



**HAL**  
open science

# Etude préclinique des effets des liquides activés par plasma froid et des champs électriques pulsés sur la croissance tumorale

Elena Griseti

► **To cite this version:**

Elena Griseti. Etude préclinique des effets des liquides activés par plasma froid et des champs électriques pulsés sur la croissance tumorale. Biotechnologie. Université Paul Sabatier - Toulouse III, 2020. Français. NNT : 2020TOU30134 . tel-03155948

**HAL Id: tel-03155948**

**<https://theses.hal.science/tel-03155948v1>**

Submitted on 2 Mar 2021

**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 l'Université Toulouse 3 - Paul Sabatier

---

Présentée et soutenue par

**Elena GRISETI**

Le 1 octobre 2020

**Etude préclinique des effets des liquides activés par plasma froid  
et des champs électriques pulsés sur la croissance tumorale**

---

Ecole doctorale : **BSB - Biologie, Santé, Biotechnologies**

Spécialité : **BIOTECHNOLOGIES**

Unité de recherche :

**IPBS - Institut de Pharmacologie et Biologie Structurale**

Thèse dirigée par

**Muriel GOLZIO et Nofel Merbahi**

Jury

M. LLuis MIR, Rapporteur

M. Antoine ROUSSEAU, Rapporteur

Mme Muriel BARBERI-HEYOB, Examinatrice

Mme Anne LORSIGNOL, Examinatrice

Mme Muriel GOLZIO, Directrice de thèse

M. Nofel MERBAHI, Co-directeur de thèse



## REMERCIEMENTS

---

Je tiens tout d'abord à remercier chaleureusement tous les membres du jury qui ont accepté de lire et d'évaluer mon travail de thèse. Je remercie le Dr. LLuis Mir et le Dr. Antoine Rousseau pour leurs révisions du manuscrit, en leur qualité de rapporteurs. Je remercie également le Pr. Muriel Barberi-Heyob et le Pr. Anne Lorsignol d'avoir accepté d'intégrer mon jury de thèse en tant qu'examinatrices et qui ont aussi apporté leur contribution par la lecture du manuscrit à une étape ultérieure. Merci également à vous 4 pour vos discussions très enrichissantes au cours de ma soutenance. Je remercie également Valérie Lobjois, avec qui j'ai découvert la recherche, et qui avait accepté d'être présente en tant qu'invitée mais qui n'a malheureusement pas pu être présente.

Cette thèse s'est effectuée en codirection entre deux laboratoires : l'IPBS et le Laplace, c'est donc tout naturellement que je souhaiterais exprimer toute ma gratitude et mes remerciements à ma directrice et mon co-directeur de thèse, le Dr. Muriel Golzio et le Pr. Nofel Merbahi. Je suis particulièrement reconnaissante de votre aimable soutien au cours de ces trois années de thèse ainsi que de votre participation essentielle à faire de mon manuscrit le livre que vous avez entre les mains. Je tenais également à vous remercier tous les deux pour votre confiance et pour m'avoir permis de passer pas mal d'heures à enseigner à l'Université, je sais que ce n'est pas aussi facile pour tous les doctorants. Un grand merci également de m'avoir donné l'opportunité de présenter mes travaux à de nombreux congrès et écoles, c'était une grande chance.

Nofel, nous avons instauré la réunion tous les trois mois au tout début de la thèse ce qui me permettait de garder le contact étant donné que je passais tout mon temps à l'IPBS, puis les choses se sont vite accélérées et nous nous sommes vus moins fréquemment. Je te remercie de m'avoir fait confiance malgré cela. Merci pour ta disponibilité, ta gentillesse et ta bienveillance à mon égard, tu m'as très souvent posé la question « sinon niveau moral comment ça va ? ». Merci d'avoir trouvé les mots justes pour me donner la motivation nécessaire lorsqu'il le fallait, même à distance, ce qui n'est pas chose facile. Merci également de m'avoir épaulée et soutenue pour mon projet d'enseignement.

