



HAL
open science

Production et caractérisation d'un substitut dermique humain pour étudier la réponse de la matrice extracellulaire dans les phénomènes d'électroporation

Moinecha Madi

► **To cite this version:**

Moinecha Madi. Production et caractérisation d'un substitut dermique humain pour étudier la réponse de la matrice extracellulaire dans les phénomènes d'électroporation. Biologie cellulaire. Université Paul Sabatier - Toulouse III, 2017. Français. NNT : 2017TOU30397 . tel-02980764

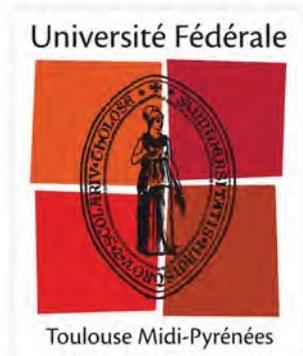
HAL Id: tel-02980764

<https://theses.hal.science/tel-02980764v1>

Submitted on 27 Oct 2020

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.



THÈSE

En vue de l'obtention du

DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ DE TOULOUSE

Délivré par :

Université Toulouse 3 Paul Sabatier (UT3 Paul Sabatier)

Présentée et soutenue par :

Moinecha Madi

le 18 Septembre 2017

Titre :

Production et caractérisation d'un substitut dermique humain pour étudier la réponse de la matrice extracellulaire dans les phénomènes d'électroporation

École doctorale et discipline ou spécialité :

ED BSB : Biotechnologies

Unité de recherche :

Institut de Pharmacologie Structurale du CNRS , UMR 5089

Directeur/trice(s) de Thèse :

Mme Marie-Pierre Rols, Directrice de recherche (CNRS, Toulouse)

Mme Laure Gibot, Chargé de recherche (CNRS, Toulouse)

Jury :

M. Olivier Lambert, Directeur de recherche (CBMN-CNRS, Bordeaux), Rapporteur

M. Romain Debret, Chargé de recherche (IBCP/LBTI-CNRS, Lyon), Rapporteur

Jean-Michel Escoffre, Chargé de recherche (INSERM, Tours), Examineur

A mes Grands-parents,

Mes parents,

Sam et Siham

Remerciements

Je tiens d'abord à remercier mes deux rapporteurs pour avoir accepté de juger ce travail de thèse : Monsieur Olivier LAMBERT, directeur de recherche au laboratoire de Chimie & Biologie des Membranes et Nano-objets (CBMN) à l'Université de Bordeaux 1, et Monsieur Romain Debret, chargé de recherche au laboratoire de Biologie Tissulaire et Ingénierie Thérapeutique (IBCP-LBTI) à l'Université Claude Bernard de Lyon 1. Merci pour vos commentaires et critiques qui permettront d'améliorer et compléter ce manuscrit.

Je remercie également Monsieur Jean Michel Escoffre, chargé de recherche à l'Inserm dans le laboratoire d'Imagerie et Cerveau, à l'Université François-Rabelais de Tours d'avoir accepté de faire partie de mon jury en tant qu'examinateur.

Je remercie Monsieur Michel Simon et le professeur Bahraoui d'avoir accepté de participer à mon jury de comité de thèse, et pour tous leurs conseils judicieux qu'ils m'ont donnés pour la suite de ce projet.

Je tiens à remercier vivement mes deux directrices de thèse Mme Marie-Pierre Rols et Mme Laure Gibot. Merci Marie Pierre de m'avoir accueillie chaleureusement au sein de ton équipe, de m'avoir fait confiance et pour tout le soutien moral et scientifique. Merci Laure de m'avoir guidé et transmis une partie de ton savoir-faire. Tu as toujours été disponible pour superviser mes travaux et tes suggestions m'ont énormément aidé dans la poursuite de cette thèse. Merci à vous deux pour tous vos conseils judicieux, vos connaissances et encouragements m'ont permis de dépasser les moments difficiles de cette thèse. Merci car je pense que cette opportunité de thèse m'a permis d'évoluer et de m'améliorer non seulement professionnellement mais aussi humainement.

Je remercie également les personnes du laboratoire avec qui j'ai travaillé, pour leur contribution qui a beaucoup apportée à mon travail de doctorat. Tout spécialement un énorme merci à Elisabeth (Babeth), sans qui cette thèse ne serait pas ce qu'elle est. Malgré ton planning, tu te débrouilles toujours pour être disponible (avec le sourire) pour m'aider et m'expliquer les tenants et aboutissants de la microscopie multiphoton sans oublier l'analyse.

Muriel merci pour ton écoute et les différents conseils scientifiques et humains qui ont influencé positivement mon travail, tu m'as éclairé plus d'une fois. Je vais garder un souvenir particulier pour ton rire contagieux !

Merci Flavien pour ta constante bonne humeur et tes conseils précieux, qu'ils soient scientifiques ou pour mon potager ! Merci de m'avoir appris à fabriquer des électrodes, ça a permis de débloquer la suite de mon projet.

Merci à toi Nathalie pour les remarques et conseils toujours juste et pertinents qui m'ont permis de me remettre en question et d'avancer. Ton humour et tes sessions musicales freestyles vont me manquer.

Je remercie Mr Teissié pour les conseils et encouragements notamment dans le cadre de ma présentation orale lors du GSO sur le modèle 3D et ses applications en oncologie.

Je tiens à remercier toute l'équipe de la plateforme de microscopie électronique, particulièrement Isabelle Fourquaux pour son travail méticuleux.

J'aimerais adresser un remerciement au conseil départemental de Mayotte pour m'avoir soutenue en m'octroyant une bourse pour ce projet de recherche à travers la DPSU. Merci à Mme Paillat pour s'être démenée pour répondre à mes multiples questions.

Laetitia merci pour ton écoute et les pauses café (sans café).

Merci aussi à Mylène pour toute ton aide au niveau administratif, je sais que mon cas était un casse-tête.

A tous mes collègues passés et présents merci pour la bonne ambiance générale, les sourires et les encouragements et votre gentillesse qui ont facilité mon intégration au sein du groupe : Charlotte, Amar, Caro, Matilde, Vincent, Laurent, Camille, Audrey, Houda, Eric, Natasha, Lise ...

Merci à Delphine Milhas pour m'avoir permis de découvrir l'enseignement.

Merci à tous mes amis qui m'ont encouragé et comme d'habitude beaucoup fait rire : Jennifer, Clara, Loriane, Magalie, Esther, Gabriel, Ursula, Mamyna, Taslima, Cynthia, Capucine, Annah, Sylvain, Amour, Céline, Rama, Romain...

Enfin merci aux membres de ma famille, plus spécialement à mes parents, qui m'ont transmis leurs valeurs et ont tout mis en œuvre pour que ma vie future soit agréable. Ils m'ont toujours poussée et soutenue et je sais qu'ils continueront encore. Un merci tout particulier à ma moitié, tu as beaucoup supporté et tu as été énormément présent pour m'encourager et me soutenir. Je sais que ça n'a pas été toujours facile, merci Sam !

Merci à ma merveilleuse fille d'être ce qu'elle est, tu es ma plus grande source de bonheur Siham! Grâce à toi je vois la vie autrement.

Merci à ma petite sœur pour tout le babysitting qui m'a permis de souffler de temps en temps.

Voilà j'espère n'avoir oublié personne !

Abstract

Electroporation is a physical technique using external electric field application to efficiently deliver therapeutic molecules of interest in targeted tissues. Its principle is based on a transient permeabilization of the plasma membrane, which facilitates the entry of molecules inside the cell. The main clinical application is electrochemotherapy (ECT), a local cancer treatment already used for treatment of primary tumors and metastases. The second medical application of electroporation is gene electrotransfer (GET), which is a method to introduce plasmids inside cells. Electroporation is also a method used to kill cells, through permanent plasma membrane permeabilization, called irreversible electroporation (IRE). Even if the *in vitro* mechanisms are more and more understood, *in vivo* effectiveness remains partial, depending on the targeted tissue type. Indeed, although DNA electrotransfer is highly effective for gene delivery on 2D cell culture *in vitro*, it is often much less efficient *in vivo*, which leads to a limited use for clinical applications.

In vivo tissue organization is more complex than cell culture *in vitro* since cells develop intercellular junctions and produce extracellular matrix (ECM). The ECM composition was shown *in vivo* to modulate gene electrotransfer efficiency, so it seems to play a role in the mechanisms governing the biodistribution of DNA in a complex environment. Very little is known about ECM role and response to electric field application in this process. A better understanding of the effects of the electric field on the ECM would improve the efficiency of this method.

Classical 2D models used for the study of electroporation do not exhibit this three-dimensional (3D) architectural organization allowing them to be physiologically comparable to native tissue. In order to study DNA electrotransfer mechanisms at tissue scale, we integrate the use of human 3D skin model that helps to mimic and predict *in vivo* situation. The objectives of this work were to investigate the role and response of cutaneous ECM during gene electrotransfer at tissue scale.

The first part of this project was to characterize the ECM content of a 3D reconstructed human dermal substitute produced by tissue engineering. ECM was characterized in this tissue by electron microscopy, histology staining and generation of second harmonic (SHG). To assess if this model can efficiently mimic the *in vivo* response observed during electroporation, a range voltage using ECT or GET electrical parameters were apply and cell permeabilization as well as plasmid expression were analyzed on fresh tissue by two-photon microscopy. In the second part, we studied direct and indirect effects of pulsed electric field on the fibrillary collagens. Defined pulsed electric fields with ECT, GET and IRE parameters were applied directly under two-photon microscope in order to visualize in live SHG modifications.

In conclusion, human dermal skin substitutes rich in endogenous extracellular matrix were produced according to the self-assembly approach. Our study shows that the cells within this 3D tissue can be efficiently electropermeabilized. A reporter gene was successfully electrotransferred into this human tissue and the transfected cells were solely located on the surface of the tissue where they are in close contact with plasmid DNA solution. Furthermore, we report evidences that electrotransfection success depends on plasmid mobility within the tissue rich in collagens. Tissue engineering produces valid biological tool for the *in vitro* study of gene electrotransfer mechanisms in human skin. Finally, we observed that electrical parameters classically used in ECT and GET do not modify fibrillar collagens organization both in fresh and decellularized tissue while in contrary those used for IRE significantly and stably decrease SHG intensity in fresh tissue, probably because of a huge release of active metalloproteinases (MMPs). The fibrillar collagens are therefore affected indirectly by the application of IRE electrical pulses.

Résumé

L'électroporation est une méthode physique utilisant le champ électrique pour perméabiliser transitoirement la membrane plasmique afin de faciliter l'entrée de molécules d'intérêt thérapeutique dans les tissus ciblés. La principale application clinique est l'électrochimiothérapie (ECT), un traitement anticancéreux local utilisé pour traiter les tumeurs primaires et métastases. La seconde application est l'électrotransfert de gène (EGT), une méthode pour introduire des acides nucléiques à l'intérieur des cellules. Enfin, l'électroporation irréversible (IRE) est une méthode utilisée pour tuer les cellules grâce à la perméabilisation permanente des membranes plasmiques. Même si les mécanismes *in vitro* sont de mieux en mieux compris, l'efficacité *in vivo* est variable selon le tissu cible. En effet, bien que l'électrotransfert d'ADN soit très efficace *in vitro* sur des cultures en deux dimensions (2D), il est souvent beaucoup moins efficace *in vivo*, ce qui limite ses applications cliniques.

L'organisation du tissu *in vivo* est plus complexe que la culture cellulaire *in vitro* car les cellules développent des jonctions intercellulaires et une matrice extracellulaire (MEC). Des études *in vivo* ont démontré que la composition de la MEC module la biodistribution de l'ADN dans le tissu et donc l'efficacité de l'électrotransfert de gène. La réponse de la MEC à l'application de champ électrique dans ce processus reste encore à définir afin d'améliorer l'efficacité de cette méthode.

Les modèles classiques en 2D ne possèdent pas cette organisation architecturale tridimensionnelle (3D) leur permettant d'être physiologiquement comparable au tissu natif. Afin d'étudier les mécanismes d'électrotransfert d'ADN à l'échelle des tissus, nous avons utilisé un modèle de peau humaine 3D pour imiter et prédire les situations *in vivo*. Les objectifs de ce travail étaient d'étudier le rôle et la réponse de la MEC cutanée lors de l'électrotransfert de gène à l'échelle du tissu.

La première partie de ce projet a été de caractériser la MEC du substitut dermique reconstruit par ingénierie tissulaire. La MEC a été caractérisée par microscopie électronique, coloration histologique et génération de seconde harmonique (SHG). Pour évaluer si ce modèle imite efficacement la réponse *in vivo* observée lors de l'électroporation, une gamme de voltage utilisant des paramètres électriques ECT ou EGT a été appliquée et la perméabilisation cellulaire ainsi que l'expression du plasmide ont été analysées sur tissu frais.

Dans la deuxième partie, nous avons étudié les effets directs et indirects du champ électrique pulsé sur les collagènes fibrillaires. Les paramètres de champs électriques ECT, EGT et IRE ont été appliqués directement sous le microscope à deux photons afin de visualiser les modifications de la SHG en direct.

En conclusion, des substituts dermiques humains riches en MEC endogène ont été produits selon l'approche d'auto-assemblage. Notre étude montre que les cellules de ce modèle 3D sont efficacement électroperméabilisées. Un gène rapporteur a été électrotransféré avec succès dans ce modèle 3D et les cellules transfectées se trouvaient uniquement à la surface du tissu, en contact avec la solution d'ADN plasmidique. En outre, nous avons montré que le succès de l'électrotransfection dépend de la mobilité des plasmides dans les tissus riches en collagènes. L'ingénierie tissulaire produit un outil biologique valide pour l'étude *in vitro* des mécanismes d'électrotransfert de gène dans la peau humaine. Enfin, nous avons observé que les paramètres électriques classiquement utilisés en ECT et EGT ne modifient pas l'organisation des collagènes fibrillaires à la fois dans des tissus vivants et décellularisés, contrairement à ceux utilisés en IRE qui diminuent de manière significative et stable l'intensité de SHG dans les tissus frais, très probablement à cause d'une importante libération de métalloprotéinases (MMPs) actives. Les collagènes fibrillaires sont donc affectés indirectement par l'application d'impulsions électriques IRE.

Table des matières

I. INTRODUCTION BIBLIOGRAPHIQUE	21
1. Traverser la membrane plasmique	21
a. La membrane plasmique : une barrière sélective	21
b. Déstabilisation de la membrane plasmique par des impulsions électriques	30
c. Mécanismes	32
d. Applications médicales	35
e. Electrotransfert de gène : questions en suspend	39
2. Structure, organisation et fonction de la matrice extracellulaire	44
a. Les protéines fibreuses : organisation structurale et élasticité de la matrice	45
b. Les polysaccharides matriciels : résistance de la matrice et réservoir de molécules bioactives	57
c. Les glycoprotéines: cohésion de la matrice	58
d. Les enzymes associées à la matrice	60
e. La peau : un organe riche en matrice extracellulaire	62
3. Ingénierie tissulaire	67
a. Du 2D au 3D	67
b. Modèles de l'ingénierie tissulaire	68

II. OBJECTIFS	73
III. MATERIEL ET MÉTHODES.....	77
1. Culture cellulaire	77
2. Production des modèles tissulaires.....	79
a. Les sphéroïdes	79
b. Le gel de collagène	79
c. Substitut dermique humain reconstruit par ingénierie tissulaire	80
d. Décellularisation des substituts dermiques.....	81
3. Caractérisation morphologique	81
a. Coloration histologique au trichrome de Masson sur cryosections.....	81
b. Microscopie électronique à transmission (MET) et à balayage (MEB)	82
c. Détection des collagènes fibrillaires par génération de seconde harmonique (SHG)	83
4. Application d'un champ électrique pulsé.....	85
a. Matériel utilisé.....	85
b. Tampon de pulsation	87
c. Paramètres électriques	87
d. Marqueur de perméabilité membranaire.....	88
e. Électropermeabilisation des substituts dermiques	88
f. Électrotransfert de gène	89
g. Marquage fluorescent de l'ADN et localisation dans le tissu	89

h.	Électroperméabilisation et suivi de température	89
5.	Viabilité et prolifération	90
a.	Viabilité cellulaire	90
b.	Prolifération cellulaire	90
6.	Détermination de l'activité des métalloprotéinases.....	91
7.	Analyses statistiques	91
IV. ÉLECTROPERMEABILISATION D'UN MODELE TISSULAIRE CUTANE RICHE EN MATRICE EXTRACELLULAIRE.....		93
1.	Le sphéroïde : un modèle 3D de tissu sain ou tumoral	93
2.	Les outils de caractérisation de la matrice extracellulaire.....	96
a.	La microscopie électronique à balayage.....	96
b.	L'histologie.....	97
c.	La génération de seconde harmonique	98
3.	Conclusion : le sphéroïde	100
4.	Le feuillet dermique, un modèle riche en matrice extracellulaire.....	100
a.	Introduction	100
b.	Publication.....	103
c.	Conclusion.....	105

V. LE FEUILLET DERMIQUE POUR ETUDIER LES MECANISMES D'ELECTROTRANSFERT DE GENE DANS UN CONTEXTE PSEUDO-TISSU	107
a. Introduction	107
b. Publication	108
c. Conclusion	109
VI. EFFETS DIRECTS ET INDIRECTS DU CHAMP ELECTRIQUE PULSE SUR LES COLLAGENES FIBRILLAIRES	113
1. Caractérisation des feuillets dermiques décellularisés	115
a. Viabilité	115
b. Organisation de la matrice extracellulaire de l'échelle du micromètre	116
2. Application d'impulsions électriques sur les feuillets vivants et décellularisés	119
a. Analyse de l'épaisseur, de l'aire et de l'intensité de SHG	119
b. L'intensité de SHG est altérée durablement après IRE	121
c. IRE et incrément thermique	122
d. Un modèle simple : le gel de collagène	123
3. Conclusion	125
VII. CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES	127
VIII. BIBLIOGRAPHIE	133
IX. ANNEXE 1 (Frandsen, Gibot et al. 2015)	147
X. ANNEXE 2 (Pillet, Gibot et al. 2017)	150

Liste des figures

Figure 1 : Schéma de la composition lipidique de la membrane plasmique; Structure des composants de la bicouche lipidique : A) Phospholipide ; B) Glycolipide et C) Cholestérol

Figure 2 : Schéma de la structure de la membrane plasmique ; Bicouche lipidique composée de lipides et protéines.

Figure 3 : Schéma des interactions entre la matrice extracellulaire et le cytosquelette via les intégrines.

Figure 4 : Schéma générale des transports actifs et passifs.

Figure 5 : Représentation schématique d'une cellule placée dans le champ électrique

Figure 6 : Différents effets de l'exposition des cellules aux impulsions électriques. Perméabilisation réversible pour l'entrée de médicaments ou d'acides nucléiques et la fusion cellulaire ; Perméabilisation irréversible pour tuer les cellules.

Figure 7 : A) Représentation schématique des différences de potentiel transmembranaire de repos $\Delta\Psi_0$ et induite $\Delta\Psi_i$; B) Courbe représentant la différence de potentiel transmembranaire totale $\Delta\Psi_{tot}$ en fonction de la position sur la membrane et l'angle θ pour une cellule sphérique ; C) Schéma de la série d'impulsions électriques: impulsions d'onde carrée définies par la tension U, durée T, période P ou fréquence f et répétition N.

Figure 8 : Principe et étapes de l'électrochimiothérapie.

Figure 9 : Différentes applications de l'électroporation et les effets obtenus lors de l'application d'impulsions électriques. Applications : Electrochimiothérapie (ECT), Electrotransfert de gène (EGT), Electroporation irréversible (IRE).

Figure 10 : Schéma des différentes barrières biologiques rencontrées par l'ADN plasmidique lors du transfert de gène dans le tissu : 1) La matrice extracellulaire limite la diffusion dans le tissu; 2) L'ADN plasmidique doit traverser la membrane plasmique; 3) Encombrement moléculaire intense dans le cytoplasme et présence de nucléases endogènes; 4) L'ADN plasmidique doit traverser l'enveloppe nucléaire.

Figure 11 : Schéma de l'organisation de la matrice extracellulaire entourant les cellules.

Figure 12 : Représentation d'une chaîne α , un monomère de collagène. Deux représentations de la triple hélice de collagène composé de 3 chaîne α .

Figure 13 : Schéma résumant la biosynthèse du collagène *in vivo*.

Figure 14 : Techniques d'imagerie du collagène. Coloration histologique de la peau humaine A) Coloration hématoxyline-éosine-safran HES, B) Trichrome de Masson ; Fibre de collagène C) Microscope électronique à balayage (gel de collagène) D) Microscope électronique à transmission (substitut dermique).

Figure 15 : Images de SHG endogène. A) SHG bande A du sarcomère muscle gastrocnémien; B) SHG fibres mitotiques et microtubules en interphase dans les cellules RBL; C) SHG collagène issue du tendon de queue de rat.

Figure 16 : Schéma fibre d'élastine, état relâché et étiré.

Figure 17 : Schéma protéoglycane (PG) : protéine cœur centrale et glycosaminoglycane (GAG) ; exemple de l'agrécan, une protéoglycane complexe.

Figure 18 : Schéma représentant les interactions membrane et matrice extracellulaire; exemple de la fibronectine associée au collagène et à une protéine transmembranaire, l'intégrine.

Figure 19 : Représentation schématique de la peau humaine et de ses principaux composants; 3 compartiments : l'épiderme, le derme et l'hypoderme.

Figure 20 : Schéma de la structure de l'épiderme ; un épithélium squameux stratifié kératinisé renouvelé continuellement, composé majoritairement de kératinocytes (90 à 95 %), de mélanocytes et de cellules de Langerhans.

Figure 21 : Schéma du derme ; un tissu conjonctif principalement composé d'une matrice extracellulaire produite par les fibroblastes dermiques.

Figure 22 : Sphéroïde tumoral (cancer colorectal humain) observé au microscope à champ large; Vue schématique d'un sphéroïde multicellulaire.

Figure 23 : Coloration histologique au trichrome de Masson d'une peau native humaine et d'une peau reconstruite par la technique d'auto-assemblage.

Figure 24 : Schéma du protocole de fabrication d'un substitut cutané humain reconstruit par auto-assemblage.

Figure 25 : Schéma récapitulatif des différentes étapes d'extraction des fibroblastes dermiques à partir d'une biopsie cutanée humaine

Figure 26 : Protocole de production des sphéroïdes en plaque 96 puits dans un environnement non-adhérent

Figure 27 : Aspect macroscopique d'un feuillet dermique après 4 semaines de culture avec de l'acide ascorbique. L'ancrage en papier est l'anneau blanc.

Figure 28 : Microscope multiphotonique inversé LSM 710 et droit LSM 7MP

Figure 29 : Analyse 3D de la SHG produite par un feuillet dermique après 4 semaines de culture supplémentée en acide ascorbique pour mesurer l'épaisseur de collagènes. A) vue de dessus B) Isosurface SHG vue du dessus C) Vue transversale D) Isosurface SHG vue transversale.

Figure 30 : Générateur utilisé pour appliquer les impulsions électriques. Trois types d'électrodes ont été développés selon l'objectif : A) Electrodes fils, distance inter électrodes 1 cm ; usage sous le microscope multiphoton droit LSM 7MP, B) Electrodes fils, distance inter

électrodes 0,8 cm ; usage sous le microscope multiphoton inversé LSM 710, C) Electrodes plaques, distance inter-électrodes 1 cm.

Figure 31 : Sphéroïde composé de fibroblastes dermiques après 28 jours de culture complémentée en acide ascorbique. A) Aspect macroscopique en lumière blanche, B) Microscopie électronique à balayage.

Figure 32 : Courbe de croissance des sphéroïdes. (N= 10) Surface mesurée avec le logiciel Image J. Courbe rouge milieu avec A.Asc et noire sans A.Asc ; A.Asc = acide ascorbique.

Figure 33 : Observation par microscopie électronique à balayage de sphéroïdes dermiques après 30 jours de culture avec milieu complémenté en acide ascorbique. A. Aspect global. B. Détail de la surface entre les cellules.

Figure 34 : Coloration histologique au trichrome de Masson d'un sphéroïde dermique. A. vue d'ensemble. B. Détail de la surface. C. Détail du cœur. Les collagènes sont marqués en bleu et les cellules en rouge.

Figure 35 : Schéma du dispositif d'observation des sphéroïdes au microscope à deux photons pour observer les collagènes fibrillaires grâce à la génération de signal de seconde harmonique.

Figure 36 : Génération de seconde harmonique d'un sphéroïde dermique après 30 jours de culture avec milieu complémenté en acide ascorbique. Bleu = SHG. Pointillés = contour du sphéroïde.

Figure 37 : Feuillet dermique après 4 semaines de culture avec du milieu complémenté avec de l'acide ascorbique. Anneau blanc = ancrage en papier pour faciliter la manipulation du feuillet. A) Plaque 24 puits avec feuillets, B) Feuillet dermique au fond du puits, C) Feuillet dermique manipulé.

Figure 38 : Caractérisation multi-échelle de la matrice extracellulaire et plus spécifiquement des collagènes dans un substitut dermique humain. Microscopie électronique à transmission (MET), microscopie électronique à balayage (MEB), génération de seconde harmonique (SHG).

Figure 39 : Observation de l'électroperméabilisation des cellules dans un substitut dermique humain. A) Vue du dessus, B) Vue transversale. Les collagènes sont observés par génération de seconde harmonique. Les cellules électroperméabilisées efficacement sont marquées en rouge grâce à l'iodure de propidium. Paramètres électriques : 200 V/cm ; 1Hz ; 5 ms ; x10.

Figure 40 : Electrotransfert d'un plasmide rapporteur marqué de façon fluorescente avec l'intercalant de l'ADN TOTO-1 sur une monocouche de fibroblastes dermiques ; paramètres électriques : 500 V/cm ; 1Hz ; 5 ms ; x10.

Figure 41 : Mesure de la viabilité par PrestoBlue de feuillets dermiques vivants (CTRL) et décellularisés par choc osmotique ou par cycles de congélation/décongélation (Congeler/DC).

Figure 42 : Coloration histologique au trichrome de Masson de feuillets dermiques vivants (CTRL) et décellularisés par choc osmotique ou par cycles de congélation/décongélation (Congeler/DC). Les cellules sont marquées en rouge et les collagènes en bleu.

Figure 43 : Caractérisation par microscopie électronique à balayage de feuillets dermiques vivants (CTRL) et décellularisés par choc osmotique ou par cycles de congélation/décongélation (Congeler/DC)

Figure 44 : Analyse de la SHG de feuillets dermiques vivants (CTRL) et décellularisés par choc osmotique ou par cycles de congélation/décongélation (Congeler/DC). A) Collagènes fibrillaires observés par génération de seconde harmonique au microscope multiphotonique; B) Volume occupé par la seconde harmonique par μm^3 de tissu, estimé avec le logiciel de traitement d'image Imaris. * : $p < 0,01$; N= 18

Figure 45 : Analyse de l'épaisseur (panel A) et de l'aire (panel B) de la seconde harmonique des substituts dermiques contrôles et décellularisés ; Traitement : ECT (1000 V/cm, 1Hz, 100 μs , 8 impulsions); EGT (800 V/cm, 1Hz, 5 ms, 10 impulsions); IRE (2000 V/cm, 0,3 Hz, 100 μs , 80 impulsions) (N=6)

Figure 46 : Analyse de l'intensité de seconde harmonique des substituts dermiques ; Traitement : A) ECT (1000 V/cm, 1Hz, 100 μs , 8 impulsions); B) EGT (800 V/cm, 1Hz, 5 ms, 10 impulsions); C) IRE (2000 V/cm, 0,3 Hz, 100 μs , 80 impulsions) (N = 6-9) ; *** : $p < 0,001$

Figure 47 : Suivi dans le temps de l'intensité de la seconde harmonique de feuillets dermiques vivants (CTRL (Gris)) et décellularisés par choc osmotique (rouge) ou par cycles de congélation/décongélation (Congeler/DC (noire)). Les stacks 3D sont pris toutes les 15 minutes (N=6).

Figure 48 : Suivi de la température durant l'application des impulsions IRE (2000 V/cm, 0,3 Hz, 100 μs et 80 impulsions) sur A, des feuillets dermiques vivants (CTRL) et décellularisés par B, choc osmotique ou C, par cycles de congélation/décongélation (Congeler/DC). (N=3)

Figure 49 : Image de génération de seconde harmonique d'un gel de collagène acellulaire

Figure 50 : Intensité du signal de seconde harmonique des gels de collagène acellulaire (N=6).

Figure 51 : Dosage des MMPs actives dans les feuillets contrôles ou traités en IRE (2000 V/cm, 0,3 Hz, 100 μs et 80 impulsions). ZAP : milieu de pulsation seul traité ; CTRL : feuillets vivants non traité. IRE : Feuilletts vivants traités avec les paramètres IRE

Figure 52 : Fibres nerveuses dans le muscle cremaster A) Nerf périphérique (bleu) entouré de fibres de collagène (SHG rouge, vert); B) Les signaux THG produits par les nerfs, les vaisseaux sanguins et d'autres petites structures; D) Collagène SHG entourant le nerf.

Liste des tableaux

Tableau 1: Principales techniques physiques de transfert de gène.

Tableau 2: Famille de collagène : Récapitulatif des différents types de collagène

Tableau 3: Types de collagène : Récapitulatif des différents types de collagènes, leurs distributions dans les tissus et de leurs caractéristiques notables.

Tableau 4: Protocole de production d'un gel de collagène.

Tableau 5: Paramètres électriques appliqués en électrochimiothérapie (ECT) électrogénéothérapie (EGT) et électroporation irréversible (IRE).

Tableau 6: Récapitulatif des paramètres appliqués en ECT, EGT et IRE.

Abréviations

2D : Deux dimensions

3D : Trois dimensions

A.Asc : Acide ascorbique

ADN : Acide Désoxyribonucléique

ARN : Acide ribonucléique

ATP : Adénosine triphosphate

CS : Chondroïtine sulfate

DDC : Cellules dendritiques du derme

DS : Dermatan sulfate

ECT : Electrochimiothérapie

EGT : Electrogénothérapie

EP : Seuil de perméabilisation

GAG : Glycosaminoglycane

GFP : Green fluorescent protein

HS: Héparane sulfate

IP : Iodure de propidium

IRE: Irreversible electroporation

KS : Kératane sulfate

LOX : Lysyl oxydase

MEB : Microscope électronique à balayage

MEC : Matrice extracellulaire

MET: Microscope électronique à transmission

MIP : Maximum intensity projection

MMP: Métalloprotéinase

PG : Protéoglycane

SHG : Génération de seconde harmonique

THG: Génération de troisième harmonique

TIMP: Tissue inhibitors of metalloprotéinases

ULA : Ultra Low Attachement

UV : Ultra violet

VEGF : Vascular endothelial growth factor

VIH : Virus de l'immunodéficience humaine

I. INTRODUCTION BIBLIOGRAPHIQUE

1. Traverser la membrane plasmique

a. La membrane plasmique : une barrière sélective

Chaque cellule du corps est entourée par une membrane plasmique, une structure dynamique qui assure des fonctions fondamentales pour la cellule. Les rôles principaux de la membrane plasmique sont la délimitation de la taille et de la forme de la cellule, ainsi que le rôle de barrière hydrophobe sélective assurant les échanges avec l'extérieur. Elle se retrouve sans exception dans toutes les cellules connues, avec toujours les mêmes caractéristiques, une composition à la fois lipidique et protéique. La structure de la membrane est une bicouche phospholipidique, qui forme une barrière stable entre les deux compartiments intracellulaires et extracellulaires (Edidin 2003).

i. Structure : bicouche lipidique

Lipides

Les phospholipides, les composants principaux des membranes cellulaires, sont constitués de deux chaînes hydrocarbonées (généralement des acides gras), qui sont reliées à une tête polaire contenant un groupe phosphorique en tant que mono/di-esther (Figure 1A). Les phospholipides s'arrangent spontanément en bicouche avec la tête polaire hydrophile faisant face au milieu aqueux à l'extérieur et à l'intérieur de la cellule. Les queues hydrophobes se font face les unes aux autres et sont ainsi maintenues à l'écart de l'eau dans la bicouche lipidique. Quatre classes de lipides sont présents majoritairement dans la membrane plasmique des cellules animales (phosphatidylcholine, phosphatidyléthanolamine, phosphatidylsérine, phosphatidylinositol) (Figure 1) (Van Meer, Voelker et al. 2008).

En plus des phospholipides, deux autres types de lipides sont présents dans la membrane plasmique. D'une part les glycolipides sont un composant mineur de la membrane qui ont la même structure que les phospholipides à l'exception du groupement phosphate remplacé par une chaîne de carbohydrate composée de différents sucres (Figure 1B). Les glycolipides se trouvent uniquement sur le côté faisant face au milieu extracellulaire. D'autre part, le cholestérol, un constituant majeur des membranes plasmiques des cellules animales, est un

lipide constitué de quatre anneaux hydrocarbonés (Figure 1C). Selon la température, le cholestérol a des effets distincts sur la fluidité de la membrane ce qui influe sur la perméabilité membranaire à la plupart des molécules telles que l'eau, les ions et autres molécules hydrophiles (Maxfield and van Meer 2010).

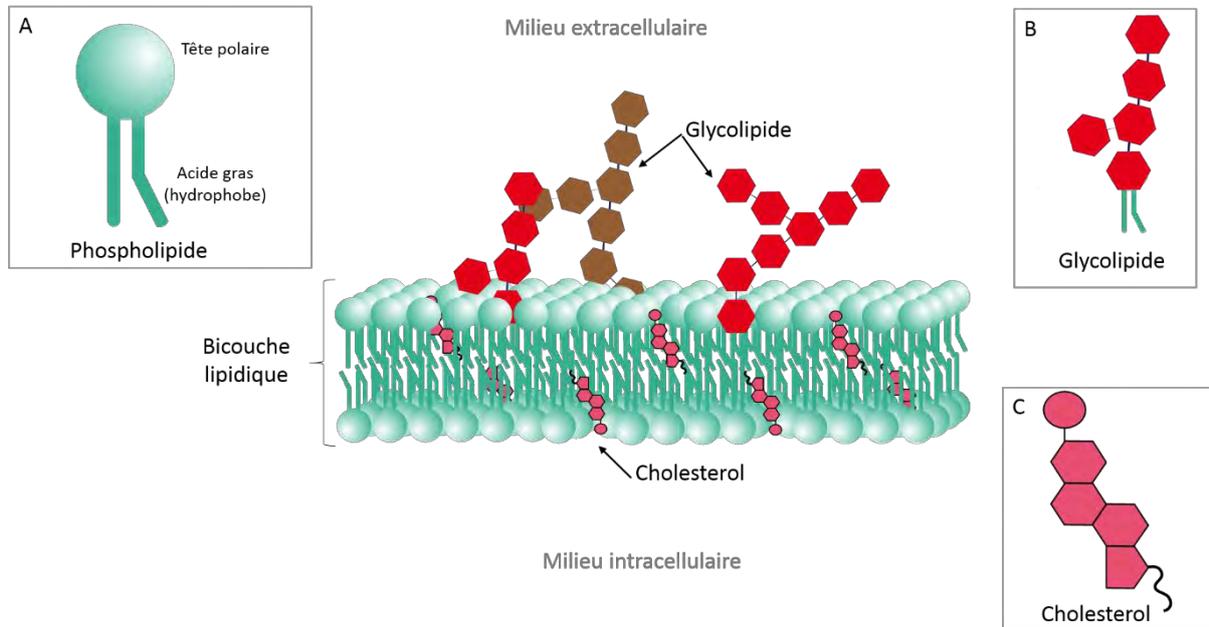


Figure 1: Schéma de la composition lipidique de la membrane plasmique; Structure des composants de la bicouche lipidique : A) Phospholipide ; B) Glycolipide et C) Cholestérol Réalisé à partir du modèle membranaire de Singer et Nicholson

Protéines

La bicouche lipidique est la base des membranes cellulaires, les protéines membranaires constituent environ 50% de la masse de cette structure. Il existe plusieurs types de protéines associées à la membrane plasmique, elles peuvent se résumer à deux classes nommées protéines membranaires transmembranaires et périphériques.

Les protéines membranaires intrinsèques, transmembranaires possèdent au moins une région hydrophobe qui les ancre au cœur hydrophobe de la bicouche phospholipidique. Elles traversent ainsi toute l'épaisseur de la membrane plasmique avec leur partie hydrophile visible de part et d'autre de la membrane (Figure 2). Elles sont importantes pour la signalisation cellulaire en aidant le système immunitaire à reconnaître les cellules du soi et à l'adhésion cellulaire en contribuant à la liaison des cellules entre elles dans les tissus.

La plupart des portions extracellulaires des protéines de la membrane plasmique sont glycosylées, en conséquence, la surface de la cellule est couverte par une couche de glucides, appelée glycocalyx, formée par les carbohydrates des glycolipides et des glycoprotéines transmembranaires (Goñi 2014).

D'autres protéines membranaires, dites périphériques ne sont pas insérées dans la partie hydrophobe de la bicouche lipidique (Figure 2). L'insertion membranaire peut être rendue possible par la présence d'une partie acylée. L'acylation est la liaison covalente de la protéine avec un acide gras qui va changer son hydrophobicité et permettre l'ancrage de la protéine à la membrane. Il existe d'autres types d'interactions par exemple via les hélices α amphipatiques parallèles au plan membranaire ou les interactions électrostatiques directes ou indirectes avec les lipides membranaires. Certaines se tiennent juste à la surface, ancrées directement à la bicouche lipidique par quelques liens ioniques sur la face intérieure. Ces protéines sont retrouvées sur la surface externe ou interne de la membrane et contrairement aux protéines transmembranaires, les protéines périphériques peuvent avoir des connexions plus faibles et temporaires à la membrane. Parmi ces protéines membranaires, les glycoprotéines sont définies par la chaîne de carbohydrate attachée à la partie extracellulaire de la protéine.

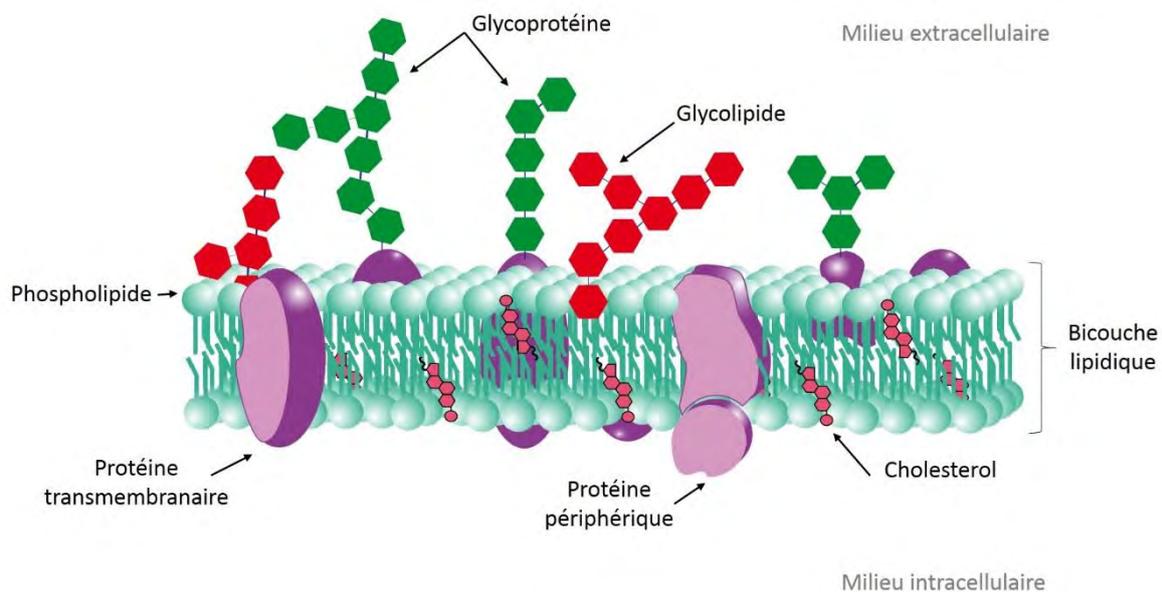


Figure 2: Schéma de la structure de la membrane plasmique ; Bicouche lipidique composée de lipides et protéines. Réalisé à partir du modèle membranaire de Singer et Nicholson (Bretscher 1985).

ii. Fonctions

La fonction première de la membrane plasmique est de délimiter l'entité cellulaire pour protéger son contenu, elle assure plusieurs autres rôles indispensables à la cellule qui a besoin de se développer, se diviser, se mouvoir, et également d'évacuer les déchets de son métabolisme. La dynamique des lipides, protéines, glycoprotéines et glycolipides membranaires permet à la membrane plasmique d'assurer ces différentes fonctions. Parmi les grandes fonctions la membrane plasmique assure le transport d'information, grâce aux récepteurs spécifiques qu'elle contient. Elle permet ou non le transport de matière (ions, molécules) en fonction des produits, par diffusion ou par des transports actifs nécessitant de l'énergie.

Rôle structural

Le compartiment cellulaire est défini par la bicouche lipidique. En général les protéines sont libres de circuler latéralement mais quelques protéines ont une mobilité latérale limitée par leur association au cytosquelette qui est un réseau de filaments de protéines qui s'étend à travers le cytoplasme de la cellule. Il est responsable des mouvements cellulaires, fournit le cadre structural et détermine la forme de la cellule. Ces interactions avec les composants du cytosquelette font de la membrane plasmique un acteur dynamique de la structure cellulaire.

En outre, la membrane plasmique est directement connectée avec la matrice extracellulaire qui entoure la cellule. Les protéines capables de créer ce lien sont essentiellement les intégrines. Des protéines de la matrice extracellulaire, telles que la fibronectine (figure 3), peuvent servir de ponts entre les intégrines et d'autres protéines de la matrice extracellulaire (le collagène). Ces connections permettent à la cellule de s'ancrer dans la matrice extracellulaire, mais aussi de détecter des modifications chimiques ou mécaniques dans son environnement qui peuvent déclencher une réponse cellulaire. La liaison entre la membrane plasmique et la matrice extracellulaire via les intégrines et l'actine montre le rôle central de la membrane dans la structure et dans les fonctions de communication cellulaire. Les protéines membranaires sont également impliquées dans la structure des tissus via les interactions cellule-cellule avec les jonctions intercellulaires (Akiyama, Yamada et al. 1981; Garcia, Nelson et al. 2017).

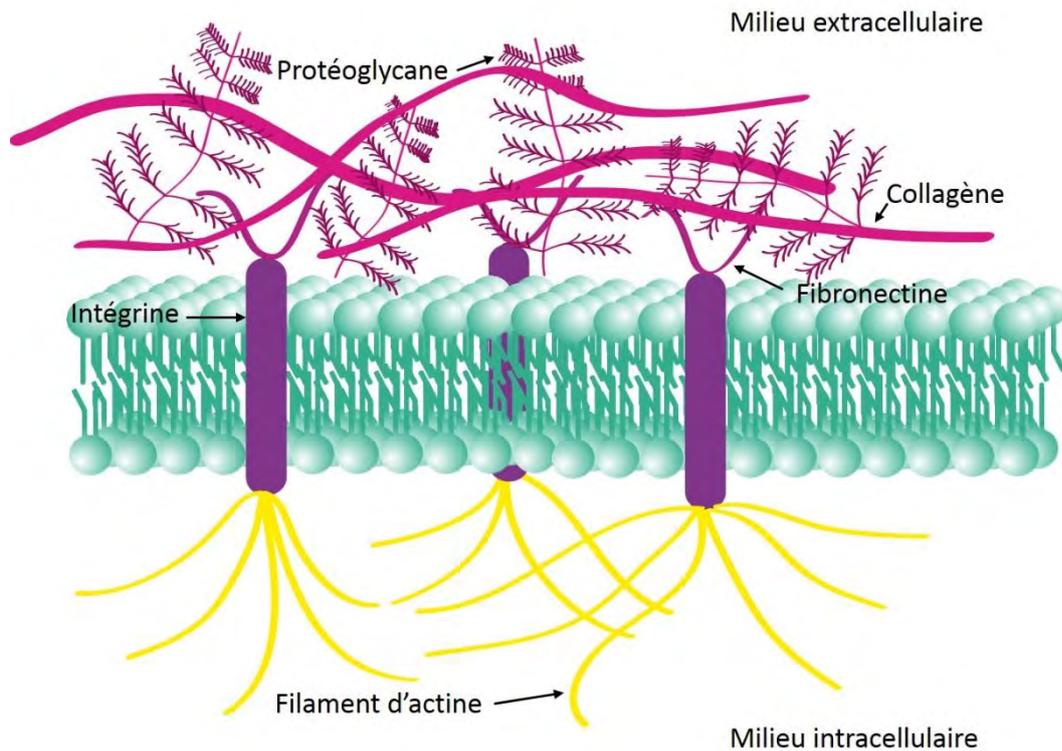


Figure 3: Schéma des interactions entre la matrice extracellulaire et le cytosquelette via les intégrines. Réalisé à partir Alberts, Bray et al. 1999

Les chaînes hydrocarbonées des acides gras permettent aux phospholipides de se déplacer librement à l'intérieur de la membrane ce qui procure à la membrane plasmique des propriétés de flexibilité et de fluidité critiques pour de nombreuses fonctions membranaires. Cette fluidité membranaire associée au réseau du cytosquelette se traduit par une structure modulable de la cellule comme par exemple lors des divisions ou des migrations cellulaires.

Rôle de barrière/filtre

L'intérieur de la bicouche des phospholipides est occupé par des chaînes d'acides gras hydrophobes, rendant la membrane imperméable aux molécules hydrophiles des deux côtés. La membrane plasmique agit également comme une barrière sélective de la matière telle que les ions et la plupart des macromolécules biologiques. Elle permet ainsi un passage suffisant d'oxygène, de nutriments et de déchets pour permettre à la cellule de fonctionner. La plupart des protéines intégrales déterminent les fonctions spécifiques de la membrane

plasmique dont certaines sont impliquées dans la circulation des molécules à travers celle-ci (Quastel 1965).

Les modes de transport au travers de la membrane plasmique sont classés en deux catégories, le passage passif et le passage actif. Le mouvement ionique qui ne nécessite pas d'énergie s'appelle le transport passif alors que les systèmes de transport actifs utilisent de l'énergie pour déplacer les molécules.

Dans le cadre du transport passif la diffusion est le mouvement des molécules grâce à leur gradient de concentration, du compartiment le plus concentré vers le moins concentré jusqu'à l'équilibre des concentrations. C'est le phénomène par lequel l'oxygène et le dioxyde de carbone circulent dans les cellules. D'autres molécules, telles que le glucose, utilisent le gradient de concentration assisté d'une protéine de transport qui en changeant de conformation va acheminer le glucose à travers la membrane. Ce phénomène de transport passif qui n'utilise pas d'énergie, est appelé transport facilité (Figure 4 A).

Pour le transport actif de molécules contre leur gradient de concentration, des protéines de transport, généralement appelées des pompes, et de l'énergie (ATP) sont nécessaires (Figure 4 B).

Malgré leur gradient de concentration, les macromolécules telles que les polypeptides ont une taille trop importante pour traverser la membrane. Elles sont transportées dans la cellule par une invagination de la membrane, selon un phénomène appelé endocytose, formant des vésicules à la surface qui vont englober les macromolécules puis migrer dans le cytoplasme. L'endocytose peut suivre différentes voies, la pinocytose et la phagocytose, cette dernière n'a lieu que dans des types cellulaires spécifiques (macrophages, neutrophiles et cellules dendritiques). La pinocytose concerne toutes les cellules et se divise en plusieurs voies dépendantes ou indépendantes de la clathrine. Le transport inverse du milieu intracellulaire vers le milieu extracellulaire est effectué par exocytose. Ainsi, des vésicules provenant du golgi vont fusionner avec la membrane plasmique pour libérer les éléments contenus dans les vésicules vers le milieu extérieur (Gundelfinger, Kessels et al. 2003) (Figure 4 C).

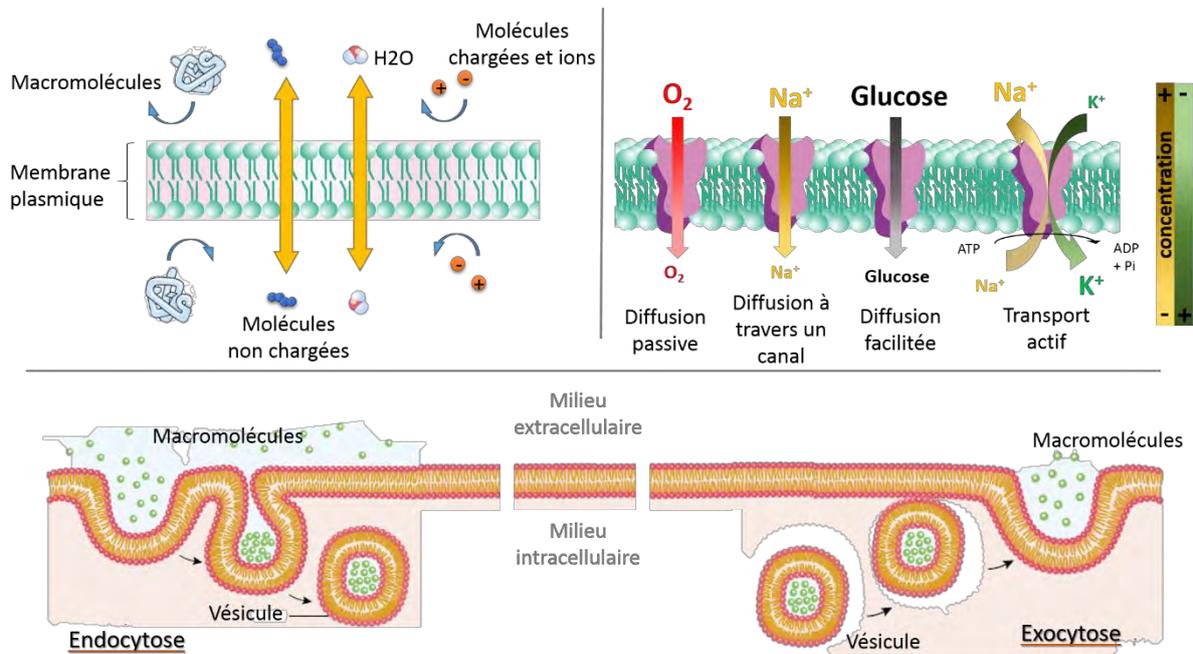


Figure 4: Schéma générale des transports actifs et passifs Réalisé à partir de www.mhhe.com/biosci/genbio/maderinquiry9/etext/chapt04.pdf

La circulation de molécules assure la survie de la cellule mais lui permet aussi de communiquer avec son environnement de manière contrôlée.

iii. Stratégies de vectorisation pour passer cette barrière

Dans un contexte physiologique, la membrane plasmique garantit donc l'intégrité de la cellule tout en contrôlant les échanges entre le milieu extérieur et intérieur. En médecine tout comme dans l'industrie pharmaceutique de nombreuses applications requièrent l'administration localisée de molécules thérapeutiques dans les cellules, telles que les médicaments anticancéreux et les acides nucléiques. La membrane plasmique est un des obstacles majeurs à franchir pour atteindre les cibles intracellulaires car en effet aucun médicament ne peut exercer une activité thérapeutique si le principe actif qu'il renferme n'est pas capable de passer les différentes barrières biologiques qui séparent le site d'administration de son site d'action. Pour améliorer la biodisponibilité de ces molécules, plusieurs techniques de délivrance localisée peuvent être envisagées selon l'application souhaitée. Les stratégies sont en général divisées en deux classes : le transfert par des vecteurs biologiques et le transfert par des approches chimiques ou physiques. La première approche consiste à transporter des acides nucléiques grâce à des vecteurs viraux en utilisant leurs capacités à pénétrer dans les cellules hôtes pour

transférer leur génome. Ils existent plusieurs classes de vecteurs viraux qui permettent une expression stable ou transitoire du transgène ce qui peut être à la fois un avantage et un inconvénient. Les principales restrictions à l'utilisation clinique des vecteurs viraux sont : la réponse immune qu'ils peuvent induire, les risques potentiels associés aux virus répliquatifs, les risques d'insertion mutagenique et le manque de spécificité (Hacein-Bey-Abina, von Kalle et al. 2003; Hacein-Bey-Abina, Von Kalle et al. 2003). Le gène ou la molécule d'intérêt thérapeutique peuvent être encapsulés et transportés à l'aide de vecteurs chimiques qui ont pour rôle principal de faire passer la membrane plasmique aux molécules non perméantes tout en limitant les inconvénients d'immunogénicité et de toxicité (Pitard, Bello-Roufaï et al. 2004). Ces vecteurs ont l'avantage d'être modulables afin d'ajouter éventuellement des éléments de ciblage cellulaire spécifique (ligands). L'un des inconvénients majeurs de l'utilisation de ce type de vecteurs reste leur efficacité de transfection bien inférieure à celle des vecteurs viraux. D'autres voies de recherche ont expérimenté des méthodes physiques ou mécaniques qui déstabilisent l'intégrité membranaire afin de faire pénétrer les molécules non perméantes. Parmi celle-ci on trouve la microinjection, le canon à ADN, le laser, les ultrasons, l'injection hydrodynamique, ou l'électroporation. Les différentes techniques sont comparées dans le tableau suivant (Tableau 1).

Technique	Principe	Avantage/Inconvénient
Microinjection	Aiguille fine injecte l'ADN directement dans la cellule	Très efficace (ciblage direct du noyau) Système automatisé, peu pratique <i>in vivo</i>
Canon à ADN	Bombardement à grande vitesse des cellules avec des particules couplées à l'ADN	Immunisation génétique, faibles quantités d'ADN Dispersion des particules variable, efficacité variable
Sonoporation	Perméabilisation de la membrane cellulaire par des ultrasons	Efficace, non invasif, bonne expression dans les cellules vasculaires
Irradiation laser	Perméabilisation induite par un faisceau laser	Haute précision du faisceau Coût élevé, toxicité Potentielle
Magnétofection	Champ magnétique conduit des nanoparticules couplées à l'ADN dans les cellules	Ciblage efficace, efficacité de transfection Risque potentiel des particules magnétiques sur la fonction cellulaire
Electroporation	Champ électrique induisant une perméabilisation de la membrane (électrodes, générateur d'impulsions)	Très efficace pour les petites molécules, efficacité d'expression, facile d'utilisation Accès des électrodes au site de traitement

Tableau 1: Principales techniques physiques de transfert de gène. Adapté de Brindley 2016 (<http://www.bioprocessintl.com/manufacturing/cell-therapies/emerging-platform-bioprocesses-for-viral-vectors-and-gene-therapies/>) (Mehier-Humbert and Guy 2005)

Parmi ces techniques, l'électroporation occupe une place importante depuis plusieurs décennies et sera utilisée pour ce travail de thèse.

b. Déstabilisation de la membrane plasmique par des impulsions électriques

L'électroporation est une technique physique largement utilisée sur les cellules et tissus pour augmenter la perméabilité membranaire et permettre l'entrée de molécules d'intérêts. L'application d'impulsions électriques contrôlées va permettre de déstabiliser la structure de la membrane plasmique et donc d'affecter ses propriétés. Ce phénomène est décrit par Neumann et al en 1972 à travers une étude qui révèle que des impulsions électriques brèves mais intenses peuvent induire une perméabilisation de la membrane plasmique des vésicules issues de cellules bovines (Neumann and Rosenheck 1972). Ce caractère perméable se traduit par une augmentation des échanges de fluides et molécules entre les milieux intra et extracellulaires (Neumann and Rosenheck 1972; Weaver 1995; Teissie, Eynard et al. 2002; Teissie, Golzio et al. 2005) (Figure 5).

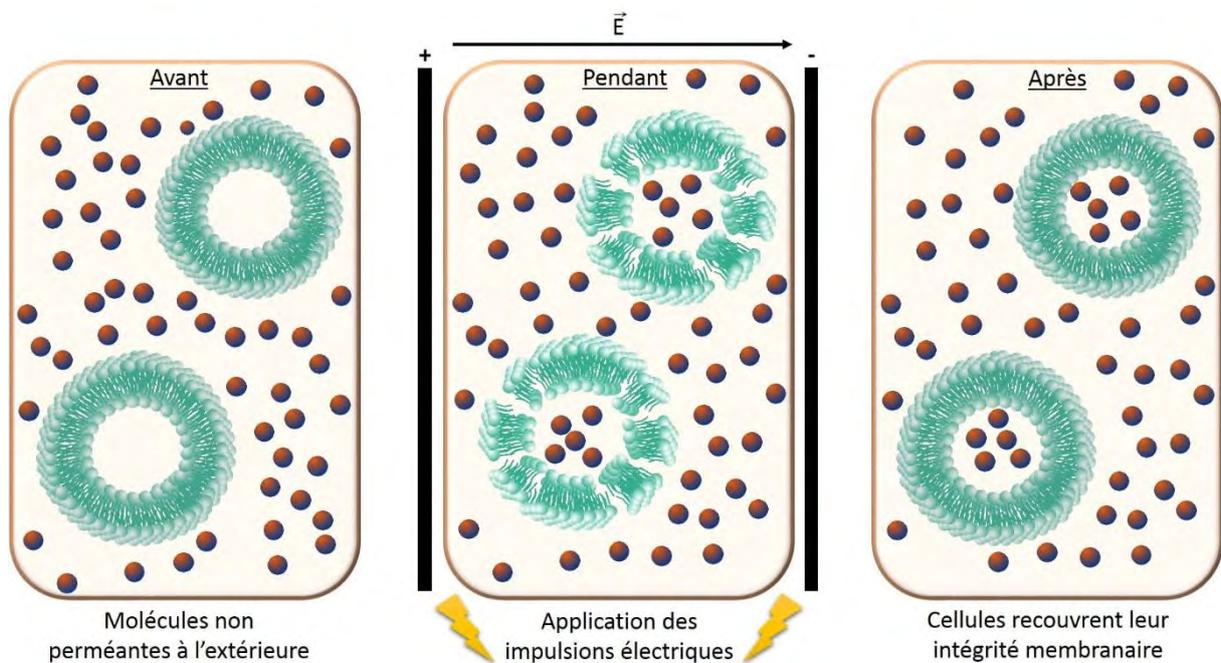


Figure 5: Représentation schématique d'une cellule placée dans le champ électrique

L'électroporation présente l'avantage, contrairement à d'autres techniques, de contrôler la perméabilisation dans l'espace et dans le temps.

Cette technique est régie par plusieurs paramètres d'impulsions. Selon l'amplitude, la durée, la fréquence et le nombre d'impulsions électriques, il est possible d'induire une perméabilisation réversible, c'est-à-dire que la cellule récupère son intégrité membranaire quelques minutes après l'application des impulsions électriques, ou irréversible qui induit des dommages irréversibles à la cellule. Initialement l'électroporation réversible a été développée pour le transfert d'acides nucléiques, mais de nos jours le processus d'électroporation connaît un intérêt grandissant car il permet notamment d'introduire dans le cytoplasme des molécules thérapeutiques. Cette méthode a ainsi été adoptée pour la délivrance d'une grande variété de molécules: des ions, médicaments, colorants, traceurs, anticorps et d'acides nucléiques (ARN et ADN) (Venslauskas and Šatkauskas 2015). Certains paramètres permettent également de fusionner les cellules entre elles (Dimitrov 1995; Jordan, Neumann et al. 2013). L'augmentation de l'amplitude et/ou de la durée des impulsions électrique peut conduire à une perméabilisation irréversible, menant à la mort de la cellule, ces paramètres étant plutôt appliqués pour l'ablation de tissus (Al-Sakere, Andre et al. 2007). En dehors des applications cliniques, elle est également utilisée dans l'industrie agro-alimentaire et phytosanitaire, où elle facilite par exemple l'extraction des jus et la stérilisation de nourriture (Zhang, Lerner et al. 1999; Toepfl, Heinz et al. 2007; Golberg, Fischer et al. 2010; Venslauskas and Šatkauskas 2015) (Figure 6).

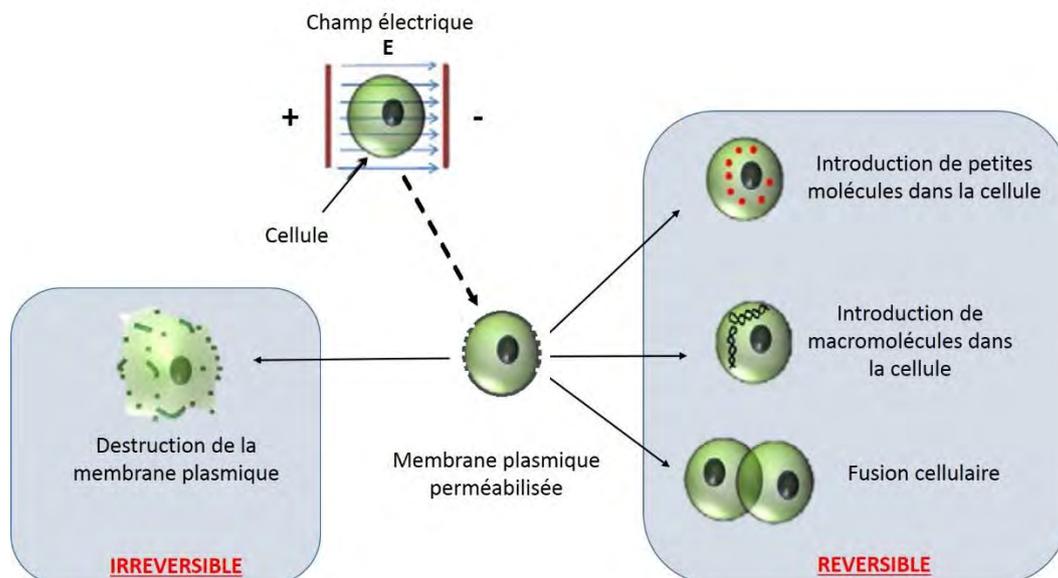


Figure 6: Différents effets de l'exposition des cellules aux impulsions électriques. Perméabilisation réversible pour l'entrée de médicaments ou d'ADN et la fusion cellulaire ; Perméabilisation irréversible pour tuer les cellules. (Corovic, Bester et al. 2009)

c. Mécanismes

En dépit de la large utilisation de cette technologie, il n'existe pas à ce jour de description moléculaire exacte du phénomène d'électroporabilité. Néanmoins, deux théories subsistent comme en témoigne la double appellation : électroporation et électroporabilité (Neumann, Schaefer-Ridder et al. 1982; Teissie, Golzio et al. 2005).

L'explication la plus communément admise de ce phénomène est la formation de pores hydrophobes dans la membrane, due à l'énergie apportée par le champ électrique, d'où le terme électroporation (Neumann, Schaefer-Ridder et al. 1982). Des doutes subsistent encore à ce propos car l'existence de ces pores n'a pour l'instant pas encore pu être démontrée. C'est pourquoi le terme électroporabilité est aussi utilisé car ce dernier plus générique, décrit la conséquence plutôt que le mécanisme, sans pour autant écarter l'hypothèse des pores. Le concept plus général de l'électroporabilité défend l'hypothèse d'une augmentation de la perméabilité en raison de réarrangements physico-chimiques dans la membrane plasmique, induits par le champ électrique (Chen, Smye et al. 2006). Cependant, pour cette théorie aussi les causes physiques pour expliquer comment ces réarrangements ont lieu n'ont pas été démontrées (Venslauskas and Šatkauskas 2015).

