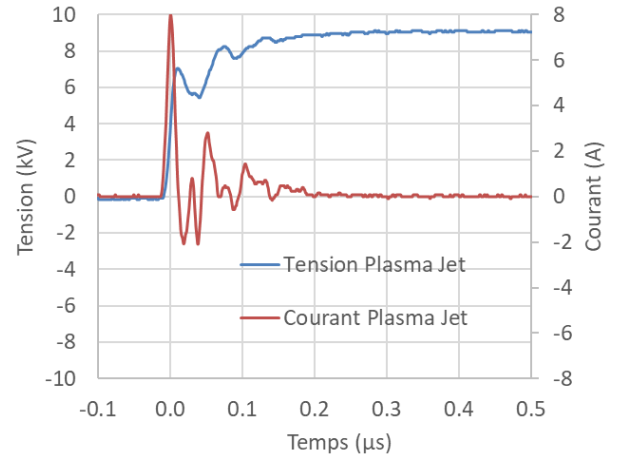


Fig. 8 : Détail tension courant pulse positif pour le dispositif Plasma Jet.

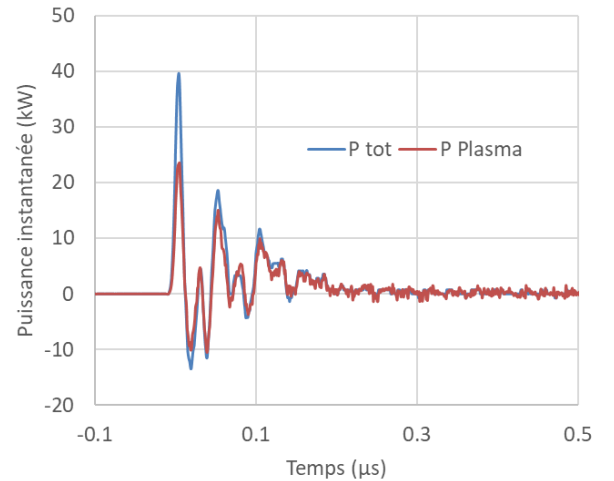


Fig. 9 : Puissance instantanée totale et du plasma pour le dispositif Plasma Jet.

3.1.1. Synthèse des puissances

Les mesures électriques présentées précédemment ont permis de déterminer les puissances absorbées par les systèmes

et les puissances fournies au plasma, elles sont récapitulées dans le Tableau 1. P_{tot} correspond à la puissance fournie au dispositif et P_{plasma} à la puissance fournie au plasma par le dispositif. Il est à noter que ces puissances varient très peu en fonction de la cible.

Concernant le système Plasma Needle la puissance calculée correspond au Plasma généré au niveau du plasma jet utilisé, la puissance appliquée à la cible sera plus faible compte tenu des pertes le long du cathéter contenant le fil guide jusqu'à l'aiguille de traitement. La puissance au niveau de cette aiguille de traitement n'a pas pu être évaluée compte tenu de la configuration du système.

Tableau 1. Synthèse de la puissance fournie au dispositif et de la puissance plasma.

	Cible	P_{tot} (W)	P_{plasma} (W)
Plasma Jet	Air	40.5	29.82
	Eau	37.35	28.45
	Poulet	40	39.63
Plasma Needle	Air	31.78	28.9
	Eau	32.16	28.89
	Poulet	32.7	29.21

3.2. Caractérisation spectroscopique

La caractérisation spectroscopique permet de valider la présence d'espèces ayant montrées dans la littérature l'efficacité des traitements par plasma froid. Nous comparerons les deux systèmes expérimentaux sur différentes cibles.

3.2.1. Plasma Jet

Comme pour la caractérisation électrique, les trois cibles, air, eau et poulet ont été utilisées et sont détaillées ci-dessous.

3.2.1.1 A l'air libre

Le spectre est effectué sur le plasma à 1cm et 2cm de la sortie du tube du plasma jet (Fig. 10) sans cible.

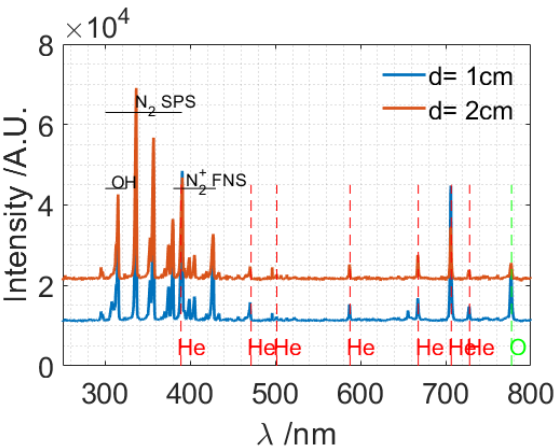


Fig. 10 : Spectre plasma Jet à l'air libre.