Mumu, quelle chance inouïe j'ai eu de t'avoir comme directrice de thèse. J'ai vite compris pourquoi on t'avait nommé « maman canard ». Ta bienveillance, ta gentillesse, ta bonne humeur permanente (je crois ; non j'en suis sûre ; ne t'avoir jamais vu faire la gueule en 3 ans), ton humour, ton rire plus que communicatif, ta façon de t'asseoir à côté « juste pour deux minutes » qui se transforme en deux heures à parler science... mais pas que. Ce sont toutes ces choses qui ont égayé ces trois années de thèse alors je te remercie pour tout ça. Merci pour ton dévouement (et je parle aussi de celui avant, pas que pendant confinement COVID-19 !!) et de ta disponibilité. Merci d'avoir veillé sur mes petites souris en mon

absence. Merci également de m'avoir donné de la liberté dans le projet et d'avoir fait confiance à la biologiste cellulaire qui sommeille en moi.

Un grand merci à Marie-Pierre Rols. Merci pour ta disponibilité malgré ton emploi du temps très chargé, et ton soutien tout au long de cette thèse. Merci également d'être la super cheffe d'équipe que tu es, et de générer une telle cohésion dans le groupe, je suis admirative.

Merci au Dr. Sylvie Monferran et au Dr. Jean-Michel Escoffre d'avoir accepté de faire partie de mon comité de suivi de thèse et d'avoir répondu à mes questionnements concernant mes travaux de thèse mais aussi mon projet postdoctoral.

Merci au Dr. Isabelle Vergne pour avoir apporté son expertise au projet et pour m'avoir permis de développer un axe de ma thèse plus qu'imprévu.

Un très grand merci à mes deux acolytes, Nana et Gégé. Quelle chance j'ai eue de vous avoir toutes les deux à mes côtés pendant ces trois années. Vous êtes devenues bien plus que des collègues de travail. Jelena, la paronymie de nos prénoms serait-elle à l'origine de cette complicité quasi-immédiate entre nous ? Merci d'avoir été là pour me booster quand j'en avais besoin, pour ton optimisme et ton dynamisme contagieux (le berocca et la vitamine C n'ont qu'à bien se tenir) et ton esprit vagabond. Einstein a dit « La créativité, c'est l'intelligence qui s'amuse » je trouve que cette phrase te colle bien à la peau. Merci pour ton aide dans la rédaction des articles et tout le reste d'ailleurs. Je n'avais encore jamais rencontré de scientifique aussi passionnée et éprise de son travail, je te souhaite de réussir tout ce que tu entreprendras pour tes futurs projets de vie.

Gege, j'ai récemment lu une définition du terme « collègue préférée », qui reste encore trop modeste pour te définir, mais qui m'a tout de même beaucoup fait penser à toi, la voici :

1) *personne qui a toujours une histoire incroyable à raconter au café*, là-dessus ni toi ni moi, ni personne du labo d'ailleurs, ne peut le nier. Je ne peux même pas compter le nombre de pause-café qui devait durer 5 minutes et qui en ont duré bien plus,

2) *garant de la bonne ambiance au bureau*, je te l'ai déjà dit un mot qui te définit c'est « solaire ». Je n'ai rejoint le bureau 101d un an et demi après mon arrivée, mais qu'est-ce qu'on a ri dans ce bureau,

3) *motivation pour aller au travail le matin*, tout est dit.

Et toutes ces choses concernent le boulot, mais il y a aussi le reste, les footings (ou plutôt les foot-gossiping), les soirées resto, bar, théâtre, danse et les séances snapchat mémorables. Merci pour tout.

Je tiens à remercier toute la Dreamteam de l'IPBS. Merci Laeti, Chacha et Juliette pour nos discussions de couloirs. Merci à mes autres copines doctorantes, Diana et Mathilde pour leurs présences. Merci Caro et ses supers devinettes (je suis hyper fière d'utiliser le mot petrichor grâce à toi), Babeth, Laurent,

Vincent, Bastien, Flavien et Justin, ce fut un grand plaisir de travailler auprès de vous. Merci également à mes amis du Laplace : Maxou, Julie, Julien, Farah, Cyril, Marjorie, Tristan, Philippe, Jérémie, Bojan, Aurélie M. et Aurélie T. Merci aux autres personnels du Laplace, Frédéric Marchal, Mohammed Yousfi et tous les autres.