Les nombreuses études menées sur le sujet permettent de comprendre les grandes lignes des mécanismes engagés. Mis à part le transport très sélectif d'ions commandé par des protéines membranaires, la membrane cellulaire ne conduit pas le courant électrique, elle se comporte donc comme un isolant électrique. À l'état natif, la circulation des ions Na^+ et K^+ à travers les pompes Na^+/K^+ ATPase entraîne un déséquilibre ionique de part et d'autre de la membrane. Ce gradient de concentration ionique, entre chaque côté de la membrane de la cellule génère une différence de potentiel transmembranaire de repos ($\Delta\Psi_0$) (Figure 7). La valeur de $\Delta\Psi_0$ est comprise entre -20 mV et -200 mV selon l'espèce et le type cellulaire. Cette valeur est homogène tout le long de la membrane plasmique (Fromm and Lautner 2007).

Lorsque les cellules sont soumises à un champ électrique uniforme, les ions vont se déplacer sous l'action de la force électrophorétique induite par le champ électrique. Les anions se déplacent vers l'anode et les cations vers la cathode. Ceci a pour conséquence l'établissement d'une nouvelle différence de potentiel à travers la membrane, appelée potentiel transmembranaire induit ($\Delta\Psi_i$) (Figure 7 A). Lorsque $\Delta\Psi_i$ atteint une valeur critique (E_p),

appelée seuil de perméabilisation, les propriétés de la membrane changent et la membrane perd son caractère isolant. L'intensité nécessaire pour dépasser E_p va dépendre de la taille de la cellule à perméabiliser, plus elle sera petite plus l'intensité devra être élevée (Rols and Teissie 1990; Escoffre, Portet et al. 2009). Cette différence de potentiel transmembranaire $\Delta\Psi_i$, qui va avoir pour conséquence une accumulation de charges des deux côtés de la membrane plasmique, est le paramètre clé déclenchant la perméabilisation.

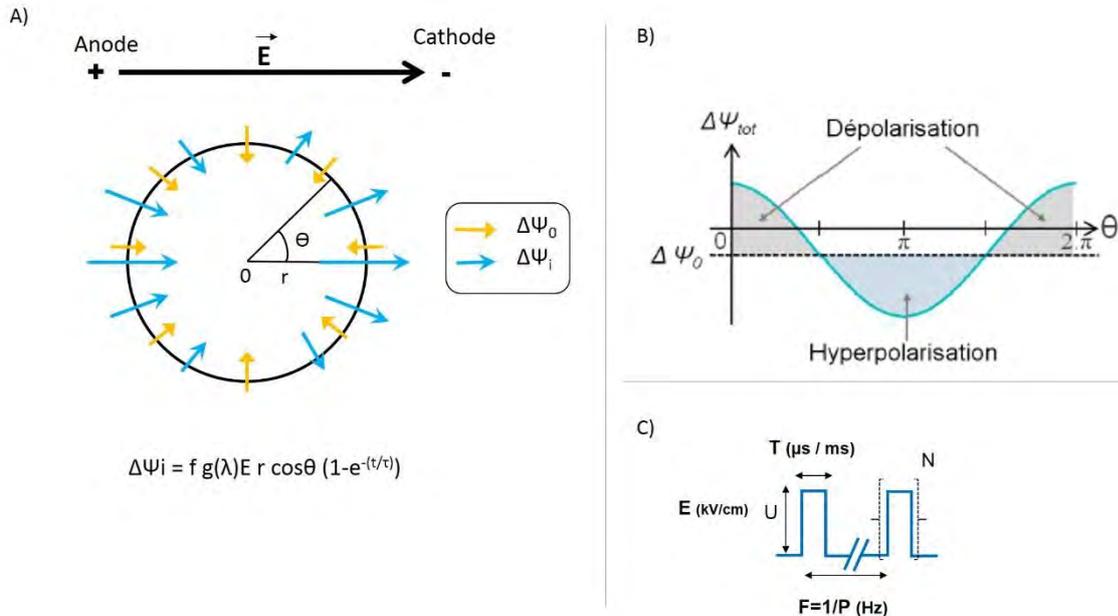


Figure 7: A) Représentation schématique des différences de potentiel transmembranaire de repos $\Delta\Psi_0$ et induite $\Delta\Psi_i$; B) Courbe représentant la différence de potentiel transmembranaire totale $\Delta\Psi_{tot}$ en fonction de la position sur la membrane et l'angle θ pour une cellule sphérique ; C) Schéma de la série d'impulsions électriques: impulsions d'onde carrée définies par la tension U , durée T , période P ou fréquence f et répétition N . Adapté de (Rols, Golzio et al. 2000)

Lors de l'application d'un champ électrique, ce potentiel transmembranaire induit $\Delta\Psi_i$ s'ajoute au potentiel de repos natif $\Delta\Psi_0$, mais contrairement à ce dernier, $\Delta\Psi_i$ varie selon la position sur la membrane par rapport à l'orientation du champ électrique (Gross, Loew et al. 1986). Ceci est important puisque seules les zones membranaires où la valeur seuil E_p est atteinte vont être perméabilisées (Rols and Teissie 1990; Teissie and Rols 1993). En effet la perméabilisation s'observe d'abord aux pôles de la cellule faisant face aux électrodes lorsque la différence de potentiel transmembranaire franchit la valeur seuil E_p de +/- 200-300 mV (Teissie and Rols 1993) (Equation 1).

$$|\Delta\Psi_i + \Delta\Psi_0| \geq 200 \text{ mV} \quad (1)$$

Les charges de part et d'autre de la membrane se réorganisant du fait du champ provoquent une hyperpolarisation (sortie massive d'ions K^+) côté anode et une dépolarisation (entrée d'ions Na^+) côté cathode (Figure 7 B). La différence de potentiel induite à la membrane cellulaire n'étant pas uniforme le long de la membrane cellulaire, $\Delta\Psi_i$ est maximum sur la membrane face aux électrodes ($\theta = 0^\circ$ ou 180°) et décroît progressivement le long de la surface de la cellule jusqu'aux pôles où $\Delta\Psi_i = 0$ ($\theta = 90^\circ$ ou 270°).

La valeur du seuil E_p dépend également de la taille de la cellule considérée, de sa densité (en suspension, en tissu), de son environnement (*in vitro*, *in vivo*), etc. En effet des expériences de modélisations ont prouvé que la densité de cellules et leurs organisation dans un volume donné influence le potentiel transmembranaire induit par le champ électrique (Pavlin, Pavsely et al. 2002). De plus, il a été constaté que l'étendue de la perméabilisation est directement dépendante de l'amplitude du champ électrique (U) appliqué sur les cellules, de la répétition (N) et la durée des pulses (T), ainsi que leur fréquence (f) et jouent un rôle important sur la perméabilité des cellules (Rols and Teissie 1990) (Figure 7 C).

L'effet est donc dépendant de l'intensité du champ électrique, de l'endroit où l'on se trouve sur la membrane, de la durée de l'impulsion au regard du temps de charge de la membrane comme décrit dans l'équation Schwann (Equation 2) (Schwan 1957):

$$\Delta\Psi_i = f g(\lambda) E r \cos\theta (1 - e^{-(t/\tau)}) \quad (2)$$

A l'état d'équilibre et lorsque la cellule peut être considérée comme une sphère homogène isolée, l'expression de l'équation peut être simplifiée (Equation 3):

$$\Delta\Psi_i = 1.5 E r \cos\theta \quad (3)$$

En d'autres termes, la perméabilisation est dépendante des paramètres électriques appliqués, des caractéristiques morphologiques du type cellulaire et des conditions de culture (*in vitro/ in vivo*, 2D/3D).

L'électroperméabilisation est un phénomène qui peut être réversible ou irréversible selon les paramètres électriques appliqués (Neumann and Rosenheck 1972).

Dans le cas où l'effet de ces impulsions est réversible, il y a réparation de la membrane plasmique (Escande-Geraud, Rols et al. 1988). L'état perméable de la membrane après électroporation peut durer de quelques minutes à quelques dizaines de minutes selon les types cellulaires. La membrane plasmique va alors retrouver lentement son état natif. Lorsque l'amplitude du champ ou la durée des impulsions est augmentée, la zone de perméabilisation irréversible peut être atteinte. Ainsi les dommages induits à la membrane sont trop importants et conduisent à la mort cellulaire (Al-Sakere, Andre et al. 2007).

Les paramètres électriques peuvent être optimisés en fonction de l'objet ciblé mais aussi en fonction du type de molécule à délivrer à travers la membrane plasmique.

d. Applications médicales

Actuellement, les principales utilisations de l'électroporation sont à des fins cliniques, avec trois axes principaux : l'électrochimiothérapie, l'ablation tissulaire par électroporation irréversible, l'électrotransfert de gène (Mir 2009; Scheffer, Nielsen et al. 2014; Spratt, Gordon Spratt et al. 2014). Les trois applications principales sont décrites dans la figure 8.

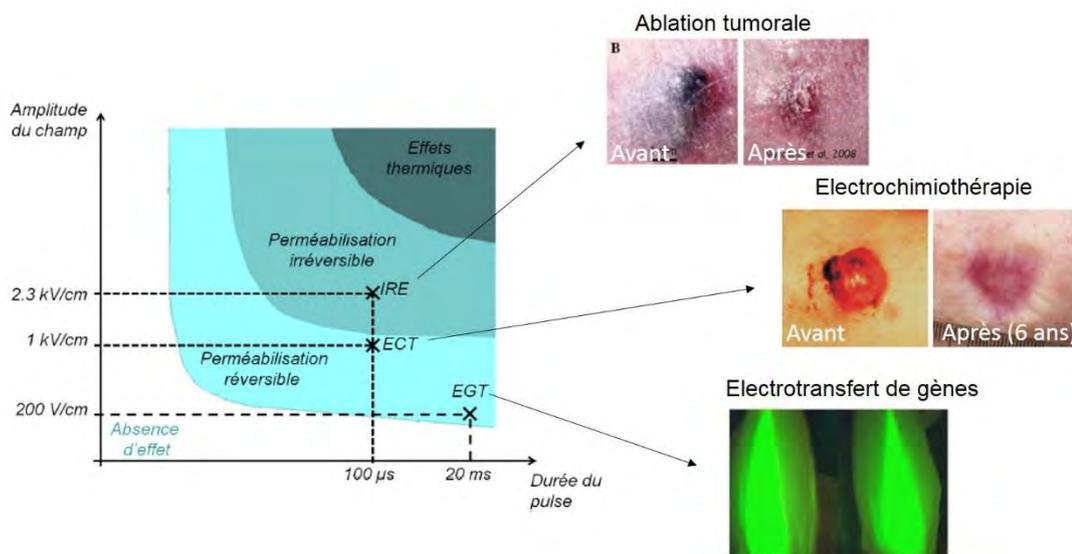


Figure 8: Différentes applications de l'électroporation et les effets obtenus lors de l'application d'impulsions électriques. Applications : Electrochimiothérapie (ECT mélanome, Sersa, et al. 2003), Electrotransfert de gène (EGT GFP muscle souris, (Šatkauskas, André et al. 2005), Electroporation irréversible (IRE mélanome, (Nuccitelli, Pliquett et al. 2006). Adaptation de (Bower, Sherwood et al. 2011)

Electrochimiothérapie

Le procédé nommé électrochimiothérapie (ECT) est l'application clinique la plus aboutie, utilisée avec succès en clinique pour le traitement de cancers cutanés et sous-cutanés (Belehradek, Domenge et al. 1993). Ce traitement alternatif à la chimiothérapie classique consiste à injecter localement ou par voie systémique une molécule cytotoxique non-perméante, puis à perméabiliser transitoirement la zone à traiter par des impulsions électriques (Gothelf, Mir et al. 2003) (Figure 9).

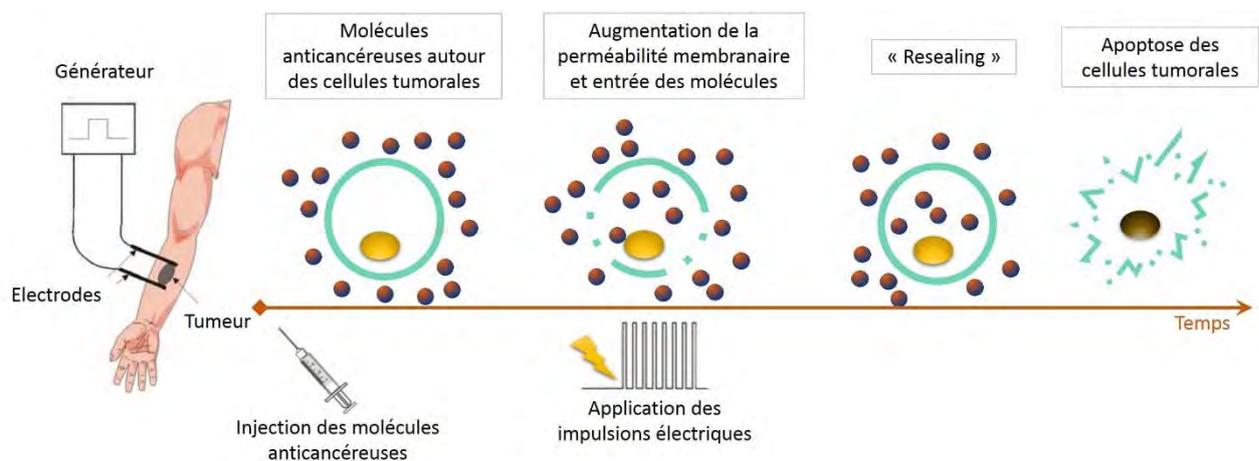


Figure 9: Principe et étapes de l'électrochimiothérapie. Réalisé à partir de (Dev 1994; Sersa, Miklavcic et al. 2008)

Des impulsions dites « microsecondes » sont le plus fréquemment utilisées et sont de l'ordre de $100 \mu\text{s}$ avec un champ électrique de l'ordre de $1000 \text{ V}\cdot\text{cm}^{-1}$. Ce type d'impulsions permet de faire pénétrer en grande quantité des molécules telles que la bléomycine ou le cisplatine dans le cytoplasme. Ces deux médicaments génotoxiques qui sont les plus souvent utilisés en électrochimiothérapie, sont très peu perméables pour la membrane (Escoffre and Rols 2012). Dans les cellules tumorales l'effet cytotoxique de ces molécules associées aux impulsions est alors considérablement augmenté, avec une toxicité pouvant être multipliée de 100 à 10000 fois pour la bléomycine (Gehl, Skovsgaard et al. 1998; Gothelf, Mir et al. 2003). L'électrochimiothérapie est significativement plus efficace que le traitement avec la bléomycine ou le cisplatine seul. L'efficacité est variable selon le type de tumeur, en effet l'électrochimiothérapie s'est avérée plus efficace sur le sarcome que dans les tumeurs de mélanome ou de carcinome (Mali, Jarm et al. 2013). L'utilisation la plus fréquente de

l'électrochimiothérapie est sur des tumeurs cutanées chez les patients présentant de nombreuses métastases cutanées ou des patients qui ont subi de nombreux traitements antérieurs (Miklavčič, Mali et al. 2014). Ce traitement est particulièrement adapté aux tumeurs cutanées qui sont aisément accessibles. Différents types d'électrodes, plus ou moins invasives, sont utilisées afin d'atteindre d'autres tissus plus profonds et des améliorations sont régulièrement apportées pour les adapter à de nouvelles régions. La technique est maintenant développée pour le traitement des tumeurs viscérales ou profondes (glioblastome, cancer du pancréas).

L'avantage de ce traitement est qu'il limite les effets secondaires des chimiothérapies classiques dans la mesure où les impulsions électriques potentialisent localement les effets du médicament administré. Depuis ses débuts, l'électrochimiothérapie a permis de traiter plus de 10000 patients dans plus de 150 hôpitaux et cliniques européens. Ce traitement est également utilisé en 1^{ère} intention et est remboursé dans plusieurs pays de l'Union Européenne (Allemagne, Danemark, Grèce, Italie, Pologne, Portugal et Slovaquie).

Electroperméabilisation irréversible

Les impulsions microsecondes très intenses peuvent aussi être utilisées pour entraîner la mort cellulaire en induisant une perméabilisation permanente avec une perte de l'homéostasie cellulaire. Lorsque les champs électriques provoquent une perméabilisation irréversible de la membrane il y a une fuite trop importante du contenu intracellulaire et/ou un « resealing » de la membrane plasmique trop lent pour que les cellules récupèrent, ce qui entraîne la mort de la cellule. Cependant, les mécanismes moléculaires et cellulaires exacts de l'électroporation irréversible ne sont pas encore connus (Weaver and Chizmadzhev 1996; Golberg, Fischer et al. 2010).

Les applications comprennent l'ablation de tissus pathologiques, la stérilisation des aliments et l'extraction de contenus cellulaires à des fins pharmaceutiques ou pour l'industrie alimentaire (Golberg, Fischer et al. 2010). L'électroperméabilisation irréversible (IRE) est plutôt utilisée à des fins cliniques comme outil d'ablation tumorale. La principale différence avec les autres techniques d'ablation (radiofréquences, laser...) est qu'elle n'induit pas d'effet thermique pour tuer les cellules (Davalos, Mir et al. 2005; Miller, Leor et al. 2005; Al-Sakere, Andre et al. 2007). Les résultats des études sur plusieurs espèces animales (souris, rat, lapin, chien, chèvre

et cochon) ont confirmé que l'IRE peut éliminer efficacement différents tissus pathologiques (cerveau, prostate, cœur, pancréas, intestin grêle, poumon, rein, foie, cancer de l'os, de la tête et du cou, tumeurs cutanées et hépatiques...). À la suite des résultats encourageants sur les modèles animaux, les études sur les humains ont commencé à étudier l'innocuité et l'efficacité du traitement IRE sur différentes tumeurs (pancréas, reins, poumons et foie). Ces études ont conclu que l'efficacité de la procédure varie selon les organes traités. Par exemple dans le cas du cancer du pancréas et de la prostate, 100% des ablations tumorales ont été efficace alors qu'aucun des traitements IRE sur les tumeurs pulmonaires n'a réussi (Golberg and Yarmush 2013). D'autres essais à grande échelle sont en cours pour déterminer la sécurité et l'efficacité du traitement IRE.

Ce traitement a pour avantage de causer de moindre dégâts aux structures tissulaires environnantes telles que les vaisseaux sanguins en comparaison avec les techniques d'ablation plus courantes (Scheffer et al. 2014). En effet tout en détruisant efficacement toutes les cellules de la zone d'ablation, la nature non-thermique de l'IRE entraîne une préservation relative de la matrice extracellulaire. Des travaux sur des tissus sains de la peau et du foie, ont démontré que l'IRE conserve la matrice extracellulaire mais éradique complètement les cellules et conduit à une régénération sans cicatrice (Golberg, Broelsch et al. 2013; Golberg, Bruinsma et al. 2015)

Electrogénothérapie

L'électrotransfert d'acides nucléiques fait intervenir le caractère réversible de l'électroperméabilisation et ouvre une nouvelle voie dans la thérapie génique (Andre, Gehl et al. 2008; Mir 2009). Le procédé repose sur l'application de pulses électriques pour induire une perméabilisation transitoire et localisée, une méthode qui permet l'entrée d'acides nucléiques dans les cellules (Neumann, Schaefer-Ridder et al. 1982). L'objectif est cette fois de faciliter l'entrée de plasmides d'ADN (des macromolécules de plusieurs millions de Daltons) dans le noyau cellulaire, en appliquant des impulsions dites « millisecondes » pour perméabiliser la membrane plasmique. Ces impulsions génèrent également une force électrophorétique permettant le mouvement de grosses molécules chargées, telles que l'ADN, et assurent ainsi une entrée de ces molécules dans les cellules perméabilisées.

Depuis plusieurs années, cette méthode est développée pour délivrer localement des acides nucléiques à une large gamme de tissus tels que les poumons, le muscle, les tumeurs, le foie et la peau (Heller, Jaroszeski et al. 1996; Rols, Delteil et al. 1998; Rols, Delteil et al. 1998; Mir, Bureau et al. 1999; Cemazar, Sersa et al. 2002; Dean, Machado-Aranda et al. 2003; Daud, DeConti et al. 2008; Gothelf and Gehl 2010). La première étude de phase I publiée sur le mélanome métastatique a révélé que l'électrotransfert d'un plasmide codant pour l'IL-12 conduit à une nécrose tumorale et une régression des métastases non traitées chez 10% des patients. Pour plus de 40% des patients une stabilisation de la maladie et/ou une réponse partielle est observée (Daud, DeConti et al. 2008). Cette méthode dispose de nombreux avantages par rapport à d'autres méthodes de transfection, car en plus d'être plus sûre que les méthodes chimiques ou virales, elle est simple, rapide et peu onéreuse.

Bien que l'électrotransfert d'ADN soit efficace *in vitro*, dans certains tissus *in vivo* tels que les tumeurs et la peau, l'expression des gènes est moins efficace (Rols, Delteil et al. 1998; Vandermeulen, Staes et al. 2007). Le transfert de gènes dans les tumeurs par électroporation montre que seulement 5 % des cellules expriment le transgène *in vivo* alors que près de 50 % des cellules l'expriment *in vitro* (Rols, Delteil et al. 1998; Golzio, Rols et al. 2004; Cemazar, Golzio et al. 2009). Tous les mécanismes du transfert d'ADN par électroporation ne sont pas encore complètement élucidés, en particulier dans le contexte *in vivo* (Escoffre, Portet et al. 2009).

e. Electrotransfert de gène : questions en suspend

La thérapie génique est définie comme l'introduction de matériel génétique dans les cellules cibles. Différents objectifs peuvent être envisagés en thérapie génique:

- Corriger la fonction défectueuse en fournissant un gène fonctionnel aux cellules. Il peut s'agir de corriger le défaut de fonction en apportant la protéine manquante comme par exemple dans les maladies monogéniques telles que la mucoviscidose (dérèglement de la protéine CFTR, Cystic Fibrosis Conductance Transmembrane Regulator, due à une mutation).
- Transférer un gène codant pour une protéine thérapeutique, afin de traiter, prévenir ou ralentir la progression de certaines maladies. Les cellules cibles peuvent par exemple être utilisées pour l'expression des protéines thérapeutiques pour des facteurs de

croissance (maladies cardiovasculaires : VEGF) ou comme source d'antigène pour la vaccination génétique (vaccin ADN).

- Introduire un gène conduisant à la mort cellulaire. Les cellules cibles pouvant par exemple directement exprimer un gène apoptotique introduit.
- Introduire un ARN anti-sens inhibant la formation d'une protéine ou la réplication d'un virus. Par exemple pour réduire la charge virale de patients infectés par le VIH en traitant les lymphocytes T avec un ARN antisens bloquant l'ARNm de l'enveloppe virale du VIH.

Le transfert de gène, par définition, est un processus par lequel des copies d'un gène sont insérées dans des cellules vivantes afin qu'il soit exprimé. Pour cela le gène d'intérêt doit parvenir à sa zone cible : le cytosol pour les ARNm et le noyau pour les ADN. Le développement clinique de la thérapie génique nécessite l'utilisation de méthodes sûres et efficaces pour administrer des gènes thérapeutiques aux cellules cibles. Les gènes sont le plus souvent transfectés sous forme d'ADN plasmidique qui contient les séquences nécessaires à l'expression en plus du gène d'intérêt lui-même. Le gène d'intérêt thérapeutique est inséré dans un plasmide bactérien et il est soit directement injecté dans les tissus ou dans les organes soit injecté par voie intraveineuse (Wolff, Dowty et al. 1992). Contrairement aux vecteurs viraux, les vecteurs plasmidiques sont non-immunogènes car ils sont entièrement composés d'ADN double brin sans protéines associées susceptibles d'activer le système immunitaire. Cependant certaines séquences des vecteurs plasmidiques dites CPG peuvent être détectées par les cellules dendritiques ou natural killer.

Quatre obstacles majeurs, qui sont représentés dans la figure 10, doivent être franchis localement par le plasmide avant qu'il puisse être exprimé par la cellule cible: (1) la diffusion dans le milieu extracellulaire et la matrice extracellulaire, (2) la membrane plasmique qui empêche le franchissement des grosses molécules chargées négativement, (3) la dégradation dans le cytoplasme, (4) le passage de la membrane nucléaire pour pénétrer dans le noyau (Escoffre, Teissie et al. 2010).

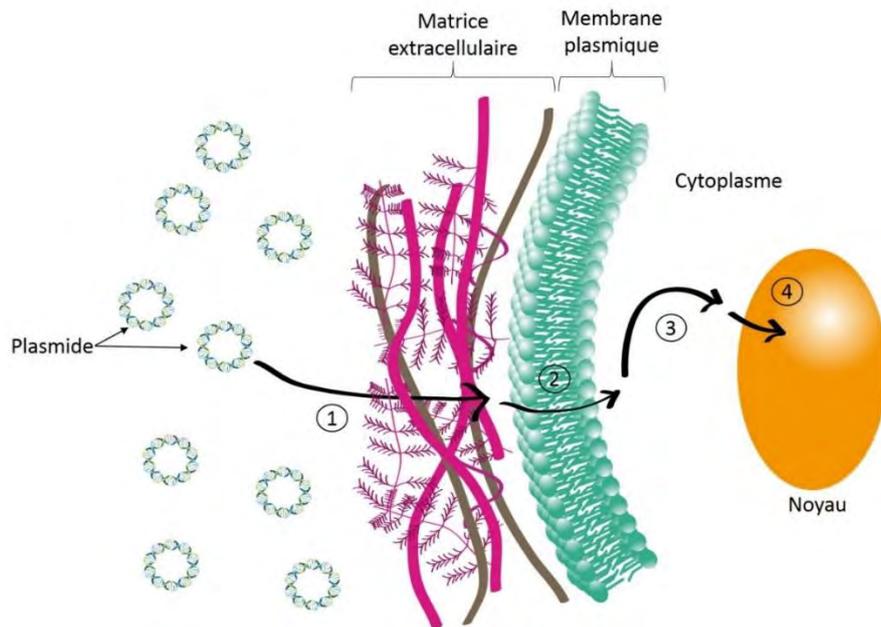


Figure 10: Schéma des différentes barrières biologiques rencontrées par l'ADN plasmidique lors du transfert de gène dans le tissu : 1) La matrice extracellulaire limite la diffusion dans le tissu; 2) l'ADN plasmidique doit traverser la membrane plasmique; 3) Encombrement moléculaire intense dans le cytoplasme et présence de nucléases endogènes; 4) L'ADN plasmidique doit traverser l'enveloppe nucléaire. Réalisé à partir (Escoffre, Portet et al. 2009; Chabot, Rosazza et al. 2013)

Il n'y a aucune limite quant à la taille du gène thérapeutique à transférer mais l'utilisation du plasmide seul est très peu efficace. L'ADN ne pénètre très difficilement dans les cellules car les caractéristiques de l'ADN plasmidique en font une molécule peu propice au passage des membranes biologiques, en effet il est hydrophile, chargé négativement et de masse moléculaire très élevée. Le défi majeur dans le transfert de gène est d'obtenir un taux d'expression satisfaisant.

Plusieurs techniques non-virales ont été développées pour augmenter l'efficacité du transfert et comme vu précédemment, des études ont démontré que l'efficacité de transfection des plasmides ADN augmente significativement lorsque l'administration du plasmide est suivie par l'application d'une série d'impulsions électriques (Neumann, Schaefer-Ridder et al. 1982; Titomirov, Sukharev et al. 1991). En effet, l'électrotransfert de gène induit une augmentation de l'efficacité de transfection de 10 à 1000 fois en comparaison avec l'injection d'ADN plasmidique nu (Mir, Bureau et al. 1999; Cappelletti, Zampaglione et al. 2003).

Les études sur les mécanismes ont démontré que le transfert d'ADN par électroporation est également dépendant de plusieurs étapes consécutives (Golzio, Teissié et al. 2002). L'électrotransfert d'ADN plasmidique nécessite la perméabilisation de la membrane plasmique et la migration électrophorétique de l'ADN plasmidique vers les cellules perméabilisées. Les impulsions électriques vont induire des interactions locales entre les acides nucléiques et la membrane plasmique lors de l'application du champ. Ces agrégats d'ADN vont s'accumuler électrophorétiquement sur la membrane du côté de la cathode et rester immobilisés sans pénétrer immédiatement dans le cytoplasme (Golzio, Rols et al. 2004). L'immobilisation de l'ADN dans la membrane perméabilisée est une étape indispensable de l'électrotransfert d'ADN qui n'est possible que si l'ADN est présent avant l'application du champ électrique. Lorsque l'ADN est ajouté après l'électroperméabilisation même après un temps très court, l'efficacité de la transfection est insignifiante dans les cellules et tissus de mammifères (Wolf, Rols et al. 1994; Rols, Delteil et al. 1998; Mir, Bureau et al. 1999). Ce phénomène est suivi d'une libération lente des plasmides dans le cytoplasme qui a lieu après l'exposition au champ. En effet un plasmide marqué de façon fluorescente ne peut être détecté à l'intérieur du cytoplasme que plusieurs minutes après l'application du champ électrique (Golzio, Teissié et al. 2002; Golzio, Rols et al. 2004; Escoffre, Portet et al. 2009; Escoffre, Portet et al. 2011). En outre, le cytosquelette semble avoir une implication active dans l'entrée de ces macromolécules nucléotidiques dans le cytoplasme. Une étude montre l'implication du cytosquelette d'actine dans l'électrotransfert d'ADN grâce à la colocalisation des agrégats d'ADN à la membrane avec des zones concentrées d'actine (Rosazza, Escoffre et al. 2011). Une altération du réseau d'actine induit une diminution de la quantité d'ADN plasmidique qui interagit avec la membrane cellulaire et du niveau d'expression du gène. Il semble néanmoins que plusieurs voies d'endocytose cellulaire soient largement impliquées dans l'électrotransfert d'ADN (Rosazza, Meglic et al. 2016). Le mouvement de l'ADN à l'intérieur des cellules récemment étudié en utilisant la technique de suivi de particule unique, montre que les trajectoires d'agrégats d'ADN électrotransférés possèdent des phases de transport actif au cours desquelles il y a une colocalisation entre les trajectoires d'ADN et les microtubules. De plus, un traitement au nocodazole, qui dépolymérise les microtubules, supprime le transport actif rapide des agrégats d'ADN sur les longues distances, démontrant ainsi la liaison de l'ADN aux microtubules lors de ce processus (Rosazza, Buntz et al. 2013). Pour autant la façon dont l'ADN est internalisé n'est cependant pas encore

bien comprise. Puis vient la dernière étape, le passage de l'enveloppe nucléaire où le gène aura accès aux protéines permettant l'expression génique.

L'électrotransfert de gène est une technique qui est très efficace sur des cellules cultivées en 2D *in vitro*, mais elle l'est beaucoup moins *in vivo*, en particulier dans le contexte de la tumeur (Rols, Delteil et al. 1998). Plusieurs théories reliées aux différentes étapes limitantes vues précédemment sont émises pour expliquer cette variabilité de l'efficacité de l'électrotransfert de gène. Avant le passage du plasmide à travers la membrane plasmique, les obstacles rencontrés par le plasmide ADN semblent être un des facteurs majeurs limitant la distribution du plasmide au sein d'un tissu. Le problème de distribution du plasmide peut être lié à la présence de jonctions entre les cellules environnantes qui vont bloquer sa diffusion dans le tissu ou à la présence de matrice extracellulaire (MEC) (Escoffre, Teissie et al. 2010). L'organisation des tissus *in vivo* est considérée comme l'un des principaux obstacles au mouvement du plasmide ADN et détermine donc sa biodistribution (Zaharoff, Barr et al. 2002; Mesojednik, Pavlin et al. 2007). Si on considère les cellules tumorales comme cible, la barrière cellulaire est représentée par la cohésion intercellulaires, les cellules endothéliales mais aussi le microenvironnement tumoral composé entre autre de fibroblastes et de matrice extracellulaire.

Certaines tentatives ont été faites pour améliorer l'efficacité de l'EGT en dégradant la matrice extracellulaire pour augmenter la circulation du plasmide entre les cellules et il en résulte que l'amélioration de la distribution des plasmides conduit à une augmentation de l'expression du transgène (Mennuni, Calvaruso et al. 2002; Goodman, Olive et al. 2007; Cemazar, Golzio et al. 2012). Après une pré-injection de hyaluronidase, une enzyme qui dégrade l'acide hyaluronique, un composant majeur de la matrice extracellulaire, une meilleure diffusion des plasmides dans le muscle squelettique est obtenue ce qui se traduit par l'augmentation de l'efficacité du transfert de gène (Mennuni, Calvaruso et al. 2002). Ce phénomène est confirmé, dans une autre étude, par l'augmentation de l'efficacité de l'électrotransfert d'ADN au sein de tumeurs murines après traitement enzymatique (relaxine ou hyaluronidase) pour altérer la matrice extracellulaire (Henshaw, Mossop et al. 2008; Cemazar, Golzio et al. 2012).

Généralement, ce problème ne se pose pas dans les cultures cellulaires en suspension ou en monocouche *in vitro*. C'est bien le contexte *in vivo* riche en matrice extracellulaire qui explique en partie la faible efficacité *in vivo*, d'où la nécessité de mieux caractériser les mécanismes

sous-jacents à l'électrotransfert d'ADN afin de pouvoir développer des stratégies pour améliorer l'efficacité de cette technologie *in vivo*.

2. Structure, organisation et fonction de la matrice extracellulaire

Les tissus conjonctifs forment les structures de support du corps. Ils sont parfois classifiés dans un éventail allant de tissus lâches (l'adventice des vaisseaux sanguins, le tissu adipeux) à denses (les tendons, le cartilage, les os). En bref, ce sont tous les tissus du corps sauf les épithéliums, les muscles et le tissu nerveux. Dans ces tissus, l'espace extracellulaire est occupé par la matrice extracellulaire. Elle est constituée d'un réseau complexe très organisé de macromolécules en contact étroit avec les cellules. Les constituants de la matrice extracellulaire sont essentiellement synthétisés et sécrétés localement par différentes cellules résidentes dont en premier lieu les fibroblastes (Tracy, Minasian et al. 2016). Le contact direct de la matrice extracellulaire avec les cellules en fait un régulateur important des comportements cellulaires, elle joue en effet un rôle essentiel dans l'architecture tissulaire, mais aussi dans des processus variés tels que :

- La régulation des fonctions cellulaires (différenciation, prolifération, mobilité cellulaire, ect...)
- La cohésion et association des cellules pour former un tissu cohérent
- La résistance mécanique dans certains tissus comme les os, les parois des artères, les tendons et les ligaments
- Le stockage de molécules biologiquement actives

La matrice extracellulaire est présente à tous les niveaux de l'organisme, mais son abondance et sa composition varient selon les tissus. Chaque tissu possède ses propres caractéristiques biologiques, fonctionnelles et morphologiques. Cette diversité est essentiellement due à la nature des cellules, à la composition moléculaire de la matrice extracellulaire, à la proportion relative entre cellules et matrice extracellulaire dans les tissus (Schlie-Wolter, Ngezahayo et al. 2013).

Ces réseaux complexes se construisent et se spécialisent au cours du développement, et leur composition évolue en fonction de différentes situations physiologiques (croissance) ou pathologiques (fibroses, cicatrisation). Ce renouvellement permanent est le résultat de l'équilibre entre la synthèse de ses constituants et leur dégradation par des enzymes spécialisées. La rupture de cet équilibre conduit à des pathologies soit par accumulation de matrice, c'est le

cas des fibroses, soit par destruction comme l'arthrose ou l'emphysème pulmonaire (Cox and Erler 2011). Quel que soit le type de matrice, il est possible d'y répertorier quatre classes de molécules distinctes biochimiquement. Tout d'abord, les protéines fibreuses qui s'organisent en fibres responsables de la structure (collagènes) et de l'élasticité des tissus (élastine). Ensuite, les protéoglycane qui forment des gels hydratés comblant les interstices entre les fibres et les cellules, assurent une résistance aux forces de compression et servent de réservoir aux molécules biologiquement actives. Puis, les glycoprotéines intervenant dans l'adhérence et la cohésion des tissus, et enfin les autres protéines associées que sont les facteurs de croissance et les enzymes (Labat-Robert, Bihari-Varga et al. 1990) (Figure 11).

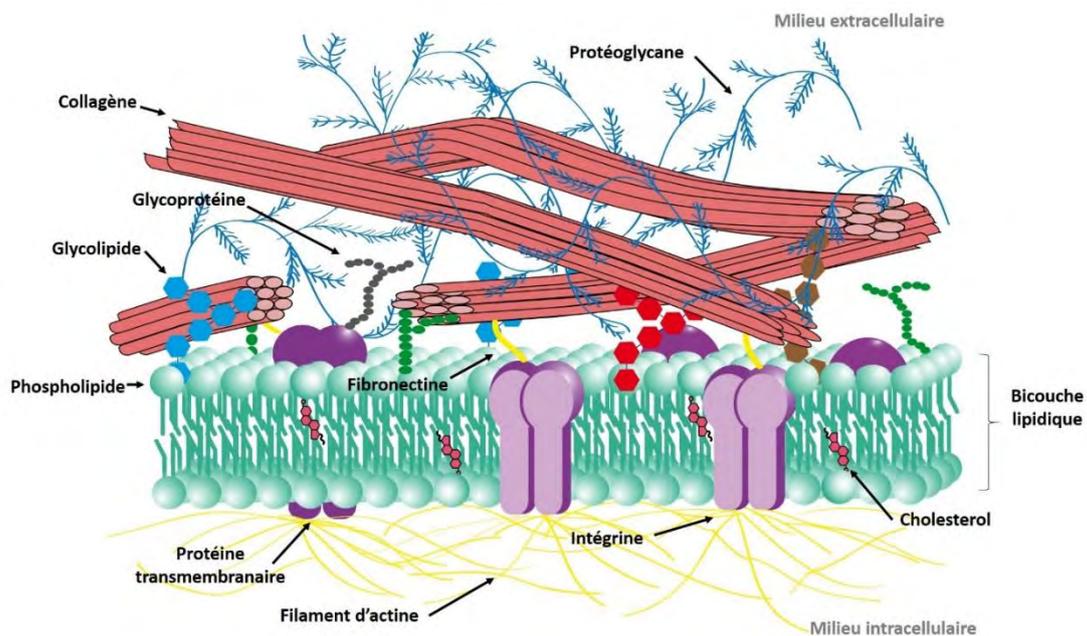


Figure 11: Schéma de l'organisation de la matrice extracellulaire entourant les cellules. Réalisé à partir Alberts, Bray et al. 1999

a. Les protéines fibreuses : organisation structurale et élasticité de la matrice

Cette catégorie regroupe l'ensemble des protéines matricielles qui peuvent former des structures fibrillaires. Il existe deux types de protéines fibreuses : celles qui forment des fibres structurales qui interviennent dans l'organisation structurale ont un rôle de soutien mécanique et confèrent la résistance au tissu, et celles qui forment des fibres élastiques qui confèrent l'élasticité au tissu.

i. Les collagènes

Les collagènes sont les protéines les plus abondantes du corps et correspondent à environ 6% du poids du corps et 30% en masse des protéines totales des mammifères (Ricard-Blum 2011). Ils sont localisés dans les tissus conjonctifs qu'ils contribuent à structurer et sont un constituant majeur de la matrice extracellulaire. A ce jour, il est recensé plus d'une vingtaine de membres dans la famille des collagènes, classés dans 8/9 familles (Tableau 2).

Famille	Caractéristiques
A	Collagène fibrillaire
B	Collagène formant des réseaux 2D
C	FACIT : collagène avec des domaines en triple hélice interrompus
D	Collagène microfibrillaire formant des filaments perlés
E	Collagène associé aux fibrilles d'ancrage
F	Collagène transmembranaire
G	Nouveaux types de collagène partiellement déterminés
H	Protéine contenant des domaines en triple hélice non définies

Tableau 2: Famille de collagène : Récapitulatif des différents types de collagène (adapté de (Prockop and Kivirikko 1995; Kadler, Baldock et al. 2007))

Leur point commun est de contenir dans leur structure des molécules de collagènes formées par une triple hélice, chaque type de collagène étant caractérisé par la complexité et la variabilité de l'organisation de ces molécules. La matrice extracellulaire est principalement composée de collagène fibrillaire notamment de type I. Ils représentent 80 à 90% des collagènes présents dans le corps humain (Van Der Rest and Garrone 1991) (Tableau 3).

Type	Famille	Tissus	Caractéristiques
I	A	Os, Derme, Cornée...	Majoritaire
II	A	Cartilage, humeur vitreuse	Fibrilles fines
III	A	Derme, Paroi des vaisseaux	Associé au type I
IV	B	Membrane basale	Non fibrillaire
V	A	Tissus conjonctifs	Régule la taille des fibrilles de type I
VI	D	Muscle, Poumon, Derme, Cartilage, Paroi	Filaments perlés
VII	E	vaisseaux	Fibrilles d'ancrage
VIII	B	Peau, Jonction dermo-épidermique, muqueuse	Non fibrillaire
IX	C	Endothélium, Membrane de Descemet	Associé au type II
X	B	Cartilage, Corps vitré	Non fibrillaire
XI	A	Cartilage hypertrophique	Associé au type II
XII	C	Cartilage, Corps vitré	Associé au type I
XIII	F	Ligaments, Tendons	Transmembranaire
XIV	C	Follicule pileux, épiderme	Associé au type I
XV	G	Derme, Tendons, Poumon, Foie, Paroi des	
XVI	C	vaisseaux	Associé au type I
XVII	F	Muscle, Pancréas, Rein, fibroblaste, Vaisseaux	
XVIII	G	Fibroblaste, Kératinocyte	Associé au type IV
XIX	C	Jonction dermo-épidermique	Rare
XX	C	Poumon, Foie, Rate	
XXI	C	Rhabdomyosarcome	
XXII	C	Tendon, épithélium cornéen, peau embryonnaire	
XXIII	F	Paroi des vaisseaux	Rare
XXIV	A	Cartilage, Follicules pileux	Expression sélective
XXV	F	Jonction des tissus	Associé au type I
XXVI	D	Cornée, Os	
XXVII	A	Plaque amyloïde	Associé au type I
XXVIII	D	Cartilage, Peau Membrane basale	Interruptions

Tableau 3: Types de collagène : Récapitulatif des différents types de collagènes, leurs distributions dans les tissus et de leurs caractéristiques notables. (Adapté de (Prockop and Kivirikko 1995; Kadler, Baldock et al. 2007))

Les molécules de collagènes ont une structure hélicoïdale caractéristique composée de trois chaînes alpha enroulées les unes autour des autres (triple hélice), excepté aux extrémités N et C-terminales (Figure 12) (Ricard-Blum 2011). La description du domaine hélicoïdal principal est valable pour tous les collagènes. Les trois chaînes polypeptidiques peuvent être identiques (forme homotrimérique) ou différentes (forme hétérotrimérique). La structure de chaque chaîne α consiste en des répétitions de la triple séquence d'acides aminés glycine-X-Y, où X et Y sont

le plus souvent une proline et une hydroxyproline. Le nombre de répétitions de ce motif dépend du type de collagène. Pour les collagènes fibrillaires, le domaine en triple hélice est continu alors que pour les collagènes non fibrillaires il est interrompu par des domaines non collagéniques.

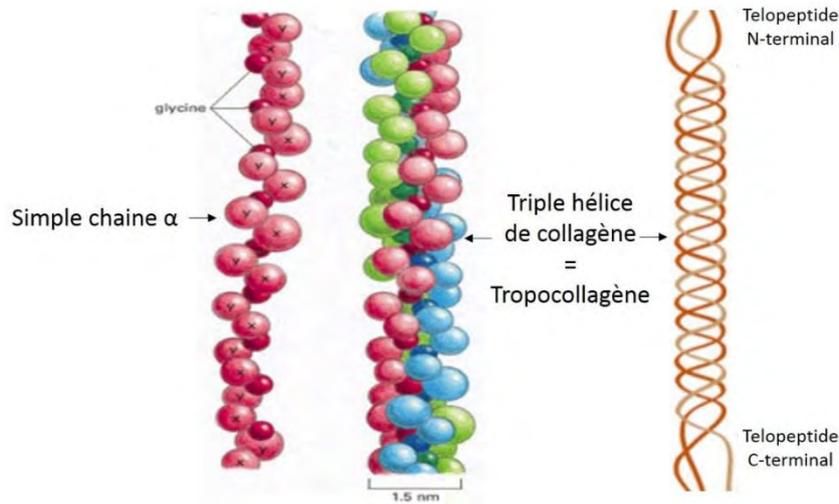


Figure 12: Représentation d'une chaîne α , un monomère de collagène. Deux représentations de la triple hélice de collagène composée de 3 chaînes
(<https://www.studyblue.com/notes/n/connective-tissues/deck/5475619>)

Du fait de son abondance dans les tissus et de sa structure spécifique, la molécule de collagène et particulièrement le collagène de type I a été très étudiée que ce soit d'un point de vue physicochimique, biochimique ou pour ses fonctions dans les tissus (Bella and Hulmes 2017; Kadler 2017). Dans le cadre de notre étude, nous nous limiterons à la description des collagènes fibrillaires et plus particulièrement aux collagènes de type I, composants majeurs de la peau (décrite dans la partie I.2.e).

Structure et biosynthèse du collagène de type I

Les collagènes fibrillaires sont produits par les cellules du tissu conjonctif telles que les fibroblastes (peau, cornée), les chondrocytes, les ostéoblastes, les cellules de Schwann, les cellules musculaires lisses ou les cellules musculaires striées. La chaîne α est synthétisée au niveau des ribosomes puis sécrétée dans le réticulum endoplasmique, où les trois chaînes α sont modifiées indépendamment les unes des autres. Les prolines sont majoritairement hydroxylées sous la forme d'hydroxyprolines par la prolyl 3-hydroxylase. Les lysines sont modifiées en

hydroxylysines par les lysyl-hydroxylases. Ces deux enzymes sont des enzymes clés dans la production et la maturation du collagène. La formation de ponts disulfure entre les pro-peptides C-terminaux permet l'alignement des trois chaînes α qui vont s'enrouler et former une triple hélice appelée procollagène. Cette configuration est permise par la grande régularité de la séquence d'acides aminés, et notamment de la présence d'une glycine tous les trois résidus. A la sortie du réticulum endoplasmique, les triples hélices de pro-collagène transitent par l'appareil de Golgi où elles sont glycosylées au niveau des résidus hydroxylysine, leurs fonctions hydroxyles permettant la formation de liaisons hydrogènes entre les chaînes α stabilisent la triple hélice. Les triples hélices sont ensuite concentrées dans des vésicules et adressées à la membrane plasmique pour être relarguées dans l'espace extracellulaire (Myllyharju and Kivirikko 2004).

Après leurs sécrétions dans l'espace extracellulaire, les domaines N et C-terminaux sont clivés par des enzymes N et C propeptidases. La molécule résultant, appelée tropocollagène, est constituée d'un domaine en triple hélice et d'une courte structure non hélicoïdale à chaque extrémité. Ces motifs non-collagéniques (partie n'étant pas formée de triple hélice) confèrent à cette protéine des sites de liaison à d'autres partenaires matriciels tels la fibronectine ou les glycosaminoglycanes (Shaw and Olsen 1991; Ricard-Blum 2011). La diminution de la solubilité, liée à la perte des domaines C- et N-terminaux, enclenche le phénomène de fibrillogenèse, un phénomène extracellulaire d'auto-assemblage des triples hélices de collagène en fibrilles de collagène. Les molécules de tropocollagènes (300 nm de long et 1,5 nm de diamètre) vont s'aligner parallèlement et dans le même sens avec un décalage régulier de 67 nm. Les liaisons hydrogènes permettent l'auto-assemblage et divers processus biochimiques aident à stabiliser la structure. Par exemple les lysines de la partie N-terminale d'une molécule de tropocollagène sont pontées de manière covalente à d'autres lysines de la partie C-terminale d'une voisine, via la lysyl-oxydase. La synthèse et l'assemblage du collagène suit le processus décrit dans la figure 13. Cet agencement permet aux molécules de tropocollagène de s'assembler en fibrilles de 10 à 300 nm de diamètre. Les différentes fibrilles peuvent de plus s'associer entre elles, ainsi qu'à d'autres protéines de la matrice extracellulaire pour former des fibres de collagènes de 0,5 à 5 μm de diamètre.

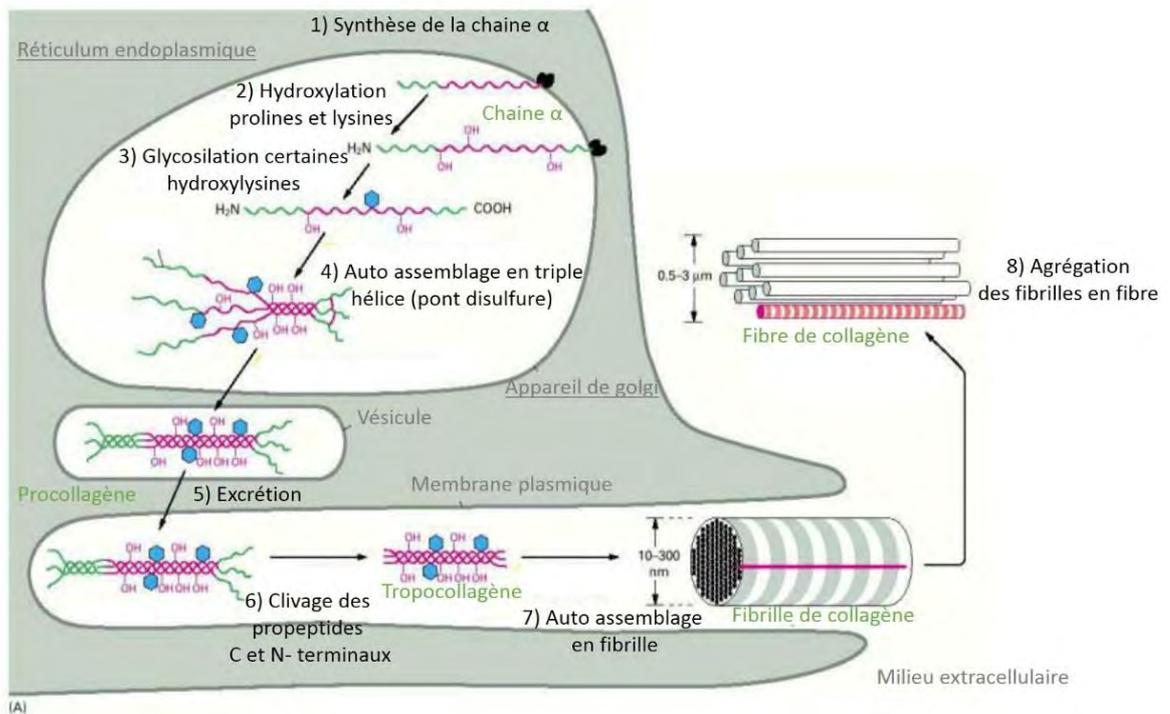


Figure 13: Schéma résumant la biosynthèse du collagène *in vivo*. Copyright 1994 *Molecular Biology of the Cell, Third Edition*, Alberts, B, Lewis, R, Roberts, W (eds)

Les collagènes fibrillaires sont principalement retrouvés dans la peau (40%), les os (10-20%), les cartilages, les tendons et l'œil. Une mauvaise conformation du collagène peut provoquer des dysfonctionnements à l'origine de graves pathologies. Parmi les plus connues, le scorbut est une pathologie liée à l'absence de la vitamine C, un cofacteur de la prolyl 3-hydroxylase et de la lysine hydroxylase, dans l'alimentation (Prost-Squarcioni, Fraïtag et al. 2008). Son absence est associée à une diminution de l'activité de la prolyl 3-hydroxylase, les chaînes α nouvellement synthétisées ne forment pas de trimères stables et sont dégradées à l'intérieur des cellules. Cette anomalie post-translationnelle de la synthèse du collagène se traduit par une fragilité tissulaire responsable de saignements chroniques, notamment le déchaussement des dents en rapport avec l'affaiblissement des ligaments qui les ancrent sur les mâchoires et des défauts de cicatrisation. D'autres pathologies sont d'origines génétiques, comme l'ostéogénèse imparfaite (ou maladie des os de verre) ou encore le syndrome d'Ehler-Danlos manifesté par une hyper-élasticité des tissus (Bateman, Boot-Handford et al. 2009).

In vivo, la dégradation des collagènes est assurée par des métalloprotéases matricielles (MMPs), notamment les collagénases spécifiques des collagènes fibrillaires (I, II et III)

(Trackman 2005). Ces enzymes clivent la partie hélicoïdale de la molécule de collagène, ce qui a pour conséquence le déroulement de l'hélice et produit un collagène dénaturé. Le déroulement expose des sites sensibles à l'action d'autres métalloprotéases comme les gélatinases (MMP-2 et 9).

La rupture de l'équilibre entre la synthèse et la dégradation des collagènes peut conduire à des anomalies structurales des tissus. Par exemple, l'arthrose est le résultat d'un déséquilibre entre anabolisme et catabolisme de la matrice extracellulaire. Le déséquilibre est provoqué par une synthèse accrue de protéases (et plus particulièrement de certaines métalloprotéases) qui ont pour substrat les protéines collagéniques et non collagéniques de la matrice et une diminution de la synthèse d'inhibiteurs naturels des protéases (les TIMPs) (Bateman, Boot-Handford et al. 2009).

Techniques d'imagerie du collagène

A l'heure actuelle il existe différentes méthodes conventionnelles d'imagerie du collagène avec des résolutions allant du mm au nm.

La coloration histologique utilise des colorants pour fixer spécifiquement les molécules à visualiser. Pour les tissus conjonctifs, les principaux colorants sont l'Hématoxyline Eosine Safran, le trichrome de Masson et le Rouge-Sirius qui permettent de discriminer les collagènes des différents constituants tissulaires (Figure 14). Le trichrome de Masson associe trois colorants : le colorant cytoplasmique acide qui va colorer en premier les éléments tissulaires acidophiles dont les constituants les plus perméables sont les fibres de collagène. Les éléments tissulaires les moins perméables vont quant à eux être colorés en rouge. La liaison entre les fibres de collagène et les premiers colorants va se rompre pour laisser place à un troisième colorant, le bleu d'aniline, visible dans la figure 14 B sur une coupe de peau humaine.

La microscopie électronique est utilisée pour étudier la structure du collagène à l'échelle du tissu avec le microscope électronique à balayage (MEB) et à l'échelle moléculaire avec le microscope électronique à transmission (MET). Brièvement, pour produire une image la microscopie électronique à balayage utilise les électrons secondaires émis de la surface de l'échantillon lorsque celui-ci est balayé par un fin faisceau d'électrons primaires. Pour rendre l'échantillon conducteur au flux d'électrons et optimiser l'émission d'électrons secondaires,

l'échantillon est au préalable recouvert d'une fine couche de métal lourd après avoir été fixé et déshydraté. Cette technique a l'avantage de pouvoir fournir des images en 3D des surfaces observées, ce qui permet ainsi de visualiser l'organisation à la surface de l'échantillon. La figure 14 C montre un gel de collagène observé au MEB. Le MET permet d'identifier le collagène fibrillaire dans un substitut dermique humain grâce aux striations caractéristiques (alternance de bandes claires et sombres) dues au décalage périodique des tropocollagènes dans la fibrille (Figure 14 D). Les principes de fonctionnement du microscope électronique à transmission requièrent des échantillons suffisamment minces pour transmettre le faisceau d'électrons. Pour cela, les échantillons sont fixés par des agents chimiques et inclus dans une résine pour être débités en coupes très minces par technique d'ultramicrotomie. Les échantillons biologiques sont essentiellement formés d'éléments atomiques légers qui interagissent peu avec les électrons, alors il est nécessaire de les contraster avec des métaux lourds pour pouvoir révéler les éléments membranaires des cellules (membrane plasmique, réticulum endoplasmique, vésicules...) et notamment les striations transverses des fibrilles de collagènes.

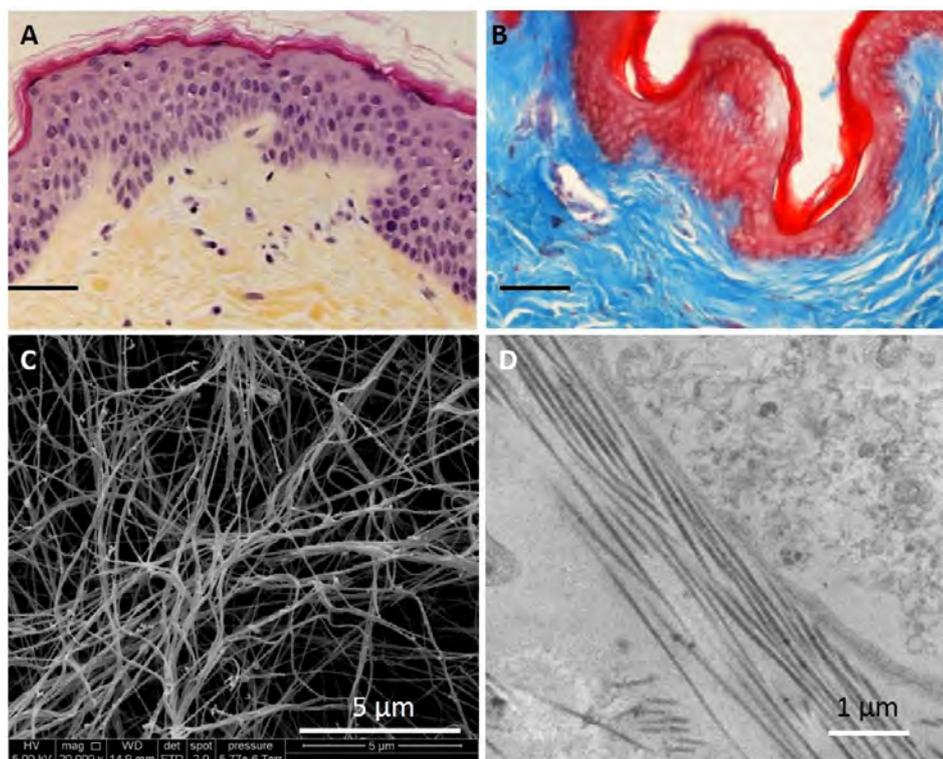


Figure 14: Techniques d'imageries du collagène. Coloration histologique de la peau humaine A) Coloration hématoxyline-éosine-safran HES, B) Trichrome de Masson ; Fibre de collagène C) Microscope électronique à balayage (gel de collagène) D) Microscope électronique à transmission (substitut dermique)

Bien que l'histologie et la microscopie électronique fournissent des informations précieuses et détaillées concernant la composition et la morphologie des collagènes dans un tissu, ces techniques sont limitées par la fixation, la déshydratation et la coloration, ce qui affecte irrémédiablement la viabilité du tissu. En outre, la visualisation tridimensionnelle en profondeur du tissu n'est pas possible avec ces modalités.

Ces dernières années, la microscopie multiphotonique a suscité beaucoup d'intérêt dans l'imagerie des tissus normaux et pathologiques car elle présente des avantages importants tels qu'une faible invasivité, la capacité de détecter des signaux endogènes variés, une résolution 3D intrinsèque et la capacité de pénétrer plus profondément dans les tissus tout en conservant une bonne résolution tridimensionnelle. La profondeur de pénétration reste cependant très dépendante des caractéristiques du tissu. Le principe de la microscopie multiphotonique est d'utiliser comme mode de contraste un phénomène impliquant l'interaction simultanée de plusieurs photons avec la molécule ou la structure à détecter. L'excitation se fait par absorption simultanée de deux photons peu énergétiques fournis par un laser délivrant des impulsions dans le proche infrarouge (700 à 1200 nm) plutôt que par l'absorption d'un photon unique. Toutes ces caractéristiques permettent de travailler et d'observer des phénomènes dynamiques en direct sur des tissus frais, c'est-à-dire non fixés. Le succès de la microscopie à deux photons est aussi dû à la possibilité d'acquérir des images combinant plusieurs modes de contraste, fournissant des renseignements complémentaires par rapport à l'imagerie de fluorescence, comme la génération de seconde harmonique (SHG). Le phénomène de génération de seconde harmonique correspond à la génération d'un signal lumineux indépendamment d'un marqueur fluorescent dans des conditions bien spécifiques. Elle est sensible à une organisation spécifique dite non centrosymétrique d'un ensemble de molécule. Les molécules responsables de la génération du signal de seconde harmonique doivent non seulement présenter une asymétrie au niveau moléculaire mais aussi une répartition spatiale organisée et non-centrosymétrique. Cette contrainte importante a l'avantage d'être extrêmement exclusive car peu d'entités biologiques présentent ces caractéristiques simultanément, ce qui permet ainsi de visualiser une composante moléculaire spécifique (Campagnola, Millard et al. 2002; Campagnola and Loew 2003). Les fibres musculaires et plus précisément les fibres de myosine constituent une source de signal SHG endogène (Nucciotti, Stringari et al. 2010) (Figure 15 A). Les microtubules, organisés en

fibres orientées dans les fuseaux mitotiques, sont un autre exemple de source de SHG endogène (Campagnola, Millard et al. 2002) (Figure 15 B).

La plus importante source de SHG dans les tissus est le collagène fibrillaire qui fournit des signaux de SHG particulièrement élevés permettant de visualiser sa distribution au sein des tissus (Figure 15 C). C'est le domaine en triple hélice du collagène qui est responsable de la SHG au niveau moléculaire, mais c'est l'organisation macromoléculaire et la répartition spatiale des fibrilles qui détermine l'efficacité de la génération de seconde harmonique. Donc même si la triple hélice est le point commun de toutes les protéines de la famille des collagènes, tous ne peuvent pas générer du signal SHG car le fort signal est obtenu du fait de l'organisation macromoléculaire du collagène plutôt que par sa composition biochimique. C'est pourquoi la SHG offre une excellente spécificité des collagènes fibrillaires dans les tissus. Les images ainsi obtenues révèlent l'architecture générale des tissus et fournissent un nouvel outil pour l'étude de processus pouvant affecter la matrice extracellulaire (Campagnola, Millard et al. 2002; Cox, Kable et al. 2003).