Classiquement, le spectre obtenu montre la présence des espèces d'un plasma froid hélium-air. Particulièrement, les pics atomiques de l'hélium et de l'oxygène dissocié ainsi que les bandes moléculaires de OH, N₂, N₂⁺. Le spectre est qualitativement identique à 1 ou 2 cm de la sortie du quartz. Les rapports d'intensité des raies moléculaires évoluent cependant en faveur de la production des métastables en s'éloignant de la sortie du tube.

3.2.1.2 Sur une cible d'eau

Un spectre est également effectué sur le plasma en contact avec l'eau à 1cm du tube de sortie (Fig. 11).

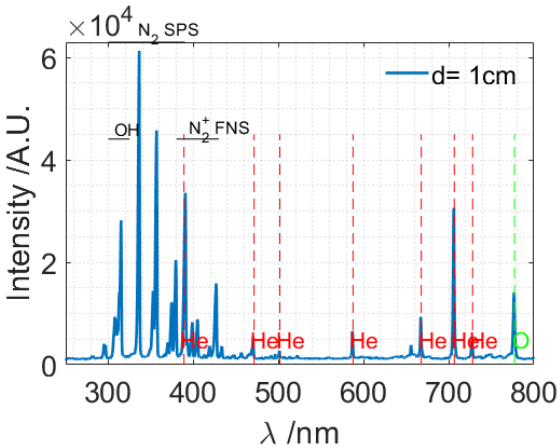


Fig. 11 : Spectre plasma Jet sur l'eau.

Les espèces observées sont les mêmes, mais les rapports de raies sont en faveur des espèces moléculaires, contrairement à ce que l'on observe sans eau à cette distance (Fig. 10).

3.2.1.3 Sur une cible modèle.

En appliquant le plasma jet sur une aiguille de poulet à 1 cm, le spectre ressemble plus au spectre obtenu avec une cible d'eau. Il est probable que le substrat se dessèche lors du traitement.

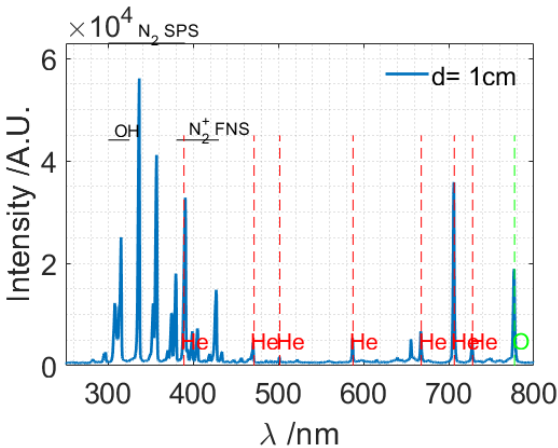


Fig. 12 : Spectre du plasma sur modèle poulet.

3.2.2. Plasma Needle

L'aiguille plasma permet d'obtenir un plasma en sortie, mais avec une intensité lumineuse beaucoup plus faible, il est donc moins aisé d'obtenir des spectres d'émission. En optimisant l'alignement de la fibre optique du spectromètre et le temps d'intégration, des spectres sont néanmoins réalisés.

3.2.2.1 A l'air libre

En utilisant le plasma needle à l'air libre, les bandes moléculaires sont toujours visibles ainsi que les pics atomiques de l'hélium, mais on remarque ici l'absence du triplet de l'oxygène à 777 nm (Fig. 13).

3.2.2.2 Sur une cible d'eau

Sur une cible constituée d'eau, les bandes moléculaires ont quasiment disparues et le spectre montre un plasma d'hélium pur (Fig. 14).

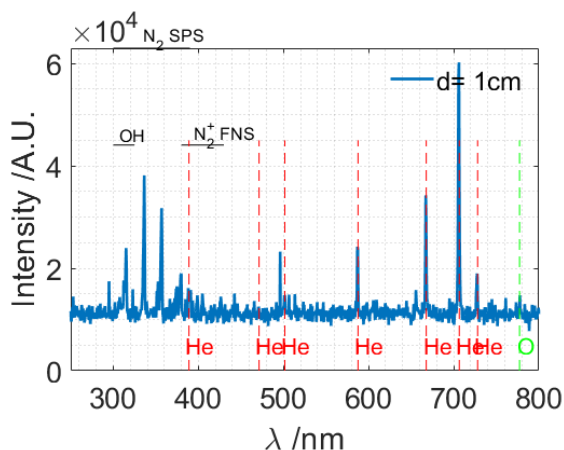


Fig. 13 : Spectre Plasma Needle dans l'air.