Merci à mes stagiaires, Jinane et Léa, pour leur motivation, le travail fourni et leur gentillesse, c'était un grand plaisir d'expérimenter l'encadrement avec vous.

Enfin, merci à ma (grande) famille. Papa, maman, merci pour votre soutien, merci d'être des parents en or, merci pour votre amour, votre joie de vivre et tout le reste. Merci à mon petit frère Victor, la fin de cette thèse sonne ton retour à Toulouse, chose à laquelle j'ai pensé dès que j'ai commencé. Tu as toujours fait preuve de curiosité et d'un intérêt particulier à l'égard de mon travail, je suis heureuse et fière d'avoir partagé un peu de tout ça avec toi. Merci à mes deux grandes sœurs (mes meilleures amies), Emma et Louise, et mes deux beaux-frères, Roro et Gégé, tous ces week-ends, ces soirées jeux apéro et cassage de bide tous les 6 m'ont fait tellement de bien, vous êtes mon équilibre et bien plus. Merci à ma meilleure amie, mon paté, d'être toujours à mes côtés et pour tous ces merveilleux voyages partagés. Un grand merci à mes deux superbes roomates Suédoises, Kati et Maylis, merci de faire partie de ma vie et merci pour votre soutien, bientôt on formera un trio de Docteurs ;) Merci également à ma belle-famille, et tout particulièrement à mes beaux-parents, Annie et Jean.

Et pour clôturer ces remerciements, qui était un peu long je l'admets. Merci à Franck, l'amour de ma vie. Mon plus fervent supporter, merci d'avoir été mon pilier pendant ces trois années et de l'être encore tous les jours, de m'avoir permis de m'évader de tout ça, d'avoir été à l'écoute et d'avoir toujours trouver les mots justes pour me booster quand il le fallait, tu fais un très bon coach. Je t'aime.

En vous souhaitant une très bonne lecture à tous.



## PUBLICATIONS

---

### Articles portant sur le sujet de thèse :

**Griseti E**, Merbahi N and Golzio M. Anti-cancer potentials of two plasma-activated liquids: implication of long-lived reactive oxygen and nitrogen species. *Cancers*, édition spéciale -Plasma for Cancer Treatment- 2020, March.

**Griseti E**, Kolosnjaj-Tabi J, Gibot L, Fourquaux I, Rols MP, Yousfi M, Merbahi N, Golzio M. Pulsed electric field treatment enhances the cytotoxicity of plasma-activated liquids in a three-dimensional human colorectal cancer cell model. *Scientific Reports*, 2019, May.

Chauvin J, Gibot L, **Griseti E**, Golzio M, Rols MP, Merbahi N, Vicendo P. Elucidation of in vitro cellular steps induced by antitumor treatment with plasma-activated medium. *Scientific Reports*, 2019, March.

### Articles contribuant à d'autres projets :

Kolosnjaj-Tabi J, Kralj S, **Griseti E**, Nemeč S, Wilhelm C, Plan Sangnier A, Bellard E, Fourquaux I, Golzio M, Rols MP. Magnetic Silica-Coated Iron Oxide Nanochains as Photothermal Agents, Disrupting the Extracellular Matrix, and Eradicating Cancer Cells. *Cancers*, 2019, December.

Record J, Sendel A, Kritikou JS, Kuznetsov NV, Brauner H, He M, Nagy N, Oliveira MMS, **Griseti E**, Haase CB, Dahlström J, Boddul S, Wermeling F, Thrasher AJ, Liu C, Andersson J, Claesson HE, Winqvist O, Burns SO, Björkholm M, Westerberg LS. An intronic deletion in megakaryoblastic leukemia 1 is associated with hyperproliferation of B cells in triplets with Hodgkin lymphoma. *Haematologica*, 2019, October.

Dechristé G, Fehrenbach J, **Griseti E**, Lobjois V, Poignard C. Viscoelastic modeling of the fusion of multicellular tumor spheroids in growth phase. *Journal of Theoretical Biology*, 2018, October.