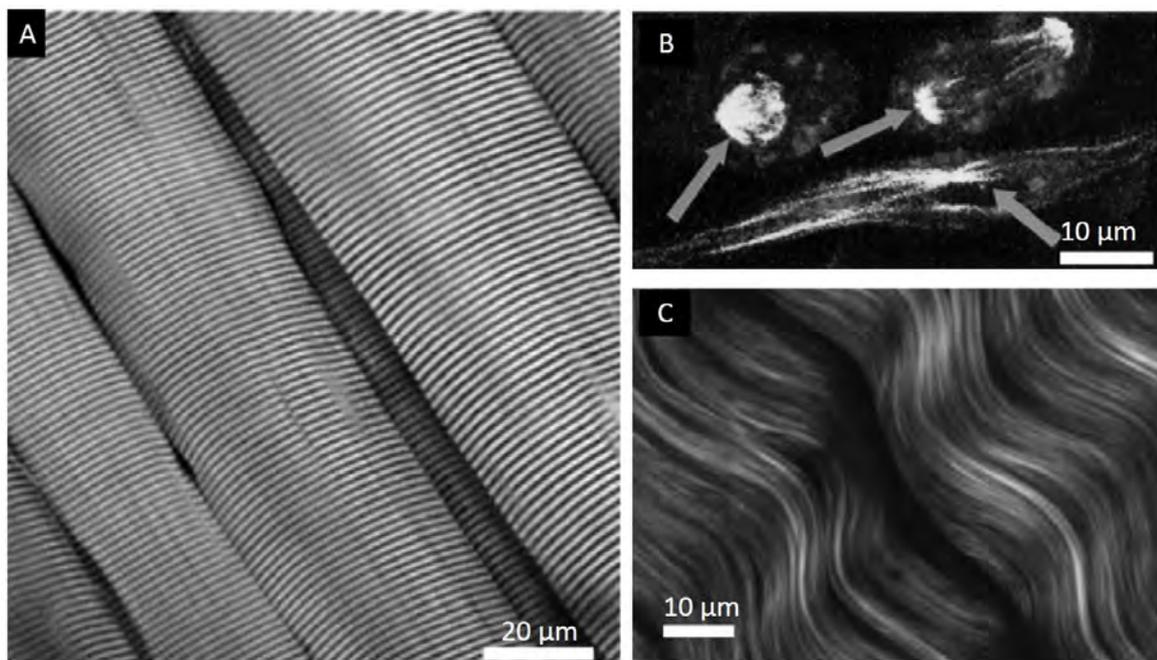


Figure 15: Images de SHG endogène. A) SHG bande A du sarcomère muscle gastrocnémien; B) SHG fibres mitotiques et microtubules en interphase dans les cellules RBL; C) SHG collagène issue du tendon de queue de rat. (Vanzi, Sacconi et al. 2012)

ii. Fibres élastiques

Un réseau de fibres élastiques présent dans la matrice extracellulaire est responsable de l'élasticité des tissus. Elles sont retrouvées très abondamment dans les tissus tels que les ligaments, les muscles ou la paroi des vaisseaux sanguins. Les constituants principaux des fibres élastiques sont une composante microfibrillaire et l'élastine. C'est l'élastine qui confère aux fibres élastiques leur élasticité et permet par exemple à la peau de reprendre sa position d'origine après étirement. La partie microfibrillaire de la fibre élastique est principalement composée de fibrilline (Weihermann, Lorencini et al. 2016).

L'élastine est traditionnellement décrite comme un polymère hydrophobe qui est totalement insoluble dans l'eau. L'élastine s'assemble via la réticulation dans l'espace extracellulaire des molécules de tropo-élastine, précurseur soluble de l'élastine, synthétisées et sécrétées sous forme de monomères hydroxylés par les fibroblastes. La molécule de tropoélastine est sécrétée dans le proche voisinage d'une fibre élastique en cours de construction afin de permettre le contact étroit avec la composante microfibrillaire de la fibre. Une famille d'enzyme des lysyl oxydases (LOXs) vont modifier des résidus lysine de la tropoélastine et le monomère activé va interagir avec les microfibrilles pour être intégré dans la fibre élastique en formation. Ces fibres peuvent être étirées jusqu'à 100-120% de leur longueur initiale et peuvent retourner à leur état d'origine après relaxation (Figure 16).

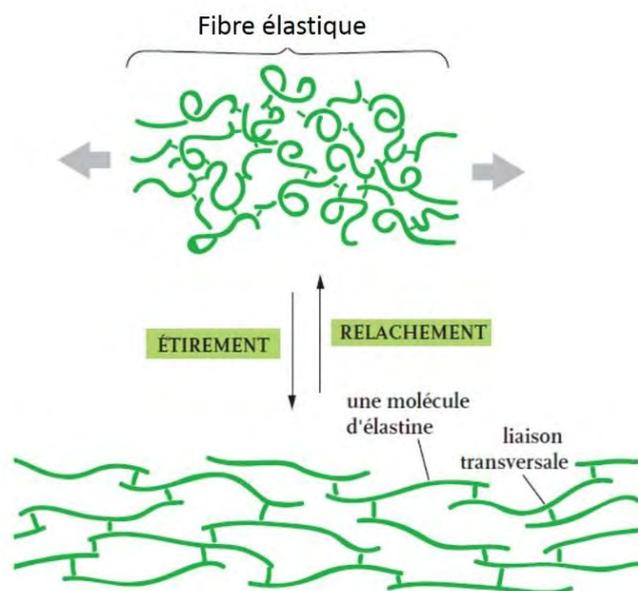


Figure 16: Schéma fibre d'élastine, état relâché et étiré (
<http://physiotherapymilan.it/blog/page/4/>)

L'action des enzymes rend l'élastine insoluble grâce à des ponts covalents avec les fibres, ce qui les classent parmi les protéines les plus résistantes de l'organismes car très difficilement dégradables par des agents chimiques (Baldwin, Simpson et al. 2013). Toutefois, certaines enzymes comme les élastases sont capables d'hydrolyser plus ou moins spécifiquement l'élastine. Parmi ces enzymes on trouve des MMPs comme les gélatinases MMP-2 et 9, les métalloélastases de macrophages (MMP-12) et la matrilysine (MMP-7,26 et 11) synthétisée par les cellules épithéliales (Mecham, Broekelmann et al. 1997).

Dans les tissus, les fibres d'élastine sont mêlées à des fibres de collagène qui limitent leur extension et évitent ainsi leur rupture.

Il existe trois types de fibres élastiques cutanées dénommées fibres oxytalanes, fibres élaunines et les fibres élastiques matures. Elles se distinguent respectivement en fonction de leur ratio plus important d'élastines vis-à-vis de la structure microfibrillaire. Ces fibres se retrouvent différemment exprimées dans les différents compartiments dermiques. Les fibres oxytalanes, exclusivement constituées de microfibrilles, sont localisées dans le derme et forment de fines arborisations perpendiculaires à la jonction dermo-épidermique. Les fibres d'élaunine et les fibres élastiques matures contiennent respectivement soit peu ou beaucoup de substance d'élastine.

b. Les polysaccharides matriciels : résistance de la matrice et réservoir de molécules bioactives

Les polysaccharides matriciels composent ce qui est communément appelée la substance fondamentale dans les tissus conjonctifs. C'est un matériau sans forme définie qui comble les espaces entre les cellules et qui retient les fibres. Elle est composée entre autre de liquide interstitiel, de protéines d'adhérence (glycoprotéines) et de protéoglycanes.

Les protéoglycanes (PGs) sont composés de deux molécules basiques: la protéine cœur (core) et les glycosaminoglycanes (GAGs) (Figure 17). Les protéines cœur sont riches en acides aminés comme la sérine et la thréonine, ces résidus agissent comme un point d'attachement auquel se lient les différents GAGs pour donner naissance à une structure semblable à une brosse. Les GAGs constituent environ 95% du poids des protéoglycanes qui ressemblent davantage à des polysaccharides qu'à des protéines.

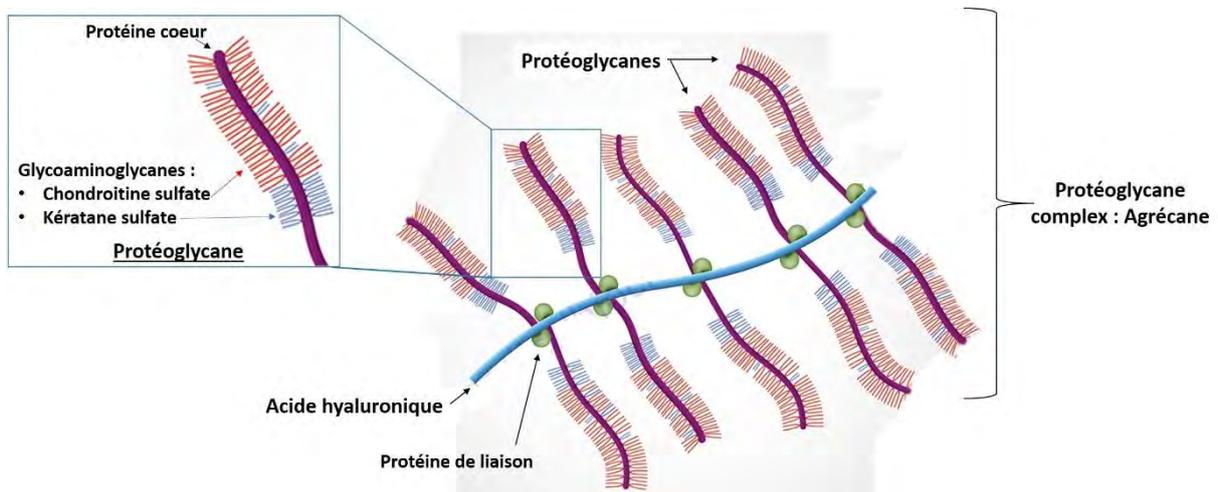


Figure 17: Schéma protéoglycane (PG) : protéine cœur centrale et glycosaminoglycane (GAG) ; exemple de l'agrécan, une protéoglycane complexe. <https://themedicalbiochemistrypage.org/glycans.php>

Les GAGs sont constitués de l'enchaînement d'unités disaccharidiques. Il en existe quatre types: la chondroïtine sulfate (CS), l'héparane sulfate (HS), la dermatane sulfate (DS) et la kératane sulfate (KS). Les GAGs de type HS, CS, DS et KS sont toujours sulfatés et liés à une protéine centrale et donc toujours retrouvés sous forme de protéoglycanes. L'acide hyaluronique est la seule famille de GAG non-sulfaté qui est retrouvée sous une forme non liée covalamment à une protéine (Gandhi and Mancera 2008). Les protéoglycanes, très abondant

dans la peau, forment un gel très hydraté qui confère au derme une grande résistance aux forces de compression.

Des GAGs de différente nature peuvent se lier à une même protéine cœur et former des complexes macromoléculaires de taille variable. Ces protéoglycanes peuvent ainsi être classés par rapport à la longueur et la composition de la protéine cœur et aussi en fonction du nombre de ramification et la composition des GAGs qu'ils possèdent. Les protéoglycanes les plus répandus sont la décorine (chondroïtine-sulfate/dermatane-sulfate) présente dans tous les tissus conjonctifs et en particulier dans la peau, le perlecan (héparane-sulfate) retrouvé dans les membranes basales, et l'agrécan abondant dans le cartilage.

La diversité de composition de la chaîne protéique et des GAGs confère aux protéoglycanes des fonctions biologiques et structurales variées. Les protéoglycanes assurent la régulation des échanges moléculaires en se liant par exemple au collagène par leur axe protéique et aux glycoprotéines de structure par les chaînes polysaccharidiques, organisant et orientant la matrice extracellulaire et la migration des cellules conjonctives. La très forte densité de groupements chargés négativement (sulfate et carboxyle) confère aux GAGs la propriété de retenir de grandes quantités d'eau et aussi la capacité de piéger de nombreuses cytokines et d'en moduler la biodisponibilité. Si la majorité de ces polysaccharides est retrouvée sous forme libre dans la matrice extracellulaire, il existe également des catégories de polysaccharides qui sont membranaires tels que les syndécans (protéoglycanes à héparanes sulfates) (Gandhi and Mancera 2008).

c. Les glycoprotéines: cohésion de la matrice

Parmi les molécules constitutives de la matrice extracellulaire, il existe une sous-catégorie complexe qui permet l'interaction entre les différents composants de la matrice et assurent la cohésion des tissus : les glycoprotéines. Les glycoprotéines de structure comme la fibronectine ou la laminine sont particulièrement impliquées dans les phénomènes d'adhésion entre les cellules et des composants de la matrice extracellulaire tels que les collagènes, les protéoglycanes et l'élastine.

Les glycoprotéines sont constituées elles aussi de complexes protéines-polysaccharides. Les glycoprotéines se distinguent des protéoglycanes par la quantité et la disposition de leurs chaînes latérales de sucre. En effet, les glycoprotéines contiennent entre 1 et 60% de glucides

sous forme de chaînes courtes d'oligosaccharides ramifiés, tandis que les protéoglycanes peuvent contenir jusqu'à 95% de glucides, sous forme de longues chaînes de GAGs non ramifiées. Ces protéines sont dites complexes de par leur haut poids moléculaire (plusieurs milliers de Da) et de par leur structure organisée en module individuel. Au sein de ces modules se trouvent des séquences en acides aminés qui permettent à la molécule de se lier à d'autres protéines et/ou de s'auto-assembler pour former un réseau complexe. La fibronectine, une des principales glycoprotéines, possède par exemple des domaines de liaison reconnus par les intégrines membranaires (Figure 18). Elle joue un rôle fondamental dans les interactions cellule/matrice extracellulaire et dans la migration cellulaire ainsi que la prolifération et la différenciation. La vitronectine est une glycoprotéine présente dans le plasma qui est déposée sous forme fibrillaire dans les tissus. Elle se lie généralement aux protéoglycanes de la matrice extracellulaire et peut s'associer aux fibres élastiques. Enfin les laminines sont les composants non collagéniques majoritaires des lames basales. Elles présentent des sites de liaisons au collagène, à l'héparine et aux cellules (Mouw, Ou et al. 2014).

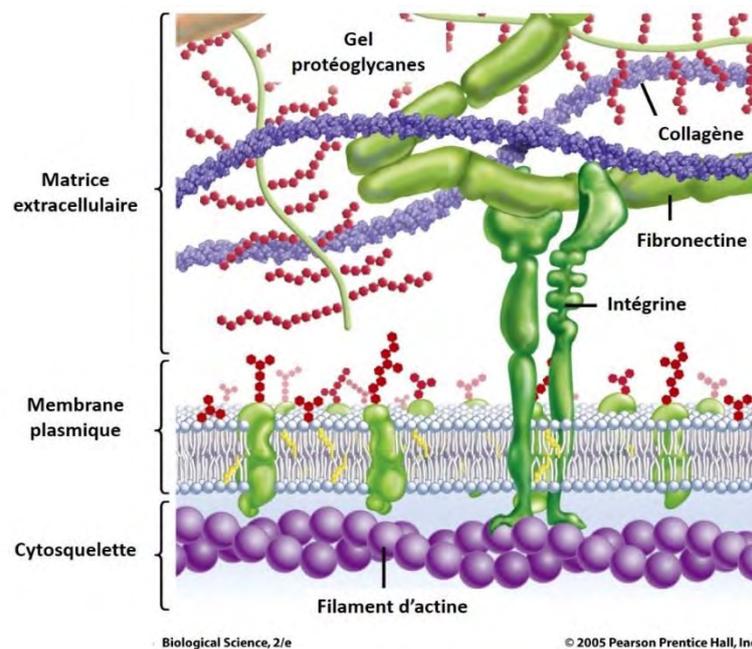


Figure 18: Schéma représentant les interactions membrane et matrice extracellulaire; exemple de la fibronectine associée au collagène et à une protéine transmembranaire, l'intégrine. Pearson Prentice Hall, Inc 2005

En plus de former des réseaux, ces glycoprotéines ont la possibilité de lier des facteurs de croissance et participent donc au rôle de réservoir de facteurs de croissance de la matrice extracellulaire.

d. Les enzymes associées à la matrice

Les enzymes agissent sur la réorganisation de la matrice extracellulaire en la modifiant (dégradation et pontage). Les matrices extracellulaires sont en renouvellement constant et subissent de profonds remaniements au cours de phénomènes biologiques ou pathologiques comme le développement embryonnaire, la cicatrisation, le cancer ou l'athérosclérose.

Les enzymes associées à la matrice sont de deux sortes : les enzymes liantes ou ligases (lyases) et les enzymes dégradantes dont les protéases.

Les enzymes liantes ont pour fonction première de lier covalamment les molécules entre elles afin de renforcer les réseaux formés dans la matrice. Parmi ces enzymes se trouvent la transglutaminase et la lysyl-oxydase qui peuvent ponter les fibres de collagène et de fibrilline (Ricard-Blum 2011).

Les molécules extracellulaires peuvent être dégradées par de nombreuses enzymes catalytiques qui ont des modes d'actions variés dépendants de l'activité de leur site actif (Wolf and Friedl 2011). Les enzymes catalytiques ont plusieurs rôles dont celui de permettre le renouvellement de la matrice tout en frayant un chemin pour la migration des cellules au sein de cette matrice. Ces enzymes ont également un rôle important dans les processus de modifications post-traductionnelles des molécules indispensables à l'organisation des molécules dans les réseaux de la matrice extracellulaire. Elles permettent ainsi aux précurseurs d'acquérir leur forme « active » avec notamment le clivage des pro-MMPs en MMPs et des pro-collagènes en collagènes. Enfin, le clivage des protéines de la matrice extracellulaire peut également engendrer des peptides biologiquement actifs appelés matrikines (Ricard-Blum and Salza 2014). Le clivage de la laminine-5 par la MMP-2 en est un exemple. Il engendre un fragment de la chaîne $\gamma 2$ qui stimule la migration cellulaire. Par leurs actions protéolytiques sur les molécules matricielles, les MMPs peuvent avoir une activité protéolytique très spécifique qui provoque la libération des facteurs de croissance stockés dans la matrice extracellulaire et agissent ainsi sur le phénotype cellulaire. Par exemple, la dégradation du perlécane par la MMP-

1 ou la MMP-3 entraîne la libération de FGF (fibroblast growth factor) tandis que le clivage de la décorine par les MMP-2, 3 ou 7 conduit à la libération de TGF- β (transforming growth factor β) (Feige and Baird 1992). D'autres groupes de MMPs ont pour fonction de cliver d'autres protéines de la matrice extracellulaire (stromélysine, metallo-élastase du macrophage, MMP de type membranaire et d'autres non classées) (Page-McCaw, Ewald et al. 2007).

L'activité des MMPs est régulée par des inhibiteurs tissulaires endogènes spécifiques, les TIMPs (Tissue inhibitors of metalloproteinases). Les TIMPs forment des complexes de haute affinité avec les formes actives des MMPs via une multiplicité de sites d'interactions. Ils inhibent ainsi l'action catalytique exercée par différents groupes de MMPs. Les TIMPs sont synthétisés par les mêmes cellules qui produisent les MMPs : par exemple TIMP-1 et -2 sont synthétisés par les cellules mésenchymateuses, par les cellules tumorales, par les cellules endothéliales et les fibroblastes. L'activité des MMPs est basée sur l'équilibre entre l'activation des pro-MMP et l'inhibition par les TIMPs (Brew and Nagase 2010).

En conclusion, la matrice extracellulaire n'est pas un échafaudage dans lequel s'insèreraient les cellules, mais plutôt une structure dynamique qui joue un rôle fondamental dans la structure et la fonction des organes humains. Les tissus conjonctifs sont variés (tendons, derme, os, cartilage, ...), mais dans tous ces tissus la masse est principalement constituée par la matrice extracellulaire, les cellules produisant cette matrice étant dispersées sporadiquement au sein du tissu. Les différents types de tissus conjonctifs doivent leurs caractères spécifiques à la composition à la fois quantitative et qualitative en collagènes. En fonction du type de collagène, de sa quantité, et des autres molécules (protéoglycanes entre autres) qui s'entrecroisent, le tissu aura des propriétés différentes.

Dans le cadre du transfert d'acides nucléiques, il est important de retenir que dans les tissus conjonctifs les cellules ne sont pas aussi accessibles que dans les autres tissus, notamment épithélial ou musculaire. En fonction de la densité du maillage de cette matrice et de sa composition la progression des acides nucléiques vers les cellules sera plus ou moins aisée. A la barrière physique constituée par cet enchevêtrement de molécules il faut ajouter la présence de nombreuses charges négatives au niveau du maillage, dûes aux GAG, qui peut également perturber le déplacement des molécules au sein du tissu. En effet les acides nucléiques sont chargés négativement et auront tendance à être repoussés.

e. La peau : un organe riche en matrice extracellulaire

Physiologie et structure de la peau

La peau est un organe complexe recouvrant en moyenne une surface de 1,5 à 2 m² du corps. Son poids totalise environ 15 % du poids total du corps adulte, ce qui lui vaut le titre du plus grand organe du corps humain. La peau possède de nombreuses fonctions impliquées principalement dans le maintien de l'homéostasie de l'organisme et notamment dans la thermorégulation, la défense contre les agressions extérieures (physiques, chimiques et biologiques). Elle joue également un rôle dans les fonctions sensorielles et métaboliques telles que la synthèse de vitamine D.

La peau est composée de trois couches distinctes qui interagissent ensemble afin d'assurer les différentes fonctions de la peau: l'épiderme, le derme et l'hypoderme (Figure 19).

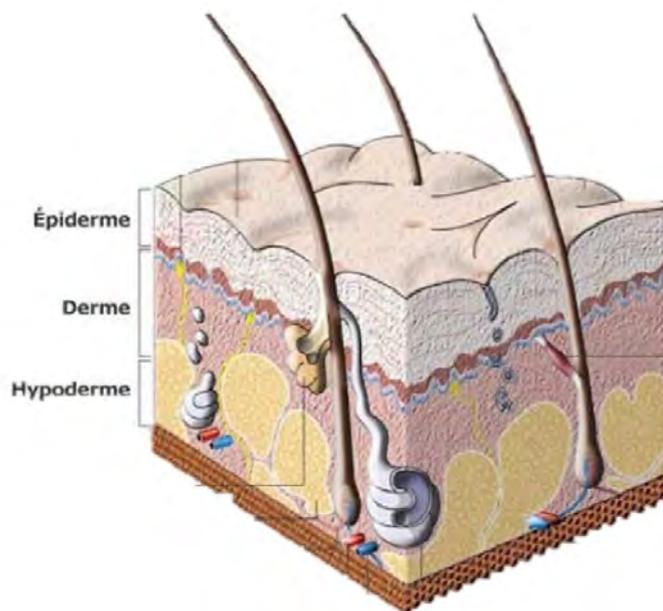


Figure 19: Représentation schématique de la peau humaine et de ses principaux composants; 3 compartiments : l'épiderme , le derme et l'hypoderme. <http://www.naturelcosmetik.com/>

Epiderme

L'épiderme est la couche la plus externe de la peau humaine. Il se compose de 4 types de cellules : les kératinocytes, les mélanocytes, les cellules de Langerhans et les cellules de Merkel. Les kératinocytes, les principales cellules de l'épiderme, se développent à partir de cellules souches sur la couche basale et se différencient vers la surface de la peau en modulant leurs propriétés cellulaires. Ce développement donne une structure stratifiée composée de couches superposées qui se terminent à la surface de la peau par une couche riche et épaissie de kératinocytes aplatis, anucléés, appelés cornéocytes : la couche cornée (stratum corneum) (Figure 20). Cette couche cornée joue un rôle de barrière imperméable. L'épiderme repose sur une lame basale qui le sépare du compartiment dermique à la jonction dermo-épidermique (Haake, Scott et al. 2001)

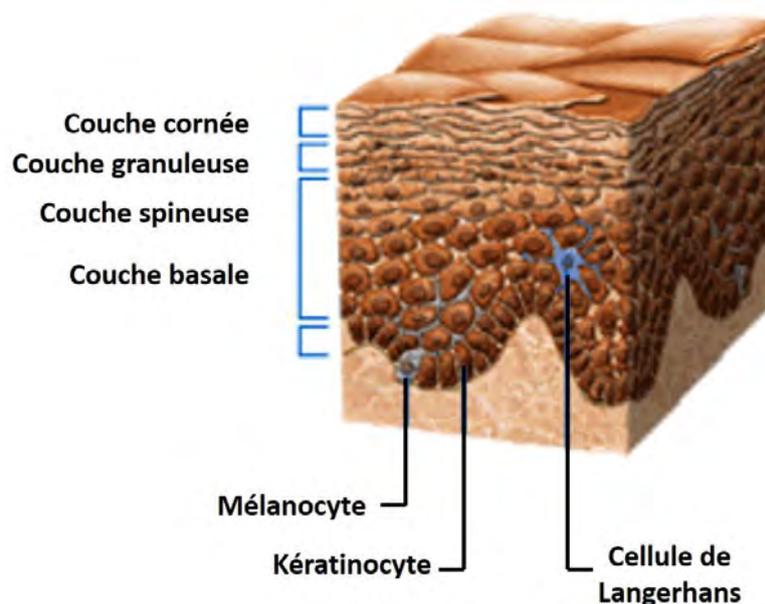


Figure 20: Schéma de la structure de l'épiderme ; un épithélium squameux stratifié kératinisé renouvelé continuellement, composé majoritairement de kératinocytes (90 à 95 %), de mélanocytes et de cellules de Langerhans (<http://slideplayer.fr/slide/3047150/>)

Les mélanocytes situés dans la couche basale produisent de la mélanine qui est responsable de la couleur de la peau et de la protection contre les UV. Les cellules de Merkel, également trouvées dans la couche basale, sont impliquées dans la perception sensorielle. Les cellules de Langerhans sont des cellules présentatrices d'antigènes et situées dans la couche moyenne de l'épiderme. Elles servent de sentinelles et détectent tout élément étranger qui passe les barrières de la peau.

Derme

Au-dessous de la membrane basale se trouve le derme, un tissu conjonctif dont la matrice extracellulaire très abondante est riche en collagènes fibrillaires et en fibres élastiques. Le derme comporte des cellules fixes comme les fibroblastes et les adipocytes et des cellules mobiles comme les macrophages, les cellules dendritiques du derme, les mastocytes, les granulocytes et les lymphocytes (Prost-Squarcioni, Fraitag et al. 2008). Le derme est divisé en deux couches sans limite franche : le derme superficiel constitué d'un tissu conjonctif lâche et le derme profond constitué d'un tissu conjonctif dense. Les fibroblastes retrouvés dans le derme superficiel sont responsables de la synthèse, de la dégradation et du remodelage de tous les composants de la matrice extracellulaire : le collagène, l'élastine, le gel de protéoglycanes et les glycoprotéines de structure (Krieg and Aumailley 2011). Le principal composant de cette matrice est le collagène : 75% du poids sec de la peau, dont le collagène de type I représente à lui seul 80% à 90% du collagène total (Bouwstra, Honeywell-Nguyen et al. 2003). A la différence de l'épiderme, le derme est richement vascularisé par un réseau d'artères et de veines de moyen puis petit calibre. Il existe aussi dans le derme une vascularisation lymphatique permettant à certaines cellules comme les lymphocytes, les macrophages, les cellules dendritiques dermiques de circuler (Figure 21).

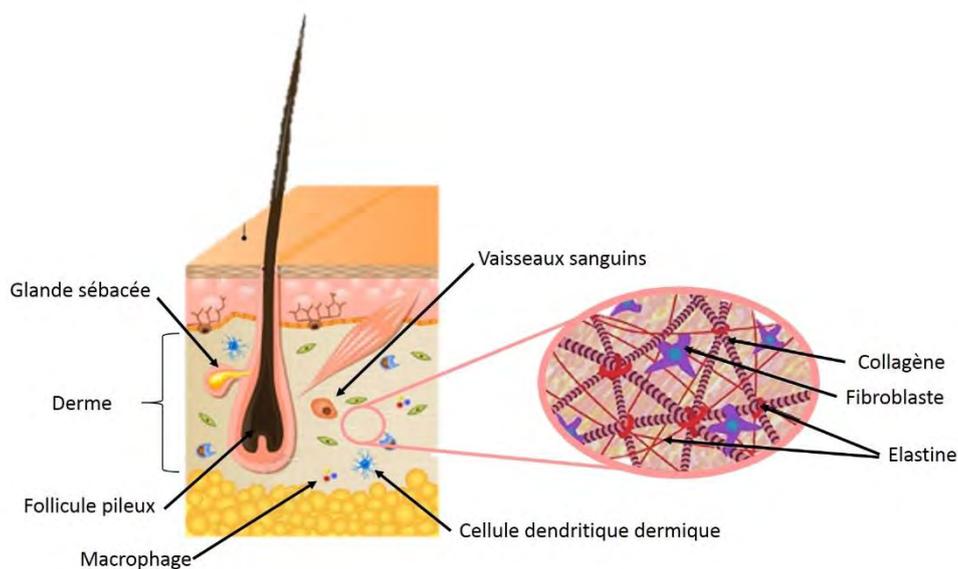


Figure 21: Schéma du derme ; un tissu conjonctif principalement composé d'une matrice extracellulaire produite par les fibroblastes dermiques.

Le derme a une fonction primordiale dans le soutien de l'épiderme tant mécanique (matrice extracellulaire) que dans la viabilité de la couche épidermique (vascularisation, nutriments, facteurs de croissances...). De plus il joue un rôle dans l'activation du système immunitaire (mastocyte, macrophage...) et dans la perception du toucher grâce à la présence de nombreuses cellules nerveuses (corpuscules de Pacini, Meissner et cellules de Merkel). Le derme contient aussi les annexes cutanées (follicules pileux, glandes sébacées et sudoripares).

L'hypoderme, la partie la plus profonde de la peau, assure le lien entre le derme et les muscles. Il est rattaché à la partie inférieure du derme par des expansions de fibres de collagène et de fibres élastiques. Il est principalement constitué de tissu adipeux qui a pour fonction d'emmagasiner l'énergie sous forme de graisse dans les adipocytes. Il joue un rôle clef dans la thermorégulation, l'amortissement des chocs et dans la réserve d'énergie. Cette couche contient aussi des fibroblastes et des macrophages, en plus de vaisseaux sanguins et des terminaisons nerveuses.

Un tissu stratégique

Parmi les organes composant le corps humain, la peau est un tissu cible stratégique pour la thérapie génique, principalement en raison de son accessibilité et de sa forte microvascularisation qui permet de considérer plusieurs approches thérapeutiques telles que la délivrance systémique de protéines thérapeutiques et la vaccination par ADN (Rochard, Scherman et al. 2011). Les vaccins ADN font partie d'une nouvelle génération de vaccins faisant appel au génie génétique. Ils permettent en effet d'exprimer les gènes codant les antigènes vaccinaux d'intérêt directement dans les cellules du sujet vacciné. L'intérêt de la peau pour la vaccination réside principalement dans sa richesse en cellules immunitaires, notamment en cellules de Langerhans et en cellules dendritiques dermiques, qui sont des piliers de l'immunité. Dans le domaine de l'électrotransfert de gène, la peau est majoritairement utilisée pour les vaccins ADN contre, entre autres, des maladies infectieuses, différents cancers, l'arthrite et la sclérose (Yarmush, Golberg et al. 2014). De nombreuses études ont été menées *in vitro* et *in vivo* depuis près de 25 ans sur l'électrotransfert de gène dans la peau à la fois de souris et humaine (Titomirov, Sukharev et al. 1991; Zhang, Li et al. 1996; Drabick, Glasspool-Malone et al. 2001; Heller, Schultz et al. 2001; Zhang, Nolan et al. 2002; Gothelf and Gehl 2010). Un exemple d'étude très avancé en phase clinique est celui de l'interleukine-12 (IL-12)

qui a été transfectée dans la peau par l'équipe de Richard Heller et qui présente un fort potentiel pour le traitement du mélanome (Heller, Schultz et al. 2001; Daud, DeConti et al. 2008; Shirley, Lundberg et al. 2015). La diversité cellulaire de la peau permet d'avoir différentes cibles potentielles en terme de thérapie génique. Par exemple les kératinocytes permettent une expression courte du transgène alors que les fibroblastes dermiques qui ont un cycle de division plus long permettent une expression plus durable. Le type de cellule cutanée transfectée est donc déterminant pour la durée de l'expression du transgène. En outre, les produits de l'expression du transgène peuvent profiter de la forte vascularisation de ce tissu pour se diffuser dans le corps. Les électrodes utilisées pour l'électrotransfert de gène dans la peau peuvent être divisées en deux groupes principaux : les électrodes non-invasives (électrodes de contact) et les électrodes invasives (aiguilles). Selon le type cellulaire ciblé et la durée d'expression souhaitée la configuration des électrodes est aussi modifiable. Comme la plupart des études ont été effectuées chez les rongeurs, les électrodes non invasives ont été le plus souvent utilisées. Cependant, lorsqu'il s'agit de traiter la peau humaine, qui est plus épaisse, il faut optimiser les électrodes (Gothelf and Gehl 2010).

Les expériences *in vitro* dans des systèmes modèles de composition simple et contrôlée permettent d'explorer et de comprendre les mécanismes et les conséquences de l'électropermabilisation. Cependant ces systèmes sont incomplets et limités car ils n'arrivent pas à représenter les interactions des cellules avec leur environnement. Or, comme vu précédemment, l'environnement influence le comportement cellulaire en réponse à un traitement. Une étude *in vitro* sur l'électrotransfert de gène en utilisant un modèle simple de cellules enrobées dans un gel 3D de collagène démontre l'intérêt de prendre en compte ce contexte 3D pour mieux comprendre les mécanismes (Haberl and Pavlin 2010). Dans leurs expériences les auteurs ont déposé la solution contenant les plasmides sur un gel de collagène contenant les cellules avant d'appliquer les impulsions électriques. Leurs résultats montrent que même si les cellules au sein de leur modèle sont efficacement électroperméabilisées, l'expression du plasmide est faible et limitée à la surface du gel. La mobilité des plasmides pendant l'électrotransfert de gène semble être limitée par la matrice de collagène.

Pour analyser la réponse cellulaire à l'échelle du tissu et développer les applications cliniques, les études sont passées à des modèles plus complexes : les modèles animaux. Les études *in vivo* sur la peau sont le plus souvent menées sur les souris, mais d'autres modèles animaux tels que

le cochon ont été également utilisés. Depuis quelques années, des doutes sont aussi émis quant à la pertinence de ces modèles dans la prédiction de la réponse tissulaire humaine. Les modèles animaux présentent des limites, notamment lorsqu'on s'intéresse à la peau. Ainsi, il est reconnu que la peau murine diffère largement de la peau humaine, particulièrement en terme d'architecture (organisation de l'épiderme, épaisseur de la peau, présence de poils) et en terme de composition cellulaire (Gothelf and Gehl 2010). De manière générale, un grand nombre de conditions différentes d'électrotransfert sont appliquées selon le tissu cible car le transfert de gène est dépendant de l'organisation du tissu et de la taille des cellules transfectées. Comme la comparaison des différentes procédures d'électrotransfert de gène n'est pas toujours évidente au sein d'un même tissu, les comparaisons inter-espèces sont d'autant plus complexes.

Les applications thérapeutiques de l'électrotransfert de gène dans la peau sont nombreuses mais la compréhension des mécanismes et l'optimisation de la procédure d'électrotransfert à l'échelle humaine est nécessaire. Il est donc indispensable de développer des modèles d'études humains fiables et alternatifs aux études basées sur les modèles animaux.

3. Ingénierie tissulaire

a. Du 2D au 3D

La culture *in vitro* de cellules permet aux chercheurs d'étudier l'activité cellulaire, de modéliser et d'évaluer l'effet de nouvelles molécules et ainsi de faire avancer le développement de nouvelles approches thérapeutiques. Les conditions environnementales, qui jouent un rôle crucial sur la structure, la physiologie et le comportement cellulaire, sont largement différentes *in vitro* et *in vivo*. L'interaction et la communication des cellules entre elles et d'une cellule avec son environnement extérieur détermine si elle va se diviser, se déplacer, se différencier ou mourir. Dans les systèmes biologiques, ces interactions se produisent principalement via les interactions cellule-cellule, cellule-matrice et récepteur-ligand. Dans de nombreux cas, ces interactions déclenchent des voies de signalisation spécifiques qui ont un effet sur le devenir cellulaire environnant. La compréhension des interactions des cellules avec leur environnement extracellulaire permet d'élaborer des modèles qui imitent efficacement les tissus *in vivo*.

L'ingénierie tissulaire est une discipline à l'interface entre les sciences de l'ingénieur et les sciences biologiques qui présente un double objectif : d'une part, celui de maintenir, réparer ou

reconstruire des tissus ou organes et, d'autre part, celui d'obtenir des cultures cellulaires en 3D, qui sont des modèles *in vitro* mimant mieux le phénotype *in vivo* que leurs équivalents en 2D (monocouches) (Langer and Vacanti 1993). Ces nouvelles techniques d'ingénierie tissulaire permettent d'étudier des phénomènes dans un tissu plus complexe et de sélectionner des conditions d'études expérimentales ce qui permet de réduire la quantité d'animaux utilisés dans un processus de recherche. Ces méthodes sont donc en accord avec la règle éthique des 3R (réduire, raffiner et remplacer). Le plus grand défi de l'ingénierie tissulaire est donc de produire *in vitro* des modèles qui sont représentatifs de la situation existant *in vivo*.

b. Modèles de l'ingénierie tissulaire

Le modèle sphéroïde

La culture de cellules cancéreuses dans des conditions non adhérentes permet de produire des sphéroïdes tumoraux tridimensionnels *in vitro* (Achilli, Meyer et al. 2012). La génération de sphéroïdes est basée sur une approche d'organogénèse qui utilise la capacité intrinsèque des cellules à adhérer entre elles et permet de produire une structure en 3D sans ajouter de matériaux exogènes (Whitesides and Grzybowski 2002). Il a été démontré que les sphéroïdes tumoraux 3D reflètent plus précisément les réponses des tumeurs humaines que les cultures simples de cellules 2D, en particulier en ce qui concerne la sensibilité aux médicaments. En effet, généralement les cellules tumorales cultivées en 3D présentent une augmentation significative de la résistance aux médicaments par rapport à celles cultivées dans des cultures monocouches 2D. Par exemple, dans les modèles sphéroïdes de cancer colorectal (Roberts, Williams et al. 2009) et de cancer du pancréas (Dufau, Frongia et al. 2012) une réduction de la réactivité aux agents anti-tumoraux a été observée par rapport aux mêmes cultures en monocouche.

La croissance des sphéroïdes s'accompagne de la mise en place d'un gradient d'oxygène décroissant de la périphérie vers le centre qui fait apparaître une région hypoxique au centre du sphéroïde. Parallèlement au gradient d'oxygène, un gradient de glucose et de facteurs de croissance se met en place, tandis qu'un gradient de métabolites se fait dans le sens inverse (Sutherland 1988; Hirschhaeuser, Menne et al. 2010) (Figure 22). La mise en place des gradients d'oxygène et de nutriments a pour conséquence l'établissement d'un gradient de cellules prolifératives. En effet, les cellules en prolifération sont localisées à la périphérie où l'oxygène et le glucose ne sont pas limitant (Sutherland 1988). Plus on s'éloigne de la surface,

plus les cellules entrent en quiescence. Lorsque les cellules sont privées d'oxygène et de nutriments, elles entrent dans un processus de mort cellulaire, conduisant à l'apparition d'un cœur nécrotique. L'ensemble de ces données montre que le modèle de sphéroïde permet de reproduire *in vitro* différents gradients présents au sein d'une tumeur, et mime ainsi efficacement la zone avasculaire des tumeurs *in vivo* (Sutherland 1988; Friedrich, Ebner et al. 2007; Mazzoleni, Di Lorenzo et al. 2009; Hirschhaeuser, Menne et al. 2010).

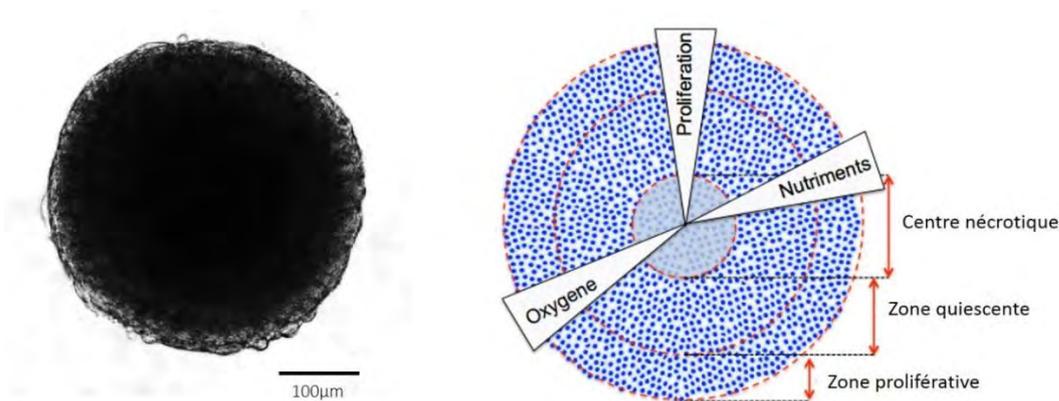


Figure 22: Sphéroïde tumoral (cancer colorectal humain) observé au microscope à champ large; Vue schématique d'un sphéroïde multicellulaire.

Enfin, l'utilisation de sphéroïdes limite considérablement le coût, le temps et les problèmes éthiques associés à l'utilisation de modèles précliniques animaux. Du point de vue de l'industrie pharmaceutique, il a été largement admis que l'intégration de sphéroïdes tumoraux dans le processus de développement de médicaments peut aider à sélectionner les candidats les plus prometteurs avant les essais cliniques.

Le modèle sphéroïde a été validé comme modèle d'étude pertinent pour les études sur l'électroporation (Wasungu, Escoffre et al. 2009; Chopinet, Wasungu et al. 2012; Marrero and Heller 2012; Gibot and Rols 2013). Ces études montrent que les effets des champs électriques sont plus proches de ceux observés *in vivo* que de ceux observés sur des monocouches en 2D. Même si les cellules au sein du sphéroïde peuvent être efficacement électroporées, l'expression génique après électrotransfert est en revanche limitée aux couches cellulaires externes du sphéroïde (Wasungu, Escoffre et al. 2009; Chopinet, Wasungu et al. 2012).

Cependant, même si le modèle sphéroïde permet de reproduire *in vitro* les interactions cellule-cellule en 3D comme *in vivo* (Dolznic, Walzl et al. 2011; Amann, Zwierzina et al. 2014), la matrice extracellulaire n'est présente que sous forme de trace. Ce modèle n'est donc pas optimal pour étudier la réponse à l'électrotransfert de gène d'un tissu riche en matrice extracellulaire comme la peau.

Un substitut dermique humain reconstruit par ingénierie tissulaire

Le tissu le plus largement exploré par l'ingénierie tissulaire est la peau et plus particulièrement l'épiderme. En effet, des substituts cutanés de plus en plus sophistiqués ont été produits depuis plusieurs décennies afin de les greffer sur des patients grands brûlés dans le but d'améliorer leur taux de survie et leur qualité de vie. Une grande expertise a donc été développée dans la reconstruction de peau humaine d'une part pour le traitement des grands brûlés et des plaies chroniques et d'autre part pour la recherche fondamentale dans le secteur du médicament et cosmétique (Shevchenko, James et al. 2009; Groeber, Holeiter et al. 2011). La principale différence entre les différents substituts disponibles est la composition du derme, basée sur l'utilisation d'une membrane artificielle, d'un gel de collagène, d'une éponge biodégradable ou d'un filet de nylon (Shevchenko, James et al. 2009).

Une approche alternative à la production d'un substitut cutané humain est la méthode d'auto-assemblage (Athanasίου, Eswaramoorthy et al. 2013). La méthode d'auto-assemblage repose sur la capacité des cellules à produire leur propre matrice extracellulaire lorsqu'elles sont stimulées, notamment par l'acide ascorbique aussi appelé vitamine C. Cette technique permet de produire *in vitro* une peau reconstruite humaine possédant un derme et un épiderme stratifié (Michel, L'Heureux et al. 1999; Auger, Pouliot et al. 2000; Athanasίου, Eswaramoorthy et al. 2013) (Figure 23).

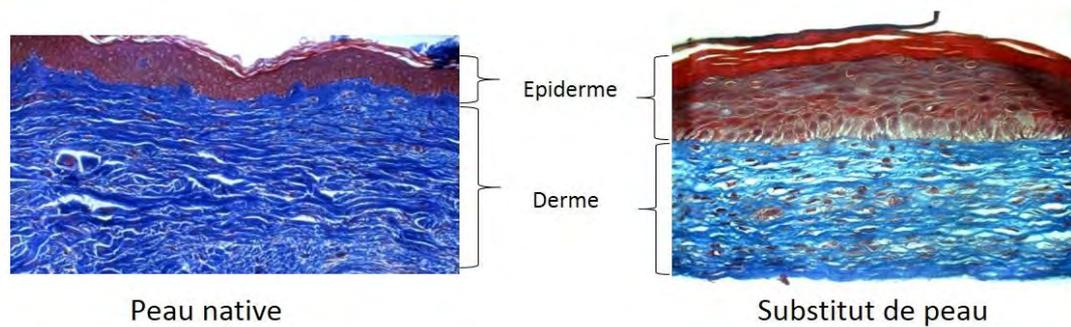


Figure 23: Coloration histologique au trichrome de Masson d'une peau native humaine et d'une peau reconstruite par la technique d'auto-assemblage (L. Gibot)

La brique de base du substitut cutané reconstruit par la méthode d'auto-assemblage est le feuillet dermique. Lorsque des fibroblastes dermiques sont cultivés en monocouche pendant 4 semaines en présence d'acide ascorbique, ils produisent et organisent suffisamment de matrice extracellulaire pour produire un feuillet manipulable. Les feuillets sont ensuite empilés pour former un tissu plus épais puisqu'ils fusionnent rapidement après empilement. Pour produire le compartiment épidermique, il suffit d'ensemencer des kératinocytes humains sur un de ces feuillets dermiques. La culture à l'interface Air/Liquide assure la différenciation terminale des kératinocytes et produit donc un épiderme stratifié présentant l'architecture d'un épiderme natif (Pouliot, Larouche et al. 2002; Auger, Berthod et al. 2004) (Figure 24).

Cette méthode de production d'un substitut cutané complètement autologue et ne nécessitant l'usage d'aucun biomatériau exogène, qu'il soit synthétique ou naturel, a permis d'obtenir d'excellents résultats dans le cadre d'une étude *in vivo* sur un modèle animal (Pouliot, Larouche et al. 2002). Ces résultats montrent que l'utilisation de cette peau reconstruite permet de restaurer les fonctions dermiques et épidermiques de façon permanente et pourrait permettre d'éviter l'utilisation de peau cadavérique et de matériaux exogènes tout en favorisant une cicatrisation adéquate. Ce modèle de substitut cutané est aussi un modèle idéal pour la recherche fondamentale et les tests précliniques concernant des thématiques de recherche sur la peau.

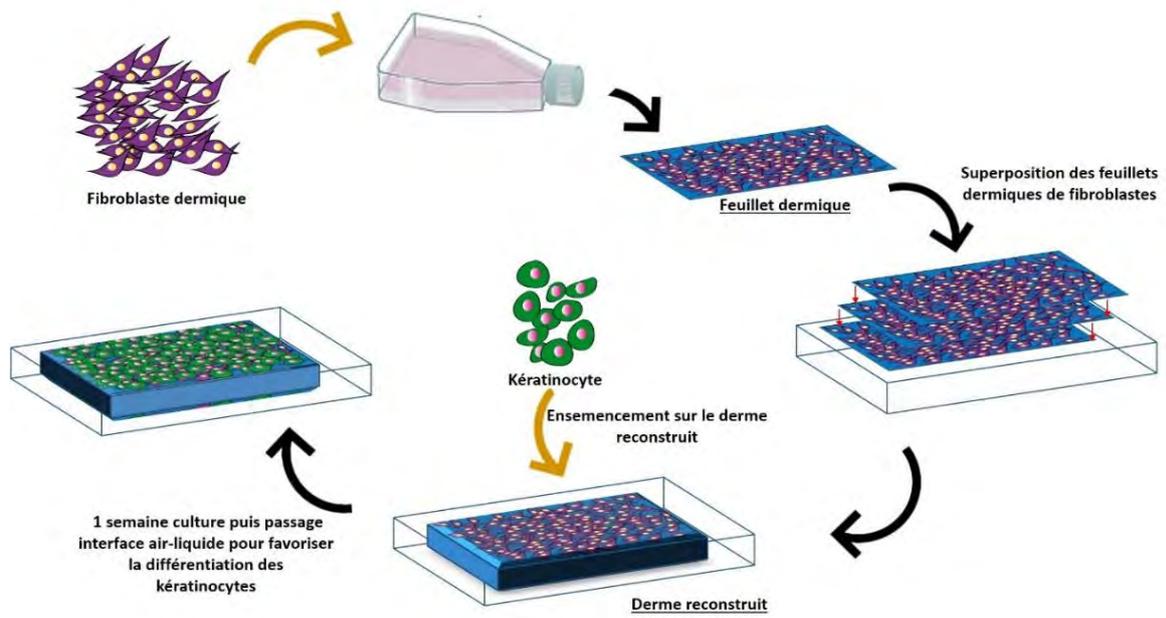


Figure 24: Schéma du protocole de fabrication d'un substitut cutané humain reconstruit par auto-assemblage. Réalisé à partir de (Pouliot, Larouche et al. 2002; Auger, Berthod et al. 2004)

II. OBJECTIFS

L'électrothérapie (EGT) est une méthode de transfert de gène efficace *in vitro* cependant tous les mécanismes du transfert d'ADN par électroporation ne sont pas encore complètement élucidés, en particulier dans le contexte *in vivo* (Escoffre, Portet et al. 2009). Plusieurs études démontrent que dans certains tissus tels que les tumeurs et la peau, l'expression des gènes est moins efficace que sur les cellules cultivées *in vitro* (Rols, Delteil et al. 1998; Vandermeulen, Staes et al. 2007). Dans le contexte *in vivo*, les vecteurs plasmidiques doivent surmonter plusieurs obstacles avant d'accéder à la machinerie d'expression protéique de la cellule cible. L'un des principaux obstacles au mouvement du plasmide est l'organisation et la densité de la matrice extracellulaire qui vont jouer un rôle majeur dans la distribution de ce dernier au sein du tissu (Zaharoff, Barr et al. 2002; Mesojednik, Pavlin et al. 2007; Escoffre, Teissie et al. 2010). La littérature démontre en effet l'implication de la matrice extracellulaire car l'altération par voie enzymatique de la matrice extracellulaire tumorale augmente significativement l'efficacité de l'électrotransfert d'ADN (Zaharoff, Barr et al. 2002; Henshaw, Mossop et al. 2008; Cemazar, Golzio et al. 2012). Il est donc nécessaire de mieux caractériser les interactions plasmide-matrice extracellulaire afin de mieux comprendre les mécanismes sous-jacents à l'électrotransfert d'ADN *in vivo* pour pouvoir développer des stratégies visant à améliorer l'efficacité de cette technologie.

Actuellement, les tests *in vitro* emploient des modèles d'études simples pour comprendre les mécanismes de l'électroporation (vésicules lipidiques artificielles, modèles cellulaires 2D en suspension ou en monocouche). Pour développer de futures applications cliniques l'utilisation de modèles animaux est indispensable pour attester des réponses *in vivo* de cette technique. Ces différents modèles sont indispensables mais il est vrai qu'ils ne présentent pas parfaitement les caractéristiques natives des tissus humains. Il est donc nécessaire de développer des modèles tissulaires plus complets mimant l'architecture et l'organisation 3D des tissus chez l'homme (Pampaloni, Reynaud et al. 2007; Ghajar and Bissell 2010; Nyga, Cheema et al. 2011). À cet effet, il est intéressant d'utiliser des modèles de peau humaine reconstruits par ingénierie tissulaire car dans le domaine de l'électrotransfert d'ADN, la peau, un organe riche en matrice extracellulaire, est une cible tissulaire stratégique en raison de sa grande surface, de son

accessibilité et de ses propriétés immunologiques (Titomirov, Sukharev et al. 1991; Rochard, Scherman et al. 2011).

Le but de cette thèse était de développer/utiliser un modèle cutané humain comme outil pour étudier les mécanismes fondamentaux de l'électrotransfert d'ADN à l'échelle tissulaire. La méthode d'auto-assemblage sera employée tout au long de cette étude afin de produire *in vitro* des modèles tissulaires humains en 3D les plus proches des conditions natives *in vivo*. Dans cette approche, les cellules (i.e les fibroblastes dermiques humains) produisent et modèlent leur propre matrice extracellulaire, sans apport de matériel exogène. Ce travail de thèse est divisé en trois parties afin de répondre à différentes questions.

1^{ère} partie

Le premier objectif consiste à évaluer et caractériser l'organisation de la matrice extracellulaire de modèles tissulaires 3D en utilisant des techniques de coloration histologique et de microscopies électroniques sur des échantillons fixés. Cette première partie sera effectuée sur deux modèles utilisés au laboratoire : le sphéroïde et le substitut dermique. Dans un second temps des impulsions électriques de l'ordre de la milliseconde seront appliquées sur le modèle choisi afin de s'assurer que l'application d'un champ électrique externe perméabilise efficacement et de façon homogène toutes les cellules composant le tissu 3D. La microscopie à deux photons permettra d'obtenir, sur des échantillons frais, des informations à la fois sur la localisation spatiale des cellules électroperméabilisées et sur l'organisation structurale des collagènes fibrillaires grâce la génération de seconde harmonique. Ces travaux ont fait l'objet d'un article sur lequel je suis première auteur, publié en 2015 dans *Journal of Membrane Biology*.

2^{ème} partie

Le deuxième objectif consiste à évaluer les paramètres optimaux pour un électrotransfert de gène efficace à l'échelle du substitut dermique humain. Pour cela, des impulsions électriques de l'ordre de la milliseconde seront appliquées avec une gamme de champ électrique croissant sur le tissu. En outre, une analyse de l'efficacité de transfert d'un gène rapporteur codant pour la GFP (green fluorescent protein) au sein du modèle tissulaire permettra de valider ce modèle en comparant les taux de transfection obtenus avec ceux disponibles dans la littérature pour la

peau. En parallèle une étude de la biodistribution du plasmide marqué de façon fluorescente permettra de comparer la localisation du plasmide avec celle des cellules exprimant le gène rapporteur. Ces travaux ont fait l'objet d'un article sur lequel je suis première auteur, publié en 2016 dans *Current Gene Therapy*.

3^{ème} partie

Le troisième objectif consiste à caractériser et comparer les effets directs et/ou indirects de champs électriques de type électrochimiothérapie (ECT), électrotransfert de gène (EGT) et électroporation irréversible (IRE) sur l'organisation du collagène fibrillaire dans le substitut dermique humain en utilisant la génération de seconde harmonique. Pour cela, les expériences seront effectuées en utilisant des substituts dermiques frais et des substituts dermiques décellularisés qui permettent de s'affranchir de la composante cellulaire dans la réponse observée. Les méthodes de caractérisation utilisées précédemment permettront d'étudier l'impact de la décellularisation sur l'organisation de la matrice extracellulaire au sein du substitut dermique, l'objectif étant de ne pas affecter la matrice extracellulaire suite à la décellularisation. Cette étude permettra de mettre en évidence les modifications potentielles de la structure et de l'organisation des collagènes fibrillaires au sein du tissu après électroporation avec des paramètres électriques de type ECT, EGT et IRE. Cet objectif sera valorisé dans un manuscrit en cours de rédaction sur lequel je serai première auteur et qui sera soumis à *Biomaterials*.

III. MATERIEL ET MÉTHODES

1. Culture cellulaire

Les cellules utilisées sont des fibroblastes dermiques humains primaires extraits à partir d'une posthectomie sur un garçon de trois ans (Figure 25).

- Lavage : La biopsie est lavée dans une solution de PBS (Eurobio CS1PBS01-01) contenant 100 U/mL de pénicilline, 100 mg/mL de streptomycine (Eurobio CABPE501-00U) et 0,5 µg/mL de fungizone (Sigma-Aldrich).
- Dissociation enzymatique du derme et de l'épiderme : des lamelles de peau d'environ 3 mm de large sont incubées une nuit à 4°C dans une solution de dispase II (Gibco®) à 10 mg/mL dans du HBSS avec Ca²⁺/Mg²⁺ (Gibco®).
- Séparation mécanique derme/épiderme : L'épiderme est pelé grâce à une pince courbe.
- Digestion enzymatique du derme : Les morceaux de derme sont incubés 30 minutes à 37°C sous agitation dans une solution de collagénase (1 mg/mL, Gibco®) pour isoler les fibroblastes du tissu conjonctif.
- Réalisation d'une banque de cellules primaires : Les fibroblastes extraits du derme sont ensuiteensemencés à 40 000 cellules par cm² et cultivés dans du milieu de culture DMEM (Gibco® #41966-029) complétementé décrit dans le paragraphe suivant. Une fois à sub-confluence, les cellules sont congelées à passage précoce (1 ou 2). C'est à partir de cette banque que les expériences seront réalisées.

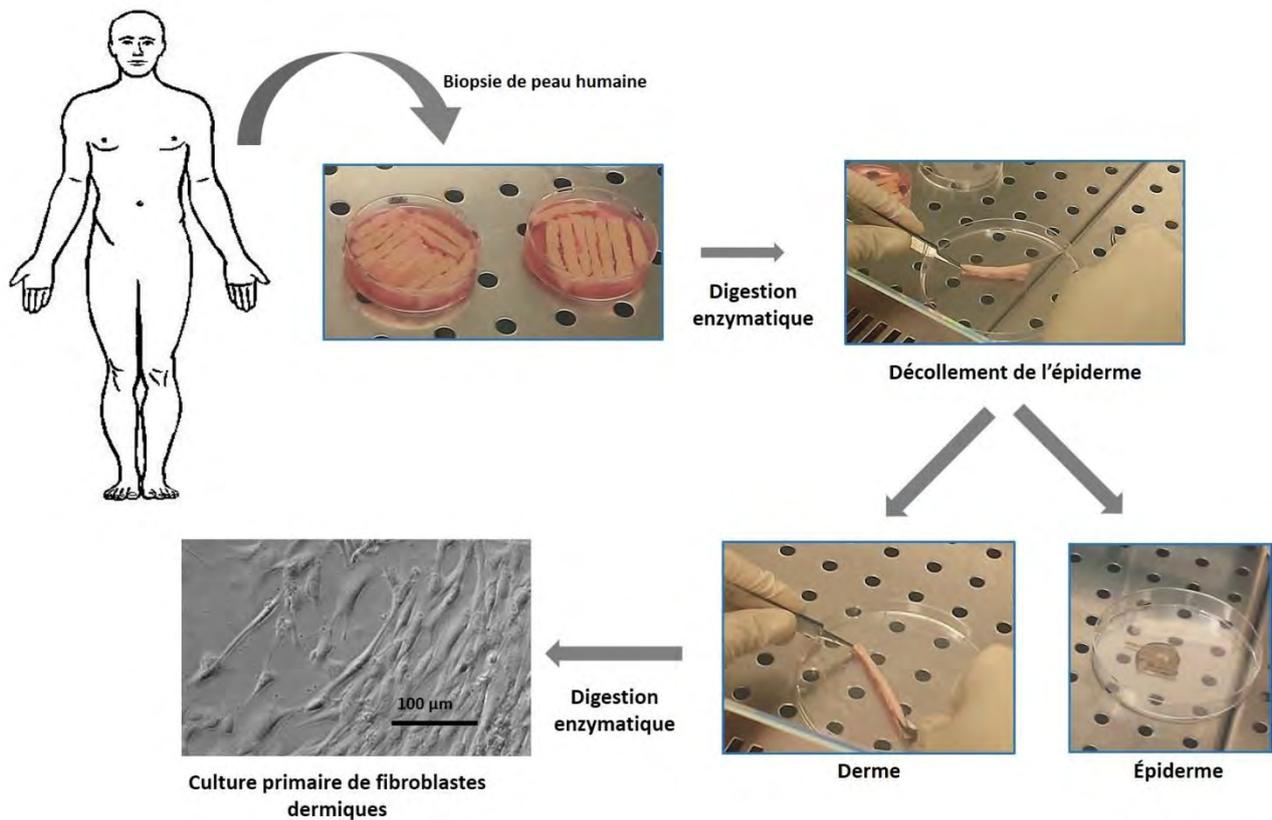


Figure 25: Schéma récapitulant les différentes étapes d'extraction des fibroblastes dermiques à partir d'une biopsie cutanée humaine

Pour chaque expérience les cellules sont décongelées puisensemencées à 37°C dans une atmosphère humide contenant 5 % de CO₂. Le milieu de culture est changé 3 fois par semaine. Les différents travaux sont effectués à partir de cellules sub-confluentes à passage précoce (1 à 8). Le milieu de culture utilisé est du DMEM, Eagles modifié de Dulbecco (Gibco-Invitrogen, Carlsbad, USA #41966-029) contenant 4,5 g/l de glucose, de la L-glutamine et 1 mM de pyruvate. Ce milieu est complété avec 10% (v/v) de sérum de veau fœtal décomplémenté (Sigma-Aldrich) et des antibiotiques (pénicilline à 100 U/mL et streptomycine à 100 mg/mL).

2. Production des modèles tissulaires

a. Les sphéroïdes

Les sphéroïdes sont produits dans des plaques 96 puits « ULA, Ultra Low Attachment » à fond rond (Costar, Corning # 7007) afin d'empêcher l'adhésion des cellules au substrat (Figure 26). Une suspension de 5000 fibroblastes ou HCT-116 est déposée dans chaque puits. Les plaques sont centrifugées 10 minutes à 300g à 4°C, puis placées en atmosphère humide à 5% CO₂ et à 37°C. Cette technique permet l'obtention d'un sphéroïde unique par puits, présentant une faible variation de taille avec un diamètre moyen, au bout de 5 jours, de 250 ± 50 µm pour les sphéroïdes de fibroblaste.

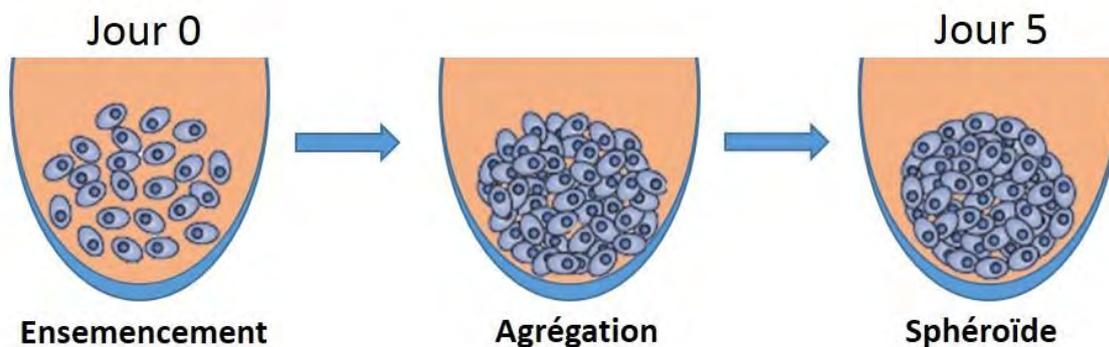


Figure 26: Protocole de production des sphéroïdes en plaque 96 puits dans un environnement non-adhérent

b. Le gel de collagène

Le gel de collagène est préparé sur la glace, en diluant une solution mère de collagène de type I (4,1 mg/mL, Corning # 354236) avec une solution de DMEM 10X (Sigma-Aldrich # RNBC9340). Le DMEM 10X contient du rouge phénol qui sert d'indicateur de pH. Une solution de sodium bicarbonate 7,5% (Gibco® # 25080-060) est ajoutée à la préparation pour ajuster le pH à 7,4. La solution est complétée avec de l'eau déionisée pour atteindre une concentration finale de gel de collagène à 2 mg/mL (Tableau 4). La solution est ensuite déposée dans les puits de labteck deux puits (Sarstedt # 94.6190.202) puis la polymérisation du gel de collagène s'effectue à 37°C pendant 45 minutes. Le gel est réhydraté avec du milieu de culture classique après polymérisation. Pour chaque test, le gel de collagène est fabriqué le jour de

l'expérience. Le protocole appliqué ici a été fourni par Victor Laurent de l'équipe de Catherine Muller (microenvironnement, cancer et adipocytes) au sein de l'IPBS/CNRS.