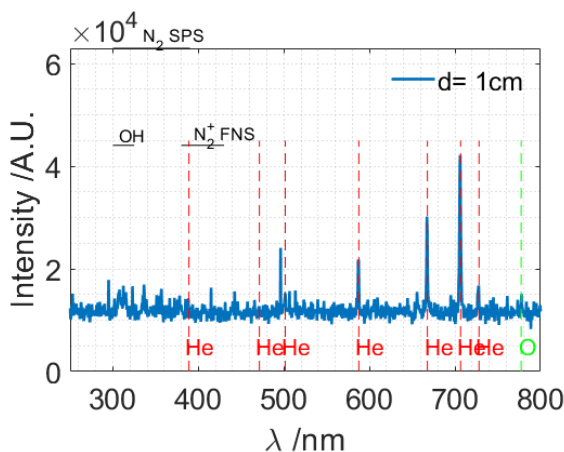


Fig. 14 : Spectre Plasma Needle sur eau.

3.2.2.3 Sur une cible modèle.

Le plasma needle est ensuite inséré dans une aiguille de poulet pour se rapprocher de l'objectif initial qui est de pouvoir traiter in-situ des tumeurs de prostate avec un plasma d'hélium-air dans un milieu qui ne contient pas d'air. L'aiguille est plantée dans une aiguille de poulet et le plasma crée se trouve à l'intérieur. Une faible lueur est néanmoins visible au-dessus de l'aiguille dans le tube. Avec des temps d'exposition de plusieurs secondes, le spectre de la Fig. 15 est obtenu. Il permet de confirmer la création d'un plasma d'hélium-air *in-situ*. On retrouve également le pic de l'oxygène.

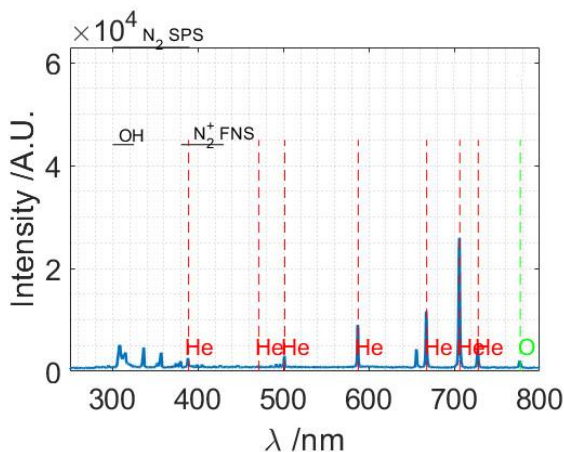


Fig. 15 : Spectre plasma Needle dans un modèle poulet.

4. APPLICATION DES DIPOSITIF SUR CELLULES CANCEREUSES

Des traitements *in-vitro* ont été réalisés sur des cellules cancéreuses afin d'évaluer l'efficacité du dispositif Plasma Needle. Dans ces traitements *in-vitro*, notre objectif a été d'évaluer un éventuel effet cytotoxique du Plasma Jet et du Plasma Needle, spécifiquement dirigé contre des cellules tumorales de cancer prostatique humain. Cette étude a été menée sur une lignée cellulaire de cancer de la prostate métastatique humain : PC3.

Les cellules PC3 ont étéensemencées pendant 24 h dans des plaques à 24 puits, à raison de 90 000 cellules dans 300 μ L de milieu par puits. Elles ont ensuite été soumises à deux traitements :

- Plasma Jet : tension de 9 kV, flux d'hélium de 3 L/min, distance de 1 cm, durée d'exposition variant de 0 à 60 (s).
- Plasma Needle (en surface) : tension de 9 kV, flux d'hélium de 0,2 L/min, flux d'air de 0,02 L/min, durée d'exposition de 1 à 10 (min).

Après 4 h et 24 h d'incubation post-traitement plasma, la viabilité cellulaire a été évaluée à l'aide du test MTS (réactif MTS : [3-(4,5-diméthylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxyméthoxyphényl)-2-(4-sulfophényl)-2H-tétrazolium], Promega, G3580).