## **COMMUNICATIONS SCIENTIFIQUES**

---

Communication orale “How pulsed electric fields could enhance cold-atmospheric plasma exposed liquids efficiency to kill cancer cells: a first proof of concept” **Symposium des étudiants**, IPBS, 8 Novembre 2019, Toulouse, France

Communication orale “Comparison of two plasma-activated saline solutions properties and their anti-cancer capacities” Groupe de recherche **HappyBio**, 4-6 Novembre 2019, Domaine de Chalès, Nouan-le-Fuzelier, France

Courte communication orale et présentation d’un poster, "Pulsed electric fields as key element overcoming cold-atmospheric plasma limits in cancer therapy" Obtention d’un prix “Jeunes Chercheurs”, **15èmes Journées du Cancéropôle GSO**, 20-22 Novembre 2019, Palais des Congrès, Arcachon, France

Communication orale “Pulsed electric fields are the key to overcome plasma-activated liquids limits for cancer therapy”, **3rd World Congress on Electroporation and Pulsed Electric Fields in Biology, Medicine, Food and Environmental Technologies**, 3-6 Septembre 2019, Centre des Congrès Pierre Baudis, Toulouse, France

Communication orale “Potentiation of plasma-activated liquid cytotoxicity with pulsed electric fields for cancer treatment” **International Workshop on Plasma for Cancer Treatment**, 1-3 Avril 2019, Université d’Anvers, Belgique

Présentation d’un poster “No More Chemical Drugs for Cancer Therapy : Cold Atmospheric Plasma and Electric Field, Are They Enough ?”, **Electroporation-Based Technologies and Treatments Workshop**, 12-17 Novembre 2018, Ljubljana, Slovénie

Présentation d’un poster “No More Chemical Drugs for Cancer Therapy: Cold Atmospheric Plasma and Electric Field, Are They Enough?” Obtention du prix du meilleur poster, **Symposium des étudiants**, IPBS, 4 Octobre 2018, Toulouse, France.



# TABLE DES MATIÈRES

---

<b>TABLE DES MATIÈRES</b> .....	<b>9</b>
<b>RESUMÉ FRANÇAIS</b> .....	<b>13</b>
<b>RESUMÉ ANGLAIS</b> .....	<b>15</b>
<b>TABLE DES FIGURES</b> .....	<b>17</b>
<b>TABLE DES TABLEAUX</b> .....	<b>24</b>
<b>ACRONYMES ET ABRÉVIATIONS</b> .....	<b>26</b>
<b>INTRODUCTION</b> .....	<b>29</b>
<b>Partie I : La physiopathologie des cancers</b> .....	<b>29</b>
1. Épidémiologie des cancers .....	29
2. La biologie des tumeurs .....	31
a. Caractéristiques des cellules cancéreuses .....	31
b. Les modèles d'études en cancérologie : avantages et limites .....	36
i. Le sphéroïde : un modèle d'étude in vitro en trois dimensions .....	37
ii. Les modèles murins : avantages et limites des modèles d'études in vivo .....	40
3. Les traitements actuels .....	42
a. L'ablation tumorale.....	43
b. La radiothérapie .....	46
c. La thérapie photo dynamique .....	46
d. La chimiothérapie .....	47
e. Les thérapies ciblées .....	49
f. L'immunothérapie.....	50
<b>Partie II : Les plasmas froids</b> .....	<b>56</b>
1. La théorie du plasma .....	56
a. Généralités sur le plasma.....	56
b. Équilibre thermodynamique des plasmas.....	57
c. Les sources de plasmas froids hors équilibre .....	58
i. La décharge à barrière diélectrique à électrode flottante .....	58
ii. Le jet de plasma.....	59
2. Les plasmas froids comme outil thérapeutique .....	61
a. Stérilisation-Décontamination .....	63
b. Cicatrisation et régénération tissulaire .....	64
c. Thérapie anti-cancéreuse.....	67
i. Modalités de traitement .....	67
ii. Effets des liquides activés par plasma sur les cellules cancéreuses : état de l'art.....	68
iii. Susceptibilité des cellules cancéreuses.....	75
iv. La chimie des liquides activés par plasma.....	78
<b>Partie III : Les champs électriques pulsés</b> .....	<b>82</b>
1. Effets sur la cellule.....	83
a. Théorie du potentiel transmembranaire induit .....	83
b. Effets des paramètres physiques électriques.....	84
c. Effets sur les lipides membranaires.....	85
d. Effets sur l'architecture de la cellule.....	88
i. Réorganisation des cytosquelettes et des jonctions cellulaires .....	88
ii. Macropinocytose et endocytose induites lors du transfert des macromolécules (ADN plasmidique) .....	89
2. Effets sur un tissu en trois dimensions : sphéroïdes et tumeurs.....	92
a. Electroperméabilisation en 3D.....	92
b. Microenvironnement tumoral .....	93