	Proportion	Référence
Solution gel de collagène 4,1 mg/mL	(% de dilution x Vf)	Corning
DMEM 10X	10% Vf	Sigma-Aldrich
Sodium bicarbonate 7,5%	15% Vf	Gibco®
Eau MilliQ	Compléter à Vf (volume finale)	

Tableau 4: Protocole de production d'un gel de collagène (3mL à 2 mg/mL). Vf : volume final.

c. Substitut dermique humain reconstruit par ingénierie tissulaire

Les substituts dermiques sont générés suivant l'approche d'auto-assemblage (F. A. Auger et al. 2000; Athanasiou et al. 2013). Un ancrage en papier filtre (Whatman™) préalablement découpé aux dimensions adéquates est disposé au fond de chaque puits d'une plaque 24 puits (Falcon # 353047). Les ancrages sont lavés plusieurs fois au PBS (Eurobio # CS51PBS01-01) pour éliminer les fibres issues du papier. L'ancrage papier permet d'éviter la contraction du tissu due aux propriétés contractiles des fibroblastes. Les fibroblastes dermiques humains primaires sont ensemencés à une densité de 15 000 cellules/cm² dans les plaques 24 puits contenant les ancrages. Les cellules vont ainsi être cultivées pendant 4 semaines dans le milieu de culture cellulaire utilisé précédemment supplémenté de 50 µg/mL d'acide ascorbique (Sigma-Aldrich # A4034-100G). Le milieu est changé trois fois par semaine, toujours avec un ajout d'acide ascorbique frais car ce dernier se dégrade rapidement et devient toxique. Après 4 semaines, les cellules ont sécrété suffisamment de matrice extracellulaire pour former un feuillet cellulaire manipulable (Figure 27).



Figure 27: Aspect macroscopique d'un feuillet dermique après 4 semaines de culture avec de l'acide ascorbique. L'ancrage en papier est l'anneau blanc.

d. Décellularisation des substituts dermiques

Deux méthodes différentes ont été sélectionnées pour décellulariser les feuillets dermiques. Le principe est de lyser les cellules tout en conservant l'intégrité de la matrice extracellulaire.

- Choc osmotique : Les feuillets frais sont plongés de 5 mL d'eau déionisée (MilliQ) puis stockés à 4 °C. La solution d'eau déionisée est changée 3 fois afin d'éliminer la majorité des débris cellulaires (Gilbert, Sellaro, and Badylak 2006). Dans le cadre de notre étude les feuillets dermiques sont conservés à 4°C pour 24h au maximum afin de conserver le même temps de culture entre les vivants et les décellularisés.
- Congélation/décongélation : Les feuillets frais sont plongés dans du PBS et subissent trois cycles successifs de congélation (-20°C pendant 20 minutes)/décongélation (37°C pendant 20 minutes) (Gilbert, Sellaro, and Badylak 2006). Les feuillets dermiques décellularisés par congélation/décongélation peuvent être conservés quelques mois à -20°C mais pour les mêmes raisons que précédemment ils sont utilisés ici dans les 24h.

3. Caractérisation morphologique

a. Coloration histologique au trichrome de Masson sur cryosections

Le trichrome de Masson colore les cellules en rouge et les collagènes en bleu (Constantine and Mowry 1968). Les substituts dermiques sont fixés dans du formol (10%, Sigma-Aldrich # HT5011-15ML) à température ambiante pendant 1h, puis enrobés dans l'OCT (Cryomatrix, thermo scientific) et stockés à -80°C. Des cryosections de 6 µm d'épaisseur sont obtenues au cryostat (Leica CM1950). Les coupes sont séchées à température ambiante, puis rincées 5 minutes à l'eau déionisée pour éliminer l'OCT résiduel avant coloration au trichrome de Masson. Les coupes sont colorées selon le protocole du fournisseur (HT15-1KT, Sigma-Aldrich):

- Incubation 3 minutes dans la solution de Fucshine Biebrich Scarlet-Acid
- Lavage à l'eau courante
- Incubation 3 minutes dans la solution de Phosphotungstic / Phosphomolybdic Acid Solution
- Incubation 2 minutes dans la solution de Bleu Aniline.

- Bref lavage dans l'acide acétique 1% (VWR # 20104.298)
- Lavage à l'eau deionisée
- Déshydratation dans des bains successifs d'éthanol (70°, 80°, 90°, 100°)
- Montage entre lame et lamelle avec une solution d'Eukitt (Fluka).

Les images sont acquises avec un microscope photonique Nikon Eclipse 80i avec un grossissement de x40.

b. Microscopie électronique à transmission (MET) et à balayage (MEB)

Pour la microscopie électronique à transmission, les substituts dermiques entiers ont été fixés pendant 4h à 4°C dans du tampon phosphate Sorensen 0,1 M (pH 7,4) contenant 2% de glutaraldéhyde. Ils sont ensuite lavés pendant une nuit dans du tampon phosphate 0,2 M, puis post-fixés pendant 1h à température ambiante avec 1% de tétroxyde d'osmium (OsO₄) dans un tampon phosphate/saccharose (0,05 M/250 mM pH 7,4). Les échantillons sont ensuite déshydratés dans une série de solutions d'éthanol à degré croissant. Les feuilletts sont ensuite séparés de leurs ancrages en papier puis découpés en lanières. Celles-ci sont imprégnées dans la résine d'inclusion Epon-araldite (Embed 812-Araldite 502). Enfin, des coupes ultra-fines obtenues par des techniques d'ultramicrotomie sont déposées sur une grille en cuivre et contrastées avec de l'acétate d'uranyle afin de visualiser et différencier les éléments intracellulaires. Les observations au microscope électronique à transmission ont été réalisées à la plateforme d'imagerie du CMEAB (Centre de microscopie électronique appliquée à la biologie (CMEAB) Plateforme Réseau Imagerie –Toulouse Réseau Imagerie TRI) sur un microscope électronique à transmission Hitachi HT7700.

Pour la microscopie électronique à balayage, les substituts dermiques entiers ont été fixés pendant 4h à 4°C dans du tampon phosphate Sorensen 0,1 M (pH 7,4) contenant 2% de glutaraldéhyde. Les échantillons sont ensuite déshydratés dans des solutions d'alcool de concentration croissante puis séchés par séchage en point critique avec l'automate Leica EMSCOPE CPD 300. L'alcool absolu est remplacé par du CO₂ liquide qui sera éliminé par transition au point super critique (31,1°C ; 73,8 bars). Ce qui permet d'éliminer le liquide de l'échantillon tout en conservant sa structure macroscopique et microscopique. La surface des échantillons est ensuite métallisée par une couche de 4 à 10 nm de platine avec un évaporateur

(Leica EMSCOPE MED020) avant observation. Les observations au microscope électronique à balayage ont été réalisées à la plateforme d'imagerie du CMEAB (Centre de microscopie électronique appliquée à la biologie (CMEAB) Plateforme Réseau Imagerie –Toulouse Réseau Imagerie TRI) sur un microscope électronique à balayage FEG FEI Quanta 250.

Pour les expériences de microscopies électroniques, toutes les étapes de préparation de l'échantillon hormis la fixation ont été réalisées par Isabelle Fourquaux sur la plateforme du CMEAB.

c. Détection des collagènes fibrillaires par génération de seconde harmonique (SHG)

Des Z-stacks tridimensionnels de 425 x 425 μm sont acquis à l'aide d'un microscope droit LSM 7MP à laser multiphotonique (Carl Zeiss SAS, Jena, Allemagne), équipé d'un objectif à immersion X20 (NA 0,95) et couplé à un laser Ti-Sapphire, Chameleon Ultra 2 (Coherent Inc) (Figure 28). Les dimensions d'acquisition en Z sont modulées (60 à 100 μm) afin d'intégrer toute l'épaisseur du feuillet dans les images. La longueur d'onde d'excitation est fixée à 800 nm afin de détecter les collagènes fibrillaires organisés par génération de second harmonique (SHG) à une longueur d'onde d'émission de 400 nm. Les échantillons sont observés directement dans le milieu de pulsation. Les filtres utilisés sont les suivants : SHG, Filtre d'émission LP 430 (BP 390-410 nm). Dans nos conditions de culture le gel de collagène ne peut être imagé avec le microscope droit sans risque de déplacer le gel avec l'objectif en immersion. Le microscope inversé multiphoton LSM 710 couplé au même laser que le LSM 7MP permet d'imager la SHG du gel de collagène.

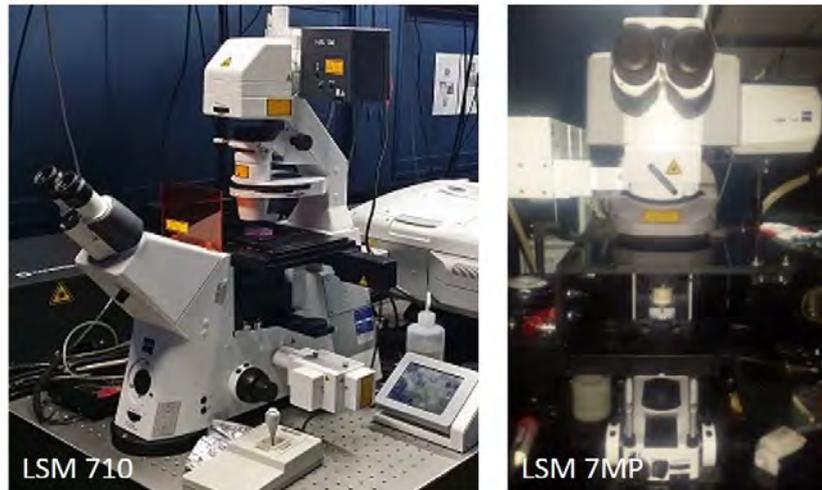


Figure 28: Microscope multiphotonique inversé LSM 710 et droit LSM 7MP

Les images 3D acquises sont ensuite analysées avec le logiciel Imaris (Bitplane AG, Zurich, Suisse). Pour chaque feuillet dermique une isosurface de la SHG est faite sur le logiciel Imaris. L'aire, l'épaisseur et l'intensité sont calculées par rapport à cette isosurface. La figure 29 montre un exemple d'image obtenue en SHG (A, C) et l'isosurface associée (B, D). Les figures 29 A et C montrent les projections maximums de l'intensité (MIP) de SHG d'un feuillet dermique observé au microscope multiphoton 7MP. Les figures 29 B et D sont les isosurfaces représentant le signal SHG occupant le volume observé calculé par le logiciel IMARIS, L'épaisseur du signal de seconde harmonique permet de déterminer si les impulsions électriques induisent une modification en z, pour cela 10 mesures sont prises sur la tranche observée sur la figure 29 D pour chaque feuillet dermique. L'aire du signal de seconde harmonique indique si la surface occupée par le collagène est modifiée après les impulsions électriques, en pratique la surface occupée par la seconde harmonique est mesurée sur la projection maximum de l'intensité du signal.

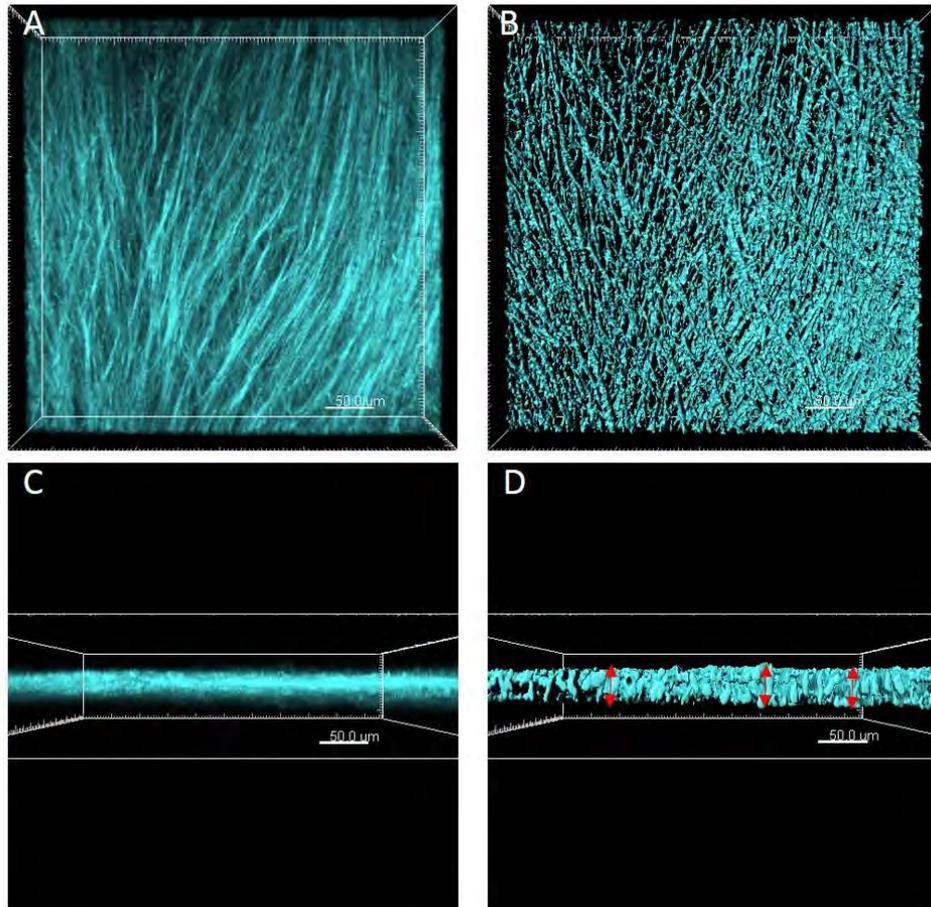


Figure 29: Analyse 3D de la SHG produite par un feuillet dermique après 4 semaines de culture supplémentée en acide ascorbique pour mesurer l'épaisseur de collagènes. A) vue de dessus B) Isosurface SHG vue du dessus C) Vue transversale D) Isosurface SHG vue transversale.

4. Application d'un champ électrique pulsé

a. Matériel utilisé

L'électropulsateur utilisé dans toutes les expériences de cette étude est le β tech electro-cell S 20 (β Tech, Toulouse, France) (Figure 29). Différents types d'électrodes sont utilisés selon les objectifs scientifiques visés.

- Différentes gammes de voltage sont appliquées sur les substituts dermiques en présence d'un marqueur de perméabilité (iodure de propidium) ou d'un plasmide codant un gène rapporteur afin d'évaluer les paramètres optimaux d'électroperméabilisation et d'électrotransfert de gène au sein du modèle tissulaire : Dans les deux cas, des électrodes de contact plates constituées de deux lames en acier inoxydable planes et parallèles sont

utilisées. La distance inter-électrode est de 1 cm ce qui permet de recouvrir toute la surface des feuillets (Figure 30 C).

- Pour évaluer les modifications potentielles de la SHG des feuillets dermiques, il est essentiel de suivre une même zone de l'échantillon avant et après application du champ électrique. Donc dans l'objectif d'observer la SHG générée par les substituts dermiques sur une zone identique avant et après pulses, des électrodes de contact en acier espacées de 1 cm ont été fabriquées pour les adapter aux boites de pétri 60 mm de chez Thermo scientific, Nunclon™, ce qui permet d'appliquer les impulsions électriques sur les substituts dermiques directement sous le microscope multiphoton droit LSM 7MP. Ces électrodes permettent d'observer la même zone avant et après application (Figure 30 A).

Les mêmes expériences sont effectuées sur les gels de collagènes donc des électrodes fils en acier de 0,8 cm de distance ont été fabriquées pour les adapter aux labteck deux puits afin d'appliquer le champ électrique sur les gels de collagène sous le microscope multiphoton inversé LSM 710 (Carl Zeiss) (Figure 30 B). Le milieu de culture au-dessus du gel est remplacé par le tampon de pulsation (décrit ci-dessous). La même zone est imagée avant et après application du champ électrique.

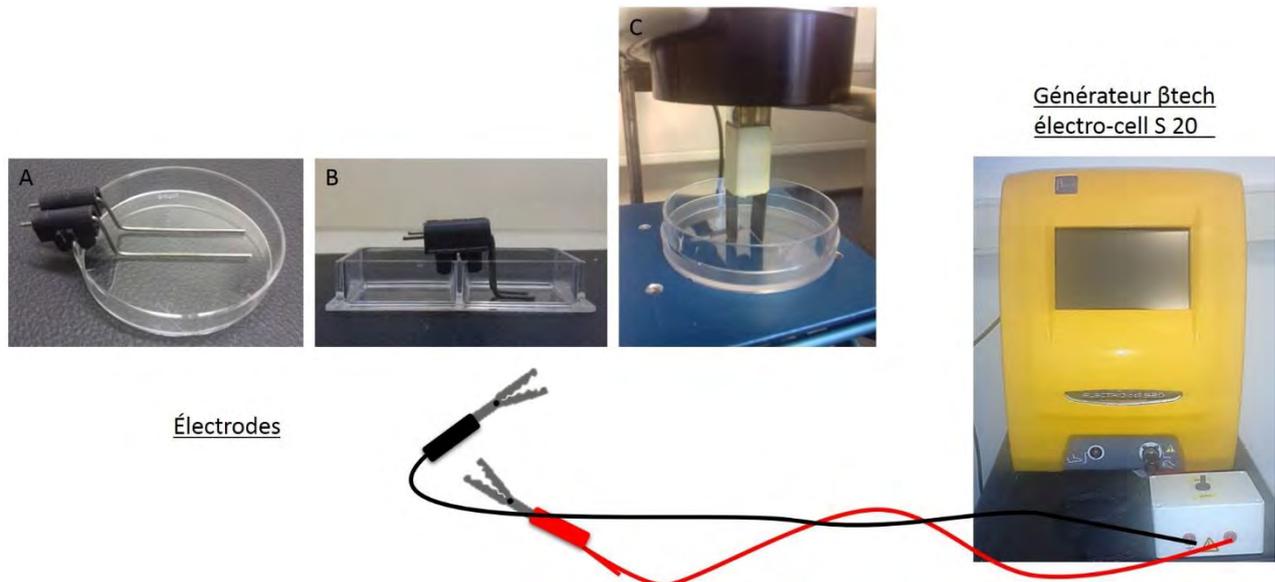


Figure 30: Générateur utilisé pour appliquer les impulsions électriques. Trois types d'électrodes ont été développés selon l'objectif : A) Electrodes fils, distance inter électrodes 1 cm ; usage sous le microscope mutiphoton droit LSM 7MP, B) Electrodes fils, distance inter électrodes 0,8 cm ; usage sous le microscope multiphoton inversé LSM 710, C) Electrodes plaques, distance inter électrodes 1 cm

b. Tampon de pulsation

Le milieu de pulsation iso-osmotique est fabriqué suivant le protocole utilisé au sein du laboratoire. Il est constitué de 8,1 mM de K_2HPO_4 (Merck # A01839904-042), 1,9 mM de KH_2PO_4 (Merck # 104873), 1 mM de $MgCl_2$ (Merck # M8266) et de 250 mM saccharose (Euromedex # 200-301) dilués dans de l'eau MilliQ puis filtré par unité de filtration (0,22 μ m). Des mesures d'osmolarité, de conductance et de pH sont ensuite effectuées. Le pH est de 7,4 pour conserver un milieu adapté aux cellules eucaryotes et l'osmolarité est de 320 mOs/kg. La conductivité est faible (1,6 mS/cm) afin de limiter l'effet Joule associé aux impulsions électriques. Le stockage s'effectue à 4°C ou à -20°C pour de plus longues périodes.

c. Paramètres électriques

Les paramètres d'impulsions électriques appliqués en ECT et IRE sont courts avec une intensité électrique élevée afin d'électroperméabiliser les cellules. Dans nos conditions, le nombre d'impulsions est multiplié par 10 pour l'IRE, par rapport aux paramètres ECT, et provoque ainsi une perméabilisation irréversible. Dans ce cas la fréquence est diminuée à 0,3 Hz afin de limiter l'effet Joule. Les impulsions appliquées en EGT sont plus longues, ce qui permet d'induire des interactions ADN/membrane plasmique grâce aux forces électrophorétiques (Tableau 5).

- EGT : 10 impulsions, durée d'impulsion de 5 ms, fréquence de répétition 1 Hz. Une gamme croissante de voltage a été appliquée pour déterminer les paramètres optimaux d'électroporation réversible dans ces conditions.
- ECT : 8 impulsions, durée d'impulsion de 100 μ s, fréquence de répétition 1 Hz. Une gamme croissante de voltage a été appliquée pour déterminer les paramètres optimaux d'électroporation réversible dans ces conditions.
- IRE : 80 impulsions, durée d'impulsion de 100 μ s, fréquence de répétition 0,3 Hz avec un voltage de 2000 V/cm comme décrit précédemment (Al-Sakere, Andre et al. 2007).

Paramètres	Intensité	Fréquence	Durée de l'impulsion	Nombre d'impulsions
ECT	0-1300 V/cm	1 Hz	100 μ s	8
EGT	0-1000 V/cm	1 Hz	5 ms	10
IRE	2000 V/cm	0,3 Hz	100 μ s	80

Tableau 5: Paramètres électriques appliqués en électrochimiothérapie (ECT) électrogénéothérapie (EGT) et électroporation irréversible (IRE).

d. Marqueur de perméabilité membranaire

La perméabilité membranaire est mise en évidence sur les tissus vivants par l'entrée d'une petite molécule fluorescente non-perméante, l'iodure de propidium (IP) (Sigma-Aldrich # P4170). Il s'agit d'une molécule classiquement utilisée comme marqueur de viabilité cellulaire, en effet elle pénètre dans les cellules uniquement lorsque l'intégrité membranaire n'est plus assurée. Le rendement quantique de fluorescence de cette sonde augmente d'un facteur 1000 lorsqu'elle s'intercale entre les bases de l'ADN. L'efficacité de l'électroperméabilisation est ainsi détectée au microscope multiphoton LSM 7MP par ajout de 100 μ M d'iodure de propidium dans le milieu de pulsation pendant l'application des impulsions électriques.

e. Électroperméabilisation des substituts dermiques

Les électrodes sont placées au contact du dessus du feuillet immergé dans le tampon de pulsation contenant 100 μ M d'iodure de propidium. La perméabilisation de la membrane cellulaire est évaluée par analyses des images en trois dimensions obtenues au microscope multiphotonique avec le logiciel Imaris. Une isosurface est réalisée pour visualiser et isoler les cellules perméabilisées. Les filtres utilisés sont les suivants : SHG, Filtre d'émission LP 430 (BP 390-410 nm) ; PI, LP 565 (BP 565-610 nm). Dans toutes les expériences réalisées, les feuillets dermiques contrôles sont disposés sur une boîte de Pétri, avec du tampon de pulsation contenant du PI et mis au contact des électrodes sans application du champ électrique, soit $E=0$ kV/cm.

f. Électrotransfert de gène

Afin d'estimer l'efficacité d'électrotransfert à l'échelle du tissu, 2 µg de plasmide codant pour une protéine rapportrice, la Green Fluorescent Protein dans notre cas (4.7 kb pEGFP-C1, Clontech #6084-1) sont utilisés. Les conditions électriques sont les suivantes: 10 impulsions de 5 ms à une fréquence de 1 Hz de 0 à 800 V/cm sont appliquées à température ambiante. Les feuillets dermiques sont ensuite incubés à 37°C à 5% de CO₂ puis observés au microscope multiphotonique LSM 7MP à 24h, 48h et 72h. Les filtres utilisés sont les suivants : SHG, Filtre d'émission LP 430 (BP 390-410 nm) ; GFP, Mirror (BP 500-550 nm).

g. Marquage fluorescent de l'ADN et localisation dans le tissu

Le plasmide pEGFP-C1 a été stoechiométriquement marqué avec un intercalant de l'ADN, le TOTO[®]-1 iodide (Molecular Probes # T3600). 4µg d'ADN sont incubés avec 1.25µl de solution de TOTO-1 à 1mM, pendant 1h à 4°C. Le feuillet dermique est incubé dans un tampon de pulsation contenant du plasmide marqué et exposé à 10 impulsions d'une durée de 5 ms à une fréquence de 1 Hz à 800 V/cm à température ambiante. Les substituts dermiques sont observés 1 minute après les impulsions avec le microscope multiphotonique LSM 7MP. Les images ont été analysées avec le logiciel IMARIS pour afficher les vues de dessus et transversales des feuillets dermiques. Le logiciel Image J (NIH, Bethesda, USA) a été utilisé pour quantifier les zones positives à la GFP dans les images totales (425x425 µm).

h. Électroperméabilisation et suivi de température

Les expériences d'électroperméabilisation des feuillets sont effectuées avec le générateur βTech électro-cell S20 et les électrodes fils de 1 cm sous le microscope multiphotonique LSM 7MP avec les paramètres d'impulsions électrique de type IRE (80 impulsions, 100 µs, 0,3 Hz et 2000 V/cm). Une sonde à température (Nomad-Touch, Neoptix # NMT) de diamètre 300 µm est mise au contact du feuillet, dans le tampon de pulsation, entre les électrodes. La température est mesurée toutes les secondes pendant 45 min pour chaque feuillet dermique (avant, pendant et après).

5. Viabilité et prolifération

a. Viabilité cellulaire

La viabilité cellulaire a été déterminée avec deux méthodes.

- Détection des cellules mortes dont les membranes plasmiques sont devenues perméantes 24h après l'application du champ électrique par ajout d'iodure de propidium : L'iodure de propidium ne pénètre que dans les cellules présentant des défauts membranaires. En ajoutant cette molécule 24h après l'application du champ électrique, seules les cellules mortes seront positivement marquées. Elles seront alors observables avec le microscope multiphotonique.
- Quantification de l'activité mitochondriale : 24h après l'application du champ électrique, les substituts dermiques sont incubés pendant 30 min à 37°C dans une solution de PrestoBlue (Invitrogen # A13262). Le test est basé sur la capacité des cellules vivantes à réduire la résazurine, une molécule perméable aux cellules, en resorufin grâce à des déshydrogénases mitochondriales (Xu, McCanna, and Sivak 2015). La resazurine est un colorant bleu, faiblement fluorescent jusqu'à ce qu'il soit irréversiblement réduit à la résorufin fluorescente rose et rouge. Le changement de couleur peut être détecté en utilisant des mesures de fluorescence ou d'absorbance. Pour les tests de viabilité, une lecture de l'absorbance (excitation 570 nm, émission 600 nm) est effectuée en utilisant un lecteur de plaques (Clariostar, BMG). Les témoins négatifs, dits "morts", sont des feuillets soumis à 3 cycles de congélation/décongélation.

b. Prolifération cellulaire

La prolifération des cellules est estimée par mesure de l'incorporation d'EdU, un analogue de la thymidine, incorporé dans l'ADN nouvellement synthétisé. L'incorporation et la détection d'EdU sont effectuées avec le Click-iT® EdU Alexa Fluor® Imaging Kit (Molecular Probes # C10337). L'EDU est ajouté dans le milieu de culture des feuillets dermiques à une concentration de 10 µM pendant une durée de 24 heures avant analyse. Les substituts dermiques sont ensuite observés avec le microscope multiphotonique LSM 7MP.

6. Détermination de l'activité des métalloprotéinases

La détermination de l'activité totale des métalloprotéinases présentes dans le milieu de pulsation est effectuée à l'aide d'un kit SensoLyte™ 520 Generic MMP Assay Kit (Anaspec, San José). Il permet de détecter simultanément l'activité des MMP-1, 2, 7, 8, 9, 12, 13 et 14. Les résultats de ce test représentent l'activité de ces MMPs dans le milieu de pulsation après application des impulsions électriques IRE. Les valeurs de fluorescence sont obtenues grâce à un fluorimètre clariostar réglé à une longueur d'onde d'excitation de 490 nm et captant l'émission de fluorescence à 520 nm.

7. Analyses Statistiques

Toutes les analyses statistiques de significativité (one-way ANOVA ou two-way ANOVA & Bonferonni test) des résultats ont été effectuées avec le logiciel GraphPad Prism 5 (GraphPad Software Inc.). Les marqueurs de significativité équivalent aux valeurs suivantes : * = $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** = $P < 0,001$ et **** = $P < 0,0001$. Les expériences ont été faites au moins 3 fois avec au minimum de trois feuillets par expérience.

IV. ÉLECTROPERMEABILISATION D'UN MODELE TISSULAIRE CUTANE RICHE EN MATRICE EXTRACELLULAIRE

L'objectif de cette première partie est de produire un modèle tissulaire 3D permettant d'étudier et de comprendre les mécanismes de l'électrotransfert de gène dans un environnement riche en matrice extracellulaire. Ce chapitre est ainsi consacré à la sélection et la caractérisation d'un modèle tissulaire cutané 3D riche en matrice extracellulaire. Dans un second temps des impulsions électriques de l'ordre de la milliseconde permettant l'électrotransfert d'ADN seront appliquées sur le modèle sélectionné. A travers ces expériences, les paramètres électriques électroperméabilisant efficacement les cellules contenues dans le modèle tissulaire choisi, sont sélectionnés. Des outils d'imageries sont utilisés pour mettre en évidence la matrice extracellulaire dans les modèles tissulaires *in vitro*. Le modèle sélectionné a pour but de devenir un outil prédictif de la réponse des cellules et du tissu cutané suite à l'application d'un champ électrique pulsé.

1. Le sphéroïde : un modèle 3D de tissu sain ou tumoral

Au début de cette étude, notre choix s'est dirigé vers le modèle sphéroïde « avascularisé » déjà employé au sein de l'équipe dans les expériences sur tissus tumoraux *in vitro*. C'est un modèle tumoral classique développé par Sutherland basé sur les propriétés adhésives des cellules lorsque celles-ci sont cultivées dans un environnement qui ne permet pas l'adhésion des cellules au support (Sutherland 1988). Il s'agit d'un outil expérimental pertinent qui a démontré son utilité à mimer certaines caractéristiques des tumeurs lors de son utilisation dans des études sur l'électroporation dans un contexte en 3D *in vitro* (Canatella, Black et al. 2004; Mellor, Davies et al. 2006; Wasungu, Escoffre et al. 2009; Chopinet, Wasungu et al. 2012; Gibot, Wasungu et al. 2013).

Bien que le sphéroïde soit généralement reconnu comme un modèle tumoral, des cellules saines sont aussi capables de produire des sphéroïdes (Kunz-Schughart, Schroeder et al. 2006). Dans notre étude, nous utiliserons des cellules primaires cutanées humaines à des passages précoces afin de conserver au mieux leurs propriétés natives. Pour obtenir ces cellules

primaires, un protocole d'extraction cellulaire à partir de biopsie de peau humaine déjà utilisé dans l'équipe est appliqué (Gibot, Galbraith et al. 2010).

Le collagène est la protéine la plus importante en poids chez les mammifères et joue un rôle essentiel dans l'assemblage des tissus biologiques. C'est une protéine synthétisée par différents types cellulaires dont les fibroblastes dermiques. Les fibroblastes dermiques ont été choisis dans notre étude non seulement car la peau est un tissu cible privilégié en électrotransfert de gène, mais aussi pour leur aptitude à synthétiser une matrice extracellulaire riche. En effet, ils consacrent jusqu'à 15% de leur capacité de synthèse des protéines à la production du collagène (Freiberger, Grove et al. 1980). Le milieu de culture des sphéroïdes dermiques sera complété en acide ascorbique à chaque changement de milieu, soit trois fois par semaine selon la méthode d'auto-assemblage. En effet, cette vitamine joue un rôle primordial dans la synthèse et l'assemblage du collagène (Nishikimi et al. 1988).

Après ensemencement des fibroblastes dermiques dans des plaques 96 puits ULA (Ultra Low Attachment), des sphéroïdes de taille homogène et manipulables sont obtenus en quelques jours. Afin de permettre aux fibroblastes dermiques de synthétiser et organiser leur matrice extracellulaire la culture des sphéroïdes en présence d'acide ascorbique est effectuée pendant 4 semaines.

Les sphéroïdes dermiques obtenus ont en moyenne un diamètre de 250-300 μ m et montrent une surface uniforme comme présenté en figure 31.

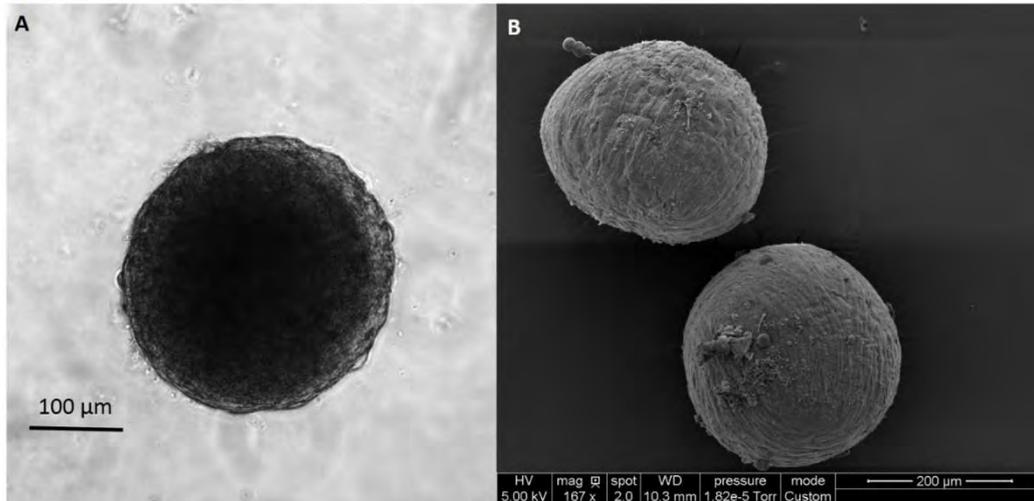


Figure 31: Sphéroïde composé de fibroblastes dermiques après 28 jours de culture complémentée en acide ascorbique. A) Aspect macroscopique en lumière blanche, B) Microscopie électronique à balayage

À haute concentration, la vitamine C a des propriétés cytotoxiques (Levine, Padayatty et al. 2011). Nous avons donc confirmé qu'à la concentration utilisée en auto-assemblage (50μg/mL) la présence continue d'acide ascorbique n'affecte pas la croissance des sphéroïdes. Des mesures du diamètre de sphéroïdes sains et cancéreux ont été réalisées régulièrement pendant 29 jours. La figure 32 montre le suivi de la croissance des sphéroïdes au cours du temps. L'ajout d'acide ascorbique dans le milieu de culture n'affecte pas la croissance des sphéroïdes. De plus, avec ou sans acide ascorbique, les sphéroïdes dermiques conservent une taille stable au cours du temps contrairement à ce qui est constaté pour les sphéroïdes tumoraux cultivés dans les mêmes conditions. Les cellules tumorales utilisés dans ces expériences, sont les HCT-116, des cellules du cancer colorectal humain employées dans l'équipe pour produire des sphéroïdes. Au-delà de 21 jours, la taille trop importante des sphéroïdes HCT-116 est devenue plus difficile à mesurer sous le microscope. La stabilité de la taille des sphéroïdes dermiques au cours du temps s'explique par l'existence de l'inhibition de contact dans les cellules saines, propriété perdue dans les cellules cancéreuses.

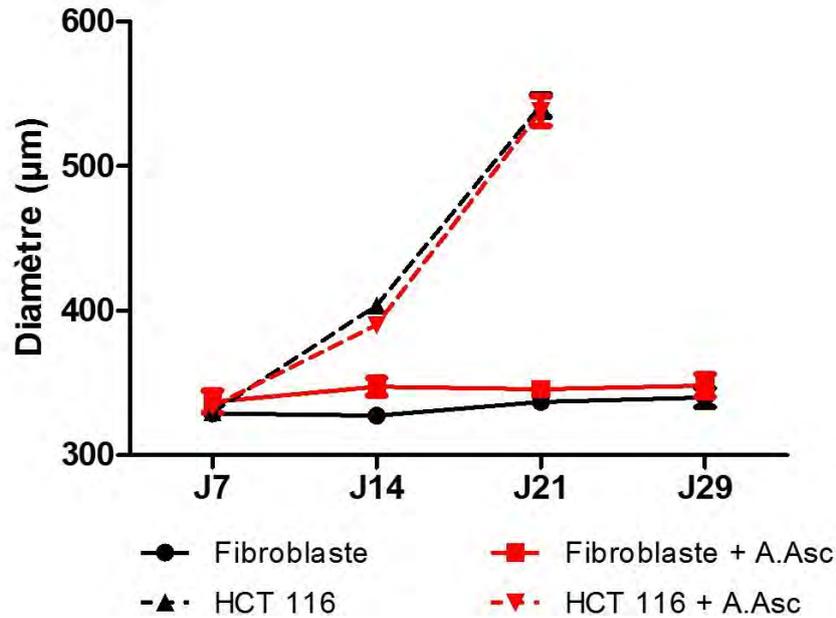


Figure 32: Courbe de croissance des sphéroïdes. (N= 10) Surface mesurée avec le logiciel Image J. Courbe rouge milieu avec A.Asc et noire sans A.Asc ; A.Asc = acide ascorbique

2. Les outils de caractérisation de la matrice extracellulaire

a. La microscopie électronique à balayage

Afin d'obtenir des informations sur la morphologie et l'architecture des sphéroïdes dermiques cultivés avec l'acide ascorbique, ils ont été observés en microscopie électronique à balayage (MEB).

Les clichés obtenus mettent en évidence une structure très cohésive dans l'organisation 3D du sphéroïde (Figure 33 A). Le détail de la surface du sphéroïde (Figure 33 B) permet d'observer quelques fibres de matrice extracellulaire déposées entre les cellules. La microscopie électronique à balayage permet ici d'observer la matrice extracellulaire sans pour autant la caractériser. De plus, cette analyse se limite à la surface des sphéroïdes. Pour une observation des structures internes d'autres techniques seront utilisées.

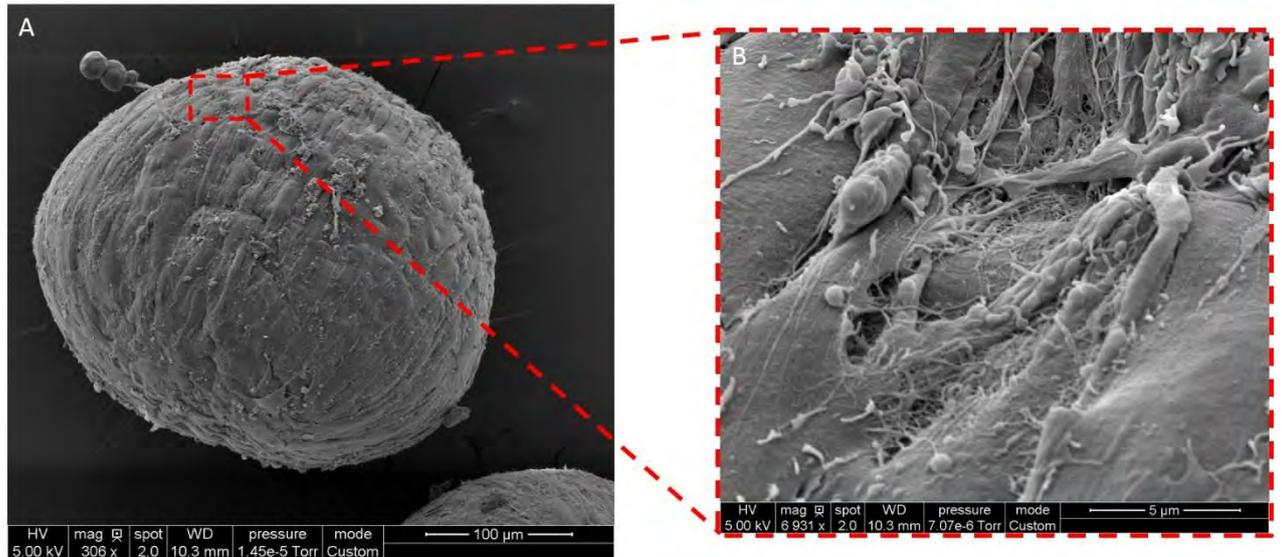


Figure 33: Observation par microscopie électronique à balayage de sphéroïdes dermiques après 30 jours de culture avec milieu complété en acide ascorbique. A. Aspect global. B. Détail de la surface entre les cellules

b. L'histologie

La coloration au trichrome de Masson de coupes de sphéroïdes dermiques permet de mettre en évidence l'organisation des fibroblastes (rouge) et des collagènes (bleu) (Figure 34 A). Les images obtenues montrent qu'il y a des collagènes dans le modèle sphéroïde mais en très faible quantité que ce soit à la surface du sphéroïde (Figure 34 B) ou au centre (Figure 34 C).

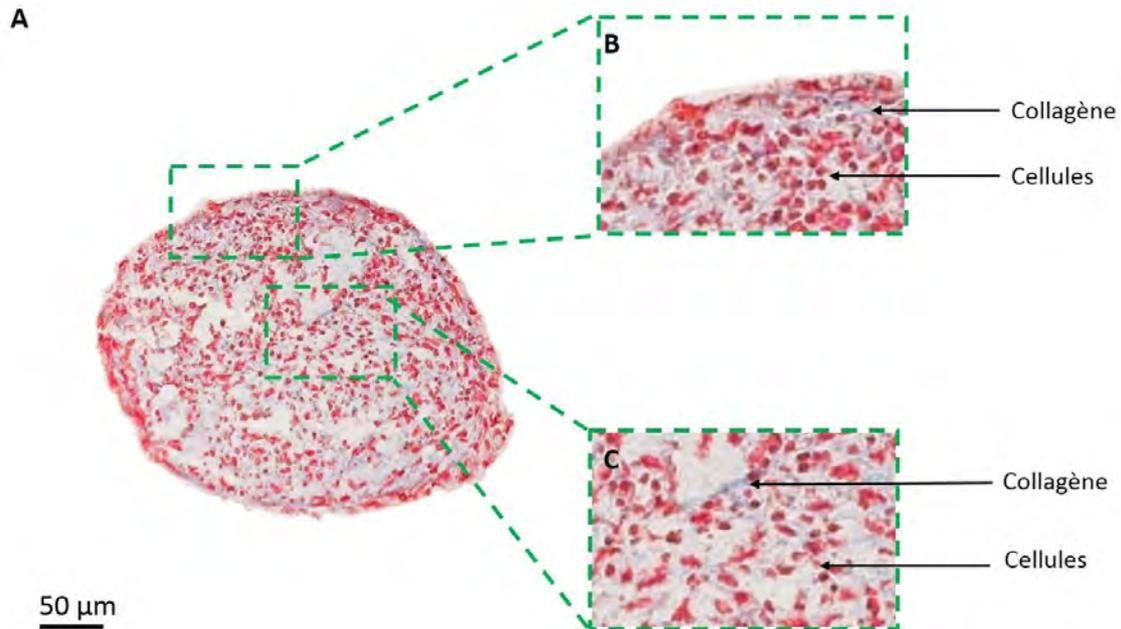


Figure 34: Coloration histologique au trichrome de Masson d'un sphéroïde dermique. A. vue d'ensemble. B. Détail de la surface. C. Détail du cœur. Les collagènes sont marqués en bleu et les cellules en rouge

c. La génération de seconde harmonique

Les deux techniques utilisées jusqu'ici pour caractériser la matrice extracellulaire nécessitent des étapes de fixation et de préparation des échantillons avant l'observation, donc potentiellement des artefacts d'observation. Nous avons donc choisi également d'imager de façon dynamique les collagènes dans les tissus vivants grâce à la génération de seconde harmonique (SHG). Pour rappel, la plus importante source de seconde harmonique dans les tissus sont les collagènes fibrillaires (Collagène I, III V, XI), protéines majeures de la matrice extracellulaire dermique (Gelse, Pöschl et al. 2003). De plus, cette méthode de caractérisation non invasive permet d'obtenir des images en 3D en haute résolution adaptée à l'échelle cellulaire et tissulaire.

En pratique les sphéroïdes sont placés dans un dispositif spécifique (Figure 35) qui permet de les séparer et empêche leurs déplacements par effet de succion sous l'objectif à immersion du microscope.

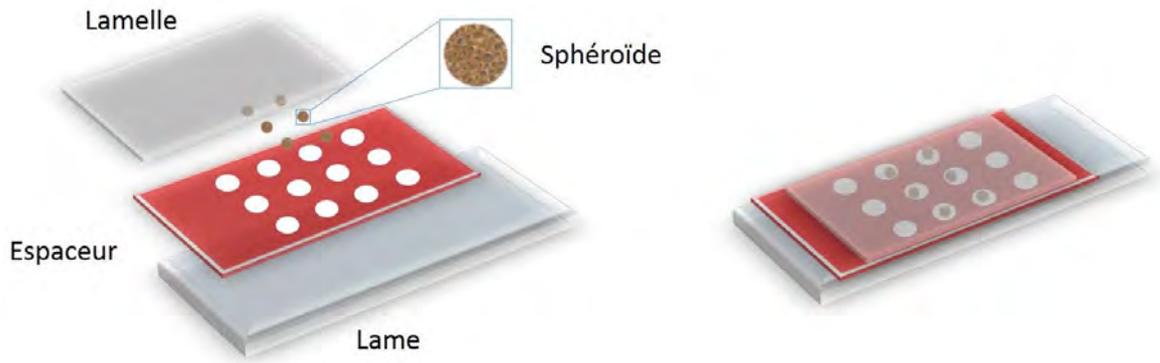


Figure 35: Schéma du dispositif d'observation des sphéroïdes au microscope à deux photons pour observer les collagènes fibrillaires grâce à la génération de signal de seconde harmonique

Les sphéroïdes observés avec le microscope biphoton présentent un très faible signal en SHG (Figure 36). Une analyse quantitative avec le logiciel Imaris confirme que le collagène fibrillaire occupe moins de 1.5% du volume total des sphéroïdes. En bref, le volume occupé par le collagène a été calculé en mesurant le volume occupé par l'isosurface du signal SHG dans le volume total du sphéroïde. Les résultats obtenus indiquent qu'il y a peu ou pas de collagènes fibrillaires dans les sphéroïdes dermiques. Ces résultats sont en adéquation avec ceux observés en histologie et au microscope électronique à balayage.

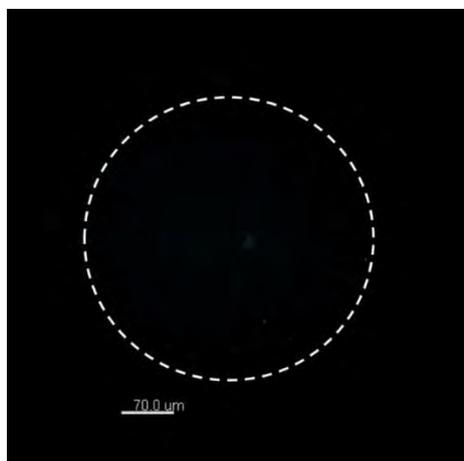


Figure 36: Génération de seconde harmonique d'un sphéroïde dermique après 30 jours de culture avec milieu complétement en acide ascorbique. Bleu = SHG. Pointillés = contour du sphéroïde

3. Conclusion : le sphéroïde

Les sphéroïdes sont largement utilisés comme modèles tumoraux *in vitro* pour étudier les effets de l'électroporation lors de la délivrance de petites molécules (Canatella, Black et al. 2004; Gibot and Rols 2013; Frandsen, Gibot et al. 2015) et de macromolécules telles que les plasmides (Wasungu, Escoffre et al. 2009; Chopinet, Wasungu et al. 2012). L'absence de matrice extracellulaire dans les sphéroïdes composés de fibroblastes dermiques sains nous a permis de démontrer que ce modèle ne présente pas les caractéristiques recherchées pour cette étude. En effet ce dernier ne produit que très peu de matrice extracellulaire, un des principaux éléments organisationnels de la peau. Néanmoins cela reste un modèle très intéressant dans le domaine de la cancérologie et plus spécialement pour étudier les effets de l'électroporation associées à des molécules anticancéreuses. Ainsi, un article auquel j'ai participé a été publié en 2015 dans PlosOne démontre le comportement différentiel des cellules saines et cancéreuses dans des sphéroïdes traités avec du calcium couplé au champ électrique (Annexe 1, (Frandsen, Gibot et al. 2015)).

L'analyse de la matrice extracellulaire d'un autre modèle tissulaire 3D, exempt de matrice exogène, va être menée avec les outils mis en place dans ces expériences précédentes.

4. Le feuillet dermique, un modèle riche en matrice extracellulaire

a. Introduction

Comme présenté dans l'introduction la méthode d'auto-assemblage consiste à stimuler les cellules avec de l'acide ascorbique pour qu'elles secrètent leur propre matrice extracellulaire endogène. Pour la suite de cette étude, nous avons utilisé cette approche afin de produire un substitut dermique humain *in vitro* manipulable, reproductible et riche en matrice extracellulaire. Le derme natif est caractérisé par une abondante matrice extracellulaire localisée entre les cellules qui l'ont synthétisées (Prost-Squarcioni, Fraitag et al. 2008). Les expériences suivantes vont utiliser des fibroblastes dermiques humains primaires produisant leur propre matrice extracellulaire.

Après 4 semaines de culture en présence d'acide ascorbique, les fibroblastes dermiques humains produisent un feuillet manipulable (Figure 37). À l'observation macroscopique, le

substitut dermique présente l'aspect d'une membrane cohésive, attachée à l'ancrage papier (anneau blanc).

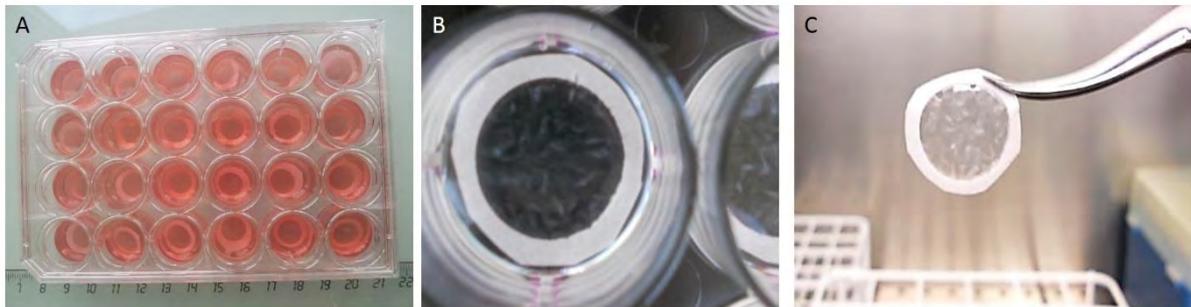


Figure 37: Feuillet dermique après 4 semaines de culture complétée avec de l'acide ascorbique. Anneau blanc = ancrage en papier pour faciliter la manipulation du feuillet. A) Plaque 24 puits avec feuillets, B) Feuillet dermique au fond du puits, C) Feuillet dermique manipulé

La matrice extracellulaire du substitut dermique est caractérisée à l'aide de plusieurs techniques complémentaires (Figure 38). À l'échelle du nm, la microscopie électronique à transmission permet une analyse morphologique et structurale des cellules et du collagène fibrillaire sur des coupes ultrafines. À l'échelle de μm , la microscopie électronique à balayage permet une analyse en surface de la topographie du substitut dermique. À l'échelle tissulaire la coloration au trichrome de Masson permet de dissocier les collagènes du reste du tissu et la SHG caractérise spécifiquement l'organisation tridimensionnelle des collagènes fibrillaires.

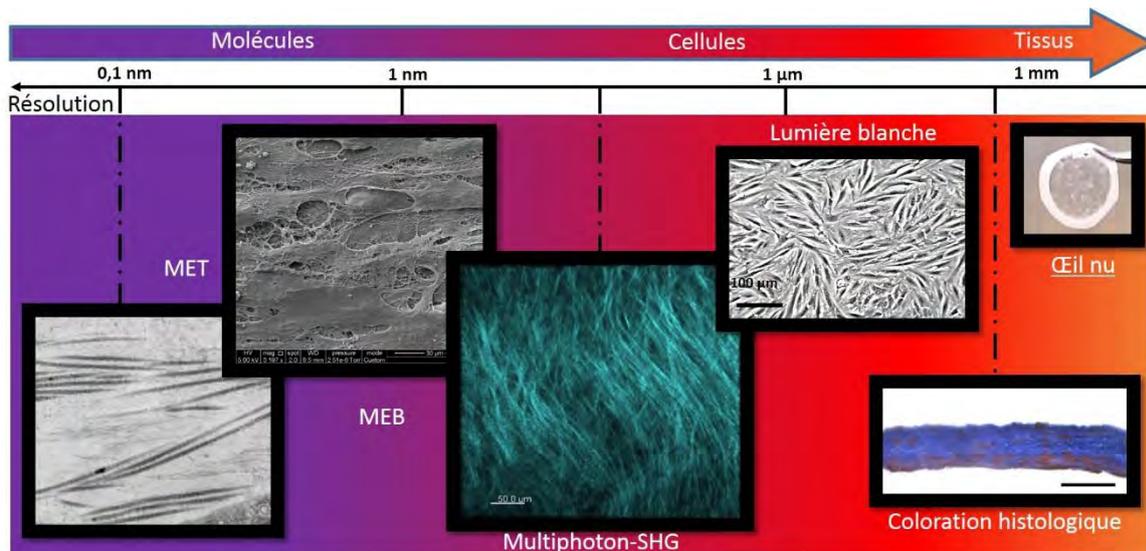


Figure 38: Caractérisation multi-échelle de la matrice extracellulaire et plus spécifiquement des collagènes dans un substitut dermique humain. Microscopie électronique à transmission (MET), microscopie électronique à balayage (MEB), génération de seconde harmonique (SHG). Photos M Madi.

L'apparence macroscopique du substitut dermique humain produit par la méthode d'auto-assemblage montre une surface inhomogène. La coloration au trichrome de Masson montre que le substitut dermique est très riche en collagènes et les observations en microscopie électronique à transmission indiquent qu'il contient des collagènes fibrillaires. La génération de seconde harmonique observée par microscopie biphotonique confirme la présence de collagène fibrillaire sur toute la surface du feuillet et en profondeur sur l'axe z. Nous avons ainsi obtenu un modèle de feuillet dermique riche en collagènes organisés dont les collagènes fibrillaires sont aisément analysables avec les outils d'imageries mis en place (Figure 38).

Une gamme d'impulsions électriques de 5 millisecondes, c'est-à-dire de type électrotransfert de gène (EGT) est appliquée sur le substitut dermique humain. À l'aide de la microscopie biphotonique, la quantification de l'efficacité de l'électroperméabilisation est obtenue par une analyse de la proportion des cellules perméabilisées dans toute l'épaisseur du tissu. Pour détecter la perméabilisation des cellules du substitut dermique au microscope multiphotonique, les impulsions sont appliquées en présence d'iodure de propidium, un intercalant de l'ADN non-perméant comme le montre la figure 39.

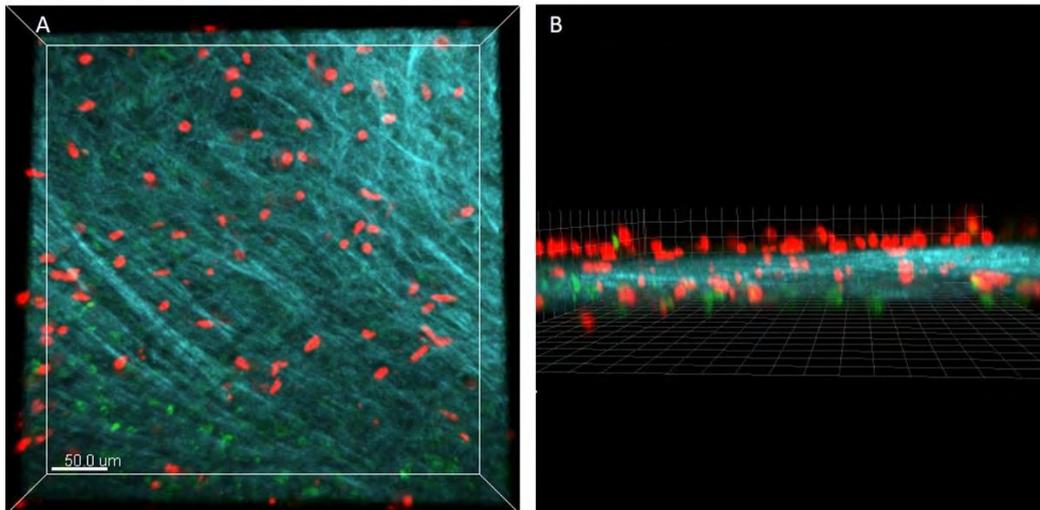


Figure 39: Observation de l'électroporation des cellules dans un substitut dermique humain. A) Vue du dessus, B) Vue transversale. Les collagènes sont observés par génération de seconde harmonique (bleu). Les cellules électroporées efficacement sont marquées en rouge grâce à l'iodure de propidium. Paramètres électriques : 200 V/cm ; 1Hz ; 5 ms ; x10.

Ces résultats ont fait l'objet d'une publication dans le Journal of Membrane Biology en 2015 sur laquelle je suis premier auteur.

b. Publication

Efficient In Vitro Electroporation of Reconstructed Human Dermal Tissue

Moinecha Madi^{1,2} · Marie-Pierre Rols^{1,2} · Laure Gibot^{1,2}

Received: 6 February 2015 / Accepted: 12 March 2015 / Published online: 19 March 2015
© Springer Science+Business Media New York 2015

Abstract DNA electrotransfer is a successful technic for gene delivery. However, its use in clinical applications is limited since little is known about the mechanisms governing DNA electrotransfer in the complex environment occurring in a tissue. The objectives of this work were to investigate the role of the extracellular matrix (ECM) in that process. Tumor ECM composition was shown to modulate in vivo gene electrotransfer efficiency. In order to assess the effects of ECM composition and organization, as well as intercellular junctions and communication, in normal tissue response to electric pulses, we developed an innovative three-dimensional (3D) reconstructed human connective tissue model. 3D human dermal tissue was reconstructed in vitro by a tissue engineering approach and was representative of in vivo cell organization since cell–cell contacts were present as well as complex ECM. This human cell model presented multiple layers of primary dermal fibroblasts embedded in a native, collagen-rich ECM. This dermal tissue could become a useful tool to study skin DNA electrotransfer mechanisms. As proof of the concept, we show here that the cells within this standardized 3D tissue can be efficiently electroporated by milliseconds electric pulses. We believe that a better comprehension of gene electrotransfer in such a model tissue would help improve electrogene therapy approaches

such as the systemic delivery of therapeutic proteins and DNA vaccination.

Keywords Tissue engineering · Electroporation · Gene electrotransfer · Connective tissue · 3D architecture

Introduction

The clinical development of gene therapy requires the use of safe and efficient methods to deliver therapeutic genes to the targeted cell. Contrary to viral vectors, plasmid DNA vectors offer many advantages. They are safer than viral vectors, cheaper and easier to mass-produce, they have a high DNA content, and their administration can be repeated since they are non-immunogenic (Pfutzner 2010). However, their major disadvantage is their low effectiveness in vivo. Indeed, plasmid DNA vectors have to overcome several obstacles, namely, DNA diffusion through the extracellular matrix (ECM), uptake across the plasma membrane, intracellular migration to the nucleus, and through the nuclear envelope (Escoffre et al. 2010).

Physical techniques such as electroporation have been developed to improve the in vivo transfection rate and are now accepted in clinics. The method relies on the application of electric pulses to induce transient and localized cell permeabilization, a process that allows naked plasmid DNA uptake into cells (Neumann and Rosenheck 1972; Neumann et al. 1982). Thanks to electrogene transfer, safe local delivery can be achieved. A wide range of soft and hard tissues have already been successfully transfected using this method including skin, liver, muscle, joints, lung, spleen, brain, eyes, and tumors (Mir et al. 2005).

Electrogene transfer in skin, which is an easy organ to treat, allows multiple therapeutic approaches to be

✉ Marie-Pierre Rols
rols@ipbs.fr

✉ Laure Gibot
laure.gibot@ipbs.fr

¹ IPBS-CNRS, 205 Route de Narbonne, 31077 Toulouse, France

² Université de Toulouse, UPS, 31077 Toulouse, France

considered such as systemic delivery of therapeutic proteins and DNA vaccination (Rochard et al. 2011; Vandermeulen et al. 2007). Indeed, human skin is largely microvascularized, allowing transfected cells to systemically secrete therapeutic proteins. Furthermore, skin contains a numerous antigen-presenting cells, allowing a strong immune response after DNA vaccination. Thus, the first published phase I study on metastatic melanoma found that IL-12 electrogene transfer led to tumor necrosis and regression of untreated distant metastases (Daud et al. 2008).

In order to improve in vivo electrogene transfer efficacy in human skin and thus to develop clinical applications, we have to have a better understanding of the gene transfer mechanisms in a tissue context. A lot of in vitro studies performed on cells in culture have been used in an attempt to optimize the electrical parameters and thus to apply this technique in clinics. However, even though they are useful, none of these studies were able to access the complexity of in vivo tissues. Accumulating evidence underlines that three-dimensional (3D) cell models are superior to classical 2D cell culture to mimic and predict in vivo situations (Ghajar and Bissell 2010; Nyga et al. 2011; Pampaloni et al. 2007).

This is why we and others have developed 3D cell culture models to study gene electrotransfer in vitro in a 3D context. The most common model, named the spheroid, is a 3D cellular model devoid of any exogenous material (Sutherland 1988). Even though mRNA for ECM components such as collagens, laminin, fibronectin, and glycosaminoglycans were found in spheroids, the model is especially relevant for intercellular junctions in a tumor context (Kunz-Schughart et al. 2006; Nederman et al. 1984; Stevens et al. 2009). We previously demonstrated that although the electrotransfection rate reached values higher than 25 % for cells in suspension, the transfection rate of cells in spheroids hardly reached 1 % under the same electrical conditions (Chopin et al. 2012), a value which is close to in vivo tumor transfection rates (Rols et al. 1998). Mellor and coll showed that transfected cells were only located on the outer layers of the spheroid, in direct contact with plasmid DNA (Mellor et al. 2006). Similarly, we noted that reporter gene expression was only detected in one cap of the spheroid, the one facing the negative electrode, which is direct evidence for the involvement of electrophoretic forces in DNA electrotransfer (Wasungu et al. 2009) and is in agreement with the in vitro process (Golzio et al. 2002; Paganin-Gioanni et al. 2011). Interestingly, in another 3D cellular model, Haberl et al. confirmed that electrogene transfer within hamster cells dispersed in a type I collagen from rat tail gel was comparable to in vivo studies and depended on plasmid DNA concentration and pulse duration (Haberl and Pavlin 2010).

Thus, close contacts between cells and ECM deposition may act as a physical barrier that limits/prevents uniform DNA distribution and could explain the low gene electrotransfer efficiency in tissue.