4.1.1. Plasma Jet

L'analyse des résultats du test MTS à 4 h et 24 h après exposition au Plasma Jet révèle une diminution significative du pourcentage de cellules MTS-positives (considérées comme vivantes) par rapport aux cellules traitées uniquement avec l'hélium (contrôle positif), en particulier après 30 et 60 (s) d'exposition. Cela témoigne d'une réduction de la prolifération et/ou de l'activité enzymatique de la succinate déshydrogénase mitochondriale dans les cellules tumorales PC3.

Aucune différence significative n'a été observée entre les cellules non traitées (Ctr) et celles traitées uniquement avec l'hélium (contrôle positif). De plus, aucune différence significative n'a été révélée entre les résultats obtenus après 4 heures et 24 heures de post-traitement, ce qui suggère un effet cytotoxique quasi immédiat du Plasma Jet (Fig. 16).

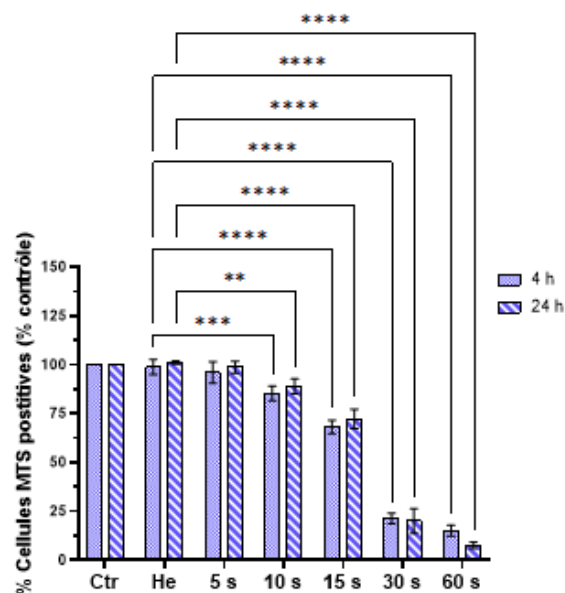


Fig. 16 : Effets du plasma Jet sur la viabilité des cellules PC3 après 4 h et 24 h (Test MTS).

4.1.2. Plasma Needle

Pour des durées d'exposition allant de 5 à 60 (s), équivalentes à celles utilisées pour le traitement par Plasma Jet, le traitement par Plasma Needle appliqué en surface s'est révélé moins efficace. Aucune diminution significative de la viabilité cellulaire n'a été observée pour ces temps courts, ce qui nous a conduits à prolonger les temps d'exposition de 1 à 10 (min) afin d'évaluer l'effet du Plasma Needle.

Les résultats du test MTS avec le Plasma Needle montrent une diminution du pourcentage de cellules MTS positives dès 3 (min) d'exposition, particulièrement marquée à 10 (min), après 4 h de traitement, par rapport au contrôle positif (He + Air). Cette diminution est encore plus significative après 24 h. Toutefois, à 4 h comme à 24 h, aucune différence significative n'a été observée entre le contrôle positif (He + Air) et le contrôle (Ctr) (Fig. 17).

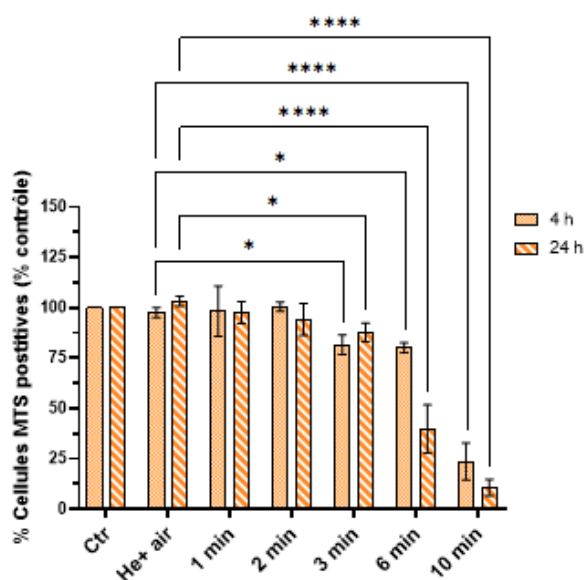


Fig. 17 : Effets du plasma Needles en surface sur la viabilité des cellules PC3 après 4 h et 24 h (Test MTS).