c. Perméabilité des vaisseaux sanguins.....	94
3. Thérapies basées sur l'électroporation.....	96
a. Délivrance de molécules thérapeutiques .....	96
i. L'électrochimiothérapie : de la paillasse à la clinique .....	96
ii. L'électrogénéothérapie.....	100
b. L'utilisation de l'électroporation irréversible pour l'ablation tumorale.....	101
<b>OBJECTIFS DE LA THÈSE .....</b>	<b>105</b>
<b>RÉSULTATS ET DISCUSSIONS .....</b>	<b>109</b>
<b>Partie I : Évaluation des effets anti-cancéreux de solutions salines activées par plasma froid dans un modèle de microtumeur en 3D.....</b>	<b>109</b>
1. Résultats introductifs-Généralités .....	109
2. Article 1: Elucidation of in vitro cellular steps induced by antitumor treatment with plasma-activated medium. Julie Chauvin, Laure Gibot, Elena Griseti, Muriel Golzio, Marie-Pierre Rols, Nofel Merbahi, Patricia Vicendo. <i>Scientific Reports</i> (2019) 9:4866. ....	110
3. Validation de l'effet du P-A DMEM sur le sphéroïde de cellules HCT 116 exprimant la GFP.....	111
4. Effets anti-cancéreux de solutions salines activées par plasma froid - Résumé de l'article 2.....	114
5. Article 2 : Anti-cancer potential of two plasma-activated liquids : implication of long-lived reactive oxygen and nitrogen species. Elena Griseti, Nofel Merbahi, Muriel Golzio. <i>Cancers</i> (2020) 12, 721.....	117
6. Effet des traitements successifs par les liquides activés par plasma sur la croissance des sphéroïdes HCT 116-GFP.....	118
7. Bilan et discussion des résultats (partie I).....	121
<b>Partie II : Étude des effets du traitement combiné par PBS activé par plasma et champs électriques pulsés.....</b>	<b>125</b>
1. Introduction-Résumé de l'article 3.....	125
2. Article 3 : Pulsed electric field treatment enhances the cytotoxicity of plasma-activated liquids in a three-dimensional human colorectal cancer cell model. Elena Griseti, Jelena Kolosnjaj-Tabi, Laure Gibot, Isabelle Fourquaux, Marie-Pierre Rols, Mohammed Yousfi, Nofel Merbahi, Muriel Golzio. <i>Scientific Reports</i> (2019) 9:7583.....	130
3. Induction de l'autophagie .....	131
a. Introduction .....	131
b. Résultats.....	133
4. Modulation des jonctions cellulaires et du cytosquelette.....	137
5. Universalité du traitement combiné par P-A PBS et EP : étude préliminaire d'autres lignées cancéreuses .....	142
a. Réponse des sphéroïdes de la lignée cellulaire FaDu.....	142
b. Réponse des sphéroïdes de la lignée cellulaire B16-F10-tdTomato .....	144
6. Bilan et discussions des résultats (Partie II).....	148
<b>Partie III : Mise en place de protocoles <i>in vivo</i> pour le traitement par liquides activés par plasma et champs électriques pulsés de différents modèles de tumeurs.....</b>	<b>155</b>
1. Introduction et modèles tumoraux utilisés.....	155
2. Réponse des tumeurs intradermiques B16-F10-tdTomato.....	157
3. Réponse des tumeurs sous-cutanées HCT 116-GFP.....	160
4. Réponse des tumeurs intrapéritonéales SKOV-3 GFP Luc.....	164
5. Bilan et discussions des résultats (Partie III) .....	166
<b>CONCLUSION GÉNÉRALE ET PERSPECTIVES .....</b>	<b>170</b>
<b>MATÉRIELS ET MÉTHODES .....</b>	<b>178</b>
1. Lignées et cultures cellulaires.....	178
2. Obtention et culture des sphéroïdes.....	178
3. Plasma froid à pression atmosphérique .....	178
a. Dispositif plasma à basse température et à pression atmosphérique .....	178
b. Activation des liquides par exposition au jet de plasma.....	179