Skin dermis is a connective tissue characterized by abundant ECM primarily synthesized by fibroblasts (Prost-Squarcioni et al. 2008). Dermis ECM is composed of collagen and elastic fibers providing tissue resistance to tensile forces and the amorphous ground substance, allowing the flow of water and dissolved molecules. In order to study gene electrotransfer mechanisms in skin, we developed here an innovative in vitro 3D human model of normal dermal tissue, where primary dermal fibroblasts produce their own, complex physiological ECM.

Materials and Methods

Cell Culture

Primary human dermal fibroblasts were isolated from human foreskin biopsy after postectomy as previously described (Gibot et al. 2010). The cells were grown in Dulbecco's Modified Eagles Medium (Gibco-Invitrogen, Carlsbad, USA) containing 4.5 g/L glucose, L-glutamine, and pyruvate, supplemented with 10 % (v/v) of heat-inactivated fetal calf serum, 100 U/ml penicillin, and 100 µg/ml streptomycin. Cells were maintained at 37 °C in a humidified atmosphere containing 5 % CO₂.

Reconstruction of a Human 3D Dermal Tissue

The self-assembly approach (Auger et al. 2002) was used to produce human 3D dermal tissue in vitro. Schematically, primary human dermal fibroblasts were cultivated for 3 weeks in cell culture medium supplemented with 50 µg/mL of ascorbic acid (Sigma) as previously described (Gibot et al. 2010, 2013). Indeed, ascorbic acid is well known to improve collagen production, secretion, and maturation (Lyons and Schwarz 1984; Schwarz 1985). After 3 weeks, cells secreted enough ECM to form a cell sheet that was easy to manipulate. Since the cells used to produce the sheet are dermal fibroblasts, ECM is comparable to that found in the dermis compartment of the skin.

Histological Analysis

After fixation in formalin (Sigma-Aldrich) at room temperature for 1 h, transversal sections of cell sheet were embedded in paraffin for staining with Masson's trichrome (Sigma-Aldrich). The Masson's trichrome method stains cells red and collagens within the dermal tissue in blue (Masson 1929).

Transmission and Scanning Electron Microscopy

For transmission electron microscopy, cell sheets were fixed in 2 % glutaraldehyde in 0.1 M Sorensen phosphate buffer (pH 7.4) for 4 h at 4 °C, washed overnight in 0.2 M phosphate buffer, and then post-fixed for 1 h at room temperature with 1 % osmium tetroxide in 250 mM saccharose and 0.05 M phosphate buffer. They were stained overnight in 2 % uranyl acetate. The samples were then dehydrated in a series of graded ethanol solutions and embedded in an Epon–araldite resin (Embed 812-Araldite 502, Electron Microscopy Sciences). Finally, ultra-thin sections stained with uranyl acetate were observed under a transmission electron microscope (Hitachi HU12A electron microscope). For scanning electron microscopy, cell sheets were fixed in 2 % glutaraldehyde in 0.1 M sodium cacodylate buffer for 4 h at 4 °C. After two washes in the same buffer, the cell sheets were dehydrated in a graded ethanol series, dried by critical point drying with EMScope CPD 750, coated with gold–palladium for 5 min at 100 \AA min^{-1} , and then observed with a S450 scanning electron microscope (Hitachi).

Collagens Detection by Second Harmonic Generation

Three dimensional stacks of $425 \times 425 \times 60 \text{ \mu m}$ were acquired using a 7MP multiphoton laser scanning microscope (Carl Zeiss S.A.S., Jena, Germany), equipped with a 20 \times objective (NA 0.95) and coupled to a Ti-Sapphire femtosecond laser, Chameleon Ultra 2 (Coherent Inc) tuned to 800 nm. Organized fibrillar collagens were detected by second harmonic generation (SHG) at a wavelength of 400 nm. The acquired 3D images were stored and then analyzed off-line with Imaris software (Bitplane AG).

Electroporation of 3D Human Dermal Tissue

Two flat parallel stainless steel electrodes (1 cm length, 1 cm width) were placed on the top of cell sheets and immersed in pulsing buffer (10 mM $\text{K}_2\text{HPO}_4/\text{KH}_2\text{PO}_4$ buffer, 1 mM MgCl_2 , 250 mM sucrose, pH 7.4) containing 100 μM propidium iodide (PI) (Sigma-Aldrich). Electroporation used an electro cell S20 generator (β Tech, Toulouse, France) which delivered square-wave electric pulses. An oscilloscope (Enertec, St. Etienne, France) was used to monitor pulse shape. The electrical conditions were as follows: eight pulses lasting 5 ms at a frequency of 1 Hz were applied from 0 to 600 V/cm at room temperature. Cell membrane permeabilization was assessed by multiphoton laser scanning microscopy on living tissues. An

isosurface was made with Imaris software to visualize and isolate the permeabilized cells.

Results

Reconstruction of Human 3D Dermal Tissue Rich in Organized Collagens

In the first step, we visualized and characterized the ECM secreted by primary human dermal fibroblasts within our in vitro 3D reconstructed dermal tissue model. For this purpose, we identified collagens by different and complementary imaging tools. Primary human dermal fibroblasts cultured by the self-assembly approach are able to reproduce a physiological environment within 3 weeks, by secreting and organizing a dense 3D ECM rich in collagens (Fig. 1). Dermal tissue cross sections showed several layers of fibroblasts embedded in a 3D ECM rich in collagens (Fig. 1a). Both scanning and transmission electron microscopy showed intact, organized collagen fibrils within our dermal tissue model (Fig. 1b, c). Longitudinal sections of collagen fibrils showed the typical striation brought about by the arrangement of tropocollagen (Fig. 1d). In addition, multiphoton imaging allowed non-invasive high-resolution in vitro, in situ imaging of organized ECM structures and cells in living intact tissue-engineered models. Thus, abundant organized collagens fibrils were distinctly observed by SHG (Fig. 1e).

Cells were Efficiently Electroporated Within 3D Reconstructed Dermal Tissue

To study the effect of electrical pulse parameters (i.e., millisecond electric pulses) currently used for gene electrotransfer, the permeabilization state of cells within 3D human dermal tissue was assessed using PI penetration. Permeabilization was followed on live human dermal tissue by multiphoton imaging (Fig. 2). Biphoton microscopy allowed observation of the entire thickness of the fresh tissue. For the control, dermal tissues were incubated with PI without any electrical pulses. We only observed a few permeabilized cells, corresponding to dead cells (Fig. 2a). Indeed, there is some cell renewal in our model, and dead cells are trapped within the tissue. For the electropulsed condition, by increasing electric field intensity, we observed that cells could be gradually permeabilized (Fig. 2b–d). These experiments showed that electric pulse intensities between 300 V/cm and 600 V/cm led to an efficient and homogeneous permeabilization of the cells. Thus, using the gene electrotransfer electrical parameters (i.e., millisecond pulses), we are able to efficiently

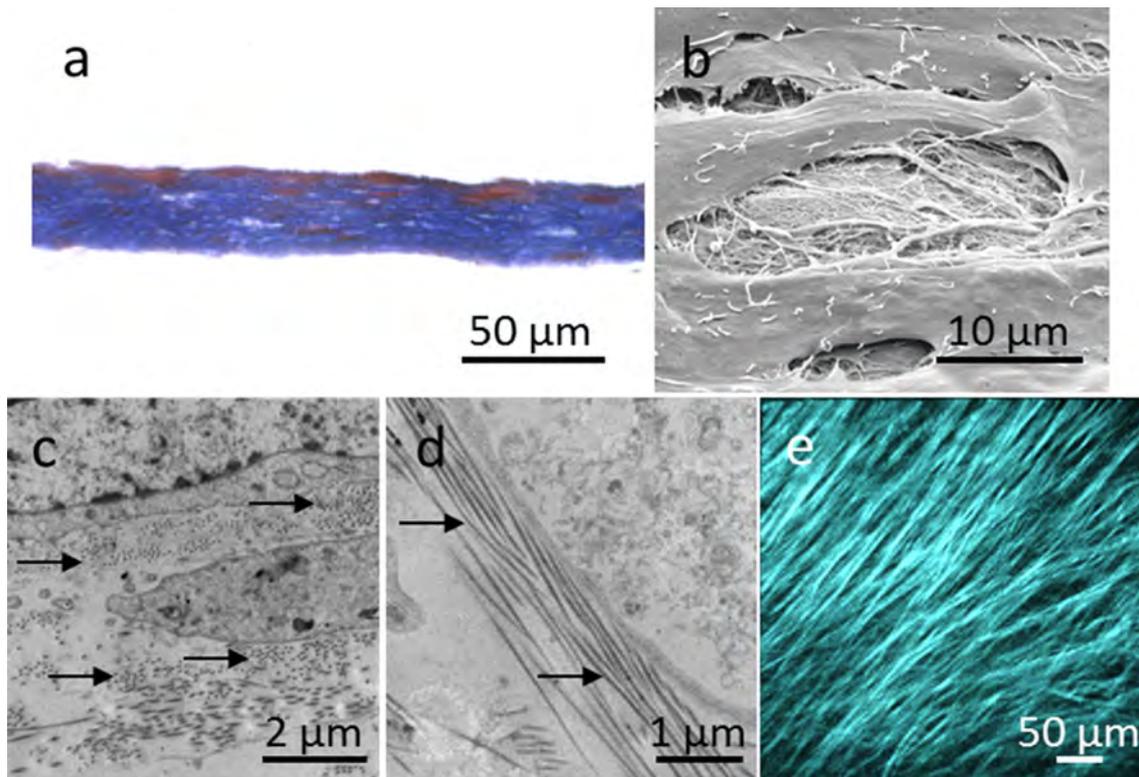


Fig. 1 Human 3D dermal tissue characterization. **a** Cell sheet cross section stained with Masson's trichrome. Cells are *red* and collagens are *blue*. **b** Scanning electron microscopy showing fibroblast cells and extracellular matrix. **c** Transmission electron microscopy of cell sheet. *Arrows* indicate collagen fiber cross sections. **d** Transmission

electron microscopy of cell sheet. *Arrows* indicate longitudinal section of collagen bundles. **e** Organized fibrillar collagens within cell sheet produce second harmonic generation signal (Color figure online)

electroporate all the cells contained in the model tissue whatever their location in the cell sheet.

Discussion

In this study, we used a tissue engineering approach to in vitro reconstruction of human 3D dermal tissue rich in organized collagens. Indeed, primary human dermal fibroblasts cultured by the self-assembly approach reproduce a physiological environment within 3 weeks, by secreting and organizing a dense 3D ECM containing collagens and elastin, with characteristics similar to those observed in vivo (Pouliot et al. 2002), (L'Heureux et al. 1998). Using self-assembly approach, we are able to produce in a reproducible manner several tens of sheets of 50 µm average thickness. The production cost is less than 5€ for each cell sheet, which is dramatically cheaper than using rat tail collagen gel to mimic dermis compartment. The major limitation of self-assembly approach can be the time necessary for cells to produce handleable cell sheet, i.e., approximately 3 weeks, which can be overcome by a good logistical organization.

To our knowledge, we are the first to implement and use these easily handleable cell sheets to study gene electrotransfer in tissue. We showed that using millisecond electric pulses, cells deep within the tissue were efficiently electroporated.

After this proof of concept, we hope that our innovative model will be a valuable tool to assess the role of ECM secretion and organization, as well as intercellular junction and communication, in tissue responses to electric pulses. Indeed, it has already been proven in vivo that electric fields improve plasmid transport via electrophoresis across extracellular medium (Henshaw and Yuan 2008). However, electrophoretic transport of plasmid DNA is inversely correlated with collagen content in solid tissues (Zaharoff et al. 2002). Soft tumors containing few proteoglycans and collagens were found in vivo to be more efficiently electroporated with plasmid DNA than solid tumors with rich ECM (Mesojednik et al. 2007). The underlying mechanism seems to be that collagen influences tumor tissue resistance to macromolecule transport by binding and stabilizing glycosaminoglycans (Netti et al. 2000). These in vivo studies were performed on mice and provided access to gene delivery in tissue, but mouse skin is

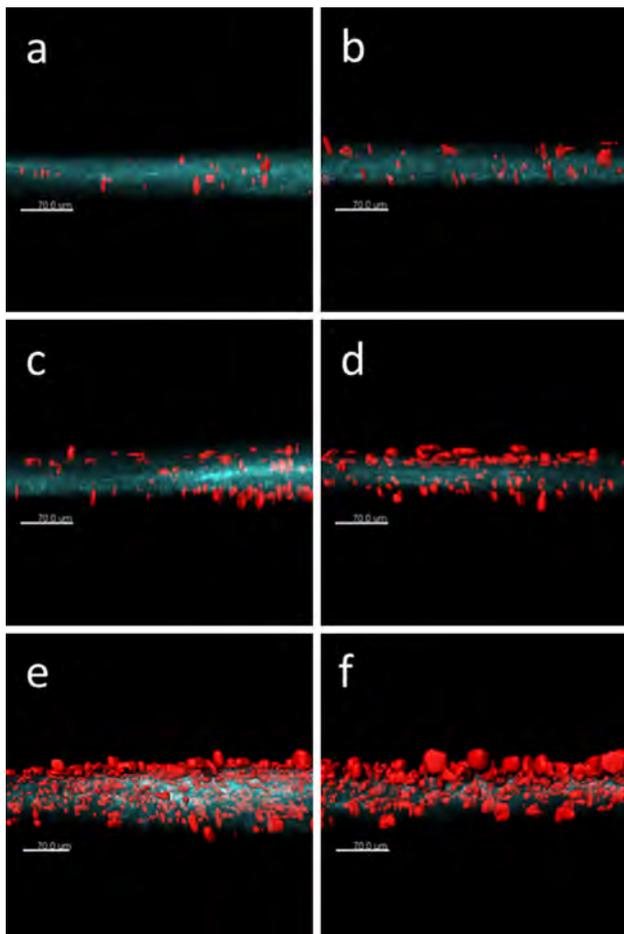


Fig. 2 3D dermal tissue electropermeabilization. Reconstructed human dermal tissue was electropermeabilized in the presence of propidium iodide (*red*) with the following electrical parameters: 8 pulses of 5 ms duration at 1 Hz. Electric field intensity was 0 V/cm (**a**), 200 V/cm (**b**), 300 V/cm (**c**), 400 V/cm (**d**), 500 V/cm (**e**), 600 V/cm (**f**) and observed under a fluorescent biphoton microscope. *Collagens* are *blue* (Color figure online)

very different from human skin (Pasparakis et al. 2014). Furthermore, most of these studies were performed in a tumor context. We think that a better understanding of the role of ECM in gene electrotransfer in a healthy human 3D-relevant context will help improve gene therapy and DNA vaccination efficiency.

In addition, tissue engineering approaches to reconstructing normal human tissue lends itself to the philosophy of the 4R's that promotes reliable alternatives to animal experiments in an attempt to reduce the numbers of animals used (responsibility, refining, replacement, and reduction). The simplicity of in vitro testing on reconstructed human dermal tissue will allow better development and adjustment of gene electrotransfer conditions in terms of plasmid DNA concentration and electrical parameters. With the development of dermal models reconstructed directly from patient cells, this technique could hold promise for the

development of patient-adjusted gene therapy, i.e., personalized medicine. It will become possible to evaluate and then adapt the electric field pulse parameters (pulse number, amplitude, and width) far beyond what can be done in animal studies.

Acknowledgments This research was performed in the scope of the EBAM European Associated Laboratory (LEA) and is a result of networking efforts within COST TD1104. We were supported by the Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS), the Agence Nationale de la Recherche (ANR), Projet PIERGEN ANR-12-ASTR-0039, the Direction Générale de l'Armement (DGA), and the Midi-Pyrénées Région. Microscopy experiments were carried out on the Plateforme Genotoul Toulouse RIO Imaging. The authors would like to gratefully acknowledge Elisabeth Bellard (IPBS), Isabelle Fourquaux, and Nacer Benmeradi (CMEAB) for their technical assistance in imaging experiments, and Peter Winterton, a native English scientist, for his careful proofreading of this manuscript.

References

- Auger, FA, et al. (2002). A truly new approach for tissue engineering: the LOEX self-assembly technique. In: Ernst Schering Res Found Workshop. pp 73–88
- Chopin L et al (2012) First explanations for differences in electrotransfection efficiency in vitro and in vivo using spheroid model. *Int J Pharm* 423:7–15
- Daud AI et al (2008) Phase I trial of interleukin-12 plasmid electroporation in patients with metastatic melanoma. *J Clin Oncol* 26:5896–5903
- Escoffre JM et al (2010) Gene transfer: how can the biological barriers be overcome? *J Membr Biol* 236:61–74
- Ghajar CM, Bissell MJ (2010) Tumor engineering: the other face of tissue engineering. *Tissue Eng Part A* 16:2153–2156
- Gibot L et al (2010) A preexisting microvascular network benefits in vivo revascularization of a microvascularized tissue-engineered skin substitute. *Tissue Eng Part A* 16:3199–3206
- Gibot L et al (2013) Development of a tridimensional microvascularized human skin substitute to study melanoma biology. *Clin Exp Metastasis* 30:83–90
- Golzio M et al (2002) Direct visualization at the single-cell level of electrically mediated gene delivery. *Proc Natl Acad Sci USA* 99:1292–1297
- Haberl S, Pavlin M (2010) Use of collagen gel as a three-dimensional in vitro model to study electropermeabilization and gene electrotransfer. *J Membr Biol* 236:87–95
- Henshaw JW, Yuan F (2008) Field distribution and DNA transport in solid tumors during electric field-mediated gene delivery. *J Pharm Sci* 97:691–711
- Kunz-Schughart LA et al (2006) Potential of fibroblasts to regulate the formation of three-dimensional vessel-like structures from endothelial cells in vitro. *Am J Physiol Cell Physiol* 290:C1385–C1398
- L'Heureux N et al (1998) A completely biological tissue-engineered human blood vessel. *FASEB J* 12:47–56
- Lyons BL, Schwarz RI (1984) Ascorbate stimulation of PAT cells causes an increase in transcription rates and a decrease in degradation rates of procollagen mRNA. *Nucleic Acids Res* 12:2569–2579
- Masson P (1929) Some histological methods; trichrome stainings and their preliminary technique. *J Tech Methods* 12:75–90
- Mellor HR et al (2006) Optimising non-viral gene delivery in a tumour spheroid model. *J Gene Med* 8:1160–1170

- Mesojednik S et al (2007) The effect of the histological properties of tumors on transfection efficiency of electrically assisted gene delivery to solid tumors in mice. *Gene Ther* 14:1261–1269
- Mir LM et al (2005) Electric pulse-mediated gene delivery to various animal tissues. *Adv Genet* 54:83–114
- Nederman T et al (1984) Demonstration of an extracellular matrix in multicellular tumor spheroids. *Cancer Res* 44:3090–3097
- Netti PA et al (2000) Role of extracellular matrix assembly in interstitial transport in solid tumors. *Cancer Res* 60:2497–2503
- Neumann E, Rosenheck K (1972) Permeability changes induced by electric impulses in vesicular membranes. *J Membr Biol* 10:279–290
- Neumann E et al (1982) Gene transfer into mouse lymphoma cells by electroporation in high electric fields. *EMBO J* 1:841–845
- Nyga A et al (2011) 3D tumour models: novel in vitro approaches to cancer studies. *J Cell Commun Signal* 5:239–248
- Paganin-Gioanni A et al (2011) Direct visualization at the single-cell level of siRNA electrotransfer into cancer cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 108:10443–10447
- Pampaloni F et al (2007) The third dimension bridges the gap between cell culture and live tissue. *Nat Rev Mol Cell Biol* 8:839–845
- Pasparakis M et al (2014) Mechanisms regulating skin immunity and inflammation. *Nat Rev Immunol* 14:289–301
- Pfutzner W (2010) Vectors for gene therapy of skin diseases. *J Dtsch Dermatol Ges* 8:582–591
- Pouliot R et al (2002) Reconstructed human skin produced in vitro and grafted on athymic mice. *Transplantation* 73:1751–1757
- Prost-Squarcioni C et al (2008) Functional histology of dermis. *Ann Dermatol Venereol* 135:1S5–1S20
- Rochard A et al (2011) Genetic immunization with plasmid DNA mediated by electrotransfer. *Human Gene Ther* 22:789–798
- Rols MP et al (1998) In vivo electrically mediated protein and gene transfer in murine melanoma. *Nat Biotechnol* 16:168–171
- Schwarz RI (1985) Procollagen secretion meets the minimum requirements for the rate-controlling step in the ascorbate induction of procollagen synthesis. *J Biol Chem* 260:3045–3049
- Stevens KR et al (2009) Physiological function and transplantation of scaffold-free and vascularized human cardiac muscle tissue. *Proc Natl Acad Sci USA* 106:16568–16573
- Sutherland RM (1988) Cell and environment interactions in tumor microregions: the multicell spheroid model. *Science* 240:177–184
- Vandermeulen G et al (2007) Optimisation of intradermal DNA electrotransfer for immunisation. *J Control Release* 124:81–87
- Wasungu L et al (2009) A 3D in vitro spheroid model as a way to study the mechanisms of electroporation. *Int J Pharm* 379:278–284
- Zaharoff DA et al (2002) Electromobility of plasmid DNA in tumor tissues during electric field-mediated gene delivery. *Gene Ther* 9:1286–1290

c. Conclusion

Nous avons montré notamment à l'aide de techniques d'imageries qu'avec la technique d'auto-assemblage les fibroblastes dermiques humains sont capables de sécréter et d'organiser une matrice extracellulaire riche et dense en collagènes. D'autres études sur ce modèle montrent que cette matrice extracellulaire présente des caractéristiques similaires de celles du derme natif (Auger, Remy-Zolghadri et al. 2002). De façon intéressante, un article auquel j'ai participé et qui vient d'être publié dans Biofabrication (Annexe 2, (Pillet, Gibot et al. 2017)) démontre que les propriétés biophysiques d'un même type cellulaire, ici des fibroblastes dermiques humains, dépendent de la configuration sous laquelle il est cultivé *in vitro*. Ainsi, les fibroblastes cultivés par la technique d'auto-assemblage au sein du feuillet dermique possèdent les mêmes caractéristiques biophysiques (i.e module de Young) que ceux dans le derme natif, contrairement aux fibroblastes cultivés sous forme de sphéroïde ou de monocouche. Il semblerait que ces propriétés biophysiques des cellules soient corrélées à la présence de matrice extracellulaire dans le modèle.

L'application d'impulsions électriques de l'ordre des millisecondes a permis d'électroperméabiliser efficacement les cellules du feuillet dermique. Cette preuve de concept montre que ce modèle pourra devenir un outil précieux pour évaluer le rôle de la matrice extracellulaire dans les réponses tissulaires à l'application d'un champ électrique externe.

Finalement, il est intéressant de noter qu'en utilisant le même type cellulaire (fibroblastes dermiques humains primaires) les résultats diffèrent en terme de production de matrice extracellulaire selon le mode de culture des cellules. En effet les sphéroïdes présentent très peu de matrice extracellulaire en comparaison aux substituts dermiques très riches en collagènes. Voici deux hypothèses qui pourraient aider à comprendre ce qui entraîne cette différence de phénotype. Une première hypothèse est que les fibroblastes du sphéroïde produisent du collagène mais qu'il est sécrété dans le milieu de culture par manque de place au sein du sphéroïde pour le déposer. Cette théorie pourra être vérifiée par une détection par ELISA des collagènes dans les surnageants de culture des sphéroïdes. La seconde hypothèse est que les fibroblastes produisent du collagène qui est dégradé par le remodelage de la matrice extracellulaire. Le dosage de l'activité des métalloprotéinases (MMPs) des sphéroïdes répondra à cette question. Ces expériences sont actuellement en cours.

V. LE FEUILLET DERMIQUE POUR ETUDIER LES MECANISMES D'ELECTROTRANSFERT DE GENE DANS UN CONTEXTE PSEUDO-TISSU

a. Introduction

Les fibroblastes dermiques humains sécrètent et organisent une matrice extracellulaire 3D dense riche en collagènes fibrillaires. Ce substitut dermique humain a été électropéabilisé avec des impulsions électriques de l'ordre des millisecondes utilisées classiquement lors de l'électrogénothérapie (EGT) comme démontré dans le chapitre précédent (Madi, Rols et al. 2015). Ce chapitre vise à évaluer la capacité des cellules, au sein du modèle tissulaire, à exprimer efficacement un plasmide ADN après application d'un champ électrique externe.

Comme vu dans l'introduction, les impulsions millisecondes permettent l'électropéabilisation des cellules et assurent la migration par électrophorèse des plasmides chargés vers la membrane plasmique. Pour l'étude du transfert d'ADN, un plasmide codant pour le gène rapporteur de la green fluorescent protein (GFP) est utilisé afin de visualiser et quantifier les cellules transfectées. Des expériences préliminaires ont été effectuées pour déterminer la concentration optimum de plasmide à utiliser pour l'électrotransfert de gène. Une gamme de voltage avec 10 impulsions de 5ms est appliquée avec ou sans iodure de propidium et des tests de viabilité cellulaire sont réalisés pour déterminer le voltage optimal pour assurer le maintien de la survie des cellules.

Une concentration de 2µg/mL de plasmide suffit pour permettre l'expression du transgène. En augmentant la concentration du plasmide, nous avons pu constater qu'une partie de la population de cellules exprimant le plasmide meurt après 72 heures de culture. Ensuite une gamme de voltage est appliquée en présence du plasmide codant pour la GFP afin d'analyser l'efficacité de transfection selon le voltage. L'expression du plasmide est observée à 6h, 24h et 48h après application du champ électrique. En parallèle, des expériences indépendantes sont effectuées en présence du plasmide codant pour GFP marqué avec le TOTO-1, un intercalant de l'ADN, pour visualiser la distribution des plasmides au sein du tissu immédiatement après les impulsions.

Enfin, il a été démontré *in vitro* que les cellules en prolifération sont plus facilement transfectables (Golzio, Teissie et al. 2002) donc une analyse de l'état de prolifération des cellules au sein des substituts dermiques a été effectuée afin de vérifier s'il corrèle avec les zones d'expression du gène rapporteur.

Ces résultats ont fait l'objet d'une publication dans Current gene Therapy en 2016 sur laquelle je suis premier auteur.

b. Publication

Gene Electrotransfer in 3D Reconstructed Human Dermal Tissue

Moinecha Madi^{a,b}, Marie-Pierre Rols^{a,b,*} and Laure Gibot^{a,b,*}



MP. Rols

^aIPBS-CNRS, 205 route de Narbonne, 31077 Toulouse, France; ^b Université de Toulouse, UPS, 31077 Toulouse, France



L. Gibot

Abstract: Gene electrotransfer into the skin is of particular interest for the development of medical applications including DNA vaccination, cancer treatment, wound healing or treatment of local skin disorders. However, such clinical applications are currently limited due to poor understanding of the mechanisms governing DNA electrotransfer within human tissue. Nowadays, most studies are carried out in rodent models but rodent skin varies from human skin in terms of cell composition and architecture. We used a tissue-engineering approach to study gene electrotransfer mechanisms

in a human tissue context. Primary human dermal fibroblasts were cultured according to the self-assembly method to produce 3D reconstructed human dermal tissue. In this study, we showed that cells of the reconstructed cutaneous tissue were efficiently electroporated by applying millisecond electric pulses, without affecting their viability. A reporter gene was successfully electrotransferred into this human tissue and gene expression was detected for up to 48h. Interestingly, the transfected cells were solely located on the upper surface of the tissue, where they were in close contact with plasmid DNA solution. Furthermore, we report evidences that electrotransfection success depends on plasmid mobility within tissue-rich in collagens, but not on cell proliferation status. In conclusion, in addition to proposing a reliable alternative to animal experiments, tissue engineering produces valid biological tool for the *in vitro* study of gene electrotransfer mechanisms in human tissue.

Keywords: Delivery, Plasmid DNA, Electroporation, Extracellular matrix, Gene therapy, Skin, Tissue engineering.

INTRODUCTION

Since few decades, a physical method named electroporation has been developed to locally deliver therapeutic drugs (cytotoxic molecules and nucleic acids) to a large range of targeted tissues [1-5]. This promising method is currently applied in human clinics. The major fields of application of DNA electrotransfer are vaccination and gene therapy in oncology [6-8]. Clinical applications have already begun in veterinary and human oncology [9-11]. Hopeful results have been obtained with the first published phase-I trial on interleukin-12 electroporation, conducted in a cohort of patients with metastatic melanomas [12].

However, while gene electrotransfer is highly efficient in a large panel of cell lines *in vitro*, gene expression is usually less efficient *in vivo* in some tissues such as tumors and the skin [7, 13]. Although the first study on DNA electrotransfer was initiated more than 30 years ago [14], underlying mechanisms are not yet fully understood, particularly in *in vivo* situations [15]. It is therefore still mandatory, for further developing the method in clinics, to increase our knowledge of the process.

The skin is an appealing tissue target for gene electrotherapy because of its large surface area, its accessibility and

its immunological properties with antigen presenting cells present both in the epidermis and in the dermis [16]. Gene electrotransfer to muscle tissue is highly effective and leads to long-term transgene expression [17, 18]. With some plasmids and under optimized delivery conditions, it could achieve higher expression than in skin [19]. Nevertheless, high and/or long-term transfection are not always required [20]. For example, in wound healing, there is no need for therapeutic growth factor transgene expression when the wound has closed [21, 22]. Similarly, DNA vaccination does not require a continuous production of antigens once the immune system has responded to the vaccine [4, 23]. Donate and collaborators gave evidence that vaccine to the skin is as, if not more, efficient than delivery to muscle [24]. Gene electrotransfer to the skin can be as efficient as muscle as reported by Heller *et al.* showing over 30% efficiency delivering to the skin [25].

Skin consists of distinct cell types, mainly keratinocytes, melanocytes, Langerhans cells, fibroblasts and endothelial cells. This diversity of cell types can differently respond to gene transfection depending on the plasmid construction (*i.e.*, tissue-specific promoters), on the electrical parameters and/or on the type of electrodes used.

In order to understand the role of each parameter of the experimental setup on the distinct cell types present within the skin during the gene electrotransfer process, relevant biological models of human skin tissue have to be developed.

*Address correspondence to these authors at the IPBS-CNRS, 205 route de Narbonne, 31077 Toulouse, France; Tel/Fax: +33-561-175-827, +33-561-175-994; E-mails: gibot@ipbs.fr; rols@ipbs.fr

Using the tissue engineering self-assembly approach [26], we produced reconstructed human dermal tissue, devoid of any exogenous material, and rich in native extracellular matrix [27, 28]. In this context, primary human dermal fibroblasts reproduce a native environment, by secreting and organizing a 3D extracellular matrix dense in collagens. These abundant collagen fibrils were clearly detected by second harmonic generation (SHG) [29]. In a previous study, we showed that this tissue-engineered model is efficiently electropermeabilized with millisecond electric pulses [29]. Thus, we propose here to further examine gene electrotransfer mechanisms *in vitro* in human tissue by using this relevant and useful biological model.

MATERIALS AND METHODS

Cell Culture

Primary human dermal fibroblasts were extracted from human child foreskin after posthectomy as previously described [27]. Primary cells were grown at 37°C in Dulbecco's Modified Eagles Medium (Gibco-Invitrogen, Carlsbad, USA) supplemented with 10% fetal calf serum, 100 U/ml penicillin and 100 μ g/ml streptomycin.

Reconstruction of Human 3D Dermal Tissue

Human dermal substitutes, devoid of any exogenous material, were reconstructed *in vitro* according to the self-assembly approach. In a few words, primary human dermal fibroblasts were grown for three weeks in cell culture medium supplemented with 50 μ g/mL of ascorbic acid (Sigma-Aldrich) as already published [28, 29]. After three weeks, enough extracellular matrix was secreted to produce a cell sheet that is easy to manipulate. Since the cells are primary dermal fibroblasts, extracellular matrix is comparable to human dermis.

Collagen Detection By Second Harmonic Generation (SHG)

Stacks of 425x425x60 μ m were acquired using a 7MP multiphoton microscope (Carl Zeiss, Jena, Germany) coupled to a Ti-Sapphire laser, Chameleon Ultra 2 (Coherent Inc) settled to 800 nm. Organized fibrillar collagens were detected by second harmonic generation at a wavelength of 400 nm. Imaris software (Bitplane AG) was used to analyze the acquired 3D images.

Electropermeabilization and Gene Electrotransfer in 3D Human Dermal Tissue

Two flat parallel stainless steel electrodes were placed on the top of a cell sheet and immersed in pulsing buffer (10 mM K₂HPO₄/ KH₂PO₄ buffer, 1 mM MgCl₂, 250 mM sucrose, pH 7.4) containing or not 100 μ M propidium iodide (PI) (Sigma-Aldrich) or 2 μ g of 4.7 kb pEGFP-C1 DNA plasmid (Clontech, #6084-1). Electropulsation was performed with an ELECTRO cell S20 generator (Tech, Toulouse, France) which delivered square-wave electric pulses. The electrical conditions were the following: 8 pulses lasting 5 ms at a frequency of 1 Hz applied from 0 to 800V/cm at room temperature.

Electropermeabilization Detection and Quantification

Cell membrane permeabilization was analyzed on living tissues by multiphoton microscopy. Electropermeabilization efficiency was investigated by adding PI to the pulsation buffer during electric field application. IMARIS software was used to draw an isosurface and to isolate the electropermeabilized cells (*i.e.* cells in which PI was present).

Cell Viability

Tissue viability was determined by adding PI 24h after application of the electric field. Viability was also quantified using PrestoBlue assay (Invitrogen) according the manufacturer's protocol. Briefly, 24h after electric field application, the cell sheet was incubated for 30 min at 37°C in a PrestoBlue solution. Absorbance (excitation 570 nm, emission 600 nm) was then read using a plate reader (Clariostar, BMG). Controls, named "Dead" were cell sheets subjected to 3 freeze/thaw cycles).

Reporter Gene Electrotransfer Efficiency

3D stacks showing both SHG and efficiently electrotransfected GFP-positive cells were acquired using a multiphoton laser scanning microscope. Pictures were analysed with IMARIS software to show both top and side views of the cell sheet. Image J software (NIH, Bethesda, USA) was used to quantify the GFP-positive areas within total pictures (425x425 μ m).

Cell Proliferation Within Dermal Tissue

Cell proliferation was assessed with Click-it[®] EdU Alexa Fluor[®] imaging kit (Molecular Probes). In a few words, cell sheet was incubated for 24h with 10 μ M EdU before being processed according to the manufacturer's recommendations. Reconstructed dermal tissues were observed with a 7MP multiphoton laser scanning microscope.

DNA Staining and Gene Electrotransfer

pEGFP-C1 plasmid was stoichiometrically labelled with TOTO-1 (Molecular Probes), a DNA intercalating dye as previously described [30]. The plasmid was stained with 2.3x10⁻⁴ M dye at a DNA concentration of 1 μ g/ μ l for 60 min on ice. Cell sheet was incubated in labeled plasmid-containing pulsation buffer and exposed to 8 pulses each lasting 5 ms at a frequency of 1 Hz at 800V/cm at room temperature. Cell sheets were observed 1 minute after the pulses with the 7MP multiphoton laser scanning microscope.

Statistical Analyses

Statistical significance in cell viability after different electrical treatments was determined using 1-way ANOVA with a Dunnett's post-test. Statistical analyses used GraphPad Prism software, version 4.02 (GraphPad Software, San Diego, USA). All plotted data were expressed as means \pm SEM.

RESULTS AND DISCUSSION

The aim of our study was to examine the relevance of reconstructed human dermal tissue as a model to address gene electrotransfer processes. To do so, we used standard electri-

cal parameters for gene electrotransfer (i.e, 8 pulses lasting 5 ms at 1 Hz frequency with field intensities from 0V/cm to 800V/cm). Multiphoton imaging allowed visualization of membrane permeabilization, gene transfer and expression at the single cell level within tissue, on fresh human models. Cell uptake of propidium iodide was used to detect membrane permeabilization. A plasmid carrying the Green Fluorescent Protein gene allowed detection of gene transfer and expression. This methodology addresses the following issues: (i) Can the cells within reconstructed dermal tissue be efficiently electroporated and transfected? (ii) Does transfection affect cell viability? (iii) Does the location of the cells within the tissue and their proliferative status affect the process?

Cells Within Reconstructed Human Dermal Tissue Are Efficiently Electroporated By Millisecond Electric Pulses

Electroporation was assessed by adding propidium iodide during electric field application. Images obtained by microscopy were analyzed by IMARIS software which allows cell sheets to be visualized both from top and side views (Fig. 1). In the control condition (0V/cm), a few permeable cells that correspond to dead cells were observed in the cell sheet. Indeed, cell renewal takes place in the reconstructed human dermal tissue model, and dead cells are entrapped within the extracellular matrix. By applying the electric pulses and increasing the electric field intensity, cells located both on the surface and in depth were efficiently and homogeneously electroporated. Thus, the whole cells embedded within the tissue model can be electroporated. We then checked whether membrane permeabilization was transient or not. Irreversible electroporation (IRE) offers great promise in interventional oncology with thermal or non-thermal tumor ablation [4, 31]. However, IRE has to be avoided in gene therapy since it is not compatible with gene expression.

Cell Viability Within Tissue is Preserved After Application of Millisecond Electric Pulses

Membrane resealing occurs in about 20 minutes after application of millisecond pulses [32, 33]. Thus, when added 24h after the electric pulses, PI only enters into irreversibly permeabilized cells *i.e.* dead cells. Control tissues revealed only a few positive cells while “dead” tissue was highly fluorescent. Images showed no significant increase in the number of dead cells after applying the electric field up to 600 V/cm (Fig. 2A). A resazurin-based functional test involving viable cell metabolic activity (Fig. 2B), was used to quantify tissue viability and showed no statistical difference between control cells (0 V/cm) and cells pulsed up to 600 V/cm. A statistically non-significant decrease was observed at 800V/cm, as confirmed by PI-positive cells increase on fluorescent pictures. At 800V/cm, side views indicated that dead cells were situated on the top of the cell sheet (data not shown). Previous histological analyses showed that several thousand cells are embedded in multiple layers within the 50 μ m thick sheet [29]. Thus, even though some cells appeared positive to PI at 800V/cm, their number was not significant. Accordingly, millisecond electric pulses up to 800 V/cm did not significantly affect cell viability within the dermal tissue.

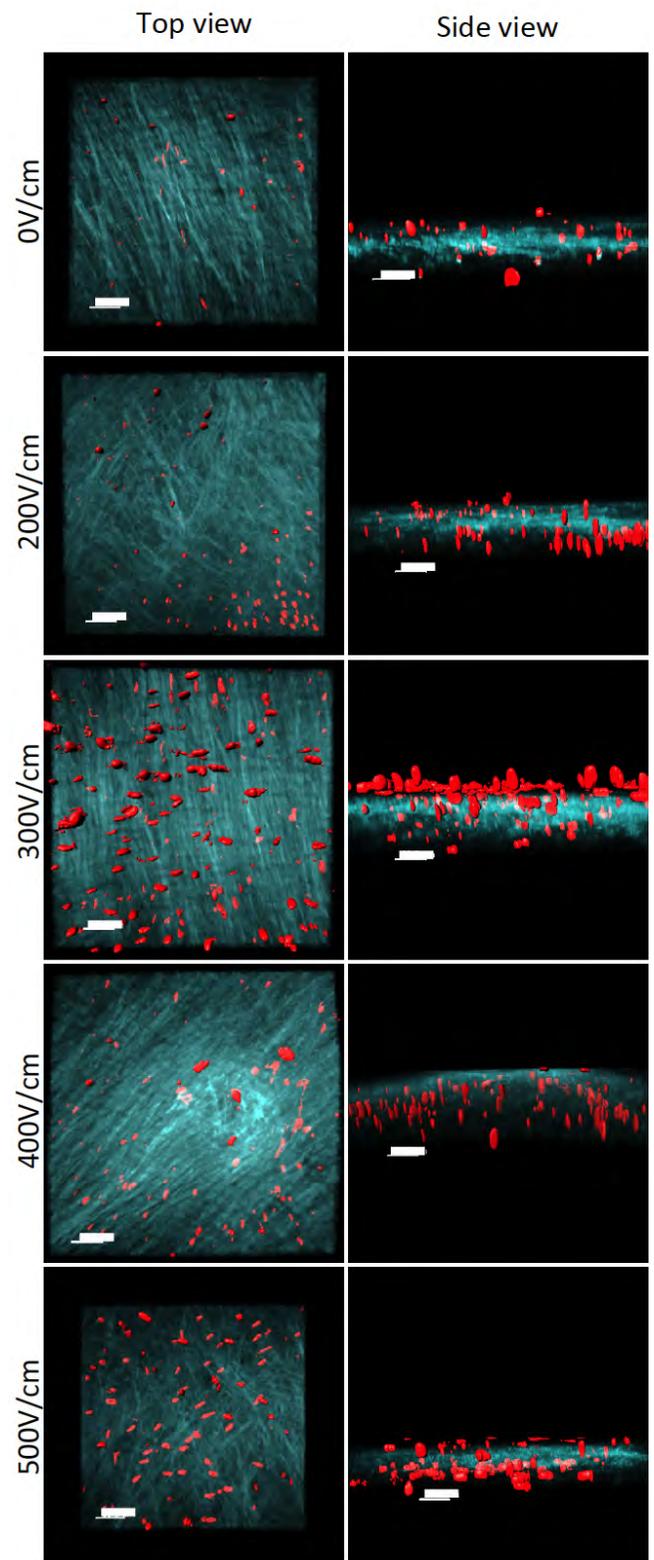


Fig. (1). 3D reconstructed human dermis electroporation with milliseconds electric pulses. Reconstructed tissues were electroporated in the presence of propidium iodide (red) with the following electrical parameters: 8 pulses of 5 ms duration at 1 Hz. Electric field intensity went from 0 V/cm to 800V/cm and was observed under a fluorescent biphoton microscope. Collagens detected by SHG are blue. IMARIS software gives top and side views of the cell sheet. Scale bar: 50 μ m.

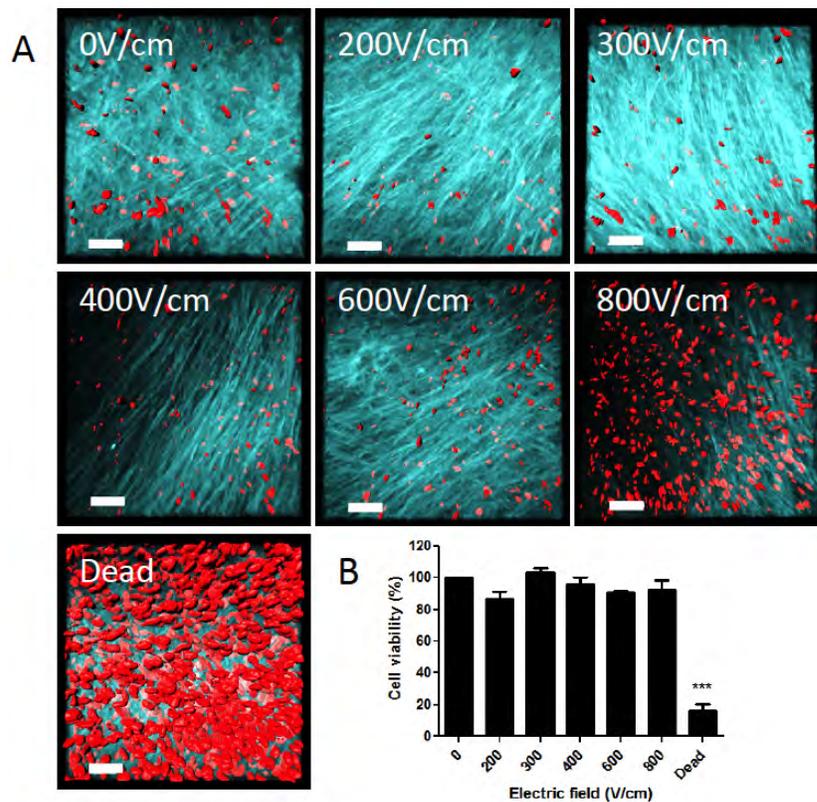


Fig. (2). 3D reconstructed human dermis viability 24h after application of milliseconds electric pulses. Reconstructed tissues were electropermeabilized (8 pulses lasting 5 ms at 1Hz frequency) with an electric field intensity of 0V/cm to 800V/cm. **A.** Cell viability within tissue observed 24h after electric pulses by propidium iodide (red) incorporation within irreversibly permeable/dead cells. **B.** Tissue viability quantified by PrestoBlue metabolic assay. Control condition, named “Dead”, was obtained by 3 freeze/thaw cycles on cell sheets. Collagens detected by SHG are blue. Scale bar: 50 μ m.

Gene Electrotransfer is Spatially and Temporally Limited Within the Tissue

GFP reporter gene plasmid was electrotransferred within 3D reconstructed dermal tissue (Fig. 3). No transfected cells were detected when no electric field was applied (0V/cm) or when no plasmid DNA was added (data not shown). GFP expression was observed 6h after gene electrotransfer and lasted up to 72h (data not shown). Electrotransfection was observed for electric field intensities above 200 V/cm, *i.e.* under electric field conditions leading to cell electropermeabilization. GFP-expressing cells increased with the electric field intensity. Cross-sectional views showed that only cells located at the top of the cell sheet were efficiently transfected (Fig. 3A), whatever the electric field intensity. This could be due to the fact that only the top of the sheet was in contact with the plasmids during application of the electric field. Quantification of GFP-positive area 24h and 48h after gene electrotransfer revealed that the most efficient electric field intensity was 800 V/cm, leading to a 8% rate of transfection (Fig. 3B). This percentage is quite low compared to *in vivo* studies achieving 30% efficiency delivery to the skin [25]. Further optimization of both electrodes geometry and placement could improve electric field distribution and increase plasmid mobility within our tissue model, leading to a better gene electrotransfer efficiency.

Reporter Gene Expression Depends On Plasmid Mobility Within the Tissue But Not On Cell Proliferation Status

A hypothesis to explain why transfected cells were solely located at the tissue surface is that only these cells are proliferative. Proliferative cells are usually more efficiently electrotransfected because, as previously reported [34], the disintegration of the nuclear membrane during mitosis helps the direct access of DNA plasmid to the nucleus, enhancing gene expression. In order to characterize cell proliferation within our 3D model, we aimed to visualize cells engaged in S-phase replication [35]. A nucleoside analog of thymidine was added to the culture medium. Proliferative cells were homogeneously distributed through the 3 dimensions within the reconstructed dermal tissue (Fig. 4A). This constant cell renewal cannot explain the localization of the transfected cells but could explain why transgene expression lasted for less than 72h.

We then aimed to determine if the accessibility of plasmid DNA to cells could explain why only cells in the upper part of the dermal tissue were transfected. To do so, cells were pulsed in the presence of a fluorescently labeled- plasmid DNA that allowed its 3D distribution within dermal tissue to be visualized (Fig. 4B). Under electrical parameters that induce efficient cell permeabilization and transfection (*i.e.* 800 V/cm), plasmid DNA was showed to interact with the cells. Interestingly, this interaction was limited to the cell

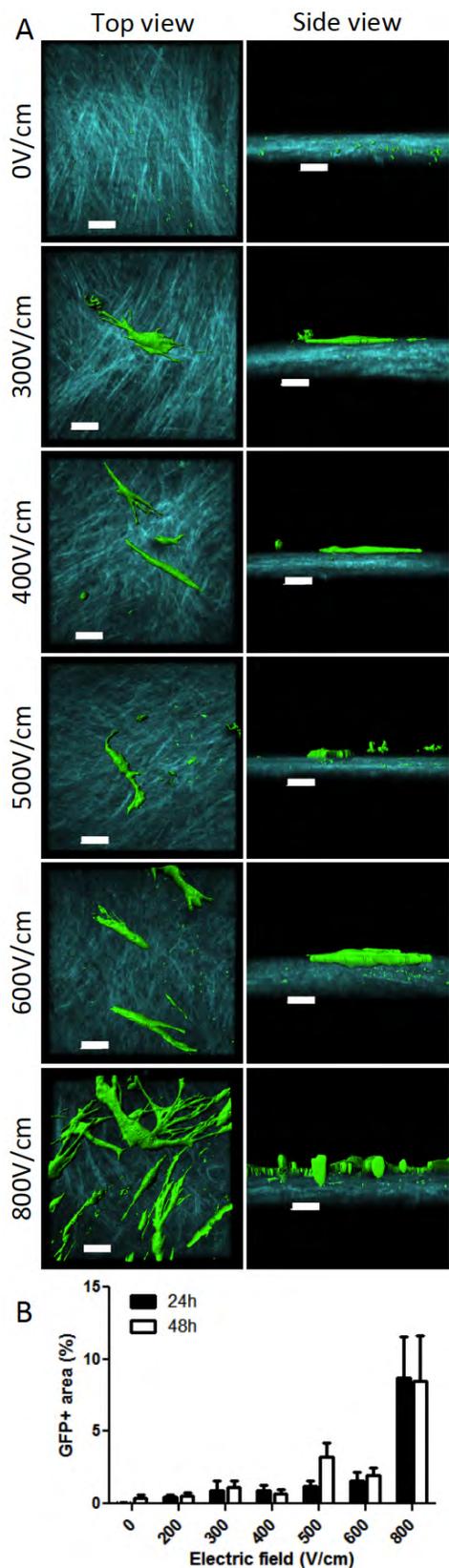


Fig. (3). Reporter gene electrotransfer within 3D reconstructed human dermis using milliseconds electric pulses. GFP-encoding plasmid (2Åg) was electrotransferred to reconstructed tissues. Electric parameters applied: 8 pulses of 5 ms duration at 1 Hz. Electric field intensity went from 0 V/cm to 800V/cm. **A.** Electrotransfer efficiency visualized within cell sheet under a fluorescent biphoton microscope, 24h after gene electrotransfer. **B.** GFP-positive area was quantified on the surface of the tissue using Image J software, 24h and 48h after electro-gene transfer. Cells efficiently electrotransfected are green. Collagens detected by SHG are blue. IMARIS software allows top and transversal visualization of the cell sheet. Scale bar: 50 Åm.

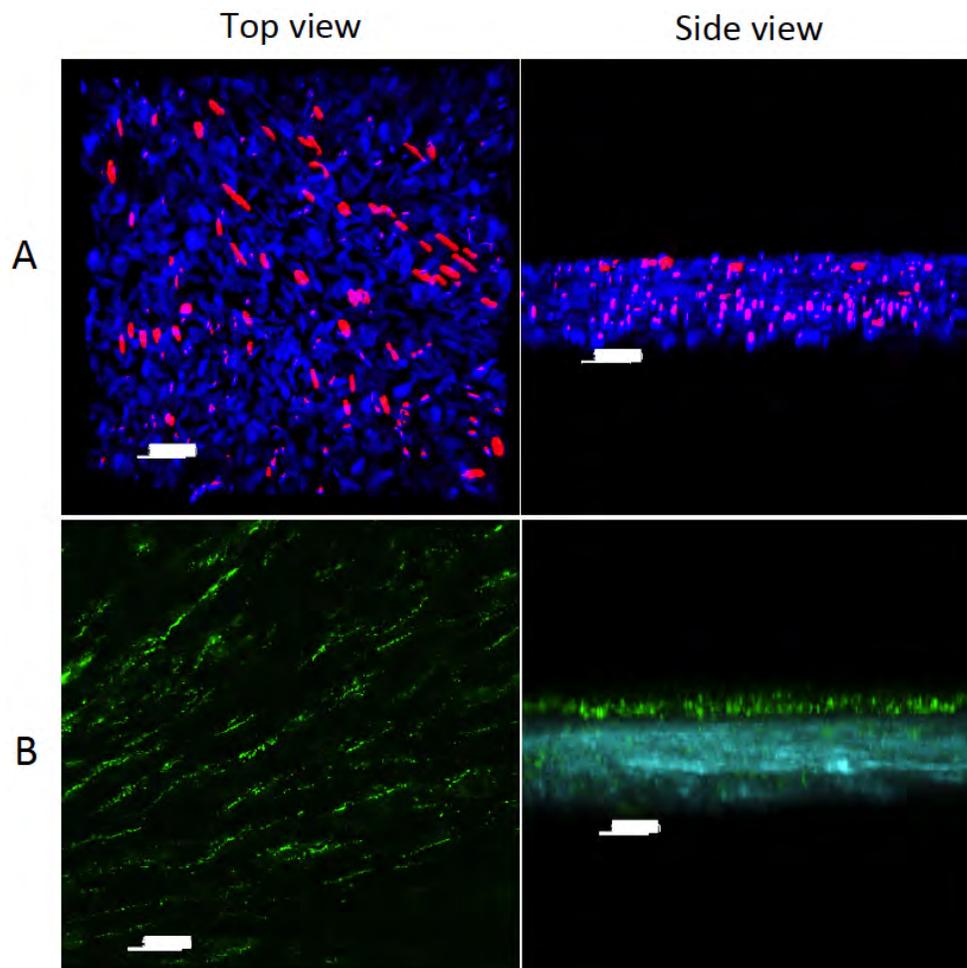


Fig. (4). Reconstructed tissue proliferative profile, and DNA plasmid localization within tissue right after gene electrotransfer. **A.** Proliferative cells (red) observed in top and side views in the reconstructed tissue. **B.** Fluorescently stained DNA-plasmid (green) localization on top and transversal views of the reconstructed tissue 1 minute after gene electrotransfer (8 pulses lasting 5 ms at 1Hz frequency, 800V/cm). Cell sheets were observed under fluorescent biphoton microscope. Collagens detected by SHG are blue. Scale bar: 50 Åm.

side facing the cathode as previously described on cells grown in monolayers and in suspension [30]. Thus, for the first time we were able to observe DNA-membrane interactions in a healthy tissue. Interestingly, by DNA spot patterns we were able to recognize fibroblast typical morphology. Indeed, these stromal cells are elongated cells growing oriented in parallel. Analysis of tissue cross-sectional views revealed that fluorescent plasmid DNA was confined to the tissue surface. It has been reported that DNA plasmid electrophoretic transport is inversely correlated with the amount of collagen in tumor tissue [36]. Thus, tumors containing only some proteoglycans and collagens were found to be more efficiently electrotransfected *in vivo* than solid tumors with a rich extracellular matrix [37, 38]. Collagen content modulates tumor tissue resistance to macromolecule diffusion by linking and stabilizing glycosaminoglycans [39]. Since the reconstructed human dermal tissue is highly rich in collagens [29], it seems that this observation is also correct for solid healthy tissue.

We are now optimizing the electrical parameters to improve gene electrotransfer efficiency in a healthy tissue context. Indeed, some authors previously showed that an asso-

ciation of high voltage with low voltage pulses enhanced gene expression in skin [7, 40-42]. Additionally, skin is a complex tissue composed of distinct cell types. Theoretically cell types with different morphological characteristics can be targeted and transfected by specific electrical parameters [32]. Thus, we plan to refine our skin tissue-engineered model by adding an epidermis compartment as previously described [27, 28] in order to study cell targeting. Finally, we would like to investigate the role of plasmid construction on gene electrotransfer efficiency in skin. Indeed, tissue-specific promoters lead to smaller transfection rates but specific cells can be better targeted [43, 44].

CONCLUSION

Reconstructed human dermal tissue appears to be a relevant tool to mimic and assess gene electrotransfer in human skin. Using this model, we will gain a better comprehension of the mechanisms involved in gene electrotransfer and its limits in tissues and propose strategies to improve its efficiency, while maintaining its safety, or to specifically target a particular cutaneous cell type.

CONFLICT OF INTEREST

Authors declare they have no competing financial interests. This work was supported by the Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS) (MPR), the Agence Nationale de la Recherche (ANR) (MPR and LG), Projet PIERGEN ANR-12-ASTR-0039, and Mayotte department (MM).

ACKNOWLEDGEMENTS

The Research was conducted in the scope of the EBAM European Associated Laboratory (LEA) and is a result of networking efforts within COST TD1104 action. Microscopy experiments were carried out at the Plateforme Genotoul Toulouse RIO Imaging. The authors would like to gratefully acknowledge Elisabeth Bellard (IPBS) for her technical assistance in imaging analysis and Peter Winterton, a native English scientist, for his careful proofreading of this manuscript.

REFERENCES

- [1] Gothelf A, Mir LM, Gehl J. Electrochemotherapy: results of cancer treatment using enhanced delivery of bleomycin by electroporation. *Cancer Treat Rev* 2003 Oct; 29(5): 371-87.
- [2] Rols MP. Gene transfer by electrical fields. *Curr Gene Ther* 2010 Aug; 10(4): 255.
- [3] Andre FM, Mir LM. Nucleic acids electrotransfer *in vivo*: mechanisms and practical aspects. *Curr Gene Ther* 2010 Aug; 10(4): 267-80.
- [4] Yarmush ML, Golberg A, Sersa G, *et al.* Electroporation-based technologies for medicine: principles, applications, and challenges. *Annu Rev Biomed Eng* 2014 Jul 11; 16: 295-320.
- [5] Mir LM, Bureau MF, Gehl J, *et al.* High-efficiency gene transfer into skeletal muscle mediated by electric pulses. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999 Apr 13; 96(8): 4262-7.
- [6] Sersa G, Teissie J, Cemazar M, *et al.* Electrochemotherapy of tumors as *in situ* vaccination boosted by immunogene electrotransfer. *Cancer Immunol Immunother* 2015 Oct; 64(10): 1315-27.
- [7] Vandermeulen G, Staes E, Vanderhaeghen ML, *et al.* Optimisation of intradermal DNA electrotransfer for immunisation. *J Control Release* 2007 Dec 4; 124(1-2): 81-7.
- [8] Vandermeulen G, Vanvarenberg K, De Beuckelaer A, *et al.* The site of administration influences both the type and the magnitude of the immune response induced by DNA vaccine electroporation. *Vaccine* 2015 Jun 22; 33(28): 3179-85.
- [9] Cemazar M, Jarm T, Sersa G. Cancer electrogene therapy with interleukin-12. *Curr Gene Ther* 2010 Aug; 10(4): 300-11.
- [10] Heller LC, Heller R. Electroporation gene therapy preclinical and clinical trials for melanoma. *Curr Gene Ther* 2010 Aug; 10(4): 312-7.
- [11] Escoffre JM, Rols MP. Electrochemotherapy: progress and prospects. *Curr Pharm Des* 2012; 18(23): 3406-15.
- [12] Daud AI, DeConti RC, Andrews S, *et al.* Phase I trial of interleukin-12 plasmid electroporation in patients with metastatic melanoma. *J Clin Oncol* 2008 Dec 20; 26(36): 5896-903.
- [13] Rols MP, Delteil C, Golzio M, *et al.* *In vivo* electrically mediated protein and gene transfer in murine melanoma. *Nature Biotechnology* 1998 Feb; 16(2): 168-71.
- [14] Neumann E, Schaefer-Ridder M, Wang Y, *et al.* Gene transfer into mouse lymphoma cells by electroporation in high electric fields. *EMBO J* 1982; 1(7): 841-5.
- [15] Escoffre JM, Portet T, Wasungu L, *et al.* What is (still not) known of the mechanism by which electroporation mediates gene transfer and expression in cells and tissues. *Mol Biotechnol* 2009 Mar; 41(3): 286-95.
- [16] Rochard A, Scherman D, Bigey P. Genetic immunization with plasmid DNA mediated by electrotransfer. *Hum Gene Ther* 2011 Jul; 22(7): 789-98.
- [17] Mir LM, Bureau MF, Rangara R, *et al.* Long-term, high level *in vivo* gene expression after electric pulse-mediated gene transfer into skeletal muscle. *C R Acad Sci III* 1998 Nov; 321(11): 893-9.
- [18] Muramatsu T, Arakawa S, Fukazawa K, *et al.* *In vivo* gene electroporation in skeletal muscle with special reference to the duration of gene expression. *Int J Mol Med* 2001 Jan; 7(1): 37-42.
- [19] Gothelf A, Gehl J. Gene electrotransfer to skin; review of existing literature and clinical perspectives. *Curr Gene Ther* 2010 Aug; 10(4): 287-99.
- [20] Shirley SA, Lundberg CG, Li F, *et al.* Controlled gene delivery can enhance therapeutic outcome for cancer immune therapy for melanoma. *Curr Gene Ther* 2015; 15(1): 32-43.
- [21] Cupp CL, Bloom DC. Gene therapy, electroporation, and the future of wound-healing therapies. *Facial Plast Surg* 2002 Feb; 18(1): 53-7.
- [22] Ferguson M, Byrnes C, Sun L, *et al.* Wound healing enhancement: electroporation to address a classic problem of military medicine. *World J Surg* 2005; 29 Suppl 1: S55-9.
- [23] Gothelf A, Gehl J. What you always needed to know about electroporation based DNA vaccines. *Hum Vaccin Immunother* 2012 Nov 1; 8(11): 1694-702.
- [24] Donate A, Heller R. Assessment of delivery parameters with the multi-electrode array for development of a DNA vaccine against *Bacillus anthracis*. *Bioelectrochemistry* 2013 Dec; 94: 1-6.
- [25] Heller LC, Jaroszeski MJ, Coppola D, *et al.* Optimization of cutaneous electrically mediated plasmid DNA delivery using novel electrode. *Gene Ther* 2007 Feb; 14(3): 275-80.
- [26] Athanasiou KA, Eswaramoorthy R, Hadidi P, *et al.* Self-organization and the self-assembling process in tissue engineering. *Annu Rev Biomed Eng* 2013; 15: 115-36.
- [27] Gibot L, Galbraith T, Huot J, *et al.* A preexisting microvascular network benefits *in vivo* revascularization of a microvascularized tissue-engineered skin substitute. *Tissue Eng Part A* 2010 Oct; 16(10): 3199-206.
- [28] Gibot L, Galbraith T, Huot J, *et al.* Development of a tridimensional microvascularized human skin substitute to study melanoma biology. *Clin Exp Metastasis* 2013 Jan; 30(1): 83-90.
- [29] Madi M, Rols MP, Gibot L. Efficient *In Vitro* Electroporabilization of Reconstructed Human Dermal Tissue. *J Membr Biol* 2015 Mar 19.
- [30] Golzio M, Teissie J, Rols MP. Direct visualization at the single-cell level of electrically mediated gene delivery. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002 Feb 5; 99(3): 1292-7.
- [31] Deipolyi AR, Golberg A, Yarmush ML, *et al.* Irreversible electroporation: evolution of a laboratory technique in interventional oncology. *Diagn Interv Radiol* 2014 Mar-Apr; 20(2): 147-54.
- [32] Rols MP, Teissie J. Electroporabilization of mammalian cells. Quantitative analysis of the phenomenon. *Biophys J* 1990 Nov; 58(5): 1089-98.
- [33] Saulis G, Saule R. Size of the pores created by an electric pulse: microsecond vs millisecond pulses. *Biochim Biophys Acta* 2012 Dec; 1818(12): 3032-9.
- [34] Golzio M, Teissie J, Rols MP. Cell synchronization effect on mammalian cell permeabilization and gene delivery by electric field. *Biochim Biophys Acta* 2002 Jun 13; 1563(1-2): 23-8.
- [35] Laurent J, Frongia C, Cazales M, *et al.* Multicellular tumor spheroid models to explore cell cycle checkpoints in 3D. *BMC Cancer* 2013; 13: 73.
- [36] Zaharoff DA, Barr RC, Li CY, *et al.* Electromobility of plasmid DNA in tumor tissues during electric field-mediated gene delivery. *Gene Ther* 2002 Oct; 9(19): 1286-90.
- [37] Cemazar M, Sersa G, Wilson J, *et al.* Effective gene transfer to solid tumors using different nonviral gene delivery techniques: electroporation, liposomes, and integrin-targeted vector. *Cancer Gene Ther* 2002 Apr; 9(4): 399-406.
- [38] Mesojednik S, Pavlin D, Sersa G, *et al.* The effect of the histological properties of tumors on transfection efficiency of electrically assisted gene delivery to solid tumors in mice. *Gene Ther* 2007 Sep; 14(17): 1261-9.
- [39] Netti PA, Berk DA, Swartz MA, *et al.* Role of extracellular matrix assembly in interstitial transport in solid tumors. *Cancer Res* 2000 May 1; 60(9): 2497-503.
- [40] Andre FM, Gehl J, Sersa G, *et al.* Efficiency of high- and low-voltage pulse combinations for gene electrotransfer in muscle, liver, tumor, and skin. *Hum Gene Ther* 2008 Nov; 19(11): 1261-71.