Dans l'ensemble, le Plasma Jet induit une diminution de la viabilité cellulaire avec des temps d'exposition plus courts (30-60 (s)), en lien avec une réduction de la prolifération et/ou de l'activité enzymatique mitochondriale, comparé au Plasma Needle, qui nécessite des durées d'exposition plus longues (6-10 (min)). Afin d'approfondir ces résultats, des expériences *ex-vivo* sont prévues. Elles consisteront à exposer des cellules PC3 intégrées dans un insert d'agar, afin d'évaluer l'effet du Plasma Needle en condition d'immersion dans un environnement se rapprochant des conditions *in-vivo*.

5. TRAITEMENT *IN-VIVO*

Des traitement *in-vivo* sont en cours sur des modèle murins PTEN^{PC}. Dans notre cas, deux catégories de PTEN ont été utilisés : les Cre- (ou Wild-type) qui ne développent pas de tumeurs, et les Cre+ qui en développent. Ces modèles disposent de marqueurs fluorescents qui permettent de suivre l'évolution des tumeurs cancéreuses [6]. Le protocole de traitement pour le

Plasma Jet et le Plasma Needle est le suivant : les souris subissent une procédure chirurgicale sous anesthésie générale durant laquelle le lobe antérieur est sorti pour être exposé au plasma froid. Une semaine seulement après traitement, l'euthanasie a lieu, le bloc uro-génital est photographié puis récolté en vue d'être analysé. Des résultats préliminaires avec le Plasma Jet sont présentés dans [6]. Les résultats complets avec le Plasma Needle ne sont pas présentés ici car en cours de réalisation, ils seront présentés dans une prochaine communication.

6. CONCLUSION

Deux systèmes à base de plasma froids sont étudiés le Plasma Jet et le Plasma Needle, les puissances fournies par le plasma au niveau du générateur sont similaires, toutefois la puissance fournie à la cible dans le cas du Plasma Needle est moindre que pour le Plasma Jet ceci compte tenu des pertes dans le cathéter et des débits d'hélium et d'air faibles.

L'analyse spectroscopique montre que les espèces de l'hélium et de l'air traditionnellement observées sont présentes. L'utilisation du needle en situation réelle (modèle poulet) montre surtout qu'un plasma d'air est créé quand le dispositif est planté dans un milieu organique.

Les essais *in-vitro* montrent que le Plasma Jet a un effet rapide et immédiat sur les cellules cancéreuses, alors que le Plasma Needle nécessite une durée de traitement plus longue. Une étude *ex-vivo* sera réalisée pour confirmer ces résultats.

Les essais *in-vivo* avec le Plasma Jet ont montrés leur efficacité [6], les essais avec le Plasma Needle actuellement en cours.

7. REMERCIEMENTS

Ce projet a été financé par l'Institut National du Cancer PLBIO 022-117 (INCA_16714).

8. REFERENCES

- [1] Fridman, G., Shereshevsky, A., Jost, M.M. et al. Floating Electrode Dielectric Barrier Discharge Plasma in Air Promoting Apoptotic Behavior in Melanoma Skin Cancer Cell Lines. *Plasma Chem Plasma Process* 27, 163–176 (2007). <https://doi.org/10.1007/s11090-007-9048-4> Kumar Dubey S. et al. (2022) *Drug Disc. Today* 27(9):2425-2439.
- [2] Yan D., Sherman J. H., Keidar M. Cold atmospheric plasma, a novel promising anti-cancer treatment modality. *Oncotarget*. 2017; 8: 15977-15995. Retrieved from <https://www.oncotarget.com/article/13304/text/>.
- [3] Fofana M, Buñay J, Judée F, Baron S, Menecier S, et al.. Selective treatments of prostate tumor cells with a cold atmospheric plasma jet. *Clinical Plasma Medicine*, 2020, 17-18, pp.100098. (10.1016/j.cpm.2020.100098). (hal-04004972)
- [4] Limanowski R, Yan D, Li L, Keidar M. Preclinical Cold Atmospheric Plasma Cancer Treatment. *Cancers*. 2022; 14(14):3461. <https://doi.org/10.3390/cancers14143461>
- [5] Yan D, Malyavko A, Wang Q, Lin L, Sherman JH, Keidar M. Cold Atmospheric Plasma Cancer Treatment, a Critical Review. *Applied Sciences*. 2021; 11(16):7757. <https://doi.org/10.3390/app11167757>
- [6] Moreau M. (2024) Thèse de l'UCA « Vers un traitement du cancer de la prostate par plasma froid » Soutenue le 02/12/2024.
- [7] Menecier S, Perisse F, Baron S, Lobaccaro JM, Moreau M, Ghzaïel I, Sanmukh SG. Dispositif de traitement par plasma atmosphérique froid. Dépôt de brevet en cours.