4.	Mesure de l'osmolarité et du pH.....	180
5.	Dosage des espèces réactives de l'oxygène et de l'azote.....	180
a.	Nitrite/nitrate.....	180
b.	Peroxyde d'hydrogène.....	182
6.	Dispositif d'électroperméabilisation (EP).....	182
7.	Traitement des sphéroïdes.....	183
a.	Par liquides activés par plasma.....	183
b.	Par solutions enrichies en RONS.....	184
c.	Par électroperméabilisation.....	184
8.	Suivi de croissance des sphéroïdes.....	185
9.	Efficacité de l'électroperméabilisation des sphéroïdes.....	185
10.	Suivi de la mort cellulaire en temps réel.....	185
11.	Analyse des images de microscopie.....	186
a.	Croissance des sphéroïdes.....	186
b.	Cinétique de pénétration du PI.....	186
12.	Marquage de l'apoptose.....	187
a.	Cytométrie en flux.....	187
b.	Microscopie confocale à fluorescence.....	187
13.	Immunofluorescences.....	188
a.	Préparation des échantillons.....	188
b.	Immunomarquages.....	188
c.	Imagerie.....	189
14.	Étude de l'expression de protéines impliquées dans l'autophagie par Western Blotting.....	189
15.	Étude de l'ultrastructure par microscopie électronique à transmission.....	190
16.	Expérimentation animale.....	190
a.	Modèle syngénique de mélanome B16-F10-tdTomato en intradermique.....	191
i.	Grefe des cellules.....	191
ii.	Suivi de croissance.....	191
b.	Modèle non syngénique d'adénocarcinome colorectal humain HCT 116-GFP en sous-cutanée.....	191
i.	Grefe des cellules.....	191
ii.	Suivi de croissance.....	192
c.	Traitement des tumeurs sous-cutanée HCT 116-GFP et intradermique B16-F10-tdTomato par P-A PBS et EP.....	192
d.	Modèle non syngénique de carcinose péritonéale ovarienne SKOV-3 GFP Luc.....	193
i.	Grefe des cellules.....	193
ii.	Traitement.....	194
iii.	Suivi de croissance tumorale par imagerie de bioluminescence non invasive.....	194
iv.	Analyse des images de bioluminescence.....	194
17.	Statistiques.....	195

***BIBLIOGRAPHIE.....197***



## RESUMÉ FRANÇAIS

---

Au cours de ces dernières décennies, l'arsenal des thérapies anticancéreuses basées sur des principes physiques tels que les radiofréquences, les ultrasons, le laser, l'électroporation, la thérapie photo dynamique et les plasmas a considérablement augmenté. Ces approches permettent d'éradiquer les cellules cancéreuses, directement ou via la stimulation du système immunitaire. Elles sont aussi proposées en tant que méthodes de vectorisation pour délivrer des molécules d'intérêt thérapeutique.

Plus récemment, est apparu un intérêt grandissant pour l'utilisation en thérapie anti-cancéreuse de liquides enrichis en espèces réactives de l'oxygène et de l'azote (RONS) via leur exposition au plasma froid. Les cellules cancéreuses peuvent ainsi être éradiquées, de façon sélective, après contact avec du liquide activé par plasma (PAL). Néanmoins, les mécanismes d'action de ces PAL sont encore peu connus à ce jour. C'est dans ce contexte que nous avons évalué le potentiel thérapeutique de différentes solutions salines exposées au jet de plasmas froids sur les cellules cancéreuses. Parallèlement, l'électroporation ou électroporation (EP) réversible connaît un essor important en raison du développement de ses applications cliniques notamment en électrochimiothérapie pour favoriser le transfert d'agent anti-cancéreux. Nous avons proposé une approche innovante reposant sur la combinaison des PAL et de l'EP, afin de potentialiser les effets cytotoxiques et génotoxiques des PAL, via la déstabilisation par l'EP de la tumeur, et obtenir ainsi une éradication plus efficace.