- [41] Gothelf A, Eriksen J, Hojman P, *et al.* Duration and level of transgene expression after gene electrotransfer to skin in mice. *Gene Ther* 2010 Jul; 17(7): 839-45.
- [42] Pavselj N, Preat V. DNA electrotransfer into the skin using a combination of one high- and one low-voltage pulse. *J Control Release* 2005 Sep 2; 106(3): 407-15.
- [43] Kos S, Tesic N, Kamensek U, *et al.* Improved Specificity of Gene Electrotransfer to Skin Using pDNA Under the Control of Collagen Tissue-Specific Promoter. *J Membr Biol* 2015 Oct; 248(5): 919-28.
- [44] Vandermeulen G, Richiardi H, Escriou V, *et al.* Skin-specific promoters for genetic immunisation by DNA electroporation. *Vaccine* 2009 Jul 9; 27(32): 4272-7.

Received: ??????????

Revised: ??????????

Accepted: ??????????

c. Conclusion

En appliquant une gamme d'impulsions électriques de cinq millisecondes et d'intensité croissante allant jusqu'à 800 V/cm, les cellules du feuillet dermique sont efficacement électroperméabilisées, sans affecter de manière significative la viabilité cellulaire. Les résultats montrent que seules les cellules situées en surface du tissu, en contact direct avec le plasmide, expriment efficacement le plasmide GFP avec un taux de 8% à 800 V/cm. La caractérisation de la prolifération cellulaire du substitut montre que les cellules prolifératives sont réparties de manière homogène à travers le feuillet dermique. Donc l'état de prolifération ne peut pas expliquer la localisation à la surface du feuillet des cellules efficacement transfectées avec la GFP. Les expériences suivantes ont cherché à déterminer si l'ADN plasmidique était accessible à toutes les cellules. Pour ce faire, les impulsions électriques ont été appliquées en présence d'un plasmide marqué par la sonde fluorescente TOTO-1 pour visualiser sa distribution dans le substitut dermique. L'analyse au microscope multiphotonique du tissu a révélé que l'ADN plasmidique fluorescent est confiné à la surface du tissu, ce qui signifie que seules les cellules à la surface ont été en contact avec le plasmide. En effet les complexes ADN/membrane plasmique formés pendant l'application des pulses électriques ont pu être observés uniquement sur la partie du substitut dermique en contact avec le plasmide. Soulignons que sans application des impulsions électriques il n'y a ni complexe ni expression du plasmide. Ces résultats correspondent à ceux retrouvés dans la littérature (Golzio, Teissie et al. 2002) et à ceux que nous avons observés sur une monocouche de fibroblastes dermiques (Figure 40). Le succès de l'électrotransfection dépend donc de la mobilité des plasmides dans le tissu riche en matrice extracellulaire.

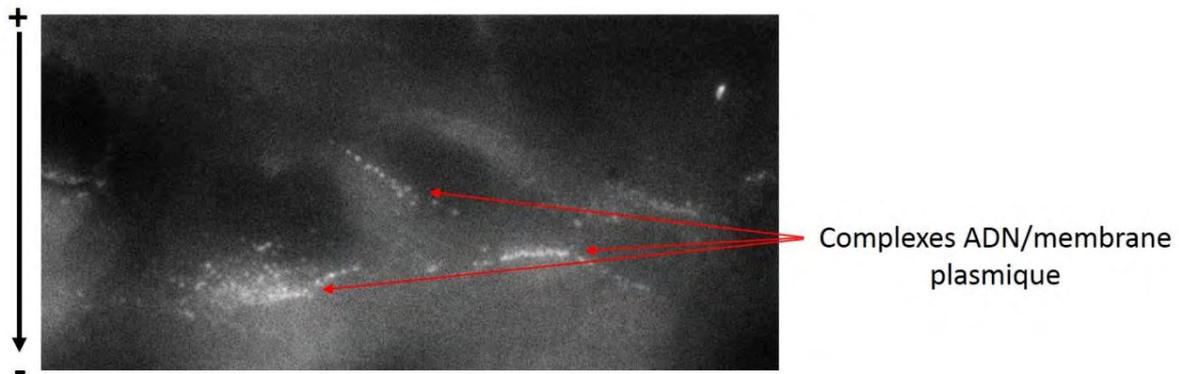


Figure 40: Electrotransfert d'un plasmide rapporteur marqué de façon fluorescente avec l'intercalant de l'ADN TOTO-1 sur une monocouche de fibroblastes dermiques ; paramètres électriques : 500 V/cm ; 1Hz ; 5 ms ; x10

L'expression du plasmide GFP localisé uniquement à la surface des feuillets pourrait s'expliquer par l'abondance en collagène de ce tissu (Madi, Rols et al. 2015). En effet, la biodistribution du plasmide dans les tumeurs *in vivo* est limitée à cause de la faible mobilité du plasmide dans la matrice extracellulaire. Il a été démontré que le transport par électrophorèse du plasmide ADN est inversement corrélé à la quantité de collagène dans le tissu tumoral (Zaharoff, Barr et al. 2002). En outre, les tumeurs ayant une faible proportion de protéoglycanes et collagènes sont plus efficacement électrotransfectées *in vivo* que les tumeurs riches en matrice extracellulaire (Mesojednik, Pavlin et al. 2007; Cemazar, Golzio et al. 2012). Cette étude *in vitro* nous a permis de démontrer que le substitut dermique humain est un outil pertinent pour évaluer l'électrotransfert d'ADN dans le derme humain riche en matrice extracellulaire.

Pour augmenter l'efficacité de transfection dans le tissu cutané, des améliorations des conditions d'expérimentations existent :

Une optimisation de la géométrie et de la mise en place des électrodes pourrait améliorer la distribution du champ électrique et ainsi augmenter la mobilité des plasmides dans le modèle tissulaire. Des études antérieures ont montré que la délivrance est plus efficace lorsque le champ est appliqué dans plus d'une direction. Cette approche perméabilise plus de zones de la membrane plasmique ainsi que plus de cellules, ce qui se traduit par une meilleure distribution du plasmide et par une expression accrue (Heller, Jaroszeski et al. 2007).

D'autres auteurs ont aussi montré qu'une association d'impulsions de haut et faible voltage pouvait améliorer l'expression des gènes dans la peau (Pavšelj and Prémat 2005; Andre, Gehl et al. 2008). Cette approche est nommée HV-LV pour High Voltage-Low Voltage. Le premier pulse de forte intensité perméabilise efficacement toutes les cellules situées entre les électrodes alors que les pulses suivants en low voltages visent principalement à assurer une composante électrophorétique à la distribution du plasmide.

L'utilisation d'enzymes pour digérer spécifiquement certains composants de la matrice extracellulaire permet d'augmenter l'efficacité de l'électrotransfert de gène dans les tumeurs murines (Cemazar, Golzio et al. 2012).

Une gamme de voltage avec des durées croissantes d'impulsions pourrait permettre d'évaluer et de quantifier si le taux de transfection augmente significativement. Cependant une modification des paramètres classiquement utilisés pourrait avoir des conséquences directes sur la matrice extracellulaire. Avant toute chose, l'étude des conséquences des paramètres électriques classiquement utilisés (ECT, EGT, IRE) sur l'organisation de la matrice extracellulaire est indispensable.

VI. EFFETS DIRECTS ET INDIRECTS DU CHAMP ELECTRIQUE PULSE SUR LES COLLAGENES FIBRILLAIRES

Les expériences des chapitres précédents ont permis de démontrer que le substitut dermique humain est un modèle riche en matrice extracellulaire endogène. Dans ce modèle de feuillet dermique, les fibroblastes sont efficacement électroperméabilisés avec des impulsions de l'ordre des millisecondes, indépendamment de leur localisation dans le tissu (Madi, Rols et al. 2015). Les résultats de l'électrotransfert de gène montrent que les cellules exprimant le gène rapporteur se limitent à la celles de la surface du feuillet, en contact avec le plasmide d'intérêt (Madi, Rols et al. 2016).

Il est intéressant de constater que peu d'informations sont disponibles sur les effets des impulsions électriques sur la matrice extracellulaire en elle-même. Il est donc nécessaire d'étudier les effets des impulsions électriques sur la matrice extracellulaire et plus particulièrement sur les collagènes. À terme, une meilleure compréhension de l'effet des champs électriques pulsés sur la matrice extracellulaire dans un contexte tissulaire humain sain pourra contribuer à l'amélioration de l'efficacité de l'électrotransfert de gène.

Comme vu dans l'introduction, le champ électrique pulsé provoque la perméabilisation des cellules via des mécanismes qui ne sont pas encore complètement connus, néanmoins il est admis que la perméabilisation de la membrane est induite lorsque le nouveau potentiel transmembranaire induit $\Delta\Psi_i$ atteint la valeur seuil de perméabilisation de la membrane plasmique. Sachant que les cellules sont reliées à la matrice extracellulaire notamment par le biais de protéines de surface et qu'elles communiquent avec leur environnement, nous pouvons supposer que les effets des impulsions sur la cellule pourraient aussi entraîner des modifications de l'organisation de la matrice extracellulaire. Dans ce chapitre les expériences vont comparer les effets induits par l'application des impulsions électriques sur des substituts dermiques vivants et décellularisés, afin de pouvoir dissocier les effets directs des effets indirects des impulsions électriques sur la matrice extracellulaire.

La décellularisation est une technique utilisée en ingénierie tissulaire pour produire des substituts tissulaires moins immunogènes qui vont servir de supports pour la recolonisation cellulaire afin de traiter des défaillances d'organes (Gilbert, Sellaro et al. 2006; Gilbert 2012; Gupta, Dinda et al. 2013; Patnaik, Wang et al. 2014). Cette technique a pour but d'éliminer les composants cellulaires du tissu tout en préservant les structures organisées de la matrice extracellulaire telles que le réseau de collagènes fibrillaires, le réseau d'élastine, les glycosaminoglycanes et la fibronectine (Gilbert, Sellaro et al. 2006; Gilbert 2012). En éliminant la composante cellulaire dans notre modèle, cette technique va permettre de s'affranchir des effets inhérents aux modifications des cellules électroperméabilisées et ainsi de dissocier les effets directs, des effets indirects du champ électrique pulsé sur la matrice extracellulaire. Les méthodes de décellularisation efficaces comprennent différentes approches chimiques, enzymatiques ou physiques (Gilbert, Sellaro et al. 2006; Crapo, Gilbert et al. 2011; Gilbert 2012; Patnaik, Wang et al. 2014). Le plus souvent ces méthodes de décellularisation sont associées pour obtenir une meilleure élimination des débris cellulaires afin d'éviter toute réaction du système immunitaire lors d'une greffe. Pour notre étude, le système immunitaire n'entre pas en jeu dans la problématique, donc des méthodes simples mais validées ont été sélectionnées afin de conserver la structure et l'architecture de la matrice extracellulaire des substituts dermiques. Pour cela, deux méthodes différentes ont été choisies : la lyse cellulaire par choc osmotique et la formation de cristaux intracellulaires par des cycles successifs de congélation/décongélation. Pour le choc osmotique, les substituts dermiques sont placés dans de l'eau déionisée, un milieu hypotonique. L'entrée d'eau dans les cellules due au gradient de pression osmotique va conduire à la lyse membranaire par choc osmotique. Les cycles de congélation/décongélation vont briser les membranes cellulaires en raison d'une série d'effets de cristallisation/fusion de l'eau et d'une expansion du volume cellulaire.

Dans un premier temps les substituts dermiques décellularisés et plus particulièrement leur matrice extracellulaire vont être caractérisés avec les techniques vues dans les précédents chapitres. Pour étudier de façon dynamique les effets des impulsions électriques sur le réseau de collagènes fibrillaires la technique non invasive de génération de seconde harmonique va être largement utilisée dans cette étude sur des substituts dermiques frais ou décellularisés. Dans ce contexte, la microscopie SHG apparaît comme une technique particulièrement appropriée, notamment grâce à sa grande spécificité pour le collagène fibrillaire et le caractère quantitatif

du signal. L'analyse de la génération de seconde harmonique est effectuée dans chacune des conditions avec les logiciels d'analyse d'images Imaris et Image J. Les paramètres d'impulsions électriques utilisés en électrochimiothérapie (ECT), électrogenothérapie (EGT) et électroporation irréversible (IRE) décrits plus loin dans le tableau 6 vont être appliqués sur les modèles vivants et/ou décellularisés.

1. Caractérisation des feuillets dermiques décellularisés

Dans un premier temps il est indispensable de vérifier que les méthodes de décellularisation sélectionnées sont efficaces : c'est-à-dire non seulement qu'elles éliminent les cellules, mais aussi qu'elles préservent l'intégrité de l'architecture de la matrice extracellulaire.

a. Viabilité

Pour déterminer la viabilité cellulaire, la quantification de l'activité mitochondriale grâce au réactif PrestoBlue a été réalisée sur les feuillets dermiques vivants et décellularisés. Les deux méthodes de décellularisation permettent d'obtenir des substituts dermiques efficacement décellularisés, en effet la viabilité cellulaire des feuillets décellularisés est quasi nulle comme le montre la figure 41.

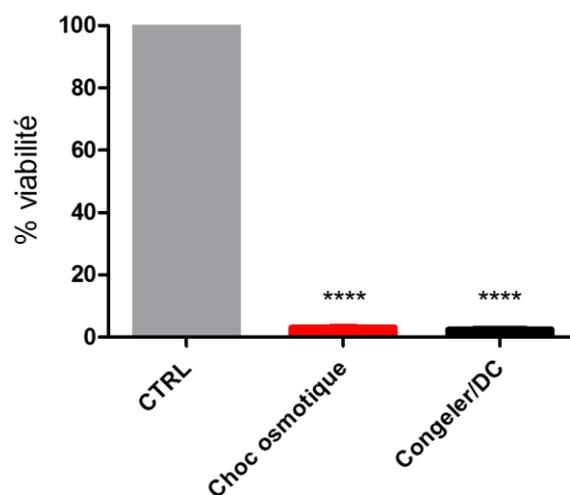


Figure 41: Mesure de la viabilité par PrestoBlue de feuillets dermiques vivants (CTRL) et décellularisés par choc osmotique ou par cycles de congélation/décongélation (Congeler/DC) **** : $p < 0,0001$; $N = 3$

Une coloration histologique au trichrome de Masson a été réalisée pour confirmer la décellularisation de la totalité du feuillet (Figure 42). L'absence de coloration rouge au sein des feuillets décellularisés permet de confirmer la disparition des cellules et la présence limitée de résidus cellulaires, ce qui indique que le modèle est efficacement décellularisé. L'architecture globale du tissu est conservée, même après décellularisation.

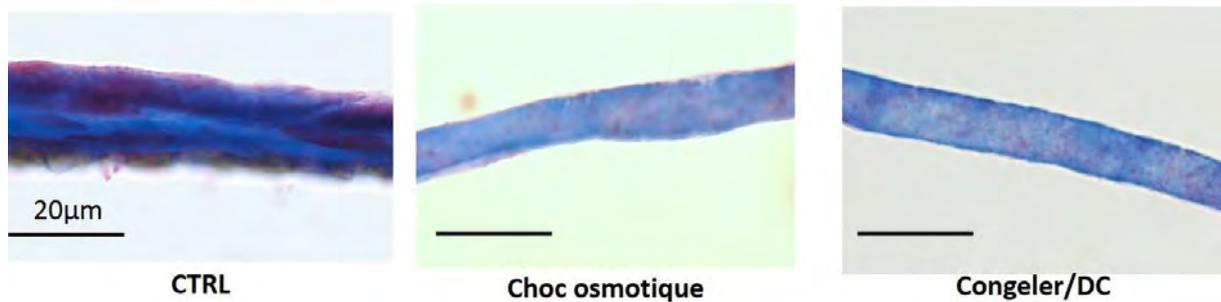


Figure 42: Coloration histologique au trichrome de Masson de feuillets dermiques vivants (CTRL) et décellularisés par choc osmotique ou par cycles de congélation/décongélation (Congeler/DC). Les cellules sont marquées en rouge et les collagènes en bleu.

b. Organisation de la matrice extracellulaire de l'échelle du micromètre

La comparaison des conditions contrôles et décellularisées au microscope électronique à balayage confirme l'absence des cellules à la surface des tissus décellularisés (Figure 43). La morphologie typique des fibroblastes, allongée et bipolaire, n'est plus observée dans les deux modèles décellularisés bien que des résidus cellulaires soient présents. La matrice extracellulaire a conservé son aspect enchevêtré et cohésif même après application des deux méthodes de décellularisation. L'organisation de la matrice extracellulaire ne semble pas être altérée par la décellularisation.

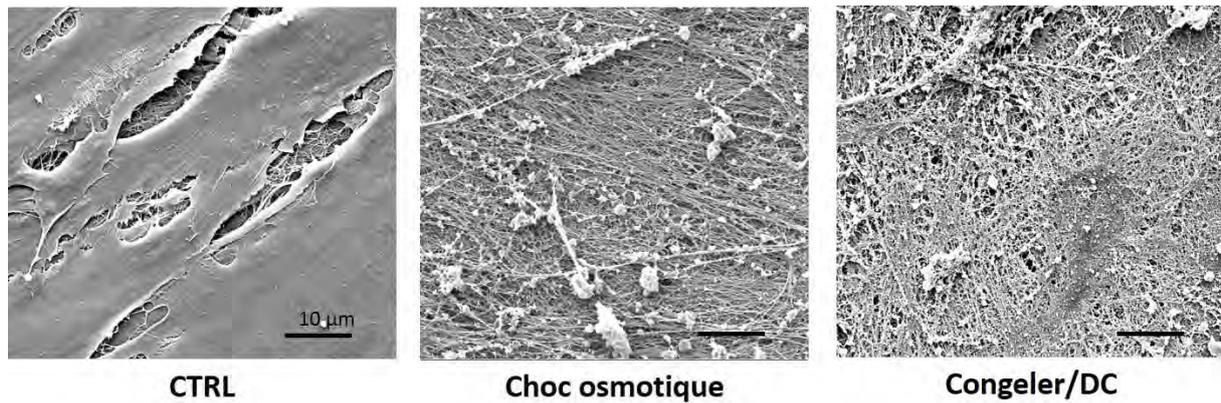


Figure 43: Caractérisation par microscopie électronique à balayage de feuillets dermiques vivants (CTRL) et décellularisés par choc osmotique ou par cycles de congélation/décongélation (Congeler/DC)

Afin de vérifier qu'il n'y pas eu d'altération de la structure des collagènes fibrillaires, la capacité de générer de la seconde harmonique est évaluée au microscope multiphotonique sur des tissus entiers. Dans les différentes conditions, la SHG est riche et abondante ce qui indique que le réseau de collagènes fibrillaires n'a pas été altéré (Figure 44 A). L'organisation du collagène fibrillaire dans les feuillets décellularisés est la même que celle observée dans les feuillets contrôles. Il est intéressant de noter que les tissus décellularisés présentent une SHG occupant un volume moins important que les feuillets vivants tout particulièrement ceux traités par la méthode de congélation/décongélation (Figure 44 B). Cette diminution peut s'expliquer par un léger affaissement dû à l'espace libéré par les cellules, d'autant plus que dans les images de colorations au trichrome de Masson une diminution de l'épaisseur des substituts dermiques est constatée.

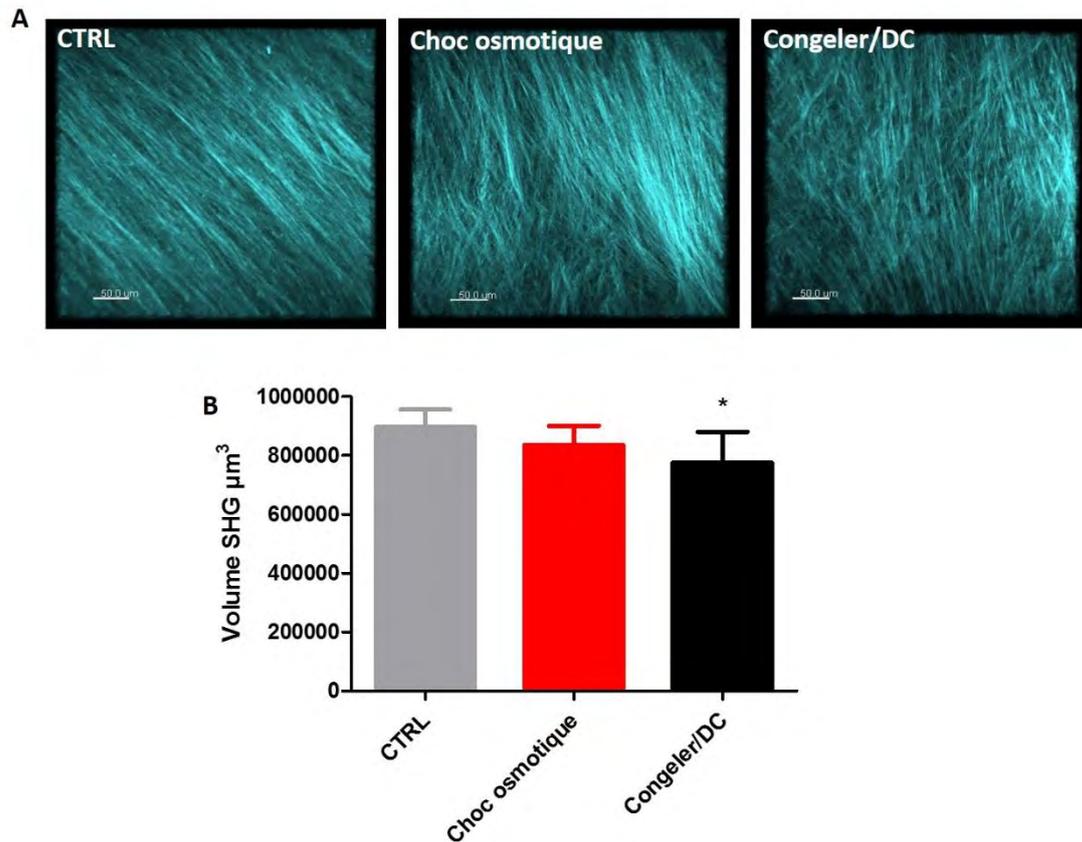


Figure 44: Analyse de la SHG de feuillets dermiques vivants (CTRL) et décellularisés par choc osmotique ou par cycles de congélation/décongélation (Congeler/DC). A) Collagènes fibrillaires observés par génération de seconde harmonique au microscope multiphotonique; B) Volume occupé par la seconde harmonique par μm^3 de tissu, estimé avec le logiciel de traitement d'image Imaris. * : $p < 0,01$; $N = 18$

L'analyse des feuillets décellularisés à travers toutes ces techniques indique donc que les feuillets sont efficacement décellularisés et qu'il n'y a pas de différence notable visible entre les feuillets décellularisés et les feuillets vivants en terme de matrice extracellulaire. En effet la matrice extracellulaire est toujours cohésive et la structure organisée du collagène fibrillaire est conservée vu sa capacité à générer de la seconde harmonique même après décellularisation.

2. Application d'impulsions électriques sur les feuillets vivants et décellularisés

Dans cette partie de l'étude, la technique de microscopie multiphotonique utilisant la SHG est majoritairement utilisée afin de pouvoir observer et analyser les feuillets dermiques avant les impulsions électriques et immédiatement après leur application. L'utilisation d'électrodes adaptées à la plateforme du microscope permet de ne pas déplacer l'échantillon et ainsi d'observer les modifications potentielles sur la même zone avant et après pulses.

Les paramètres de champs électriques appliqués ont été sélectionnés en corrélation avec les applications *in vivo*. Ces paramètres en électrochimiothérapie (ECT), électrogénothérapie (EGT) et électroperméabilisation irréversible (IRE) sont récapitulés dans le tableau 6. Pour entrainer la mort des cellules en IRE, un champ électrique plus intense est appliqué à une fréquence plus brève et avec un grand nombre d'impulsions (Al-Sakere, Andre et al. 2007). Les images 3D obtenues au microscope multiphotonique sont analysées à l'aide des logiciels IMARIS et Image J qui vont permettre la mesure de l'épaisseur, de l'aire et de l'intensité de la SHG.

Paramètres	Intensité	Fréquence	Durée de l'impulsion	Nombre d'impulsions
ECT	1000 V/cm	1 Hz	100 µs	8
EGT	800 V/cm	1 Hz	5 ms	10
IRE	2000 V/cm	0,3 Hz	100 µs	80

Tableau 6: Récapitulatif des paramètres électriques appliqués en ECT, EGT et IRE

a. Analyse de l'épaisseur, de l'aire et de l'intensité de SHG

L'analyse de l'épaisseur et de l'aire de la SHG des feuillets dermiques avant et après application des différents paramètres d'impulsions électriques (ECT ou EGT ou IRE) ne présente aucune différence statistiquement significative (Figure 45). L'épaisseur du signal de seconde harmonique permet de déterminer si les impulsions électriques induisent un écartement du collagène fibrillaire en z. L'aire du signal de seconde harmonique indique si la surface occupée par le collagène est modifiée après les impulsions électriques.

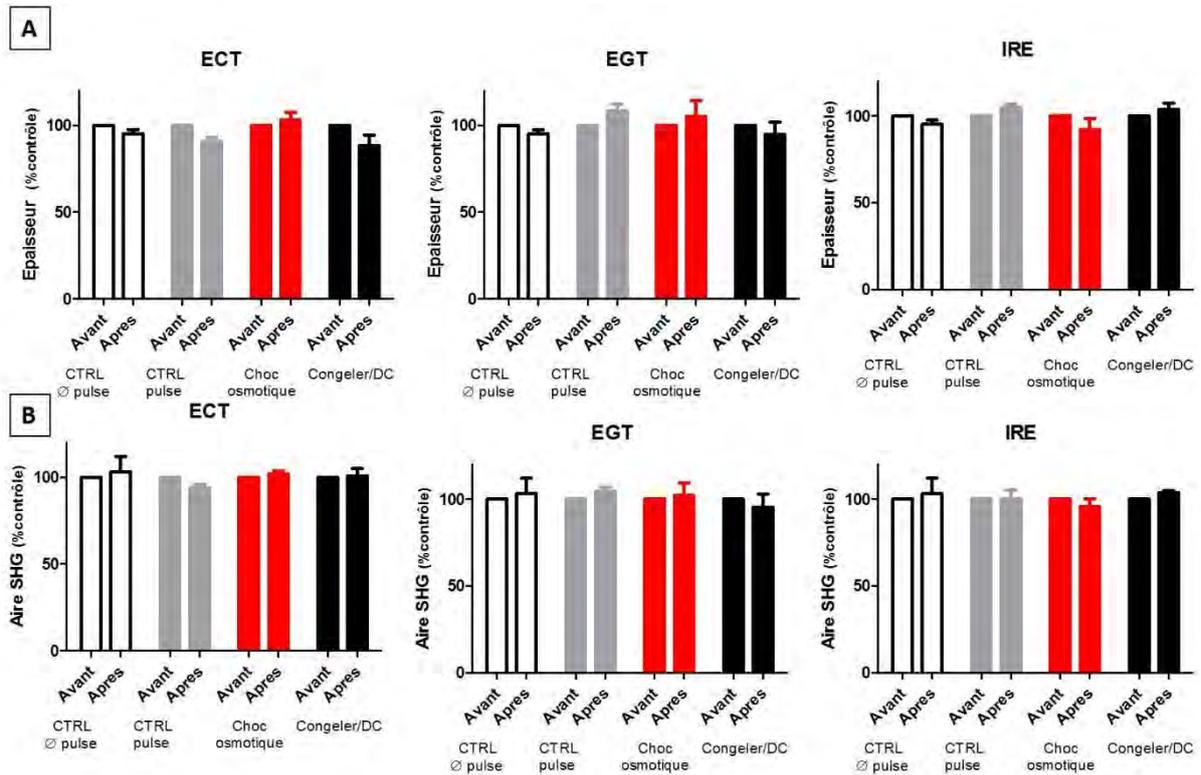


Figure 45: Analyse de l'épaisseur (panel A) et de l'aire (panel B) de la seconde harmonique des substituts dermiques contrôles et décellularisés ; Traitement : ECT (1000 V/cm, 1Hz, 100 μ s, 8 impulsions); EGT (800 V/cm, 1Hz, 5 ms, 10 impulsions); IRE (2000 V/cm, 0,3 Hz, 100 μ s, 80 impulsions) (N=6)

De même aucune différence d'intensité de la SHG n'est à noter lorsque des impulsions électriques en ECT ou en EGT sont appliquées sur les feuillets contrôles ou les feuillets décellularisés (Figure 46 A et B). Cependant une diminution statistiquement significative de l'intensité de SHG (de l'ordre de 10%) est observée sur les feuillets vivants électroperméabilisés avec les paramètres IRE, ce qui indique que le traitement avec le champ électrique a induit une altération de l'organisation du collagène fibrillaire (Figure 46 C). La diminution observée dénote une altération de l'organisation au sein des fibrilles de collagène.

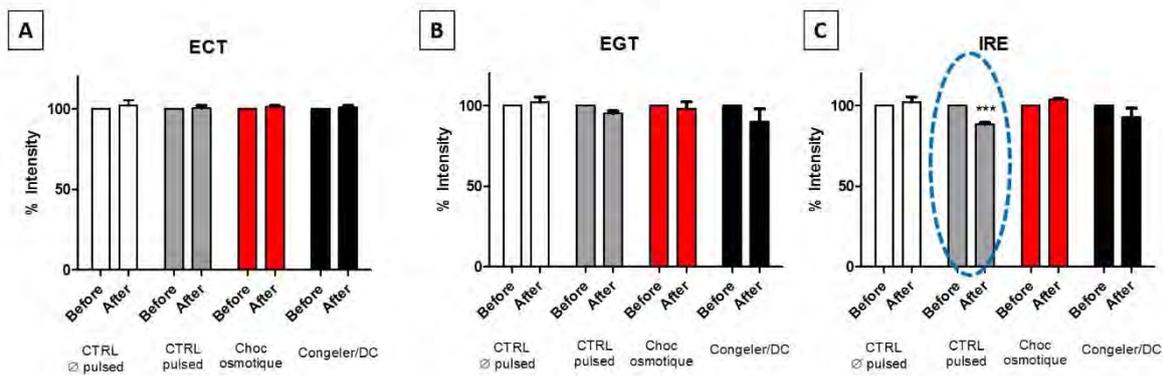


Figure 46: Analyse de l'intensité de seconde harmonique des substituts dermiques ; Traitement : A) ECT (1000 V/cm, 1Hz, 100 μ s, 8 impulsions); B) EGT (800 V/cm, 1Hz, 5 ms, 10 impulsions); C) IRE (2000 V/cm, 0,3 Hz, 100 μ s, 80 impulsions) (N = 6-9) ; *** : $p < 0,001$

b. L'intensité de SHG est altérée durablement après IRE

Pour aller plus loin des expériences complémentaires en IRE ont été effectuées afin de déterminer si ces modifications du signal de SHG sont transitoires ou permanentes. Pour cela chaque feuillet est observé au microscope pendant 45 à 60 min puis l'intensité de la SHG est mesurée sur les images 3D obtenues. Les résultats confirment qu'il n'y a pas de modification de l'intensité de la SHG dans les feuillets décellularisés après application des paramètres d'impulsions IRE. L'allure de la courbe des feuillets vivants contrôles pulsés indique bien une diminution significative et durable de l'intensité de SHG après applications des impulsions (Figure 47). Cette diminution se maintient voire s'amplifie au moins jusqu'à 60 minutes après application de l'IRE. Des travaux sont en cours pour suivre cette altération dans le temps sur plusieurs heures et les résultats préliminaires montrent que l'altération est toujours présente 3h après les impulsions.

Les résultats indiquent que seuls les feuillets contenant des cellules vivantes voient leur matrice extracellulaire affectées par l'application des paramètres de champ électriques utilisés en IRE.

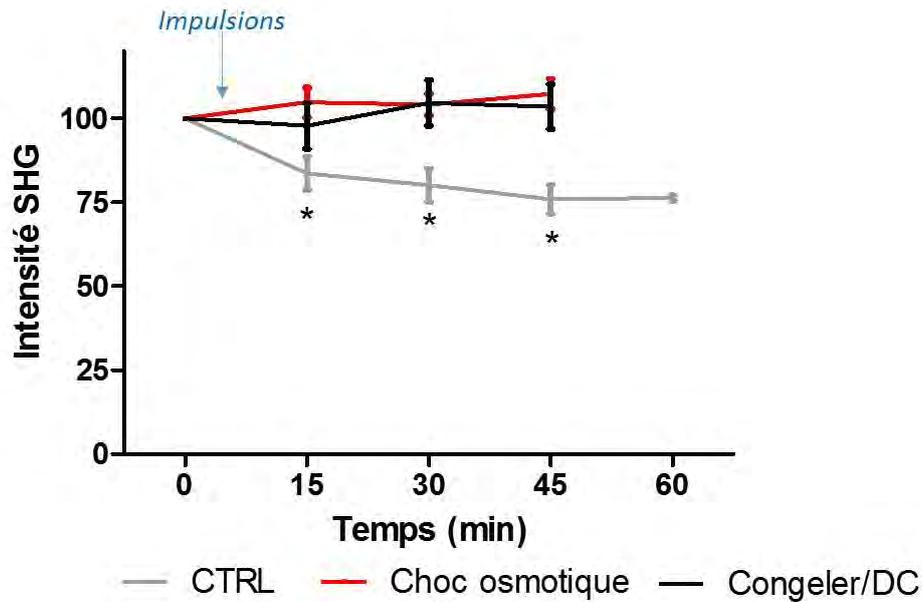


Figure 47: Suivi dans le temps de l'intensité de la seconde harmonique de feuillets dermiques vivants (CTRL (Gris)) et décellularisés par choc osmotique (rouge) ou par cycles de congélation/décongélation (Congeler/DC (noir)). Les stacks 3D sont pris toutes les 15 minutes après applications des impulsions IRE (N=6).

c. IRE et incrément thermique

Pour expliquer cette altération de l'intensité de SHG plusieurs hypothèses sont envisageables. Parmi elles, des études montrent que l'augmentation de la température peut altérer l'organisation du collagène fibrillaire et donc altérer l'intensité de SHG (Sun, Chen et al. 2006). Dans nos expériences, le milieu de pulsation utilisé est volontairement peu conducteur afin de l'effet Joule. Cependant si un relargage massif d'ions a lieu dans le milieu durant les impulsions, cela pourrait conduire à une modification de la conductance. De plus, théoriquement, l'IRE est une alternative aux méthodes thermiques classiques d'ablation pour les applications cliniques. En effet, la fréquence d'application des pulses (0,3Hz) a été choisie pour assurer la diffusion de la chaleur générée par l'application des impulsions.

Afin de vérifier cette théorie, un suivi de la température est effectué sur les échantillons pendant toute l'expérience d'application des impulsions IRE. Les résultats obtenus montrent une faible augmentation de la température de l'ordre de 4 à 8°C ce qui ne peut pas justifier les modifications d'intensité de SHG observées (Figure 48). En effet la variation de température n'est pas assez importante pour expliquer l'altération des fibres de collagène comparé aux

températures mesurées dans d'autres études qui sont de l'ordre de 50°C et plus (Sun et al. 2006). La température n'est vraisemblablement pas la cause de l'altération de la SHG dans les conditions de notre étude. Il est intéressant de noter qu'il n'y a quasiment pas d'incrément thermique avec les feuillets décellularisés par choc osmotique. Cette observation peut s'expliquer par une moindre libération d'ions dans le milieu avec cette technique puisqu'ils ont déjà été relargués lors du processus de décellularisation par choc osmotique.

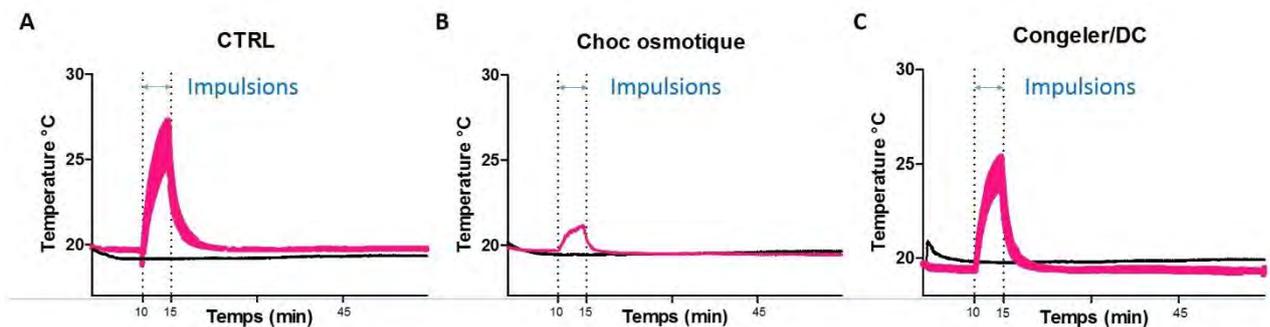


Figure 48: Suivi de la température durant l'application des impulsions IRE (2000 V/cm, 0,3 Hz, 100 μ s et 80 impulsions) sur A, des feuillets dermiques vivants (CTRL) et décellularisés par B, choc osmotique ou C, par cycles de congélation/décongélation (Congeler/DC). (N=3)

d. Un modèle simple : le gel de collagène

Afin de confirmer que les cellules pulsées en IRE sont impliquées dans l'altération de l'intensité de SHG, des expériences sont menées sur un modèle plus simple : le gel de collagène produit à partir de collagène de type I extrait de la queue de rat. Le collagène de type I peut spontanément former une triple hélice à 37°C et créer ainsi une matrice 3D de gel de collagène. Il s'agit d'un modèle simple qui permet ici de s'affranchir des autres composants de la matrice extracellulaire présents dans le feuillet dermique et de regarder uniquement les effets de l'IRE sur le collagène fibrillaire. Il est possible d'ajouter une composante cellulaire à ce modèle de gel de collagène, ce qui leur permet de proliférer dans un environnement proche du tissu car elles sont entourées de collagène. Les fibres de collagène au sein de ce gel *in vitro* générèrent un signal de seconde harmonique comme le montre la figure 49.

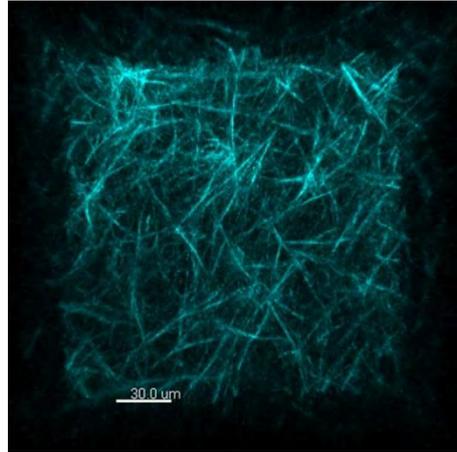


Figure 49: Image de génération de seconde harmonique d'un gel de collagène acellulaire

Dans ce modèle les effets des différents paramètres d'impulsions seront étudiés en présence ou en absence de cellules au sein du gel. Les travaux sont encore en cours mais les résultats actuels confirment qu'il n'y a pas altération de l'intensité de SHG du gel de collagène ne contenant pas de cellule après application des impulsions électriques (ECT, EGT et IRE) (Figure 50).

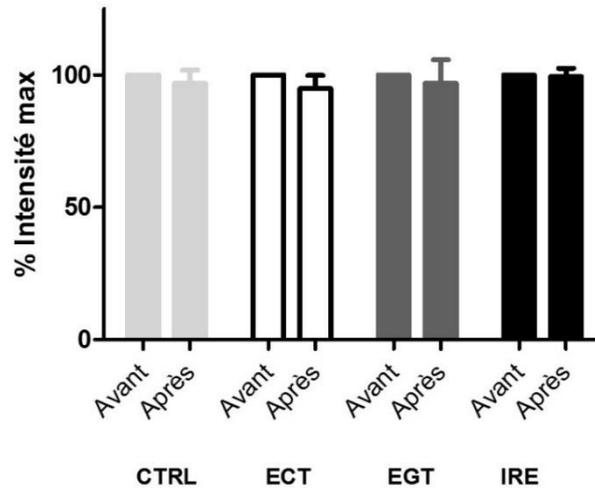


Figure 50: Intensité du signal de seconde harmonique des gels de collagène acellulaires (N=6)

3. Conclusion

Les techniques de décellularisation utilisées dans ce chapitre se sont avérées efficaces pour éliminer les cellules sans endommager l'architecture de la matrice extracellulaire. Nous avons ensuite comparé les conséquences induites par l'application d'impulsions électriques sur les collagènes fibrillaires de feuillets dermiques vivants et décellularisés. Les résultats ont montré qu'il n'y avait pas d'altération de la seconde harmonique quand les feuillets sont traités en ECT et en EGT. Pour l'IRE il n'y a pas de modification de la SHG en termes d'épaisseur et de surface occupée dans les feuillets dermiques vivants ou décellularisés. Cependant l'intensité de la seconde harmonique est altérée significativement (de l'ordre de 10%) et durablement lors de l'application des paramètres IRE sur les feuillets dermiques vivants. Une diminution de l'intensité de la SHG implique une désorganisation de la structure du collagène fibrillaire au sein du feuillet dermique électroporé. Le suivi de la température au cours des différentes expériences a permis d'éliminer l'incrément thermique comme cause de cette altération de la SHG sous l'effet des impulsions électriques IRE.

Cet effet n'étant observé que dans les feuillets vivants ayant reçu des impulsions électriques de type IRE, l'hypothèse la plus probable à ce stade de l'étude est que les cellules sont responsables des modifications de SHG observées. Afin d'étayer cette théorie, des expériences complémentaires ont été effectuées sur un modèle simple, le gel de collagène. Les résultats préliminaires des tests sur le gel de collagène confirment qu'en l'absence de cellules, il n'y a aucune modification de l'intensité de SHG en l'IRE. Des travaux sont en cours pour analyser l'intensité de SHG du collagène fibrillaire de type I après application d'impulsions électriques de type IRE en présence de fibroblastes dermiques.

Des récentes études sur la peau murine ont démontré que l'IRE affecte uniquement les cellules tout en préservant l'architecture de la matrice extracellulaire. En effet, le champ électrique détruit les cellules mais aucun signe de formation de tissu cicatriciel n'a été constaté sur la zone traitée et le collagène a maintenu son architecture normale (Golberg, Broelsch et al. 2013; Quinn, Golberg et al. 2015; Golberg, Villiger et al. 2016). Ces conclusions ne sont pas en contradictions avec les nos résultats car les observations ont été faites sur des biopsies plusieurs semaines ou mois après traitement, laissant le temps aux cellules voisines de recoloniser et remodeler la zone traitée. Dans notre étude nous avons observé uniquement un

effet immédiat. Parmi les travaux envisagés pour compléter ces expériences, des tests à longs termes (plusieurs jours) sont prévus afin de suivre ces modifications dans le temps.

Une excrétion d'enzymes telles que les métalloproteinases (MMPs) qui sont capables de dégrader les collagènes pourrait expliquer d'un point de vue mécanistique les résultats observés. Les résultats préliminaires du dosage de l'activité des MMPs sont très prometteurs, ils suggèrent en effet une libération massive de MMPs par les fibroblastes dermiques immédiatement après applications d'impulsions électriques de type IRE (Figure 51). Pour confirmer l'hypothèse de l'action des MMPs dans la dégradation des collagènes, une expérience sera menée avec un inhibiteur large spectre des MMPs (le galardin) pour quantifier l'intensité de SHG après IRE.

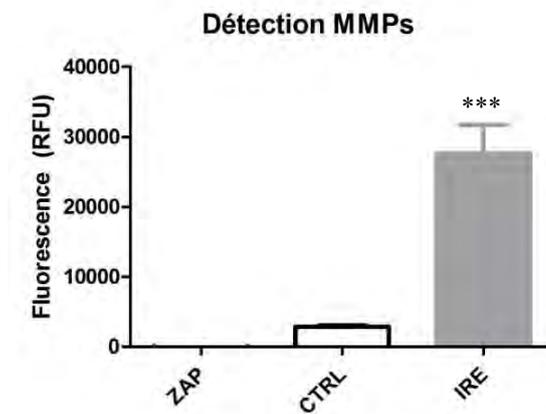


Figure 51: Dosage des MMPs actives dans les feuillets contrôles ou traités en IRE (2000 V/cm, 0,3 Hz, 100 μ s et 80 impulsions). ZAP : milieu de pulsation seul traité ; CTRL : feuillets vivants non traité. IRE : Feuillets vivants traités avec les paramètres IRE *** : $p < 0,001$; $N=3$

Une meilleure compréhension de la réponse de la matrice extracellulaire suite à l'application d'impulsions électriques permettrait d'améliorer les protocoles utilisés *in vivo* en clinique.

VII. CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

Traditionnellement les cultures cellulaires en deux dimensions (monocouche et cellules en suspensions) et les modèles animaux sont utilisés dans les études sur l'électroporation. Cependant le concept d'organisation en trois dimensions est de plus en plus pris en compte dans les études *in vitro*, notamment les interactions cellule-cellule et cellule-matrice extracellulaire. Il est devenu indispensable de se tourner vers des stratégies de bio-mimétisme pour se rapprocher *in vitro* de l'organisation tridimensionnelle observée *in vivo* pour obtenir *in vitro* des résultats les plus pertinents et transposables possibles. Le but de cette thèse était de mettre en place un modèle d'étude *in vitro* mimant les caractéristiques de la matrice extracellulaire *in vivo* pour comprendre le rôle de cette matrice dans les mécanismes de l'électroporation à l'échelle du tissu, cutané en l'occurrence. Pour cela nous avons choisi d'utiliser la méthode d'auto-assemblage pour produire *in vitro* par ingénierie tissulaire un modèle de substitut dermique humain.

La première partie de cette thèse consistait à caractériser l'organisation de la matrice extracellulaire des modèles tissulaires 3D, les sphéroïdes et les substituts dermiques. Dans les expériences que nous avons réalisées, nous avons constaté à l'aide de techniques d'imagerie que la technique d'auto-assemblage basée sur la capacité des cellules à produire leur propre matrice extracellulaire permet d'obtenir un modèle 3D *in vitro* de tissu dermique humain riche et dense en collagènes organisés avec des caractéristiques proches de l'*in vivo*. L'application d'impulsions électriques de l'ordre des millisecondes et des microsecondes a permis d'électroperméabiliser efficacement et de façon homogène les cellules à travers le feuillet dermique.

Dans une seconde partie un gène rapporteur a été électrotransféré avec succès dans ce tissu 3D humain. Les cellules transfectées étaient uniquement localisées à la surface du tissu, où elles sont en contact direct avec la solution d'ADN plasmidique, indépendamment de leur état de prolifération. Une dissociation enzymatique du tissu et le passage des cellules en cytométrie en flux serait une étape complémentaire pour obtenir une analyse plus quantitative de la perméabilisation et du taux de transfection dans le substitut dermique. Des expériences complémentaires avec un plasmide marqué permettent d'établir que l'accessibilité de l'ADN

aux cellules peut expliquer ce résultat. En effet nous avons pu observer que les complexes ADN/membrane plasmique formés pendant l'application des pulses électriques étaient uniquement localisés à la surface du substitut dermique. Ceci signifie que l'état perméable des cellules au sein du feuillet ne suffit pas à l'électrotransfert de gène dans toutes les cellules. Ces constatations permettent de valider notre modèle d'étude car elles reflètent les résultats constatés *in vivo* avec une limitation de l'expression du plasmide dans certains tissus tel que le mélanome (Rols, Delteil et al. 1998). Il est intéressant de noter qu'il n'est pas nécessaire d'avoir de fort taux d'expression du transgène pour obtenir un résultat prometteur comme le montre la publication de Shirley sur la thérapie génique utilisant l'IL-12 dans le traitement du mélanome (Shirley, Lundberg et al. 2015). Dans cette étude, les niveaux plus élevés d'IL-12 n'entraîne aucun bénéfice thérapeutique pour les patients par rapport à des taux plus faibles. Classiquement, dans les études de l'électrotransfert de gène *in vivo* dans la peau, le plasmide est délivré par une injection intradermique. Dans notre étude le feuillet est trop fin pour une injection mais il est tout à fait possible de superposer plusieurs substituts dermiques pendant une semaine pour leur permettre de fusionner et ainsi créer un derme plus épais. Par ailleurs une optimisation possible dès l'application du champ électrique serait d'utiliser diverses électrodes conçues pour l'électrotransfert de gène *in vivo* dans la peau humaine afin de se rapprocher des conditions d'études *in vivo*.

Par ailleurs il serait intéressant d'évaluer la diffusion de molécules fluorescentes de taille variables comme le dextran à travers le maillage de la matrice extracellulaire du substitut dermique. Ces expériences indiqueraient approximativement la taille des pores du maillage matriciel, donnant des indices précieux sur la taille que le plasmide d'intérêt devrait avoir pour qu'elle soit compatible avec une bonne distribution dans le tissu cible. Les étapes suivantes seraient d'appliquer le champ électrique pour analyser la migration de ces molécules à travers un substitut dermique humain. Dans la troisième partie de l'étude, les propriétés du substitut dermiques nous ont permis de caractériser et comparer les effets directs et/ou indirects des impulsions électriques ECT, EGT et IRE sur l'organisation du collagène fibrillaire. Pour cela, les mêmes expériences ont été effectuées avec ou sans cellules dans le substitut dermique. Les résultats des traitements avec les paramètres ECT et EGT, ont montré qu'il n'y avait aucune modification de la génération de signal de seconde harmonique par le collagène fibrillaire. Pour le traitement IRE, l'intensité de la seconde harmonique a significativement diminué

immédiatement après l'application des impulsions électriques sur les feuillets dermiques vivants, ce qui implique une désorganisation de la structure du collagène fibrillaire qui semble être durable dans le temps. Ce phénomène n'est pas observé lorsque le traitement IRE est appliqué sur un feuillet décellularisé et un gel acellulaire de collagène. Des mesures de la température ont par ailleurs indiqué que les paramètres IRE appliqués sont non thermiques. Ces différentes observations impliquent que les effets constatés doivent être dus aux cellules électroperméabilisées. Des expériences complémentaires ont été effectuées pour quantifier l'état d'activation des métalloprotéinases, capables de dégrader les collagènes immédiatement après pulse. Les résultats préliminaires du dosage de l'activité des MMPs suggèrent une libération massive de MMPs dans le tissu électroperméabilisé irréversiblement. Les expériences en cours sont désormais réalisées sur de la peau de souris explantée afin de confirmer ces résultats *in vivo*. Enfin, dans cette partie de l'étude nous avons observé un effet immédiat des pulses IRE sur les collagènes fibrillaires, il serait intéressant donc de compléter ces expériences par une étude à plus long terme (plusieurs jours) afin de suivre le devenir de ces modifications dans le temps. En effet, des études *in vivo* sur la peau de souris ont montré que le champ électrique de type IRE est capable de tuer les cellules traitées tout en préservant l'architecture de la matrice extracellulaire au sein du tissu (Golberg, Broelsch et al. 2013; Golberg, Villiger et al. 2016; Golberg, Villiger et al. 2016). Par ailleurs des études sur d'autres organes et tissus tels que les vaisseaux sanguins, l'intestin grêle, le muscle lisse et le foie ont fait état de la préservation complète de l'architecture de la matrice extracellulaire après un traitement par ablation avec l'IRE (Maor, Ivorra et al. 2007; Golberg and Yarmush 2013; Yarmush, Golberg et al. 2014). Dans toutes ces études les analyses sont faites plusieurs jours, semaines ou mois après le traitement, ce qui laisse le temps aux cellules avoisinantes non-affectées de coloniser et remodeler la zone traitée par IRE. Pour comprendre si la dégradation des collagènes par les MMPs suite à l'électroporation irréversible induit une modification significative des propriétés mécaniques du tissu à l'échelle macroscopique des analyses rhéologiques sont en cours. Il s'agit d'utiliser un texturomètre, technique dans laquelle une bille vient exercer une pression au contact du tissu tout en enregistrant la réponse du tissu. Cette composante mécanique est primordiale à caractériser suite à l'application de l'IRE car il est de plus en plus admis que l'environnement biomécanique des cellules modifie leur comportement : c'est le domaine de la mécanobiologie. Ces outils sont d'autant plus important dans le domaine de l'ingénierie

tissulaire pour évaluer les propriétés mécaniques des substituts reconstruits par rapport à la peau humaine native (Zahouani, Pailler-Mattei et al. 2009; Pailler-Mattei, Laquieze et al. 2014).

Le modèle de substitut dermique utilisé dans ces expériences est d'autant plus intéressant qu'il est la première étape vers la construction d'un tissu plus complexe, la peau humaine artificielle. En effet, le tissu peut être complexifié en ajoutant un compartiment épidermique issu des cellules du même donneur, afin de créer une peau reconstruite présentant des caractéristiques retrouvées dans la peau native (Auger, Lopez Valle et al. 1995; Auger, Rémy-Zolghadri et al. 2000; Auger, Berthod et al. 2004; Gibot, Galbraith et al. 2010; Gibot, Galbraith et al. 2013). Ce modèle de peau complète (derme + épiderme) permettrait de répondre à plusieurs questions visant à caractériser l'effet des champs électriques appliqués sur la peau : existe-t-il une désorganisation des jonctions intercellulaires au niveau épidermique ? cela induit-il une modification de la fonction barrière de la peau ? le champ électrique modifie-t-il le comportement cellulaire, la différenciation des kératinocytes par exemple ? cela induit-il une modification des différentes fonctions de l'épiderme ? Quel type cellulaire est le plus efficacement transfecté ? combien de temps dure l'expression du transgène ? Une tentative pour répondre à une partie de ces questions a récemment été menée par l'équipe de Richard Heller à Norfolk en utilisant une biopsie de peau humaine décellularisée repeuplée par des fibroblastes et des kératinocytes humains (Bulysheva, Burcus et al. 2016). Cette étude montre les caractéristiques très avantageuses de la culture 3D de peau et présente aussi des résultats similaires à l'*in vivo*. Leur modèle d'étude a l'avantage de présenter l'organisation d'origine de la peau native mais l'utilisation de lignées immortalisées est moins relevant de la réalité *in vivo*. Notre étude est en parfaite adéquation avec les avancées dans le domaine de l'ingénierie tissulaire mais aussi dans le développement de modèles tissulaires plus pertinents pour l'étude de l'électroporation.

Le développement de ces modèles grâce à l'ingénierie tissulaire est vraiment un tournant dans la recherche fondamentale en terme d'éthique, de pertinence biologique et de rendement. Il aide en effet à promouvoir les méthodes alternatives à l'utilisation d'animaux de laboratoire qui appliquent le concept des 3Rs (remplacer, réduire et raffiner) afin de réduire le nombre d'animaux utilisés lors de l'expérimentation animale. Nous avons aussi pu garder certains avantages de la culture 2D que sont le contrôle et la manipulation des conditions expérimentales tout en se rapprochant de l'architecture 3D du *in vivo*. Au cours de cette thèse, de la mise au

point des outils aux expériences répétées jusqu'à 10 fois, un nombre incalculable de feuillets dermiques a pu être utilisé alors que les mêmes expériences reproduites *in vivo* avec les mêmes proportions aurait coûté nettement plus cher, aurait conduit au sacrifice de centaines de souris et surtout aurait apporté des connaissances sur la réponse aux champs électriques des tissus murins et non humains.

Remarquons que la limitation majeure de l'approche d'auto-assemblage est le temps nécessaire pour que les cellules produisent un feuillet cellulaire manipulable (i.e 4 semaines). Cette limitation est surmontée par une bonne organisation logistique. Pour accélérer la production de matrice extracellulaire par les cellules, certaines études utilisant d'autres approches comme la méthode d'encombrement de macromolécules qui consiste à ajouter des macromolécules non toxiques dans les milieux de culture pour imiter l'espace extracellulaire dense et permettre ainsi la production rapide de substituts vivants riches en matrice extracellulaire (Lareu, Subramhanya et al. 2007; Kumar, Satyam et al. 2015), ou alors la culture dynamique des feuillets sur un gyroscope (Fortier, Gauvin et al. 2013).

Les techniques d'études conventionnelles de la matrice extracellulaire telles que la coloration au trichrome de Masson et la microscopie électronique nous ont permis de mettre en évidence une matrice extracellulaire dense et organisée dans les substituts dermiques produits par ingénierie tissulaire. Cependant, ces méthodes ne permettent pas de sonder le tissu en volume, car elles sont limitées soit à une coupe histologique fine, soit à la surface d'observation, par conséquent elles ne permettent pas de révéler l'architecture tridimensionnelle du tissu et encore moins de la quantifier. Nous avons donc choisi d'utiliser la microscopie multiphotonique couplée à la génération de seconde harmonique, ce qui nous a permis de confirmer la forte proportion de collagène fibrillaire dans le feuillet frais. La seconde harmonique est un avantage indéniable dans cette thèse, car cette technique nous permet de travailler sur du vivant sans ajouter de molécule fluorescente tout en évaluant l'organisation du collagène fibrillaire. Il est possible d'aller plus loin en utilisant toujours les propriétés de la microscopie multiphotonique pour observer la génération de troisième harmonique (THG). La microscopie THG est une technique récente dont les applications commencent à voir le jour. La génération de troisième harmonique est un processus similaire à la SHG, mais qui n'est pas limité aux matériaux non-centrosymétriques. La propriété remarquable de la microscopie THG est qu'aucun signal ne peut être obtenu lorsque le plan focale d'excitation du laser se trouve dans un milieu complètement

homogène. Ainsi, un signal n'est observé que lorsqu'une interface entre deux milieux différents (par exemple, une vésicule lipidique) se trouve dans le plan focal de l'objectif. La microscopie THG permet donc d'effectuer une cartographie structurale de cellules et de tissus non marqués, en détectant les interfaces et variations de milieu (Barad, Eisenberg et al. 1997; Yelin and Silberberg 1999; Debarre, Pena et al. 2006; Debarre, Supatto et al. 2006). La figure 52 montre un exemple d'image obtenue en mixant la SHG et la THG dans le muscle cremaster de la souris. Le fort signal THG dans les fibres nerveuses semble être dû aux couches superposées de la gaine de myéline (Rehberg, Krombach et al. 2011). Par ailleurs cette technique innovante a déjà été utilisée dans le cadre d'une étude de substitut de cornée issu de l'ingénierie tissulaire (Jay, Bourget et al. 2015).

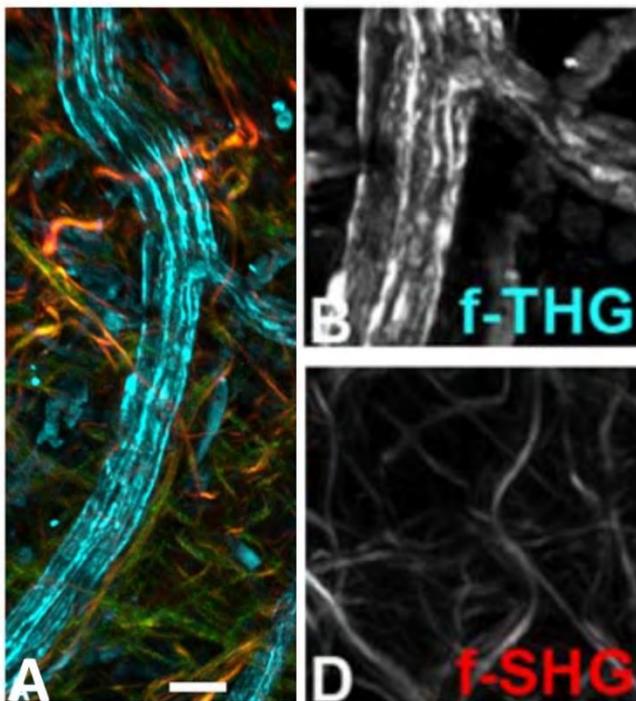


Figure 52: Fibres nerveuses dans le muscle cremaster A) Nerf périphérique (bleu) entouré de fibres de collagène (SHG rouge, vert); B) Les signaux THG produit par les nerfs, les vaisseaux sanguins et d'autres petites structures; D) Collagène SHG entourant le nerf (Rehberg, Krombach et al. 2011)

En conclusion, les résultats obtenus au cours de cette thèse ont démontré l'intérêt du substitut dermique humain comme outil pertinent pour l'étude des réponses tissulaires à l'application d'un champ électrique externe dans un tissu riche en matrice extracellulaire.

VIII. BILIOGRAPHIE

- Achilli, T. M., J. Meyer, et al. (2012). "Advances in the formation, use and understanding of multi-cellular spheroids." Expert Opin Biol Ther **12**(10): 1347-1360.
- Akiyama, S. K., K. M. Yamada, et al. (1981). "The structure of fibronectin and its role in cellular adhesion." J Cell Biochem **16**(4): 345-358.
- Al-Sakere, B., F. Andre, et al. (2007). "Tumor ablation with irreversible electroporation." PLoS One **2**(11): e1135.
- Amann, A., M. Zwierzina, et al. (2014). "Development of an Innovative 3D Cell Culture System to Study Tumour - Stroma Interactions in Non-Small Cell Lung Cancer Cells." PLoS One **9**(3): e92511.
- Andre, F. M., J. Gehl, et al. (2008). "Efficiency of high- and low-voltage pulse combinations for gene electrotransfer in muscle, liver, tumor, and skin." Hum Gene Ther **19**(11): 1261-1271.
- Athanasiou, K. A., R. Eswaramoorthy, et al. (2013). "Self-organization and the self-assembling process in tissue engineering." Annu Rev Biomed Eng **15**: 115-136.
- Auger, F., M. Rémy-Zolghadri, et al. (2000). "The self-assembly approach for organ reconstruction by tissue engineering." e-biomed: a journal of regenerative medicine **1**(5): 75-86.
- Auger, F. A., F. Berthod, et al. (2004). "Tissue-engineered skin substitutes: from *in vitro* constructs to *in vivo* applications." Biotechnol Appl Biochem **39**(Pt 3): 263-275.
- Auger, F. A., C. A. Lopez Valle, et al. (1995). "Skin equivalent produced with human collagen." In vitro Cell Dev Biol Anim **31**(6): 432-439.
- Auger, F. A., R. Pouliot, et al. (2000). "Multistep production of bioengineered skin substitutes: sequential modulation of culture conditions." In vitro Cell Dev Biol Anim **36**(2): 96-103.
- Auger, F. A., M. Remy-Zolghadri, et al. (2002). "A truly new approach for tissue engineering: the LOEX self-assembly technique." Ernst Schering Res Found Workshop(35): 73-88.
- Barad, Y., H. Eisenberg, et al. (1997). "Nonlinear scanning laser microscopy by third harmonic generation." Applied Physics Letters **70**(8): 922-924.
- Bateman, J. F., R. P. Boot-Handford, et al. (2009). "Genetic diseases of connective tissues: cellular and extracellular effects of ECM mutations." Nat Rev Genet **10**(3): 173-183.

- Belehradek, M., C. Domenge, et al. (1993). "Electrochemotherapy, a new antitumor treatment. First clinical phase I-II trial." Cancer **72**(12): 3694-3700.
- Bella, J. and D. J. Hulmes (2017). Fibrillar Collagens. Fibrous Proteins: Structures and Mechanisms, Springer: 457-490.
- Bouwstra, J. A., P. L. Honeywell-Nguyen, et al. (2003). "Structure of the skin barrier and its modulation by vesicular formulations." Progress in lipid research **42**(1): 1-36.
- Bower, M., L. Sherwood, et al. (2011). "Irreversible electroporation of the pancreas: definitive local therapy without systemic effects." Journal of surgical oncology **104**(1): 22-28.
- Bretscher, M. S. (1985). "The molecules of the cell membrane." Sci Am **253**(4): 100-108.
- Brew, K. and H. Nagase (2010). "The tissue inhibitors of metalloproteinases (TIMPs): An ancient family with structural and functional diversity." Biochim Biophys Acta **1803**(1): 55-71.
- Bulysheva, A. A., N. Burcus, et al. (2016). "Recellularized human dermis for testing gene electrotransfer ex vivo." Biomed Mater **11**(3): 035002.
- Campagnola, P. J. and L. M. Loew (2003). "Second-harmonic imaging microscopy for visualizing biomolecular arrays in cells, tissues and organisms." Nat Biotechnol **21**(11): 1356-1360.
- Campagnola, P. J., A. C. Millard, et al. (2002). "Three-dimensional high-resolution second-harmonic generation imaging of endogenous structural proteins in biological tissues." Biophys J **82**(1 Pt 1): 493-508.
- Canatella, P. J., M. M. Black, et al. (2004). "Tissue electroporation: quantification and analysis of heterogeneous transport in multicellular environments." Biophys J **86**(5): 3260-3268.
- Cappelletti, M., I. Zampaglione, et al. (2003). "Gene electro-transfer improves transduction by modifying the fate of intramuscular DNA." J Gene Med **5**(4): 324-332.
- Cemazar, M., M. Golzio, et al. (2012). "Hyaluronidase and collagenase increase the transfection efficiency of gene electrotransfer in various murine tumors." Hum Gene Ther **23**(1): 128-137.
- Cemazar, M., M. Golzio, et al. (2009). "Control by pulse parameters of DNA electrotransfer into solid tumors in mice." Gene Ther **16**(5): 635-644.
- Cemazar, M., G. Sersa, et al. (2002). "Effective gene transfer to solid tumors using different nonviral gene delivery techniques: electroporation, liposomes, and integrin-targeted vector." Cancer Gene Ther **9**(4): 399-406.
- Chabot, S., C. Rosazza, et al. (2013). "Nucleic acids electro-transfer: from bench to bedside." Curr Drug Metab **14**(3): 300-308.

- Chen, C., S. W. Smye, et al. (2006). "Membrane electroporation theories: a review." Med Biol Eng Comput **44**(1-2): 5-14.
- Chopinnet, L., L. Wasungu, et al. (2012). "First explanations for differences in electrotransfection efficiency *in vitro* and *in vivo* using spheroid model." Int J Pharm **423**(1): 7-15.
- Corovic, S., J. Bester, et al. (2009). "An e-learning application on electrochemotherapy." Biomed Eng Online **8**: 26.
- Cox, G., E. Kable, et al. (2003). "3-dimensional imaging of collagen using second harmonic generation." Journal of structural biology **141**(1): 53-62.
- Cox, T. R. and J. T. Erler (2011). "Remodeling and homeostasis of the extracellular matrix: implications for fibrotic diseases and cancer." Disease models & mechanisms **4**(2): 165-178.
- Crapo, P. M., T. W. Gilbert, et al. (2011). "An overview of tissue and whole organ decellularization processes." Biomaterials **32**(12): 3233-3243.
- Daud, A. I., R. C. DeConti, et al. (2008). "Phase I trial of interleukin-12 plasmid electroporation in patients with metastatic melanoma." J Clin Oncol **26**(36): 5896-5903.
- Davalos, R. V., L. Mir, et al. (2005). "Tissue ablation with irreversible electroporation." Ann Biomed Eng **33**(2): 223-231.
- Dean, D., D. Machado-Aranda, et al. (2003). "Electroporation as a method for high-level nonviral gene transfer to the lung." Gene Ther **10**(18): 1608-1615.
- Debarre, D., A. M. Pena, et al. (2006). "[Second- and third-harmonic generation microscopies for the structural imaging of intact tissues]." Med Sci (Paris) **22**(10): 845-850.
- Debarre, D., W. Supatto, et al. (2006). "Imaging lipid bodies in cells and tissues using third-harmonic generation microscopy." Nat Methods **3**(1): 47-53.
- Dev, S. (1994). "Killing cancer cells with a combination of pulsed electric fields and chemotherapeutic agents." Cancer watch **3**: 12-14.
- Dimitrov, D. (1995). "Electroporation and electrofusion of membranes." Handbook of biological physics **1**: 851-901.
- Dolznic, H., A. Walzl, et al. (2011). "Organotypic spheroid cultures to study tumor–stroma interaction during cancer development." Drug Discovery Today: Disease Models **8**(2–3): 113-119.
- Drabick, J. J., J. Glasspool-Malone, et al. (2001). "Cutaneous transfection and immune responses to intradermal nucleic acid vaccination are significantly enhanced by *in vivo* electropermeabilization." Molecular Therapy **3**(2): 249-255.

- Dufau, I., C. Frongia, et al. (2012). "Multicellular Tumor Spheroid model to evaluate spatio-temporal dynamics effect of chemotherapeutics. Application to the gemcitabine / CHK1 inhibitor combination in pancreatic cancer." BMC Cancer **12**(1): 15.
- Edidin, M. (2003). "Lipids on the frontier: a century of cell-membrane bilayers." Nature Reviews Molecular Cell Biology **4**(5): 414-418.
- Escande-Geraud, M., M. Rols, et al. (1988). "Reversible plasma membrane ultrastructural changes correlated with electroporation in Chinese hamster ovary cells." Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes **939**(2): 247-259.
- Escoffre, J. M., T. Portet, et al. (2011). "Electromediated formation of DNA complexes with cell membranes and its consequences for gene delivery." Biochim Biophys Acta **1808**(6): 1538-1543.
- Escoffre, J. M., T. Portet, et al. (2009). "What is (still not) known of the mechanism by which electroporation mediates gene transfer and expression in cells and tissues." Mol Biotechnol **41**(3): 286-295.
- Escoffre, J. M. and M. P. Rols (2012). "Electrochemotherapy: Progress and Prospects." Curr Pharm Des.
- Escoffre, J. M., J. Teissie, et al. (2010). "Gene transfer: how can the biological barriers be overcome?" J Membr Biol **236**(1): 61-74.
- Fortier, G. M., R. Gauvin, et al. (2013). "Dynamic culture induces a cell type-dependent response impacting on the thickness of engineered connective tissues." Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine **7**(4): 292-301.
- Frandsen, S. K., L. Gibot, et al. (2015). "Calcium Electroporation: Evidence for Differential Effects in Normal and Malignant Cell Lines, Evaluated in a 3D Spheroid Model." PLoS One **10**(12): e0144028.
- Freiberger, H., D. Grove, et al. (1980). "Procollagen I synthesis in human skin fibroblasts: effect of culture conditions on biosynthesis." Journal of Investigative Dermatology **75**(5): 425-430.
- Friedrich, J., R. Ebner, et al. (2007). "Experimental anti-tumor therapy in 3-D: spheroids—old hat or new challenge?" International journal of radiation biology **83**(11-12): 849-871.
- Fromm, J. and S. Lautner (2007). "Electrical signals and their physiological significance in plants." Plant, cell & environment **30**(3): 249-257.
- Gandhi, N. S. and R. L. Mancera (2008). "The structure of glycosaminoglycans and their interactions with proteins." Chemical biology & drug design **72**(6): 455-482.
- Garcia, M. A., W. J. Nelson, et al. (2017). "Cell-Cell Junctions Organize Structural and Signaling Networks." Cold Spring Harb Perspect Biol.

- Gehl, J., T. Skovsgaard, et al. (1998). "Enhancement of cytotoxicity by electropermeabilization: an improved method for screening drugs." Anticancer Drugs **9**(4): 319-325.
- Gelse, K., E. Pöschl, et al. (2003). "Collagens—structure, function, and biosynthesis." Adv Drug Deliv Rev **55**(12): 1531-1546.
- Ghajar, C. M. and M. J. Bissell (2010). "Tumor engineering: the other face of tissue engineering." Tissue Engineering Part A **16**(7): 2153-2156.
- Gibot, L., T. Galbraith, et al. (2010). "A preexisting microvascular network benefits *in vivo* revascularization of a microvascularized tissue-engineered skin substitute." Tissue Eng Part A **16**(10): 3199-3206.
- Gibot, L., T. Galbraith, et al. (2013). "Development of a tridimensional microvascularized human skin substitute to study melanoma biology." Clin Exp Metastasis **30**(1): 83-90.
- Gibot, L. and M. P. Rols (2013). "3D Spheroids' Sensitivity to Electric Field Pulses Depends on Their Size." J Membr Biol **246**(10): 745-750.
- Gibot, L., L. Wasungu, et al. (2013). "Antitumor drug delivery in multicellular spheroids by electropermeabilization." Journal of Controlled Release **167**(2): 138-147.
- Gilbert, T. W. (2012). "Strategies for tissue and organ decellularization." J Cell Biochem **113**(7): 2217-2222.
- Gilbert, T. W., T. L. Sellaro, et al. (2006). "Decellularization of tissues and organs." Biomaterials **27**(19): 3675-3683.
- Golberg, A., G. F. Broelsch, et al. (2013). "Non-thermal, pulsed electric field cell ablation: A novel tool for regenerative medicine and scarless skin regeneration." Technology (Singap World Sci) **1**(01): 1-7.
- Golberg, A., B. G. Bruinsma, et al. (2015). "Tissue heterogeneity in structure and conductivity contribute to cell survival during irreversible electroporation ablation by "electric field sinks"." Sci Rep **5**.
- Golberg, A., J. Fischer, et al. (2010). The Use of Irreversible Electroporation in Food Preservation. Irreversible Electroporation. B. Rubinsky, Springer Berlin Heidelberg: 273-312.
- Golberg, A., M. Villiger, et al. (2016). "Skin regeneration with all accessory organs following ablation with irreversible electroporation." Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine.
- Golberg, A., M. Villiger, et al. (2016). "Preventing Scars after Injury with Partial Irreversible Electroporation." Journal of Investigative Dermatology **136**(11): 2297-2304.

- Golberg, A. and M. L. Yarmush (2013). "Nonthermal irreversible electroporation: fundamentals, applications, and challenges." IEEE Transactions on biomedical Engineering **60**(3): 707-714.
- Golzio, M., M. Rols, et al. (2004). "*In vitro* and *in vivo* electric field-mediated permeabilization, gene transfer, and expression." Methods **33**(2): 126-135.
- Golzio, M., J. Teissié, et al. (2002). "Direct visualization at the single-cell level of electrically mediated gene delivery." Proceedings of the National Academy of Sciences **99**(3): 1292-1297.
- Golzio, M., J. Teissie, et al. (2002). "Direct visualization at the single-cell level of electrically mediated gene delivery." Proc Natl Acad Sci U S A **99**(3): 1292-1297.
- Goñi, F. M. (2014). "The basic structure and dynamics of cell membranes: an update of the Singer–Nicolson model." Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes **1838**(6): 1467-1476.
- Goodman, T. T., P. L. Olive, et al. (2007). "Increased nanoparticle penetration in collagenase-treated multicellular spheroids." International journal of nanomedicine **2**(2): 265.
- Gothelf, A. and J. Gehl (2010). "Gene electrotransfer to skin; review of existing literature and clinical perspectives." Curr Gene Ther **10**(4): 287-299.
- Gothelf, A., L. M. Mir, et al. (2003). "Electrochemotherapy: results of cancer treatment using enhanced delivery of bleomycin by electroporation." Cancer Treat Rev **29**(5): 371-387.
- Groeber, F., M. Holeiter, et al. (2011). "Skin tissue engineering—*in vivo* and *in vitro* applications." Adv Drug Deliv Rev **63**(4): 352-366.
- Gross, D., L. M. Loew, et al. (1986). "Optical imaging of cell membrane potential changes induced by applied electric fields." Biophys J **50**(2): 339-348.
- Gundelfinger, E. D., M. M. Kessels, et al. (2003). "Temporal and spatial coordination of exocytosis and endocytosis." Nature Reviews Molecular Cell Biology **4**(2): 127-139.
- Gupta, S. K., A. K. Dinda, et al. (2013). "Fabrication and characterization of scaffold from cadaver goat-lung tissue for skin tissue engineering applications." Materials Science and Engineering: C **33**(7): 4032-4038.
- Haake, A., G. A. Scott, et al. (2001). "Structure and function of the skin: overview of the epidermis and dermis." The biology of the skin **2001**: 19-45.
- Haberl, S. and M. Pavlin (2010). "Use of collagen gel as a three-dimensional *in vitro* model to study electropermeabilization and gene electrotransfer." J Membr Biol **236**(1): 87-95.

- Hacein-Bey-Abina, S., C. von Kalle, et al. (2003). "A serious adverse event after successful gene therapy for X-linked severe combined immunodeficiency." N Engl J Med **348**(3): 255-256.
- Hacein-Bey-Abina, S., C. Von Kalle, et al. (2003). "LMO2-associated clonal T cell proliferation in two patients after gene therapy for SCID-X1." Science **302**(5644): 415-419.
- Heller, L. C., M. J. Jaroszeski, et al. (2007). "Optimization of cutaneous electrically mediated plasmid DNA delivery using novel electrode." Gene Ther **14**(3): 275-280.
- Heller, R., M. J. Jaroszeski, et al. (1996). "Phase I/II trial for the treatment of cutaneous and subcutaneous tumors using electrochemotherapy." Cancer **77**(5): 964-971.
- Heller, R., J. Schultz, et al. (2001). "Intradermal delivery of interleukin-12 plasmid DNA by *in vivo* electroporation." DNA Cell Biol **20**(1): 21-26.
- Henshaw, J., B. Mossop, et al. (2008). "Relaxin treatment of solid tumors: effects on electric field-mediated gene delivery." Mol Cancer Ther **7**(8): 2566-2573.
- Hirschhaeuser, F., H. Menne, et al. (2010). "Multicellular tumor spheroids: an underestimated tool is catching up again." J Biotechnol **148**(1): 3-15.
- Jay, L., J. M. Bourget, et al. (2015). "Characterization of tissue-engineered posterior corneas using second- and third-harmonic generation microscopy." PLoS One **10**(4): e0125564.
- Jordan, C. A., E. Neumann, et al. (2013). Electroporation and electrofusion in cell biology, Springer Science & Business Media.
- Kadler, K. E. (2017). "Fell Muir Review: Collagen fibril formation *in vitro* and *in vivo*." Int J Exp Pathol.
- Kadler, K. E., C. Baldock, et al. (2007). "Collagens at a glance." J Cell Sci **120**(Pt 12): 1955-1958.
- Krieg, T. and M. Aumailley (2011). "The extracellular matrix of the dermis: flexible structures with dynamic functions." Exp Dermatol **20**(8): 689-695.
- Kumar, P., A. Satyam, et al. (2015). "Macromolecularly crowded *in vitro* microenvironments accelerate the production of extracellular matrix-rich supramolecular assemblies." Sci Rep **5**.
- Kunz-Schughart, L. A., J. A. Schroeder, et al. (2006). "Potential of fibroblasts to regulate the formation of three-dimensional vessel-like structures from endothelial cells *in vitro*." Am J Physiol Cell Physiol **290**(5): C1385-1398.
- Labat-Robert, J., M. Bihari-Varga, et al. (1990). "Extracellular matrix." FEBS Lett **268**(2): 386-393.

- Langer, R. and J. Vacanti (1993). "Tissue engineering." Science **260**(5110): 920-926.
- Lareu, R. R., K. H. Subramhanya, et al. (2007). "Collagen matrix deposition is dramatically enhanced *in vitro* when crowded with charged macromolecules: the biological relevance of the excluded volume effect." FEBS Lett **581**(14): 2709-2714.
- Levine, M., S. J. Padayatty, et al. (2011). "Vitamin C: a concentration-function approach yields pharmacology and therapeutic discoveries." Advances in Nutrition: An International Review Journal **2**(2): 78-88.
- Madi, M., M. P. Rols, et al. (2015). "Efficient *In vitro* Electroporation of Reconstructed Human Dermal Tissue." J Membr Biol **248**(5): 903-908.
- Madi, M., M. P. Rols, et al. (2016). "Gene Electrotransfer in 3D Reconstructed Human Dermal Tissue." Curr Gene Ther **16**(2): 75-82.
- Mali, B., T. Jarm, et al. (2013). "Antitumor effectiveness of electrochemotherapy: a systematic review and meta-analysis." European Journal of Surgical Oncology (EJSO) **39**(1): 4-16.
- Maor, E., A. Ivorra, et al. (2007). "The effect of irreversible electroporation on blood vessels." Technol Cancer Res Treat **6**(4): 307-312.
- Marrero, B. and R. Heller (2012). "The use of an *in vitro* 3D melanoma model to predict *in vivo* plasmid transfection using electroporation." Biomaterials **33**(10): 3036-3046.
- Maxfield, F. R. and G. van Meer (2010). "Cholesterol, the central lipid of mammalian cells." Current opinion in cell biology **22**(4): 422-429.
- Mazzoleni, G., D. Di Lorenzo, et al. (2009). "Modelling tissues in 3D: the next future of pharmaco-toxicology and food research?" Genes Nutr **4**(1): 13-22.
- Mehier-Humbert, S. and R. H. Guy (2005). "Physical methods for gene transfer: improving the kinetics of gene delivery into cells." Adv Drug Deliv Rev **57**(5): 733-753.
- Mellor, H. R., L. A. Davies, et al. (2006). "Optimising non-viral gene delivery in a tumour spheroid model." J Gene Med **8**(9): 1160-1170.
- Mennuni, C., F. Calvaruso, et al. (2002). "Hyaluronidase increases electrogene transfer efficiency in skeletal muscle." Hum Gene Ther **13**(3): 355-365.
- Mesojednik, S., D. Pavlin, et al. (2007). "The effect of the histological properties of tumors on transfection efficiency of electrically assisted gene delivery to solid tumors in mice." Gene Ther **14**(17): 1261-1269.
- Michel, M., N. L'Heureux, et al. (1999). "Characterization of a new tissue-engineered human skin equivalent with hair." In vitro Cellular & Developmental Biology-Animal **35**(6): 318.

- Miklavčič, D., B. Mali, et al. (2014). "Electrochemotherapy: from the drawing board into medical practice." Biomed Eng Online **13**(1): 29.
- Miller, L., J. Leor, et al. (2005). "Cancer cells ablation with irreversible electroporation." Technol Cancer Res Treat **4**(6): 699-705.
- Mir, L. (2009). "Nucleic acids electrotransfer-based gene therapy (electrogenetherapy): past, current, and future." Mol Biotechnol **43**(2): 167.
- Mir, L. M., M. F. Bureau, et al. (1999). "High-efficiency gene transfer into skeletal muscle mediated by electric pulses." Proceedings of the National Academy of Sciences **96**(8): 4262-4267.
- Mir, L. M., M. F. Bureau, et al. (1999). "High-efficiency gene transfer into skeletal muscle mediated by electric pulses." Proc Natl Acad Sci U S A **96**(8): 4262-4267.
- Mouw, J. K., G. Ou, et al. (2014). "Extracellular matrix assembly: a multiscale deconstruction." Nat Rev Mol Cell Biol **15**(12): 771-785.
- Myllyharju, J. and K. I. Kivirikko (2004). "Collagens, modifying enzymes and their mutations in humans, flies and worms." TRENDS in Genetics **20**(1): 33-43.
- Neumann, E. and K. Rosenheck (1972). "Permeability changes induced by electric impulses in vesicular membranes." J Membr Biol **10**(3): 279-290.
- Neumann, E. and K. Rosenheck (1972). "Permeability changes induced by electric impulses in vesicular membranes." Journal of Membrane Biology **10**(1): 279-290.
- Neumann, E., M. Schaefer-Ridder, et al. (1982). "Gene transfer into mouse lyoma cells by electroporation in high electric fields." EMBO J **1**(7): 841.
- Neumann, E., M. Schaefer-Ridder, et al. (1982). "Gene transfer into mouse lyoma cells by electroporation in high electric fields." EMBO J **1**(7): 841-845.
- Nucciotti, V., C. Stringari, et al. (2010). "Probing myosin structural conformation *in vivo* by second-harmonic generation microscopy." Proceedings of the National Academy of Sciences **107**(17): 7763-7768.
- Nuccitelli, R., U. Pliquett, et al. (2006). "Nanosecond pulsed electric fields cause melanomas to self-destruct." Biochem Biophys Res Commun **343**(2): 351-360.
- Nyga, A., U. Cheema, et al. (2011). "3D tumour models: novel *in vitro* approaches to cancer studies." J Cell Commun Signal **5**(3): 239.
- Page-McCaw, A., A. J. Ewald, et al. (2007). "Matrix metalloproteinases and the regulation of tissue remodelling." Nat Rev Mol Cell Biol **8**(3): 221-233.

- Pailler-Mattei, C., L. Laquieze, et al. (2014). "Rheological behaviour of reconstructed skin." J Mech Behav Biomed Mater **37**: 251-263.
- Pampaloni, F., E. G. Reynaud, et al. (2007). "The third dimension bridges the gap between cell culture and live tissue." Nat Rev Mol Cell Biol **8**(10): 839-845.
- Patnaik, S. S., B. Wang, et al. (2014). "Decellularized scaffolds: concepts, methodologies, and applications in cardiac tissue engineering and whole-organ regeneration." Tissue Regeneration: Where Nanostructure Meets Biology. Singapore: World Scientific: 77-124.
- Pavlin, M., N. Pavselj, et al. (2002). "Dependence of induced transmembrane potential on cell density, arrangement, and cell position inside a cell system." IEEE Trans Biomed Eng **49**(6): 605-612.
- Pavšelj, N. and V. Pr at (2005). "DNA electrotransfer into the skin using a combination of one high-and one low-voltage pulse." Journal of Controlled Release **106**(3): 407-415.
- Pillet, F., L. Gibot, et al. (2017). "Importance of endogenous extracellular matrix in biomechanical properties of human skin model." Biofabrication **9**(2): 025017.
- Pillet, F., L. Gibot, et al. (2017). "Importance of endogenous extracellular matrix in biomechanical properties of human skin model." Biofabrication **9**(2).
- Pitard, B., M. Bello-Rouf i, et al. (2004). "Negatively charged self-assembling DNA/poloxamine nanospheres for *in vivo* gene transfer." Nucleic Acids Res **32**(20): e159-e159.
- Pouliot, R., D. Larouche, et al. (2002). "Reconstructed human skin produced *in vitro* and grafted on athymic mice." Transplantation **73**(11): 1751-1757.
- Pouliot, R., D. Larouche, et al. (2002). "Reconstructed human skin produced *in vitro* and grafted on athymic mice1, 2." Transplantation **73**(11): 1751-1757.
- Prockop, D. J. and K. I. Kivirikko (1995). "Collagens: molecular biology, diseases, and potentials for therapy." Annu Rev Biochem **64**: 403-434.
- Prost-Squarcioni, C., S. Fraitag, et al. (2008). Functional histology of dermis. Ann Dermatol Venereol.
- Quastel, J. (1965). "Review Lecture: Molecular Transport at Cell Membranes." Proceedings of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences **163**(991): 169-196.
- Quinn, K. P., A. Golberg, et al. (2015). "An automated image processing method to quantify collagen fibre organization within cutaneous scar tissue." Exp Dermatol **24**(1): 78-80.

- Rehberg, M., F. Krombach, et al. (2011). "Label-free 3D visualization of cellular and tissue structures in intact muscle with second and third harmonic generation microscopy." PLoS One **6**(11): e28237.
- Ricard-Blum, S. (2011). "The collagen family." Cold Spring Harb Perspect Biol **3**(1): a004978.
- Ricard-Blum, S. and R. Salza (2014). "Matricryptins and matrikines: biologically active fragments of the extracellular matrix." Exp Dermatol **23**(7): 457-463.
- Roberts, D. L., K. J. Williams, et al. (2009). "Contribution of HIF-1 and drug penetrance to oxaliplatin resistance in hypoxic colorectal cancer cells." Br J Cancer **101**(8): 1290-1297.
- Rochard, A., D. Scherman, et al. (2011). "Genetic immunization with plasmid DNA mediated by electrotransfer." Hum Gene Ther **22**(7): 789-798.
- Rochard, A., D. Scherman, et al. (2011). "Genetic immunization with plasmid DNA mediated by electrotransfer." Hum Gene Ther **22**(7): 789-798.
- Rols, M.-P., C. Delteil, et al. (1998). "*In vivo* electrically mediated protein and gene transfer in murine melanoma." Nat Biotechnol **16**(2): 168-171.
- Rols, M.-P., M. Golzio, et al. (2000). "*In vitro* delivery of drugs and other molecules to cells." Electrochemotherapy, Electrogenetherapy, and Transdermal Drug Delivery: Electrically Mediated Delivery of Molecules to Cells: 83-97.
- Rols, M.-P. and J. Teissie (1990). "Electropermeabilization of mammalian cells. Quantitative analysis of the phenomenon." Biophys J **58**(5): 1089-1098.
- Rols, M. P., C. Delteil, et al. (1998). "*In vivo* electrically mediated protein and gene transfer in murine melanoma." Nat Biotechnol **16**(2): 168-171.
- Rols, M. P. and J. Teissie (1990). "Electropermeabilization of mammalian cells. Quantitative analysis of the phenomenon." Biophys J **58**(5): 1089-1098.
- Rosazza, C., A. Buntz, et al. (2013). "Intracellular tracking of single-plasmid DNA particles after delivery by electroporation." Mol Ther **21**(12): 2217-2226.
- Rosazza, C., J. M. Escoffre, et al. (2011). "The actin cytoskeleton has an active role in the electrotransfer of plasmid DNA in mammalian cells." Mol Ther **19**(5): 913-921.
- Rosazza, C., S. H. Meglic, et al. (2016). "Gene Electrotransfer: A Mechanistic Perspective." Curr Gene Ther **16**(2): 98-129.
- Šatkauskas, S., F. André, et al. (2005). "Electrophoretic component of electric pulses determines the efficacy of *in vivo* DNA electrotransfer." Hum Gene Ther **16**(10): 1194-1201.

- Scheffer, H. J., K. Nielsen, et al. (2014). "Irreversible electroporation for nonthermal tumor ablation in the clinical setting: a systematic review of safety and efficacy." Journal of Vascular and Interventional Radiology **25**(7): 997-1011.
- Schlie-Wolter, S., A. Ngezahayo, et al. (2013). "The selective role of ECM components on cell adhesion, morphology, proliferation and communication *in vitro*." Exp Cell Res **319**(10): 1553-1561.
- Schwan, H. P. (1957). "Electrical properties of tissue and cell suspensions." Advances in biological and medical physics **5**: 147.
- Sersa, G., D. Miklavcic, et al. (2008). "Electrochemotherapy in treatment of tumours." Eur J Surg Oncol **34**(2): 232-240.
- Shaw, L. M. and B. R. Olsen (1991). "FACIT collagens: diverse molecular bridges in extracellular matrices." Trends in biochemical sciences **16**: 191-194.
- Shevchenko, R. V., S. L. James, et al. (2009). "A review of tissue-engineered skin bioconstructs available for skin reconstruction." Journal of the Royal Society Interface: rsif20090403.
- Shirley, S. A., C. G. Lundberg, et al. (2015). "Controlled gene delivery can enhance therapeutic outcome for cancer immune therapy for melanoma." Curr Gene Ther **15**(1): 32-43.
- Spratt, D. E., E. A. Gordon Spratt, et al. (2014). "Efficacy of skin-directed therapy for cutaneous metastases from advanced cancer: a meta-analysis." Journal of Clinical Oncology **32**(28): 3144-3155.
- Sun, Y., W. L. Chen, et al. (2006). "Investigating mechanisms of collagen thermal denaturation by high resolution second-harmonic generation imaging." Biophys J **91**(7): 2620-2625.
- Sutherland, R. M. (1988). "Cell and environment interactions in tumor microregions: the multicell spheroid model." Science **240**(4849): 177-184.
- Sutherland, R. M. (1988). "Cell and environment interactions in tumor microregions: the multicell spheroid model." Science **240**(4849): 177-184.
- Teissie, J., N. Eynard, et al. (2002). "Recent biotechnological developments of electropulsation. A prospective review." Bioelectrochemistry **55**(1): 107-112.
- Teissie, J., M. Golzio, et al. (2005). "Mechanisms of cell membrane electropermeabilization: a minireview of our present (lack of?) knowledge." Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects **1724**(3): 270-280.
- Teissie, J. and M.-P. Rols (1993). "An experimental evaluation of the critical potential difference inducing cell membrane electropermeabilization." Biophys J **65**(1): 409-413.

- Titomirov, A. V., S. Sukharev, et al. (1991). "*In vivo* electroporation and stable transformation of skin cells of newborn mice by plasmid DNA." Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Gene Structure and Expression **1088**(1): 131-134.
- Toepfl, S., V. Heinz, et al. (2007). "High intensity pulsed electric fields applied for food preservation." Chemical engineering and processing: Process intensification **46**(6): 537-546.
- Trackman, P. C. (2005). "Diverse biological functions of extracellular collagen processing enzymes." J Cell Biochem **96**(5): 927-937.
- Tracy, L. E., R. A. Minasian, et al. (2016). "Extracellular matrix and dermal fibroblast function in the healing wound." Adv Wound Care (New Rochelle) **5**(3): 119-136.
- Van Der Rest, M. and R. Garrone (1991). "Collagen family of proteins." The FASEB Journal **5**(13): 2814-2823.
- Van Meer, G., D. R. Voelker, et al. (2008). "Membrane lipids: where they are and how they behave." Nature Reviews Molecular Cell Biology **9**(2): 112-124.
- Vandermeulen, G., E. Staes, et al. (2007). "Optimisation of intradermal DNA electrotransfer for immunisation." J Control Release **124**(1-2): 81-87.
- Vandermeulen, G., E. Staes, et al. (2007). "Optimisation of intradermal DNA electrotransfer for immunisation." Journal of Controlled Release **124**(1): 81-87.
- Vanzi, F., L. Sacconi, et al. (2012). "Protein conformation and molecular order probed by second-harmonic-generation microscopy." J Biomed Opt **17**(6): 0609011-0609018.
- Venslauskas, M. S. and S. Šatkauskas (2015). "Mechanisms of transfer of bioactive molecules through the cell membrane by electroporation." European Biophysics Journal **44**(5): 277-289.
- Wasungu, L., J.-M. Escoffre, et al. (2009). "A 3D *in vitro* spheroid model as a way to study the mechanisms of electroporation." Int J Pharm **379**(2): 278-284.
- Wasungu, L., J. M. Escoffre, et al. (2009). "A 3D *in vitro* spheroid model as a way to study the mechanisms of electroporation." Int J Pharm **379**(2): 278-284.
- Weaver, J. C. (1995). "Electroporation theory: concepts and mechanisms." Animal Cell Electroporation and Electrofusion Protocols: 3-28.
- Weaver, J. C. and Y. A. Chizmadzhev (1996). "Theory of electroporation: a review." Bioelectrochemistry and bioenergetics **41**(2): 135-160.
- Weiherrmann, A., M. Lorencini, et al. (2016). "Elastin structure and its involvement in skin photoaging." Int J Cosmet Sci.

- Whitesides, G. M. and B. Grzybowski (2002). "Self-assembly at all scales." Science **295**(5564): 2418-2421.
- Wolf, H., M. P. Rols, et al. (1994). "Control by pulse parameters of electric field-mediated gene transfer in mammalian cells." Biophys J **66**(2 Pt 1): 524-531.
- Wolf, K. and P. Friedl (2011). "Extracellular matrix determinants of proteolytic and non-proteolytic cell migration." Trends Cell Biol **21**(12): 736-744.
- Wolff, J., M. E. Dowty, et al. (1992). "Expression of naked plasmids by cultured myotubes and entry of plasmids into T tubules and caveolae of mammalian skeletal muscle." J Cell Sci **103**(4): 1249-1259.
- Yarmush, M. L., A. Golberg, et al. (2014). "Electroporation-based technologies for medicine: principles, applications, and challenges." Annu Rev Biomed Eng **16**: 295-320.
- Yarmush, M. L., A. Golberg, et al. (2014). "Electroporation-based technologies for medicine: principles, applications, and challenges." Annu Rev Biomed Eng **16**.
- Yelin, D. and Y. Silberberg (1999). "Laser scanning third-harmonic-generation microscopy in biology." Opt Express **5**(8): 169-175.
- Zaharoff, D., R. Barr, et al. (2002). "Electromobility of plasmid DNA in tumor tissues during electric field-mediated gene delivery." Gene Ther **9**(19): 1286.
- Zaharoff, D. A., R. C. Barr, et al. (2002). "Electromobility of plasmid DNA in tumor tissues during electric field-mediated gene delivery." Gene Ther **9**(19): 1286-1290.
- Zahouani, H., C. Paillet-Mattei, et al. (2009). "Characterization of the mechanical properties of a dermal equivalent compared with human skin *in vivo* by indentation and static friction tests." Skin Res Technol **15**(1): 68-76.
- Zhang, L., S. Lerner, et al. (1999). "Electroporation-mediated topical delivery of vitamin C for cosmetic applications." Bioelectrochemistry and bioenergetics **48**(2): 453-461.
- Zhang, L., L. Li, et al. (1996). "Depth-targeted efficient gene delivery and expression in the skin by pulsed electric fields: an approach to gene therapy of skin aging and other diseases." Biochem Biophys Res Commun **220**(3): 633-636.
- Zhang, L., E. Nolan, et al. (2002). "Enhanced delivery of naked DNA to the skin by non-invasive *in vivo* electroporation." Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects **1572**(1): 1-9.

IX. ANNEXE 1 (FRANSEN, GIBOT ET AL. 2015)

RESEARCH ARTICLE

Calcium Electroporation: Evidence for Differential Effects in Normal and Malignant Cell Lines, Evaluated in a 3D Spheroid Model

Stine Krog Frandsen¹✉, Laure Gibot^{2,3}✉, Moinecha Madi^{2,3}, Julie Gehl^{1*}, Marie-Pierre Rols^{2,3*}

1 Center for Experimental Drug and Gene Electrotransfer, Department of Oncology, Copenhagen University Hospital Herlev, 2730 Herlev, Denmark, **2** CNRS, Institut de Pharmacologie et de Biologie Structurale, Toulouse, France, **3** Université de Toulouse, UPS, Institut de Pharmacologie et de Biologie Structurale, Toulouse, France

✉ These authors contributed equally to this work.

* Karen.Julie.Gehl@regionh.dk (JG); Marie-Pierre.Rols@ipbs.fr (MPR)



CrossMark
click for updates

OPEN ACCESS

Citation: Frandsen SK, Gibot L, Madi M, Gehl J, Rols M-P (2015) Calcium Electroporation: Evidence for Differential Effects in Normal and Malignant Cell Lines, Evaluated in a 3D Spheroid Model. PLoS ONE 10(12): e0144028. doi:10.1371/journal.pone.0144028

Editor: Boris Rubinsky, University of California at Berkeley, UNITED STATES

Received: July 10, 2015

Accepted: November 12, 2015

Published: December 3, 2015

Copyright: © 2015 Frandsen et al. This is an open access article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution License](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Data Availability Statement: All relevant data are within the paper.

Funding: SKF—grant, University of Copenhagen, The experimental work was performed during the Short-Term Scientific Mission (Grant ECOST-STSM-TD1104-14339) under the networking efforts of COST Action TD1104; LG—grant, ANR Astrid PIERGEN, ANR-12-ASTR-0039-01; MM—grant, Department de Mayotte; JG—research fellow of the Royal Swedish Academy of Science supported by the Acta Oncologica Foundation; MPR—ANR Astrid PIERGEN, ANR-12-ASTR-0039-01. Research was conducted in the scope of the EBAM European

Abstract

Background

Calcium electroporation describes the use of high voltage electric pulses to introduce supra-physiological calcium concentrations into cells. This promising method is currently in clinical trial as an anti-cancer treatment. One very important issue is the relation between tumor cell kill efficacy—and normal cell sensitivity.

Methods

Using a 3D spheroid cell culture model we have tested the effect of calcium electroporation and electrochemotherapy using bleomycin on three different human cancer cell lines: a colorectal adenocarcinoma (HT29), a bladder transitional cell carcinoma (SW780), and a breast adenocarcinoma (MDA-MB231), as well as on primary normal human dermal fibroblasts (HDF-n).

Results

The results showed a clear reduction in spheroid size in all three cancer cell spheroids three days after treatment with respectively calcium electroporation ($p < 0.0001$) or electrochemotherapy using bleomycin ($p < 0.0001$). Strikingly, the size of normal fibroblast spheroids was neither affected after calcium electroporation nor electrochemotherapy using bleomycin, indicating that calcium electroporation, like electrochemotherapy, will have limited adverse effects on the surrounding normal tissue when treating with calcium electroporation. The intracellular ATP level, which has previously been shown to be depleted after calcium electroporation, was measured in the spheroids after treatment. The results showed a dramatic decrease in the intracellular ATP level ($p < 0.01$) in all four spheroid types—malignant as well as normal.

Associated Laboratory. This report is the result of networking efforts of COST Action TD1104 (<http://www.electroporation.net>). The funders had no role in the study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Competing Interests: Two of the authors on this paper, Stine Krog Frandsen and Julie Gehl, have submitted a patent (Therapeutic applications of calcium electroporation to effectively induce tumour necrosis; EU #11195435.0 and USA #6L/579,775). This does not alter the authors' adherence to all PLOS ONE policies on sharing data and materials.

Conclusion

In conclusion, calcium electroporation seems to be more effective in inducing cell death in cancer cell spheroids than in a normal fibroblast spheroid, even though intracellular ATP level is depleted in all spheroid types after treatment. These results may indicate an important therapeutic window for this therapy; although further studies are needed *in vivo* and in patients to investigate the effect of calcium electroporation on surrounding normal tissue when treating tumors.

Introduction

Electroporation or electropermeabilization is a method to generate transient permeabilization of the cell membrane by applying short, intense electric pulses [1]. The method can be used to facilitate transport of normally non-permeant ions or molecules into most cell types [2]. This method is used in the clinic in combination with chemotherapeutic drugs (electrochemotherapy) where the effect of the drug is increased drastically [2–5]. Due to common side effects of most chemotherapeutic drugs including bleomycin [6]; it is appealing to be able to use non-toxic molecules or ions that will induce cell death, when they are internalized into the cells in high concentration by electroporation. Calcium is a tightly regulated ubiquitous second messenger that is involved in regulation of transcription, metabolism, proliferation, apoptosis, necrosis, and many other cellular processes [7–9]. Calcium electroporation, where calcium is introduced into the cell cytosol by electroporation, has previously been shown to efficiently induce cell death *in vitro* and *in vivo* associated with acute ATP depletion [10], using electroporation parameters similar to those used for electrochemotherapy [11]. Calcium electroporation is currently in clinical trial (ClinicalTrials.gov ID- NCT01941901) for cutaneous metastasis where the response of the treatment will be compared with the response of electrochemotherapy using bleomycin, which is a clinically used anti-cancer treatment [12,13]. Calcium electroporation has been proven efficient in cell death of cancer cells but the effect on a broader range of tumor cell lines and on normal cells has not previously been investigated. We have tested the effect of calcium electroporation and electrochemotherapy using bleomycin in four different human cell spheroids (three cancer cell lines and one normal primary cell type) in order to investigate any difference in sensitivity between the different cell types. We chose using 3D spheroids as an *in vivo*-like model of tumors, a system which has previously been used for electroporation and electrochemotherapy studies [14,15].

Materials and Methods

Chemicals

Propidium iodide (PI; Sigma-Aldrich), bleomycin sulfate (Bleo; Merck-Millipore), and calcium chloride (Ca; SAD, Denmark).

Cell culture

Three human cancer cell lines and one normal human cell type were used in this study. HT29 cells (ATCC #HTB-38), from a human colorectal adenocarcinoma, were grown in RPMI-1640 culture medium (Gibco, Invitrogen). SW780 (kindly provided by Dr. Lars Dyrskjot Andersen, Department of Molecular Medicine, Aarhus University Hospital, Skejby, Denmark), a human bladder transitional cell carcinoma [16], MDA-MB-231 (ATCC #HTB-26), a human breast

adenocarcinoma, and human dermal fibroblasts HDF-n (ScienCell #2310) were grown in DMEM culture medium (Gibco, Invitrogen). All cells grew with 10% fetal calf serum (Gibco, Invitrogen) and 100 U/ml penicillin and 100 µg/ml streptomycin, and all tested negative for mycoplasma using MycoAlert mycoplasma detection kit (Lonza). Cells were maintained at 37°C in a humidified atmosphere containing 5% CO₂.

Spheroid formation

Spheroids were produced with a non-adherent technique as previously described [14]. Briefly, 5000 cells were seeded in ultra-low attachment 96-well plates (Corning, Fisher Scientific) that were centrifuged 5 min at 4°C at 300 g. Spheroids were cultivated for 5 days at 37°C in a humidified atmosphere containing 5% CO₂. Day of treatment was denoted as day 0. The normal dermal fibroblast spheroids were smaller as primary normal cells do not grow as aggressively as cancer cell lines.

Electroporation conditions

One spheroid at the time was incubated 5 min in 100 µl of HEPES buffer (10 mM HEPES, 250 mM sucrose, and 1 mM MgCl₂ in sterile water) with added drug before placed between two stainless steel, flat, parallel electrodes (0.4 cm between electrodes) in 100µl of HEPES buffer with added drug and 8 square-wave pulses of 100 µs, 1 Hz, and 1000 V/cm or 5000 V/cm (applied voltage to electrode distance ratio) were delivered by the Electro cell S20 generator (βTech, France) at room temperature. After treatment, spheroids were rinsed in HEPES buffer and cultivated in cell culture media before analysis. Membrane permeabilization was assessed by pulsing spheroids in the presence of 100 µM propidium iodide after 5 min incubation (1000 V/cm) followed by fluorescence imaging as in [15]. The 1000 V/cm parameters (applied voltage to electrode distance ratio) are the same as the ones used in our previous *in vivo* study [10] and used in the clinical setting [12].

Spheroid growth experiment

After harvesting, spheroids were washed in HEPES buffer and incubated for 5 min in respectively HEPES buffer (control), 168 mM CaCl₂ (as used before [10]), or 1 mM bleomycin (as used before [15]) before electric pulse application or not.

Growth of spheroids was followed by light microscopy before treatment and at day 2, 3, and 4 after treatment using a Leica DMIRB microscope coupled to a coolSNAP HQ camera (Roper Scientific, Photometrics) and size determined using Image J software (NIH, Bethesda, USA). The normalized area was expressed as the ratio of the post-treatment spheroid 2D area compared to the area before treatment as in [14,15].

Differences in normalized areas in the 6 treatment groups were evaluated as repeated measurements, validated and analysed with an exponential decrease model with Bonferroni correction using SAS software version 9.2. 'Group', 'days' and 'spheroid' were considered factors and baseline level of spheroid area as covariant.

Viability

Four days after treatment, spheroids were incubated for 30 min at 37°C with 2 µM Calcein-AM and 4 µM EthD-1 (LIVE/DEAD viability/cytotoxicity kit, Invitrogen). In living cells, active intracellular esterase cleaves the calcein-AM to intensely fluorescent calcein, which is retained within cells with membrane integrity. Fluorescence was observed using a Leica DMIRB microscope coupled to a coolSNAP HQ camera (Roper Scientific, Photometrics). In order to

compare pictures, fluorescence intensities were normalized using the maximum value, using Image J software (NIH, Bethesda, USA).

MDA-MB231 spheroids could not be tested since the spheroids were destroyed after both calcium electroporation and electrochemotherapy using bleomycin, and therefore transfer of the spheroids at day 4 to do live/dead staining could not be performed.

ATP assay

Spheroids of the four cell types were electroporated as described above with 168 mM calcium. Spheroids electroporated with HEPES buffer, non-electroporated spheroids incubated with 168 mM calcium and untreated spheroids were used as controls. Additionally, one group of spheroids was exposed to very high voltage electroporation (8 pulses of 100 μ s, 5000 V/cm, and 1 Hz); the highest electric field possible to apply with the used equipment and with the electrode geometry employed. This was done with the aim of examining cell death but results showed that this high electric field was not sufficient for complete cell death. Spheroids were lysed 1, 4, 24, and 72 hours after treatment with 100 μ L of lysis buffer (50 mM TRIS pH 8, 1 mM EDTA, 0.5% Tween20), and ATP content determined by adding 100 μ L rL/L Reagent (ENLITEN ATP Assay, Promega) and measuring light emission using a luminometer (Clariostar, BMG). Difference in ATP level after different treatments was assessed by 2-way ANOVA with post least-squares-means test with Bonferroni correction.

Results and Discussion

Calcium electroporation seemingly had no effect on the size of the human fibroblast spheroids compared with untreated controls, but efficiently reduced the size of the three different cancer cell spheroids compared with untreated controls ($p < 0.0001$ three days after treatment), at least as efficiently as electrochemotherapy using bleomycin ($p < 0.0001$ three days after treatment; [Fig 1](#)). Although the effect of calcium electroporation appears to be superior to the effect of electrochemotherapy using bleomycin in two of the cancer cell spheroids (HT29 and SW780), this could be due to the chosen concentrations (168 mM CaCl_2 as previously used *in vivo* [10] and 1 mM bleomycin as previously used in spheroids [15]).

As seen in [Fig 1](#), despite seeded at the same density, the spheroids differ in size on the day of treatment with the fibroblast spheroids being the smallest (182 \pm 9 μ m in diameter) followed by the breast cancer spheroids being 321 \pm 15 μ m in diameter and the bladder cancer and colon cancer spheroids being the largest (514 \pm 17 μ m and 628 \pm 17 μ m in diameter, respectively). It has previously been shown that the size of the spheroids affects the sensitivity to electroporation with the smaller spheroids being most sensitive [14]. The fibroblast spheroids should therefore be more permeabilized and more affected than the cancer cell spheroids which are not the case (as described later and seen in [Fig 1](#)). Thus, in spite of the smaller size the fibroblast spheroids seem to be less sensitive to calcium electroporation than the cancer cell spheroids. It is also seen that the untreated normal cell spheroids decreased slightly in size over time indicating that these cells do not continue to grow over time as cancer cells. The breast cancer cell spheroids decreased in size over time likely because this is a metastasizing cell line, thus the cells easier detach from each other.

To investigate whether cells in the spheroids were dead or alive after treatment, the spheroids were examined using a viability/cytotoxicity assay where living cells were stained with calcein-AM and dead cells were stained with EthD-1 ([Fig 2](#)). The normal fibroblast spheroids stained with calcein irrespective of treatment, showing that many of the cells in these spheroids were still viable after the different treatments albeit with few cells staining EthD-1 indicating cell death. This could be due to the natural turn-over of these cells, and the amount of dead

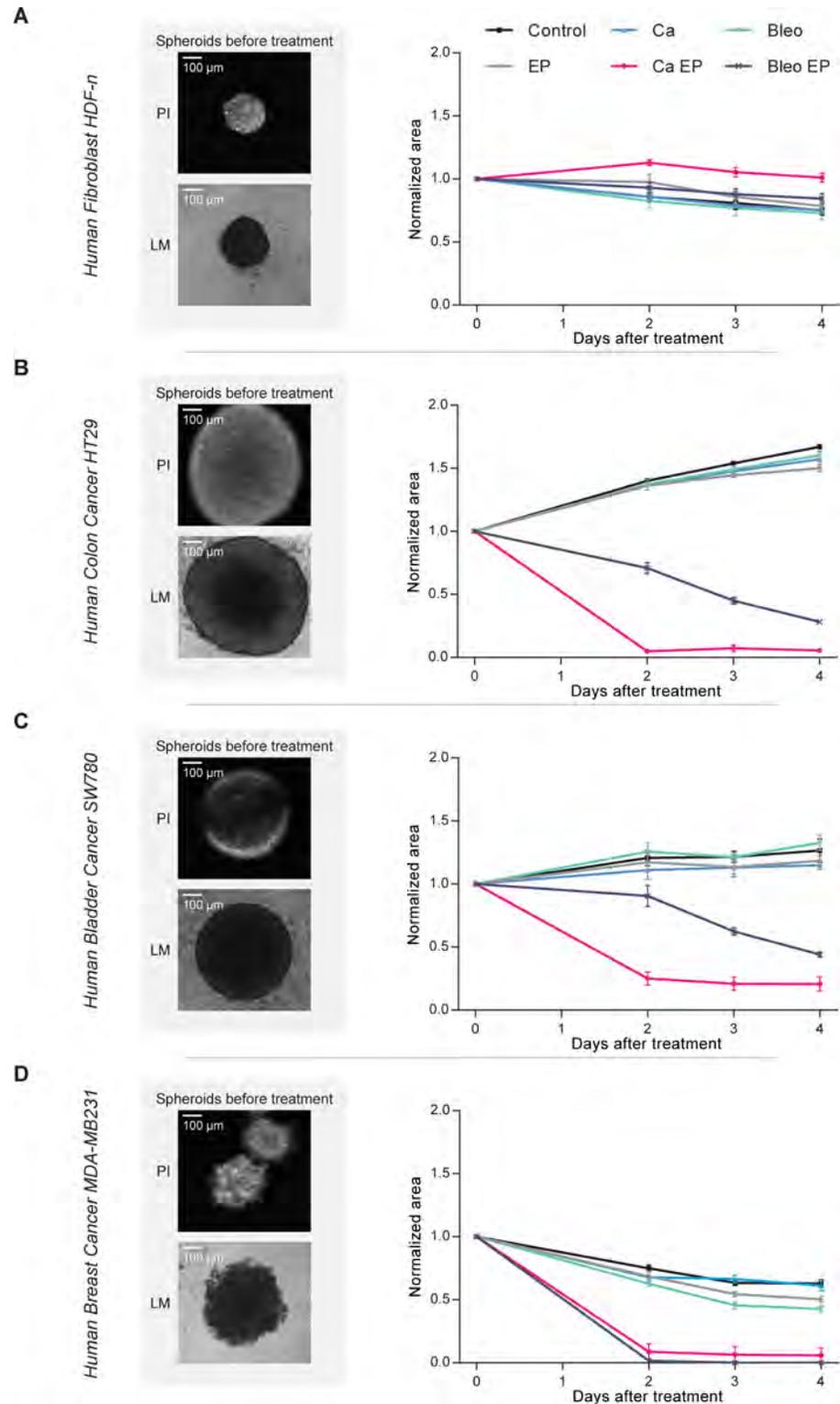


Fig 1. Spheroid size. Size measurements of human normal dermal fibroblast (A), colon cancer (B), bladder cancer (C), and metastatic breast cancer (D) spheroids. Left panel: representative fluorescence microscopy images of a spheroid just after electroporation (8 pulses of 100 μ s, 1000 V/cm, and 1 Hz) in buffer containing propidium iodide (PI) to visualize electroporated cells and light microscopy images of another spheroid just before treatment (LM). Right panel: Growth curves of the spheroids after treatment with respectively 168

mM calcium (Ca), 1 mM bleomycin (Bleo), electroporation (EP), 168 mM calcium electroporation (Ca EP), electrochemotherapy using 1 mM bleomycin (Bleo EP), and untreated controls (Control). Measurements performed before treatment and at day 2, 3, and 4. Spheroid size is normalized to the size before treatment, means \pm SD, $n = 5-6$.

doi:10.1371/journal.pone.0144028.g001

cells seems to be comparable in control as well as in treated spheroids. When looking at the colon cancer spheroids, it is clearly seen that there was a high death rate (low calcein staining and high EthD-1 staining) in the spheroids treated with calcium electroporation and electrochemotherapy using bleomycin. It is also seen that electroporation alone caused dissociation of some of the cells on the outer surface of the spheroid but did not kill the cells. Live/dead staining of the bladder cancer spheroids showed, similar to staining of that cell line with propidium iodide (Fig 1), that the dyes did not enter the spheroid. This could be due to tight junctions in the bladder cancer cell line.

Electrochemotherapy using bleomycin has a therapeutic window, where tumors are much more sensitive to electrochemotherapy than normal cells [17–19], thus the limited effect of electrochemotherapy using bleomycin on the normal fibroblast spheroids was expected. Interestingly, our present study could indicate that also treatment with calcium electroporation affects malignant and normal cells differentially.

ATP levels were previously shown to be acutely and severely depleted after electroporation alone as well as after calcium electroporation. The electroporated cells have re-established the ATP level 4 hours after treatment whereas in cells treated with calcium electroporation the ATP level stayed low for up to 8 hours after treatment [10]. The intracellular ATP level in the spheroids after calcium electroporation was measured (Fig 3) to investigate if the difference in sensitivity between cancer and normal cells could partly be explained by a difference in intracellular ATP level after treatment. Intriguingly, we found a dramatic decrease in ATP level both in cancer and normal cells after treatment with calcium electroporation ($p < 0.01$). Thus, the effect of calcium electroporation on the intracellular ATP level cannot explain the difference in sensitivity; however the normal cells seem able to survive this decrease in ATP level whereas the highly metabolically active cancer cells do not. The amount of ATP per spheroid differs up to a 100 fold between the different cell spheroids likely due to the difference in size between the different spheroid types. In addition, we applied high voltage electroporation treatment, attempting to induce cell death. The intracellular ATP was actually not totally depleted in all these spheroids, indicating that all of the cells were not dead. Indeed, calcium electroporation significantly affected the intracellular ATP level more than treatment with high voltage pulses in the cancer cell spheroids ($p < 0.0001$).

The electroporation parameters used in this study (8 pulses of 100 μ s, 1000 V/cm (applied voltage to electrode distance ratio), and 1 Hz) is the same as the clinically used electroporation parameters. The linear array electrode is used in the clinic [20] and has 4 mm in distance between the electrodes exactly like the plate electrode used in this study. To test if the parameters caused permeabilization of the cells in the spheroid model, the spheroids were electroporated in the presence of propidium iodide (Fig 1). This showed that the cells were permeabilized using these parameters in accordance with previous work showing that all the cells within spheroids, even those in the center, were permeabilized after electric pulses application [15]. Cells in the center of the spheroids can be up to 19% smaller than the peripheral cells [21] and the different cell types differ in size, however cell size should not affect the sensitivity to treatment since all the cells in the spheroids were permeabilized (Fig 1). Interestingly, propidium iodide (668 Da) was not detected in all of the cells in the bladder cancer (SW780) spheroid. This could be explained by the presence of tight and adherent junctions in this epithelial

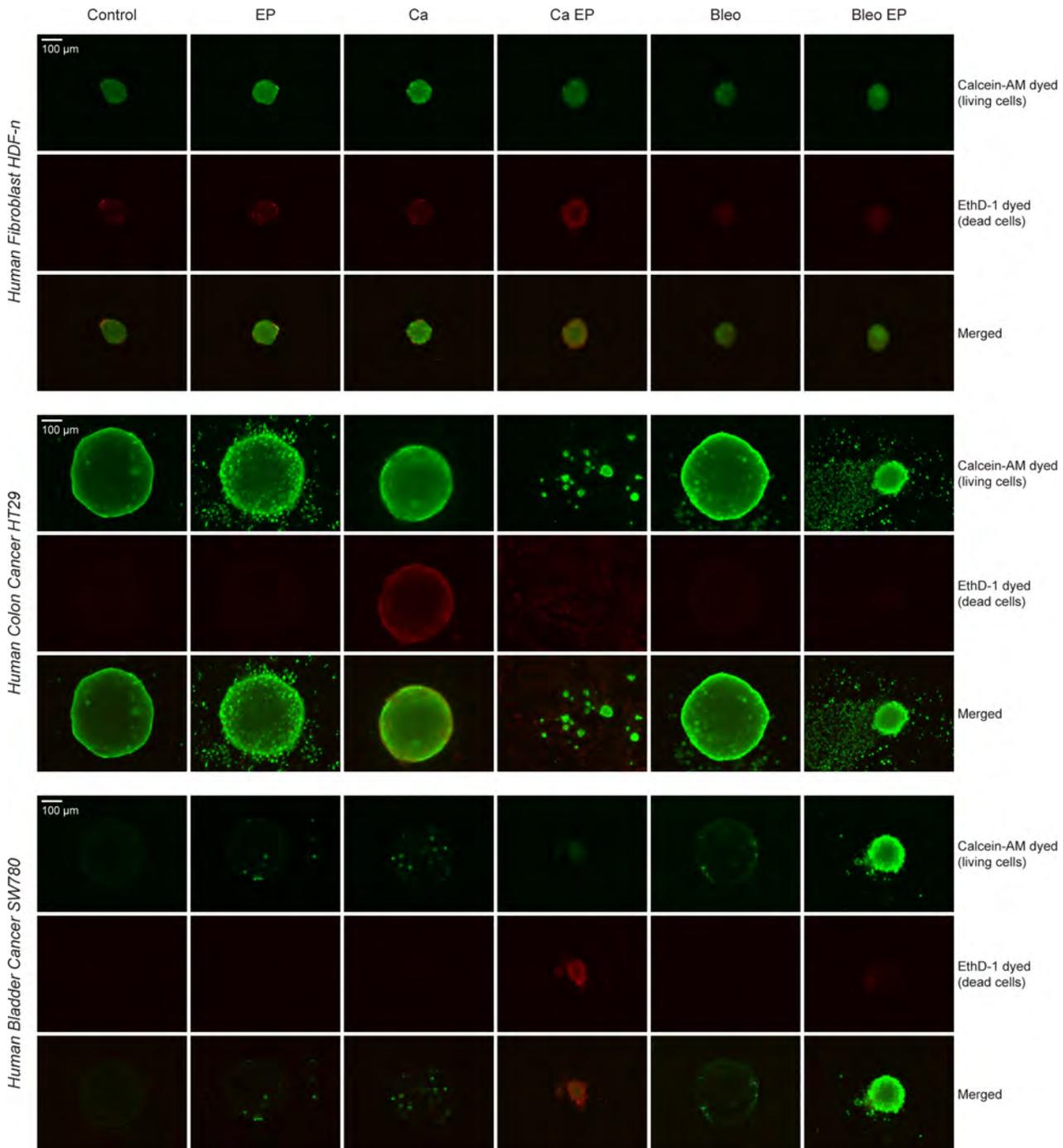


Fig 2. Live/dead staining. Live/dead staining with Calcein-AM and EthD-1 of human normal dermal fibroblast, colon cancer, and bladder cancer spheroids 4 days after treatment with 168 mM calcium (Ca), 1 mM bleomycin (Bleo), electroporation (EP; 8 pulses of 100 μ s, 1000 V/cm, and 1 Hz), 168 mM calcium electroporation (Ca EP), or electrochemotherapy using 1 mM bleomycin (Bleo EP), and of untreated controls (Control). Upper panels are calcein-AM staining (living cells), middle panels are EthD-1 staining (dead cells), and lower panels are merged images of living (green) and dead (red) cells.

doi:10.1371/journal.pone.0144028.g002

bladder cell line impeding diffusion of propidium iodide into the center of the spheroid. Indeed, bladder epithelial cells are known to display tight junctions playing a critical role in the maintenance of a physiological, impermeable, urine-blood barrier [22]. This barrier prevents

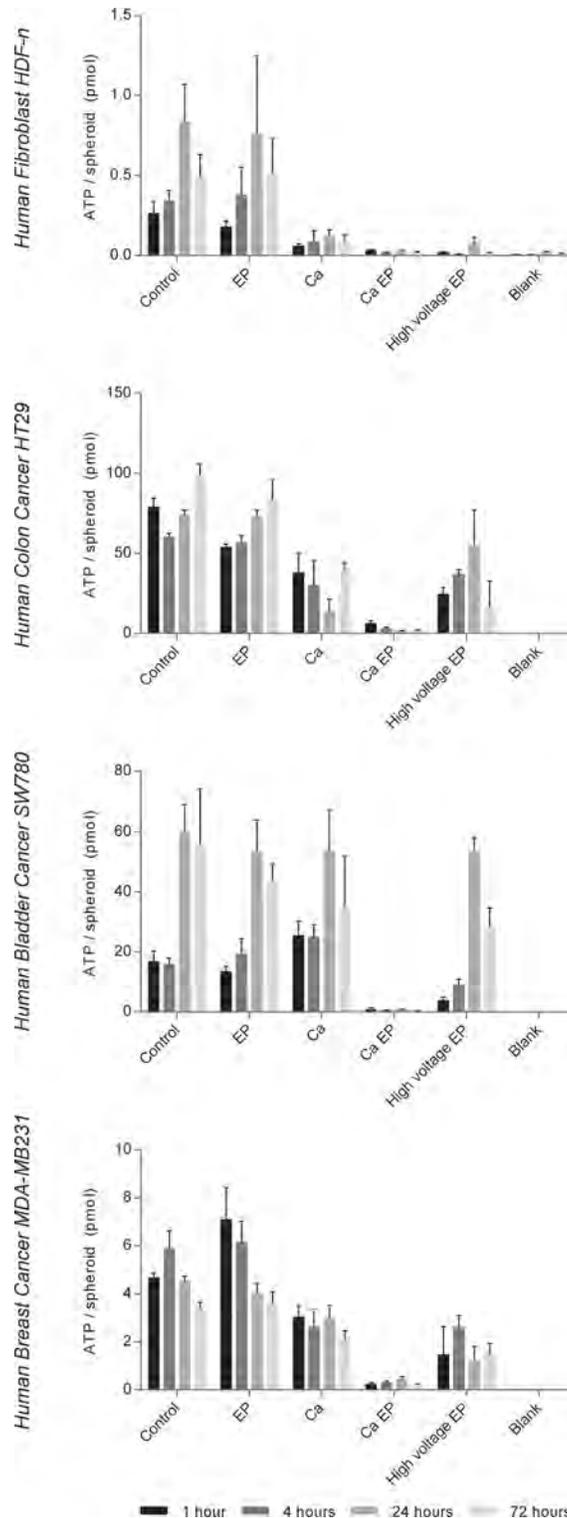


Fig 3. Intracellular ATP level. Intracellular ATP measurements of human normal dermal fibroblast, colon cancer, bladder cancer, and breast cancer spheroids 1, 4, 24, and 72 hours after treatment with 168 mM calcium (Ca), electroporation (EP; 8 pulses of 100 μ s, 1000 V/cm, and 1 Hz), 168 mM calcium electroporation (Ca EP), high voltage EP (8 pulses of 100 μ s, 5000 V/cm, and 1 Hz), and of untreated controls (Control). Means + SD, n = 3–5 (n = 2 for blank). Please note the difference in the y-axes.

doi:10.1371/journal.pone.0144028.g003

passage of ions and solutes between the urine and the blood. This could also explain the lack of live/dead staining in this spheroid type (Fig 2). However, the spheroids were clearly affected by calcium electroporation and electrochemotherapy using bleomycin indicating that these drugs, with electroporation, are able to enter the cells in the spheroid. The bladder cancer spheroids treated with calcium electroporation or electrochemotherapy using bleomycin showed more labeling after live/dead staining than spheroids treated with the other conditions. It could be that electroporation with these drugs loosens or alters tight junctions, however more research is needed. Indeed, bladder cancer is a likely novel target for electrochemotherapy or calcium electroporation [23,24].

Electrochemotherapy using bleomycin is used in the clinic for treatment of cutaneous metastasis of all histologies [5,13,18,25]. Calcium electroporation is currently being investigated in a double-blinded randomized clinical trial, where intratumoral injection of either bleomycin or calcium followed by electroporation is evaluated for response. It has previously been shown that when treating cutaneous metastasis with electrochemotherapy the surrounding normal tissue is much less affected [18]. However, the effect of calcium electroporation on normal cells has not been investigated. Here, we have shown that both calcium electroporation and electrochemotherapy using bleomycin effectively induce cell death in the tested cancer cell spheroids but the treatments do not seem to affect the normal fibroblast spheroids to the same degree even though a similar loss of intracellular ATP level was observed in all cell lines. Reasons for this apparent discrepancy in sensitivity to calcium electroporation between malignant and normal cells could be differences in calcium signaling pathways [26], calcium channel expression [27], cell death pathways [28], and other phenomena e.g. effects on the microtubule system [29] or membrane repair system [30]. The discrepancy could also be due to difference in the active calcium transport [31,32] such as the expression of the plasma membrane calcium ATPases. Further investigations are needed to understand the cell death pathway of calcium electroporation and the difference in sensitivity.

The perspectives for calcium electroporation are many since electroporation based treatments are increasingly used to treat cutaneous metastases [5,13], in guidelines for treatment of cutaneous tumors [33], and also increasingly used for tumors in internal organs e.g. for liver, brain, and bone metastases [2,4,34]. Several clinical trials are ongoing for irreversible electroporation in treatment of tumors in internal organs [35–38] and the treatment field in irreversible electroporation may be enlarged using calcium as an adjuvant. Furthermore, calcium electroporation may be of particular interest since it can be used directly by interventional radiologists and surgeons since oncologists are not required for application of this novel treatment.

In conclusion, calcium electroporation is a novel, efficient, simple, and inexpensive procedure, showing very promising results in preclinical studies, and is currently in clinical trial. The finding of a differential effect to calcium electroporation in malignant and normal cell spheroids is promising and further research is needed to verify this on other normal cell types as well as *in vivo* and in patients to validate the findings and to understand the mechanism behind this difference.

Author Contributions

Conceived and designed the experiments: SKF LG JG MPR. Performed the experiments: SKF LG MM. Analyzed the data: SKF LG. Contributed reagents/materials/analysis tools: JG MPR. Wrote the paper: SKF LG MM JG MPR.

References

1. Yarmush ML, Golberg A, Sersa G, Kotnik T, Miklavcic D. Electroporation-based technologies for medicine: principles, applications, and challenges. *Annu Rev Biomed Eng.* 2014; 16: 295–320. doi: [10.1146/annurev-bioeng-071813-104622](https://doi.org/10.1146/annurev-bioeng-071813-104622) PMID: [24905876](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24905876/)

2. Kee ST, Gehl J, and Lee EW. *Clinical Aspects of Electroporation*. 1st. New York: Springer; 2011.
3. Orłowski S, Belehradek J, Paoletti C, Mir LM. Transient Electroporation of Cells in Culture—Increase of the Cyto-Toxicity of Anticancer Drugs. *Biochemical Pharmacology*. 1988; 37: 4727–4733. PMID: [2462423](#)
4. Miklavcic D, Sersa G, Breclj E, Gehl J, Soden D, Bianchi G et al. Electrochemotherapy: technological advancements for efficient electroporation-based treatment of internal tumors. *Med Biol Eng Comput*. 2012; 50: 1213–1225. doi: [10.1007/s11517-012-0991-8](#) PMID: [23179413](#)
5. Spratt DE, Gordon Spratt EA, Wu S, DeRosa A, Lee NY, Lacouture ME et al. Efficacy of skin-directed therapy for cutaneous metastases from advanced cancer: a meta-analysis. *J Clin Oncol*. 2014; 32: 3144–3155. doi: [10.1200/JCO.2014.55.4634](#) PMID: [25154827](#)
6. Fyfe AJ, McKay P. Toxicities associated with bleomycin. *J R Coll Physicians Edinb*. 2010; 40: 213–215. doi: [10.4997/JRCPE.2010.306](#) PMID: [21127762](#)
7. Carafoli E, Santella L, Branca D, Brini M. Generation, control, and processing of cellular calcium signals. *Crit Rev Biochem Mol Biol*. 2001; 36: 107–260. PMID: [11370791](#)
8. Berridge MJ, Bootman MD, Roderick HL. Calcium signalling: Dynamics, homeostasis and remodelling. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. 2003; 4: 517–529. PMID: [12838335](#)
9. Zhivotovsky B, Orrenius S. Calcium and cell death mechanisms: A perspective from the cell death community. *Cell Calcium*. 2011; 50: 211–221. doi: [10.1016/j.ceca.2011.03.003](#) PMID: [21459443](#)
10. Frandsen SK, Gissel H, Hojman P, Tramm T, Eriksen J, Gehl J. Direct therapeutic applications of calcium electroporation to effectively induce tumor necrosis. *Cancer Res*. 2012; 72: 1336–1341. doi: [10.1158/0008-5472.CAN-11-3782](#) PMID: [22282658](#)
11. Frandsen SK, Gissel H, Hojman P, Eriksen J, Gehl J. Calcium electroporation in three cell lines: a comparison of bleomycin and calcium, calcium compounds, and pulsing conditions. *Biochim Biophys Acta*. 2014; 1840: 1204–1208. doi: [10.1016/j.bbagen.2013.12.003](#) PMID: [24342489](#)
12. Mir LM, Gehl J, Sersa G, Collins CG, Garbay JR, Billard V et al. Standard operating procedures of the electrochemotherapy: Instructions for the use of bleomycin or cisplatin administered either systemically or locally and electric pulses delivered by the Cliniporator (TM) by means of invasive or non-invasive electrodes. *Eur J Cancer Supplements*. 2006; 4: 14–25.
13. Electrochemotherapy for metastases in the skin from tumours of non-skin origin (IPG446). NICE—National Institute for Health and Care Excellence. 2013. Available: <http://guidance.nice.org.uk/IPG446>.
14. Gibot L, Rols MP. 3D spheroids' sensitivity to electric field pulses depends on their size. *J Membr Biol*. 2013; 246: 745–750. doi: [10.1007/s00232-013-9535-x](#) PMID: [23519620](#)
15. Gibot L, Wasungu L, Teissie J, Rols MP. Antitumor drug delivery in multicellular spheroids by electroporation. *J Control Release*. 2013; 167: 138–147. doi: [10.1016/j.jconrel.2013.01.021](#) PMID: [23385033](#)
16. Herbsleb M, Birkenkamp-Demtroder K, Thykjaer T, Wiuf C, Hein AM, Orntoft TF et al. Increased cell motility and invasion upon knockdown of lipolysis stimulated lipoprotein receptor (LSR) in SW780 bladder cancer cells. *BMC Med Genomics*. 2008; 1: 31. doi: [10.1186/1755-8794-1-31](#) PMID: [18647386](#)
17. Heller R, Coppola D, Pottinger C, Gilbert R, Jaroszeski MJ. Effect of electrochemotherapy on muscle and skin. *Technology in cancer research & treatment*. 2002; 1: 385–391.
18. Marty M, Sersa G, Garbay JR, Gehl J, Collins CG, Snoj M et al. Electrochemotherapy—An easy, highly effective and safe treatment of cutaneous and subcutaneous metastases: Results of ESOPÉ (European Standard Operating Procedures of Electrochemotherapy) study. *Ejc Supplements*. 2006; 4: 3–13.
19. Agerholm-Larsen B, Iversen HK, Ibsen P, Moller JM, Mahmood F, Jensen KS et al. Preclinical validation of electrochemotherapy as an effective treatment for brain tumors. *Cancer Res*. 2011; 71: 3753–3762. doi: [10.1158/0008-5472.CAN-11-0451](#) PMID: [21507935](#)
20. Matthiessen LW, Chalmers RL, Sainsbury DC, Veeramani S, Kessell G, Humphreys AC et al. Management of cutaneous metastases using electrochemotherapy. *Acta Oncol*. 2011; 50: 621–629. doi: [10.3109/0284186X.2011.573626](#) PMID: [21574833](#)
21. Canatella PJ, Black MM, Bonnicksen DM, McKenna C, Prausnitz MR. Tissue electroporation: quantification and analysis of heterogeneous transport in multicellular environments. *Biophys J*. 2004; 86: 3260–3268. PMID: [15111439](#)
22. Haynes MD, Martin TA, Jenkins SA, Kynaston HG, Matthews PN, Jiang WG. Tight junctions and bladder cancer (review). *Int J Mol Med*. 2005; 16: 3–9. PMID: [15942671](#)
23. Vasquez JL, Gehl J, Hermann GG. Electroporation enhances mitomycin C cytotoxicity on T24 bladder cancer cell line: a potential improvement of intravesical chemotherapy in bladder cancer. *Bioelectrochemistry*. 2012; 88: 127–133. doi: [10.1016/j.bioelechem.2012.08.001](#) PMID: [22940093](#)

24. Vasquez JL, Ibsen P, Lindberg H, Gehl J. In vitro and in vivo experiments on electrochemotherapy for bladder cancer. *J Urol*. 2015; 193: 1009–1015. doi: [10.1016/j.juro.2014.09.039](https://doi.org/10.1016/j.juro.2014.09.039) PMID: [25245485](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25245485/)
25. Matthiessen LW, Johannesen HH, Hendel HW, Moss T, Kamby C, Gehl J. Electrochemotherapy for large cutaneous recurrence of breast cancer: a phase II clinical trial. *Acta Oncol*. 2012; 51: 713–721. doi: [10.3109/0284186X.2012.685524](https://doi.org/10.3109/0284186X.2012.685524) PMID: [22731832](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22731832/)
26. Berchtold MW, Villalobo A. The many faces of calmodulin in cell proliferation, programmed cell death, autophagy, and cancer. *Biochim Biophys Acta*. 2014; 1843: 398–435. doi: [10.1016/j.bbamcr.2013.10.021](https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2013.10.021) PMID: [24188867](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24188867/)
27. Dubois C, Vanden Abeele F, Lehen'kyi V, Gkika D, Guarmit B, Lepage G et al. Remodeling of channel-forming ORAI proteins determines an oncogenic switch in prostate cancer. *Cancer Cell*. 2014; 26: 19–32. doi: [10.1016/j.ccr.2014.04.025](https://doi.org/10.1016/j.ccr.2014.04.025) PMID: [24954132](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24954132/)
28. Vandenabeele P, Galluzzi L, Vanden Berghe T, Kroemer G. Molecular mechanisms of necroptosis: an ordered cellular explosion. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2010; 11: 700–714. doi: [10.1038/nrm2970](https://doi.org/10.1038/nrm2970) PMID: [20823910](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20823910/)
29. Thompson GL, Roth CC, Dalzell DR, Kuipers M, Ibey BL. Calcium influx affects intracellular transport and membrane repair following nanosecond pulsed electric field exposure. *J Biomed Opt*. 2014; 19: 055005. doi: [10.1117/1.JBO.19.5.055005](https://doi.org/10.1117/1.JBO.19.5.055005) PMID: [24825506](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24825506/)
30. Mellgren RL, Miyake K, Kramerova I, Spencer MJ, Bourg N, Bartoli M et al. Calcium-dependent plasma membrane repair requires m- or mu-calpain, but not calpain-3, the proteasome, or caspases. *Biochim Biophys Acta*. 2009; 1793: 1886–1893. doi: [10.1016/j.bbamcr.2009.09.013](https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2009.09.013) PMID: [19781581](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19781581/)
31. Aung CS, Kruger WA, Poronnik P, Roberts-Thomson SJ, Monteith GR. Plasma membrane Ca²⁺ +-ATPase expression during colon cancer cell line differentiation. *Biochem Biophys Res Commun*. 2007; 355: 932–936. PMID: [17321497](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17321497/)
32. Papp B, Brouland JP, Arbabian A, Gelebart P, Kovacs T, Bobe R et al. Endoplasmic reticulum calcium pumps and cancer cell differentiation. *Biomolecules*. 2012; 2: 165–186. doi: [10.3390/biom2010165](https://doi.org/10.3390/biom2010165) PMID: [24970132](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24970132/)
33. Stratigos A, Garbe C, Lebbe C, Malvehy J, Del M, V, Pehamberger H et al. Diagnosis and treatment of invasive squamous cell carcinoma of the skin: European consensus-based interdisciplinary guideline. *Eur J Cancer*. 2015; 51: 1989–2007. doi: [10.1016/j.ejca.2015.06.110](https://doi.org/10.1016/j.ejca.2015.06.110) PMID: [26219687](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26219687/)
34. Edhemovic I, Breclj E, Gasljevic G, Marolt MM, Gorjup V, Mali B et al. Intraoperative electrochemotherapy of colorectal liver metastases. *J Surg Oncol*. 2014; 110: 320–327. doi: [10.1002/jso.23625](https://doi.org/10.1002/jso.23625) PMID: [24782355](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24782355/)
35. Neal RE, Rossmeisl JH Jr., Garcia PA, Lanz OI, Henao-Guerrero N, Davalos RV. Successful treatment of a large soft tissue sarcoma with irreversible electroporation. *J Clin Oncol*. 2011; 29: e372–e377. doi: [10.1200/JCO.2010.33.0902](https://doi.org/10.1200/JCO.2010.33.0902) PMID: [21321291](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21321291/)
36. Neal RE, Millar JL, Kavnaudias H, Royce P, Rosenfeldt F, Pham A et al. In vivo characterization and numerical simulation of prostate properties for non-thermal irreversible electroporation ablation. *Prostate*. 2014; 74: 458–468. doi: [10.1002/pros.22760](https://doi.org/10.1002/pros.22760) PMID: [24442790](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24442790/)
37. Scheffer HJ, Nielsen K, de Jong MC, van Tilborg AA, Vieveen JM, Bouwman AR et al. Irreversible electroporation for nonthermal tumor ablation in the clinical setting: a systematic review of safety and efficacy. *J Vasc Interv Radiol*. 2014; 25: 997–1011. doi: [10.1016/j.jvir.2014.01.028](https://doi.org/10.1016/j.jvir.2014.01.028) PMID: [24656178](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24656178/)
38. Jiang C, Davalos RV, Bischof JC. A review of basic to clinical studies of irreversible electroporation therapy. *IEEE Trans Biomed Eng*. 2015; 62: 4–20. PMID: [25389236](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25389236/)

X. ANNEXE 2 (PILLET, GIBOT ET AL. 2017)

Importance of endogenous extracellular matrix in biomechanical properties of human skin model

This content has been downloaded from IOPscience. Please scroll down to see the full text.

2017 Biofabrication 9 025017

(<http://iopscience.iop.org/1758-5090/9/2/025017>)

View [the table of contents for this issue](#), or go to the [journal homepage](#) for more

Download details:

IP Address: 193.48.0.3

This content was downloaded on 18/05/2017 at 10:11

Please note that [terms and conditions apply](#).

You may also be interested in:

[Physics of Cancer: The mechanical and structural properties of the microenvironment](#)

C T Mierke

[Physics of Cancer: Cell–cell and cell–matrix adhesion strength, local cell stiffness and forces](#)

C T Mierke

[Biophysical properties of dermal building-blocks affect extra cellular matrix assembly in 3D endogenous macrotissue](#)

F Urciuolo, A Garziano, G Imparato et al.

[Engulfment of ceramic particles by fibroblasts does not alter cell behavior](#)

Pierre-Antoine Faye, Olivier Roualdes, Fabrice Rossignol et al.

[AFM stiffness nanotomography of normal, metaplastic and dysplastic human esophageal cells](#)

A Fuhrmann, J R Staunton, V Nandakumar et al.

[AFM study shows prominent physical changes in elasticity and pericellular layer in human acute leukemic cells due to inadequate cell-cell communication](#)

Natalia V Guz, Sapan J Patel, Maxim E Dokukin et al.

[Manipulation of in vitro collagen matrix architecture for scaffolds of improved physiological relevance](#)

Lauren A Hapach, Jacob A VanderBurgh, Joseph P Miller et al.

[Recellularized human dermis for testing gene electrotransfer ex vivo](#)

Anna A Bulysheva, Nina Burcus, Cathryn Lundberg et al.

Biofabrication



PAPER

Importance of endogenous extracellular matrix in biomechanical properties of human skin model

RECEIVED
12 January 2017

REVISED
12 April 2017

ACCEPTED FOR PUBLICATION
24 April 2017

PUBLISHED
11 May 2017

Flavien Pillet^{1,3}, Laure Gibot^{1,3}, Moinecha Madi¹, Marie-Pierre Rols^{1,4} and Etienne Dague^{2,4}

¹ Institut de Pharmacologie et de Biologie Structurale, Université de Toulouse, CNRS, UPS, Toulouse, France

² LAAS-CNRS, Université de Toulouse, CNRS, Toulouse, France

³ These authors contributed equally to this work.

⁴ Authors to whom any correspondence should be addressed.

E-mail: rols@ipbs.fr and edague@laas.fr

Keywords: AFM, cell sheet, collagen, fibroblast, pheroid, tissue-engineering, self-assembly

Supplementary material for this article is available [online](#)

Abstract

The physical and mechanical properties of cells modulate their behavior such proliferation rate, migration and extracellular matrix remodeling. In order to study cell behavior in a tissue-like environment *in vitro*, it is of utmost importance to develop biologically and physically relevant 3D cell models. Here, we characterized the physical properties of a single cell type growing in configurations of increasing complexity. From one human skin biopsy, primary dermal fibroblasts were isolated and seeded to give monolayer (2D model), spheroid (3D model poor in extracellular matrix) and tissue-engineered cell sheet (3D model rich in endogenous extracellular matrix). Living native human dermis tissue was used as a gold standard. Nanomechanical and viscoelastic properties at the cell scale were measured by atomic force microscopy (AFM) while biphoton microscopy allowed collagen detection by second harmonic generation and scanning electron microscopy helped in model morphological characterization. In all models, fibroblasts presented a similar typical elongated cell shape, with a cytoskeleton well-arranged along the long axis of the cell. However, elastic moduli of the tissue-engineered cell sheet and native dermis tissue were similar and statistically lower than monolayer and spheroid models. We successfully carried out AFM force measurements on 3D models such as spheroids and tissue-engineered cell sheets, as well as on living native human tissue. We demonstrated that a tissue-engineered dermal model recapitulates the mechanical properties of human native dermal tissue unlike the classically used monolayer and spheroid models. Furthermore, we give statistical evidence to indicate a correlation between cell mechanical properties and the presence of collagens in the models studied.

Introduction

Over the past century, cells cultured in two-dimensions (2D) on glass or in Petri dishes served as an invaluable tool in cell biology [1]. Although still widely used and useful, growing cells in flat 2D monolayers on plastic surfaces does not accurately model the *in vivo* state. Nowadays, it is well accepted that 3D cell culture models are more relevant to *in vivo* situations than 2D cell cultures [2–6]. Indeed, 3D cell models exploit more representative spatial, biological, biochemical and biophysical parameters to bridge the gap between *in vitro* and *in vivo* experiments [7–9]. In addition, the presence of extracellular matrix in—3D

models is more relevant, to mimic biochemical and biomechanical properties of cells within tissues [10, 11].

Tissue engineering approaches have been widely used *in vitro* to produce 3D tissue equivalents, especially for skin substitutes [12, 13]. Most of these methods rely on the use of biomaterials to provide a 3D structure, or scaffold, in which living cells are added. For example, fibroblasts, which are the main cell type within the dermis, can be embedded in different types of gel [14]. Although easy to carry out, this method presents some limitations. Fibroblasts seeded within collagen gels remodel them, leading to the phenomenon of collagen matrix contraction [15, 16], making

long-term culture unfeasible. By contrast, scaffold-free tissue-engineering approaches are based on the ability of cells to develop cell–cell interactions and to produce their own endogenous extracellular matrix. Spheroids were developed in the 1980s by Sutherland *et al* and are based on cell aggregation properties when cells are cultured in suspension or in a non-adhesive environment [17]. Nowadays, spheroids are widely used *in vitro* to investigate many aspects of cell biology, especially in cancer studies [18, 19]. However, some studies showed only a weak presence of extracellular matrix within spheroids [20, 21]. The self-assembly approach is an attractive tissue-engineered strategy to produce *in vitro*, complex 3D tissue models rich in endogenous extracellular matrix [22]. The reconstructed tissue produced by the self-assembly technology is called a cell sheet. Thus, it becomes possible to produce reconstructed human dermal tissue, devoid of any exogenous material [23–25]. We previously demonstrated that the primary human dermal fibroblasts reproduce a physiological environment by secreting and organizing a dense, native 3D extracellular matrix rich in organized collagens [26].

In this study, we analyzed the biophysical properties of human dermal fibroblasts grown under configurations of increasing complexity, going from a 2D classical monolayer to living native tissue. For this, we used a cutting edge multiparametric atomic force microscopy (AFM) in liquid which is particularly relevant to perform, morphological and mechanical analyses on live cells and useful to study cell interface properties in various areas, such as in microbiology, pharmacology and oncology [27–29]. However, while performing AFM experiments on cell monolayers is widespread, to the best of our knowledge we were the first to succeed in measuring mechanical forces by AFM in physiologic conditions, on a spheroid model, cell sheet model and fresh native tissue. Hence, our AFM experiments represented a technical challenge. Scanning electron microscopy (SEM) was used to characterize structural organization and architecture of the fibroblasts within the different models. Then, second harmonic generation (SHG) was used to visualize by two-photon microscopy, the organization of fibrillary collagens within extracellular matrix [30].

Our results provide a better understanding of the biophysical organization of each model presented in the next sections.

Results

Cell morphological characterization

Living human primary dermal fibroblasts seeded in distinct growth configurations were observed by optical microscopy during AFM measurements (figure 1). Fibroblasts seeded in monolayers appeared elongated and well spread out (figure 1(a)). Spheroids displayed a round shape with an average diameter of

250 μm (figure 1(b)). Interestingly, no spheroids were taken off during AFM measurements by the passage of the tip. No artifacts with AFM tip were observed (supplementary figure S1 is available online at stacks.iop.org/BF/9/025017/mmedia). Fibroblasts in cell sheets were narrower than those in monolayers (figure 1(c)). They grew in an orientated manner, parallel to each other. No picture of fresh native dermis could be taken as light was unable to pass through the thick tissue. SEM gave a better definition of each model at cell scale (figure 2). In all models, fibroblasts were bipolar and elongated. At higher resolution (images of 10 μm \times 10 μm), cytoskeleton was detectable under the cell surface in all cell models. The cell surface was smooth and no collagen fibers being observed either in monolayers (figure 2(a)) or in the spheroid model (figure 2(b)), whatever the magnification. In the cell sheet model (figure 2(c)) and native dermis tissue (figure 2(d)), cells were embedded in a complex extracellular matrix and were partially covered by large collagen fibers.

Topographic properties of fibroblasts within models of increasing complexity

Quantitative imaging (QI) measurements were performed by AFM to study the morphology in living conditions of various models of human dermal fibroblast. Height AFM images exhibited fibroblast cells from different growth configurations (figure 3). For monolayer (figure 3(a)), spheroid (figure 3(b)) and cell-sheet models (figure 3(c)), cells displayed distinct edges, a smooth surface and had a bipolar, elongated shape. Unfortunately, due to its heterogeneous surface, no 50 μm \times 50 μm pictures was acquired for the dermis tissue, so no conclusion can be reached on global fibroblast shape within this model. Interestingly, in higher resolution images (images of 10 μm \times 10 μm), fibers were observed in the whole region of the cell well-arranged along the long axis of the cell, as previously shown for dermal fibroblasts [31]. Similar fibers were also observed in native dermis (figure 3(d)). These observations confirmed the typical fibroblast morphology for all the *in vitro* cell models studied.

Cytoskeleton motifs revealed by elasticity measurements

Comparative topographic and elasticity studies were carried out by AFM to investigate the cytoskeleton of cells in a monolayer configuration, spheroid, tissue-engineered cell sheet and native dermis (figure 4). Quantitative data were obtained by scanning the area shown in the height AFM images (figure 4(a)). 139 478 curves were recorded, translated into elasticity maps given in Young's Modulus values at 200 nm depth (figure 4(b)), down to 1000 nm (data not shown). In all models, repetitive parallel motifs of cytoskeleton were noted in the cross section of Young's Modulus versus

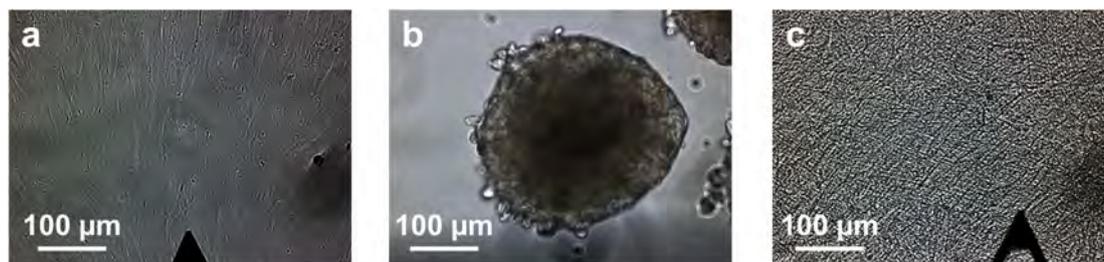


Figure 1. Optical pictures of human dermal fibroblast in various growth configurations. Pictures of fibroblast monolayer (a), spheroid (b) and cell sheet (c) taken during AFM experiments.

distance (figure 4(c)). Analysis by fast Fourier transform (FFT) and filtering highlights the motifs (figure 4(d)). It confirmed the parallel stiff motifs with a periodicity between 0.7 and 1.2 μm . This observation suggests that the motifs visualized correspond to cytoskeleton, as previously described by AFM in dermal fibroblasts grown in a monolayer [31] and observed by fluorescent microscopy in supplementary figure S2.

Cell membrane viscoelastic properties are correlated with collagen within the model

For each model, the Young's Modulus values were calculated at 500 and 1000 nm of indentation from all the force curves (e.g. 36 780 curves from 9 maps in 3 independent monolayers, 53 246 curves from 13 maps in 3 independent spheroids, 36 466 curves from 9 maps in 3 independent cell-sheets and 12 986 curves from 6 maps in native dermis) and expressed as histograms (figures 5(a), (b)). Statistical analyses (table 1) revealed 2 groups of Young's Modulus, a group of low elasticity (around 50 Pa) corresponding to dermis and cell-sheet configurations and a group of higher elasticity (between 100 and 175 Pa) corresponding to spheroid and monolayer configurations. Interestingly, old monolayers grown for 4 weeks without ascorbic acid were also statistically significantly different to the cell-sheet (supplementary figure S3). Multiphoton imaging was used. This non-invasive technology allows at high-resolution imaging of organized fibrillar collagen structures in living models. Monolayer and spheroid models showed a lack of SHG signal (figures 5(c), (d)), which confirms results observed by SEM (figures 2(a), (b)). Cell sheets and native dermis were highly positive for SHG (figures 5(e), (f)), meaning that organized fibrillar collagens were abundant in these models, as previously observed by SEM (figures 2(c), (d)) and by histological analyses of tissue cross sections (supplementary figure S4). Collagen content in each cell model was quantified with Imaris software (supplementary figure S5). Thus, collagens represent $0 \pm 0.0\%$ of monolayer's volume, $0 \pm 0.0\%$ of spheroid's volume, $7 \pm 1.4\%$ of cell sheet's volume and $6 \pm 2\%$ of native dermis's volume.

Discussion

Extracellular matrix mechanical properties synergize with chemical cues to drive cell behavior in culture and acts to establish and maintain tissue homeostasis *in vivo* [32]. Indeed, extracellular matrix was previously thought to serve only a structural and mechanical role by maintaining tissue architecture and providing a support for cell migration. However, nowadays it is recognized that it also provides biomechanical cues influencing a wide range of cell activities (adhesion, differentiation, phenotypic modulation, survival) [10]. Understanding tissue homeostasis requires now an appreciation of cell and tissue level mechanics and is an absolute necessity when designing therapies to treat cancers, chronic diseases or delayed wound healing. Thus, correlating confocal microscopy and atomic force indentation reveals that metastatic cancer cells stiffen during invasion into collagen [33]. AFM applied on sectioned mice-skin enables the connection of the tissue function to the corresponded ultrastructure and revealed tissue structures with a nanoscale resolution, especially in a wound model [34].

It is of utmost importance to develop relevant *in vitro* models providing biomechanical cues. By using cutting-edge advanced microscopies, we examined morphological and mechanical properties of human dermal fibroblasts grown in various cell models, compared to native human dermis tissue.

Our SEM experiments revealed that the cell sheet is the closest model to human dermis, especially in terms of extracellular matrix content. We assumed that the extracellular matrix was mainly composed by fibrillar type I collagen, which is biosynthesized and remodeled by dermal fibroblasts [35]. Highly organized collagen fibrils and fibers are known to provide skin its structural framework and mechanical properties [36]. Interestingly, a correlation between extracellular matrix, gene expression and cell elasticity was recently described by Kim *et al* in human dermal fibroblast monolayers [31]. They showed that a decrease in pro-collagen I mRNA with cell aging is correlated with increased stiffness of dermal fibroblasts.

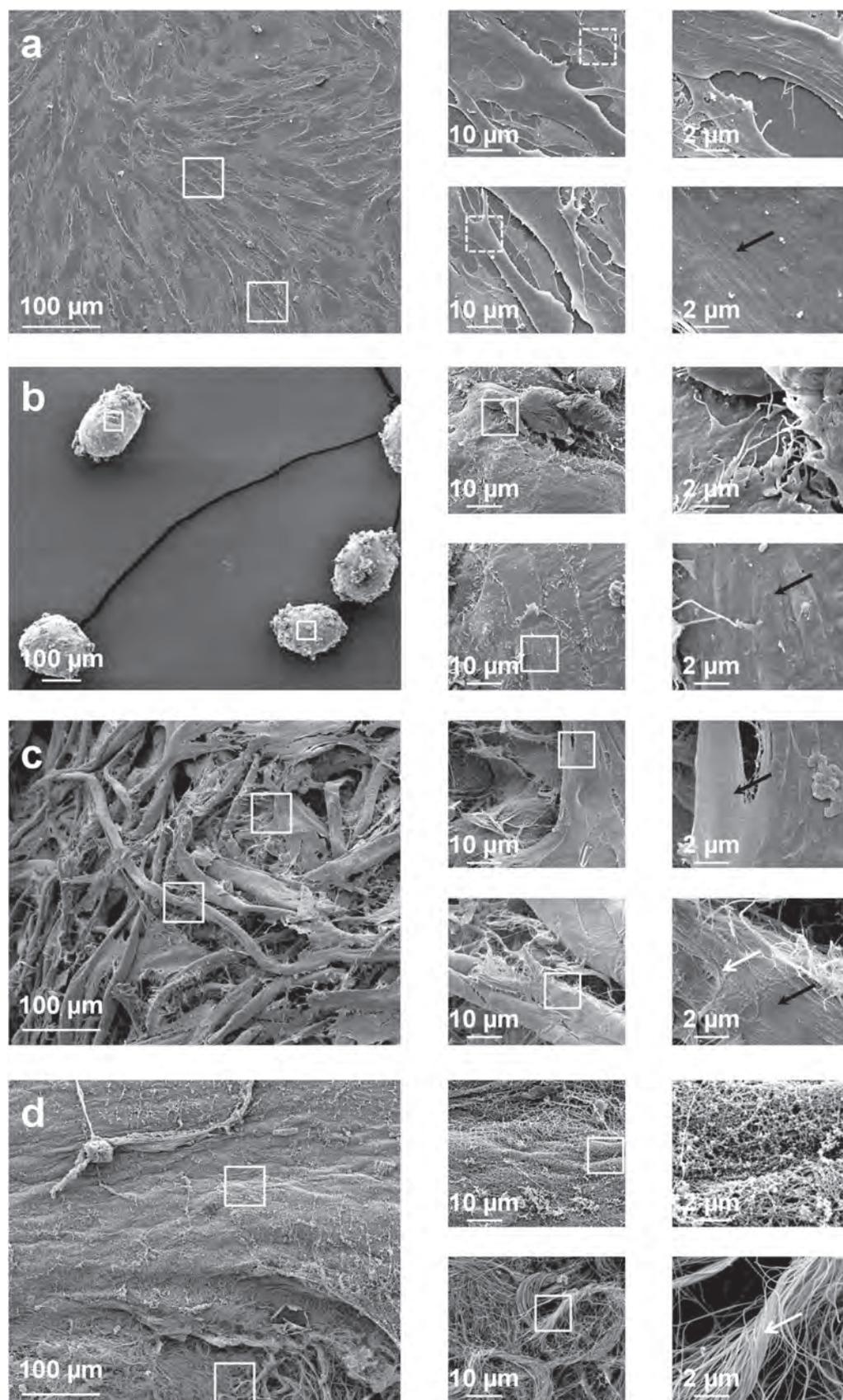


Figure 2. Scanning electron microscopy (SEM) pictures of cell models of increasing complexity from cell monolayer to native dermal tissue. SEM shows the cell architecture and organization in monolayer (a), spheroid (b), cell sheet (c) and native dermis (d). Inset exhibits the presence of naked cells on monolayer and spheroid and cell partially covered by collagens fibers on cell sheet and native dermis (white arrows). Black arrows indicate the cytoskeleton fibers.

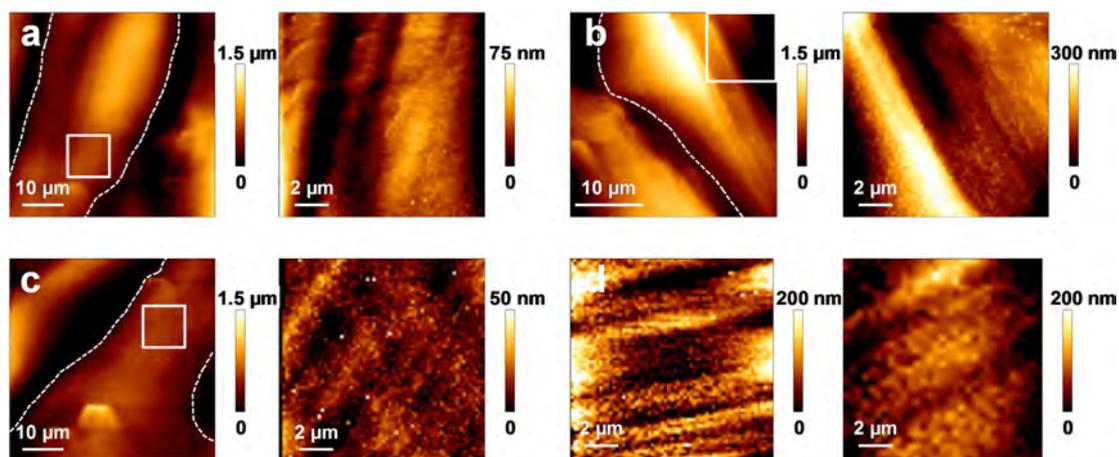


Figure 3. Atomic force microscopy (AFM) height images of cell models of increasing complexity. Examples of topographic images obtained by AFM on monolayer (a), spheroid (b), cell sheet (c) and native dermis (d). The dashed lines revealed the positions of individual cells.

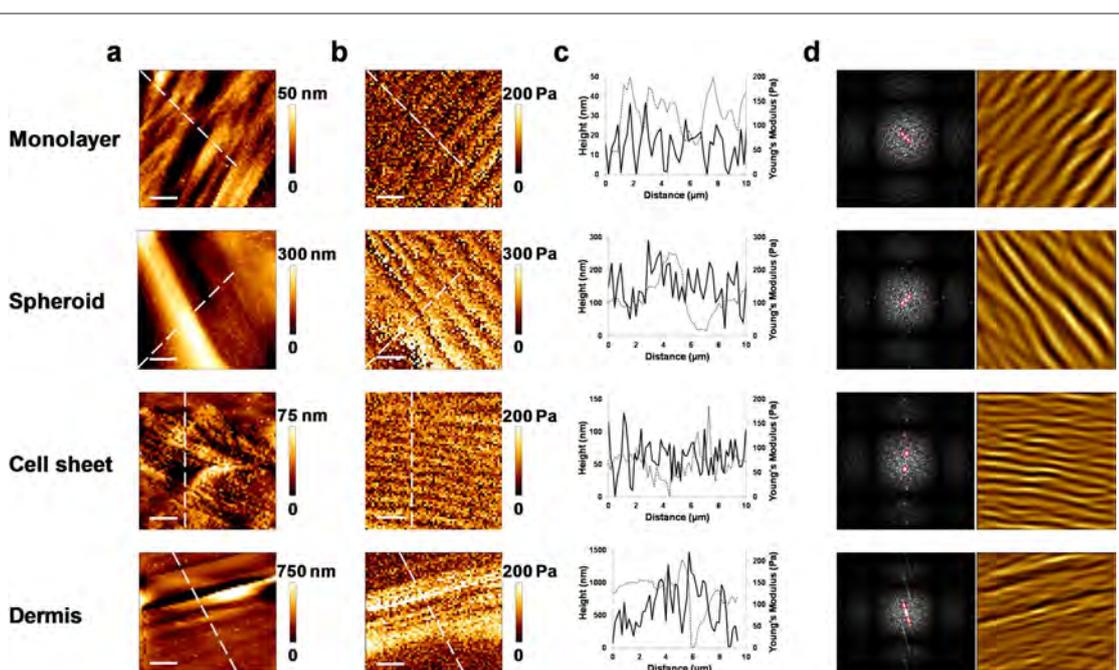


Figure 4. Visualization of the cytoskeleton motifs by AFM measurements. (a) Height images showed the surface morphology of cells. (b) Elasticity measurements on the same area revealed corresponding motifs for a depth of 200 nm. (c) Height (full lines) and elasticity (dotted line) cross sections were taken across the dashed lines in (a) and (b). (d) Fourier transforms were obtained from elasticity maps. The filtering of Fourier transform (red circles) exhibited the cytoskeleton motifs. Data were obtained from representative fibroblast cells in monolayer, spheroid, tissue-engineered cell sheet and native dermis. Scale bars: 2 μm .

In conclusion, we investigated and proved the feasibility of carrying out AFM force measurements on 3D models such as spheroids and tissue-engineered cell sheets, as well as on living native human tissue. We demonstrated that cell mechanical properties depend on the cell growth configuration and overall on the presence of extracellular matrix. We underlined the major role of collagens on cell mechanical properties and proved that the tissue-engineered cell sheet model rich in collagens is the closest model to human native dermis. Within context, further experiments should be done to understand the impact of extracellular

matrix on various cellular fates, such as proliferation, migration and differentiation but also to investigate its impact both on genes and proteins expression in skin fibroblasts.

Although there are an increasing number of studies published on the relevance of 3D models compared to classical 2D monolayers, their incomplete physical, mechanical and biochemical characterization limits their full potential exploitation.

Our observations offer perspectives in wound healing and aging studies with the relevant cell sheet model. Furthermore, developing relevant 3D cell

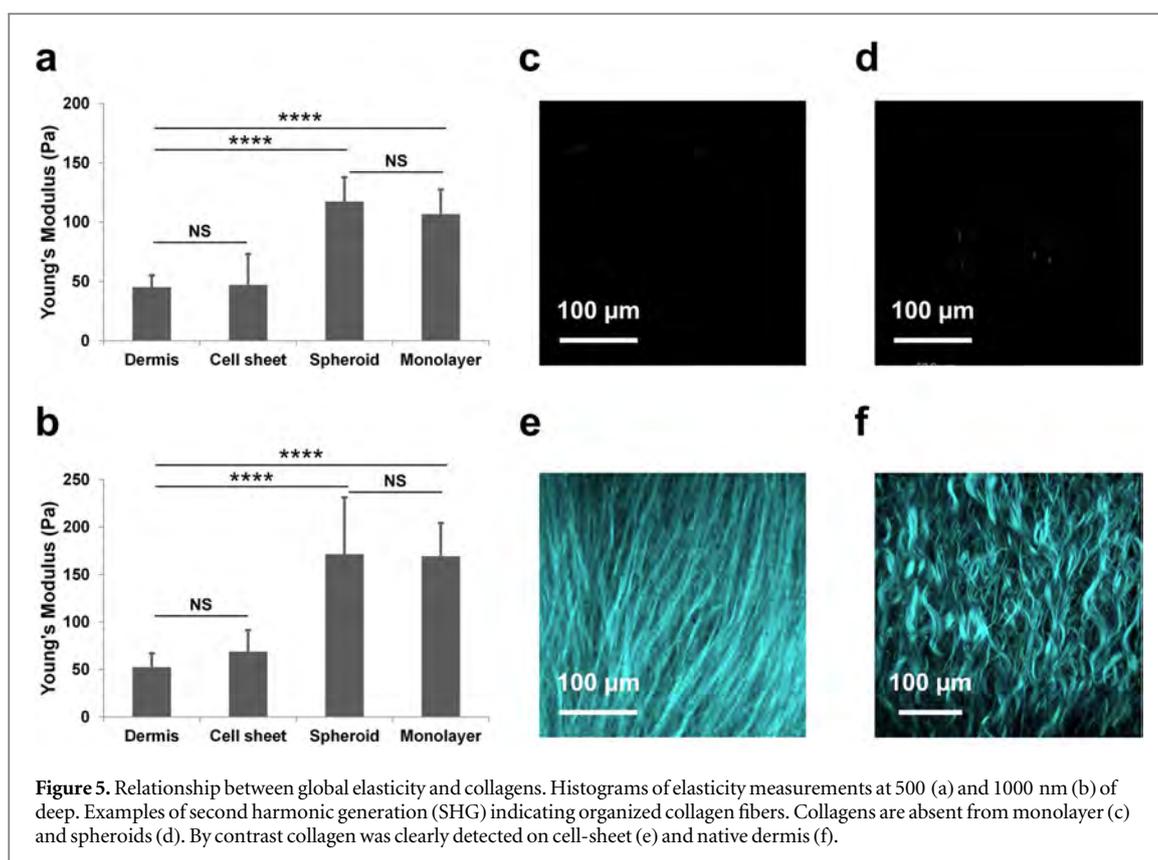


Table 1. Statistical analyses of Young's Modulus revealed 2 groups of elasticity. For each model, the mean values of Young's Modulus were calculated at 500 and 1000 nm from the elasticity maps and their related curves. Non-parametric statistical analyses were performed with the Mann–Whitney test. 4/4 pairs of test were performed to compare all the conditions with each other. The level of significance is given by the p value (* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.0001$; **** $p < 0.0001$). Non-significant differences of Young's Modulus were obtained between the dermis and the cell-sheet and between the spheroids and the monolayer.

		Maps	Curves	Mean (Pa)	Statistical comparisons	Mann–Whitney test (P value)
500 nm indentation	Dermis	6	12 978	46 ± 10	Dermis/Cell-sheet	0.3884
	Cell-sheet	9	36 466	47 ± 26	Dermis/Spheroids	0.0007 ****
	Spheroid	13	53 246	117 ± 20	Dermis/Monolayer	0.0004 ****
	Monolayer	9	36 780	107 ± 21	Cell-sheet/Spheroids	0.0002 ***
					Cell-sheet/Monolayer	0.0003 ****
				Spheroids/Monolayer	0.4229	
1000 nm indentation	Dermis	6	12 978	52 ± 15	Dermis/Cell-sheet	0.0879
	Cell-sheet	9	36 466	69 ± 23	Dermis/Spheroids	0.0007 ****
	Spheroid	13	53 246	171 ± 60	Dermis/Monolayer	0.0004 ****
	Monolayer	9	36 780	169 ± 35	Cell-sheet/Spheroids	0.0002 ****
					Cell-sheet/Monolayer	<0.0001 ****
				Spheroids/Monolayer	0.3853	

culture models *in vitro* both from a biological and physical point of view complies with the ethical principles of animal research (3R's philosophy) by proposing alternative methods to the use of laboratory animals.

Material and methods

Dermis native tissue and human cell isolation

Primary human dermal fibroblasts were isolated from a 3-year-old child's foreskin purchased from Icelltis (Toulouse, France) as previously described [23].

Briefly, after overnight incubation in Dispase II enzyme (10 mg ml^{-1} , Gibco-Invitrogen, Carlsbad, USA), epidermis was carefully peeled-off, and part of the fresh native dermis was used for direct analyses by AFM while another part was used for enzymatic isolation of fibroblasts with collagenase type 1 (1 mg ml^{-1} , Abnova, Taipei, Taiwan). 5 d after primary fibroblast isolation and expansion, cells at precocious passage 1, from the same batch, were used to seed and produce at least three independent monolayers, spheroids and cell sheet models. Cells were grown in Dulbecco's Modified Eagle's Medium

(Invitrogen), supplemented with 10% of heat-inactivated fetal calf serum, 100 U ml⁻¹ penicillin and 100 µg ml⁻¹ streptomycin. Cells were maintained at 37 °C in a humidified atmosphere containing 5% CO₂.

Monolayer

For monolayers, cells were directly seeded (3000 cells cm⁻²) onto removable, gelatin-coated 1-well Lab-tek glass slide (Fisher Scientific, Illkirch, France). Gelatin-coating allows better cell attachment and spreading. Three distinct cell monolayers were analyzed 5 d after seeding. Alternatively, cells grown in monolayer were cultivated for 4 weeks in order to compare their properties with cell sheet model.

Spheroid

We took advantage of our expertise in spheroid culture to include it in this comparative cell model study. Spheroids were generated by the non-adherent technique as previously described [37, 38]. Briefly, 10 000 cells/well were seeded on ultra-low attachment 96-well plates (Fisher Scientific). At least three distinct spheroids were analyzed 5 d after seeding.

Cell sheet

Primary fibroblasts at passage 1 were seeded (15 000 cells cm⁻²) onto 24-well plates as for monolayer, but grown for 4 weeks in complete cell culture medium supplemented with 50 µg ml⁻¹ ascorbic acid (Sigma). When stimulated with vitamin C, cells are able to produce and assemble more collagens in the extracellular space. This trick is widely used in tissue engineering to produce tissue substitute by the self-assembly approach [22]. Indeed ascorbic acid, which is a co-factor of prolyl-hydroxylase and lysyl-hydroxylase enzymes, is well known to improve collagen production, secretion and maturation [39, 40]. Three distinct cell sheets were analyzed 4 weeks after seeding.

Scanning electron microscopy

Cells were fixed with 2% glutaraldehyde in 0.1 M Sorensen phosphate buffer pH7.2. The samples were prepared by the CMEAB platform (Toulouse, France). Images were visualized with an electron microscope QuantaTM 250 FEG (FEI, USA) at an accelerating voltage of 5 kV.

Atomic force microscopy

All AFM experiments were carried out in Phosphate Buffered Saline (Sigma-Aldrich) which is compatible with cell survival for at least 30 min, as previously described by Chopinet *et al* [41]. AFM acquisitions lasted less than 15 min for each sample. For monolayers, cells were directly observed on gelatin-coated Lab-tek glass slide. Spheroids were immobilized for 15 min on a glass slide coated with polyethylenimine (PEI) (Sigma-Aldrich). Cell sheet and native dermis

were directly deposited on the glass slide. AFM measurements were performed with a Nanowizard III (JPK Instruments, Germany) in QI mode [42]. The cantilever (CP-PNPL NanoAndMore) spring constant was measured by the thermal tune method [43] before each experiment and found to lie in the range of 0.05 N m⁻¹–0.2 N m⁻¹. A force of 10 nN was applied. The loading frequency was 100 Hz and the indentation speed 400 µm s⁻¹, as used in previous studies [44]. Cell elasticity was determined from the Young's Modulus values which were calculated with the JPK Data processing software (JPK) from square QI images of 10 µm using the Hertz model [45, 46] and according to the equation (1). Typical force distance curves used for Young's Modulus calculations were shown in figure 6.

$$F = \frac{4}{3} \cdot \frac{E}{1-\nu_s^2} \cdot \sqrt{r} \cdot \delta^{\frac{3}{2}}, \quad (1)$$

where F is the applied force in N, E the Young's Modulus in Pa, ν_s Poisson's ratio, r the tip radius of the probe in m and δ the indentation of the sample in m. Here, we considered AFM tip as a sphere of 10 µm of radius and a Poisson ratio of 0.5 was applied.

Elasticity maps were obtained at 200 nm depth, as previously described in the literature [47, 48]. FFT calculations were carried out with the free software Gwyddion 2.41.

Statistical analysis

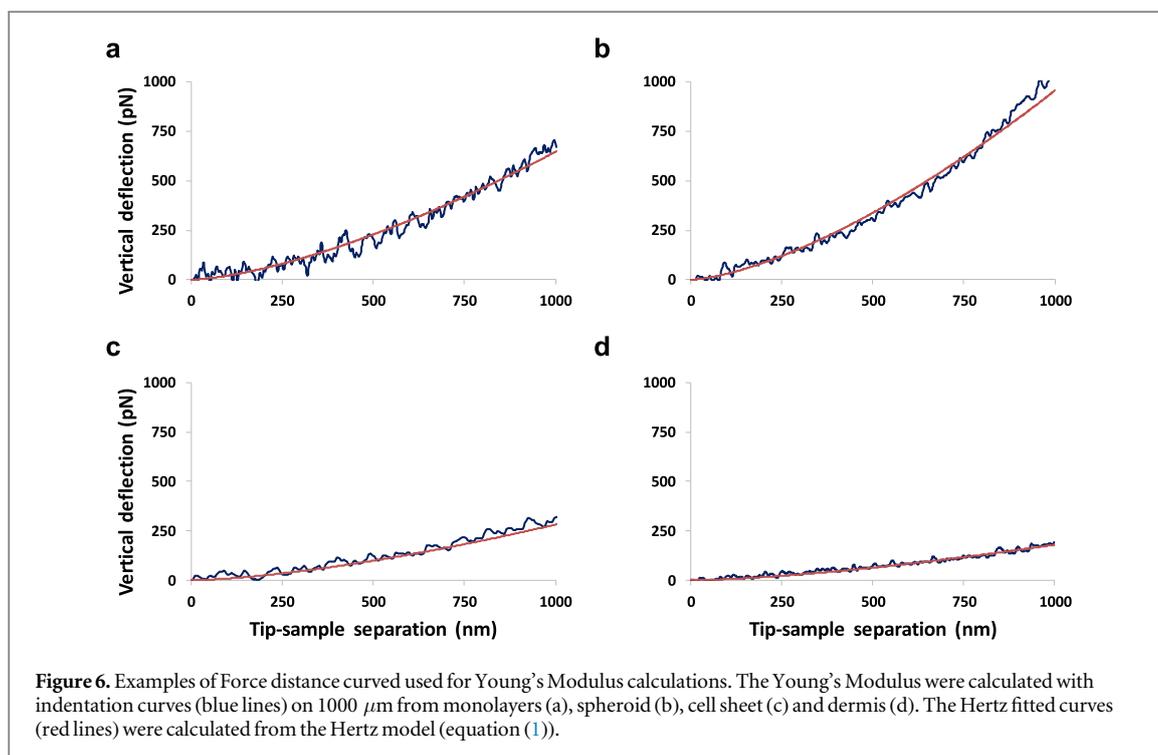
The elasticity maps were obtained by calculation of the Young's Modulus values which were deduced from each approach curve (figure 6). The statistical analyses between each cell model were performed from the means of elasticity maps and by using the non-parametric Mann–Whitney test with the Prism 5.04 software (GraphPad).

Collagens detection by SHG

As previously described [26], 3D stacks of 425 × 425 × 60 µm were acquired using a 7 MP multiphoton laser scanning microscope (Carl Zeiss, Jena, Germany), equipped with a 20× objective and coupled to a Ti-sapphire femtosecond laser, Chameleon Ultra 2 (Coherent Inc.) tuned to 800 nm. Organized fibrillar collagens were detected by SHG at a wavelength of 400 nm. The acquired 3D images and collagens quantification were analyzed off-line with Imaris software (Bitplane AG). Briefly the volume occupied by the collagen was calculated by measuring the volume occupied by the isosurface of the SHG in a cube of defined volume (80,1 × 80,1 × 80 µm). Three independent samples were used for each condition.

Histological staining

Fresh cell sheets and native dermis tissues were embedded in OCT and conserved at –80 °C until use. 5 µm sections were realized on a cryostat. After



removal of OCT in deionized water, tissue sections were stained with Masson's trichrome according to the manufacturer's protocol (Sigma-Aldrich). The Masson's trichrome method stains cells red and collagens within the dermal tissue in blue [49].

Acknowledgments

This research was performed in the scope of the EBAM European Associated Laboratory (LEA) and is a result of networking efforts within COST TD1104. We were supported by the Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS), the Agence Nationale de la Recherche (ANR), Projet PIERGEN ANR-12-ASTR-0039, the Direction Générale de l'Armement (DGA), the Midi-Pyrénées Région and the Fondation d'entreprise SILAB-Jean Paufigue. Microscopy experiments were carried out on the TRI-Genotoul platform. The authors would like to gratefully acknowledge Elisabeth Bellard (IPBS), Isabelle Fourquaux (CMEAB) for their technical assistance in imaging experiments, and the late Mr Peter Winterton, a native English scientist, for his careful proofreading of this manuscript.

References

- [1] Carrel A 1912 On the permanent life of tissues outside of the organism *J. Exp. Med.* **15** 516–28
- [2] Schmeichel K L and Bissell M J 2003 Modeling tissue-specific signaling and organ function in three dimensions *J. Cell Sci.* **116** 2377–88
- [3] Schwartz M A and Chen C S 2013 Deconstructing dimensionality *Science* **339** 402–4
- [4] Yamada K M and Cukierman E 2007 Modeling tissue morphogenesis and cancer in 3D *Cell* **130** 601–10
- [5] Abbott A 2003 Cell culture: biology's new dimension *Nature* **424** 870–2
- [6] Abbott R D and Kaplan D L 2015 Strategies for improving the physiological relevance of human engineered tissues *Trends Biotechnol.* **33** 401–7
- [7] Pampaloni F, Reynaud E G and Stelzer E H K 2007 The third dimension bridges the gap between cell culture and live tissue *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **8** 839–45
- [8] Smalley K S M, Lioni M and Herlyn M 2006 Life isn't flat: taking cancer biology to the next dimension *in vitro Cell. Dev. Biol. Anim.* **42** 242–7
- [9] Leong D T and Ng K W 2014 Probing the relevance of 3D cancer models in nanomedicine research *Adv. Drug. Deliv. Rev.* **79–80** 95–106
- [10] Humphrey J D, Dufresne E R and Schwartz M A 2014 Mechanotransduction and extracellular matrix homeostasis *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **15** 802–12
- [11] Wang N, Tytell J D and Ingber D E 2009 Mechanotransduction at a distance: mechanically coupling the extracellular matrix with the nucleus *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **10** 75–82
- [12] Langer R and Vacanti J P 1993 Tissue engineering *Science* **260** 920–6
- [13] Badyal S F, Weiss D J, Caplan A and Macchiarini P 2012 Engineered whole organs and complex tissues *Lancet* **379** 943–52
- [14] Hakkinen K M, Harunaga J S, Doyle A D and Yamada K M 2011 Direct comparisons of the morphology, migration, cell adhesions, and actin cytoskeleton of fibroblasts in four different three-dimensional extracellular matrices *Tissue Eng. A* **17** 713–24
- [15] Elsdale T and Bard J 1972 Collagen substrata for studies on cell behavior *J. Cell Biol.* **54** 626–37
- [16] Grinnell F and Petroll W M 2010 Cell motility and mechanics in three-dimensional collagen matrices *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **26** 335–61
- [17] Sutherland R M and Durand R E 1984 Growth and cellular characteristics of multicell spheroids *Recent Results Cancer Res.* **95** 24–49
- [18] Hirschhaeuser F, Menne H, Dittfeld C, West J, Mueller-Klieser W and Kunz-Schughart L A 2010 Multicellular tumor spheroids: an underestimated tool is catching up again *J. Biotechnol.* **148** 3–15

- [19] Nyga A, Cheema U and Loizidou M 2011 3D tumour models: novel *in vitro* approaches to cancer studies *J. Cell Commun. Signal.* **5** 239–48
- [20] Nederman T, Norling B, Glimelius B, Carlsson J and Brunk U 1984 Demonstration of an extracellular matrix in multicellular tumor spheroids *Cancer Res.* **44** 3090–7
- [21] Santini M T, Rainaldi G and Indovina P L 2000 Apoptosis, cell adhesion and the extracellular matrix in the three-dimensional growth of multicellular tumor spheroids *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* **36** 75–87
- [22] Athanasiou K A, Eswaramoorthy R, Hadidi P and Hu J C 2013 Self-organization and the self-assembling process in tissue engineering *Annu. Rev. Biomed. Eng.* **15** 115–36
- [23] Gibot L, Galbraith T, Huot J and Auger F A 2010 A preexisting microvascular network benefits *in vivo* revascularization of a microvascularized tissue-engineered skin substitute *Tissue Eng. A* **16** 3199–206
- [24] Gibot L, Galbraith T, Huot J and Auger F A 2013 Development of a tridimensional microvascularized human skin substitute to study melanoma biology *Clin. Exp. Metastasis* **30** 83–90
- [25] Gibot L, Galbraith T, Kloos B, Das S, Lacroix D A, Auger F A and Skobe M 2016 Cell-based approach for 3D reconstruction of lymphatic capillaries *in vitro* reveals distinct functions of HGF and VEGF-C in lymphangiogenesis *Biomaterials* **78** 129–39
- [26] Madi M, Rols M-P and Gibot L 2015 Efficient *in vitro* Electroporation of reconstructed human dermal tissue *J. Membr. Biol.* **248** 903–8
- [27] Formosa C, Pillet F, Schiavone M, Duval R E, Ressler L and Dague E 2015 Generation of living cell arrays for atomic force microscopy studies *Nat. Protocols* **10** 199–204
- [28] Pillet F, Chopinet L, Formosa C and Dague E 2014 Atomic Force microscopy and pharmacology: from microbiology to cancerology *Biochim. Biophys. Acta* **1840** 1028–50
- [29] Pillet F, Lemonnier S, Schiavone M, Formosa C, Martin-Yken H, Francois J M and Dague E 2014 Uncovering by atomic force microscopy of an original circular structure at the yeast cell surface in response to heat shock *BMC Biol.* **12** 6
- [30] Bancelin S, Aimé C, Gusachenko I, Kowalczyk L, Latour G, Coradin T and Schanne-Klein M-C 2014 Determination of collagen fibril size via absolute measurements of second-harmonic generation signals *Nat. Commun.* **5** 4920
- [31] Kim K S, Park H-K, Lee J-W, Kim Y I and Shin M K 2015 Investigate correlation between mechanical property and aging biomarker in passaged human dermal fibroblasts *Microsc. Res. Tech.* **78** 277–82
- [32] Gilbert P M and Weaver V M 2016 Cellular adaptation to biomechanical stress across length scales in tissue homeostasis and disease *Semin. Cell Dev. Biol.* (<https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2016.09.004>)
- [33] Staunton J R, Doss B L, Lindsay S and Ros R 2016 Correlating confocal microscopy and atomic force indentation reveals metastatic cancer cells stiffen during invasion into collagen I matrices *Sci. Rep.* **6** 19686
- [34] Chang A C, Liu B H, Shao P L and Liao J D 2017 Structure-dependent behaviours of skin layers studied by atomic force microscopy *J. Microsc.* (<https://doi.org/10.1111/jmi.12562>)
- [35] Shoulders M D and Raines R T 2009 Collagen structure and stability *Annu. Rev. Biochem.* **78** 929–58
- [36] Sherman V R, Yang W and Meyers M A 2015 The materials science of collagen *J. Mech. Behav. Biomed. Mater.* **52** 22–50
- [37] Gibot L et al 2014 Polymeric micelles encapsulating photosensitizer: structure/photodynamic therapy efficiency relation *Biomacromolecules* **15** 1443–55
- [38] Gibot L, Wasungu L, Teissié J and Rols M-P 2013 Antitumor drug delivery in multicellular spheroids by electroporation *J. Control. Release* **167** 138–47
- [39] Lyons B L and Schwarz R I 1984 Ascorbate stimulation of PAT cells causes an increase in transcription rates and a decrease in degradation rates of procollagen mRNA *Nucleic Acids Res.* **12** 2569–79
- [40] Schwarz R I 1985 Procollagen secretion meets the minimum requirements for the rate-controlling step in the ascorbate induction of procollagen synthesis *J. Biol. Chem.* **260** 3045–9
- [41] Louise C, Etienne D and Marie-Pierre R 2014 AFM sensing cortical actin cytoskeleton destabilization during plasma membrane electroporation *Cytoskeleton* **71** 587–94
- [42] Chopinet L, Formosa C, Rols M P, Duval R E and Dague E 2013 Imaging living cells surface and quantifying its properties at high resolution using AFM in QI™ mode *Micron* **48** 26–33
- [43] Hutter J L and Bechhoefer J 1993 Calibration of atomic-force microscope tips *Rev. Sci. Instrum.* **64** 1868–73
- [44] Smolyakov G, Formosa-Dague C, Severac C, Duval R E and Dague E 2016 High speed indentation measures by FV, QI and QNM introduce a new understanding of bionanomechanical experiments *Micron* **85** 8–14
- [45] Hertz H 1881 Ueber die berührung fester elastischer körper *J. Reine Angew. Math.* **1882** 156–71
- [46] Sen S, Subramanian S and Discher D E 2005 Indentation and adhesive probing of a cell membrane with AFM: theoretical model and experiments *Biophys. J.* **89** 3203–13
- [47] Kasas S et al 2005 Superficial and deep changes of cellular mechanical properties following cytoskeleton disassembly *Cell Motil. Cytoskeleton* **62** 124–32
- [48] Longo G, Rio L M, Roduit C, Trampuz A, Bizzini A, Dietler G and Kasas S 2012 Force volume and stiffness tomography investigation on the dynamics of stiff material under bacterial membranes *J. Mol. Recognit.* **25** 278–84
- [49] Masson P 1929 Some histological methods; trichrome stainings and their preliminary technique *Tech. Methods* **12** 75–90