Dans un premier temps, nous avons étudié l'effet du tampon phosphate salin (PBS) et du chlorure de sodium (NaCl) exposés au jet hélium de plasma froid, *in vitro*, sur la croissance, la viabilité/mort cellulaire et l'organisation structurale de modèles 3D de tumeurs non-vascularisées (les sphéroïdes). Deux lignées cellulaires cancéreuses ont été utilisées : cellules de cancer colorectal humain HCT-116 et cellules de carcinome ovarien péritonéal humain SKOV-3. Nous avons mis en évidence que ces PAL induisent une cascade d'événements cellulaires : fuite de l'ATP intracellulaire, dommages à l'ADN et dysfonction mitochondriale, provoquant la mort apoptotique des cellules des couches externes du sphéroïde dans les heures suivant le traitement (~6 heures). De plus, le PBS activé par plasma a montré une cytotoxicité et génotoxicité supérieure au NaCl, qui est corrélée avec la quantité de RONS présente dans les PAL. L'efficacité d'éradication des cellules cancéreuses de ces PAL se limitent aux cellules en périphérie des sphéroïdes. Il est nécessaire de faire plusieurs traitements pour avoir une éradication totale.

Ainsi dans une deuxième partie, afin de pallier les problèmes de pénétration des PAL, nous avons proposé de les associer à l'EP réversible. La combinaison de ces deux approches a montré une potentialisation de la cytotoxicité et la génotoxicité des PAL, induisant la mort de toutes les cellules cancéreuses du sphéroïde. Cette augmentation de l'efficacité est en partie causée par des réarrangements des jonctions cellulaires suite à l'EP et à l'induction d'une mort cellulaire par autophagie.

La transposition de cette méthodologie *in vivo*, pouvant conduire à l'éradication des tumeurs solides, a été initiée en fin de thèse sur différents modèles de tumeurs murines et humaines avec des résultats plus ou moins encourageants selon le modèle tumoral utilisé.

Les travaux effectués au cours de cette thèse ont permis, d'une part, une meilleure compréhension des mécanismes de morts cellulaires induits par les PAL. D'autre part, nous avons montré que l'EP peut être proposée pour potentialiser l'effet des PAL, engendrant également un autre type de mort cellulaire : l'autophagie. Cette nouvelle stratégie, utilisation de l'EP combinée au PAL, pourrait permettre de compléter l'arsenal thérapeutique anti-cancéreux.



## RESUMÉ ANGLAIS

---

Over the past decades, physic-based anticancer therapies such as radiofrequencies, ultrasound, laser-assisted medicine, electroporation, photodynamic therapy and cold plasma have significantly increased. These novel approaches allow efficient eradication of cancer cells, either directly or via the stimulation of immune response, and are now proposed as vectorization methods for anti-cancer drugs delivery.

More recently, there is a growing interest in the use for anti-cancer therapy based on reactive oxygen and nitrogen species (RONS)-enriched solutions exposed to cold plasma. Cancer cells can be selectively eradicated after being in contact with these plasma-activated liquids (PAL). Nevertheless, little is known about cellular mechanisms underlying cell death caused by PAL. In this light, we evaluate the therapeutic anti-cancer potential of different saline solutions exposed to cold plasma. In parallel, reversible electroporation or electroporation (EP) is booming due to its development for clinical applications such as electrochemotherapy, which enhanced chemotherapeutic agents tumour delivery. We propose a novel approach based on the combination of PAL and EP with the aim of potentiate cytotoxic and genotoxic effects of PAL, via EP-induced tumour destabilization, and thus to achieve a more efficient eradication.

First of all, we study the effect of phosphate buffered saline (PBS) and sodium chloride (NaCl) solutions exposed to a helium plasma jet, *in vitro*. Growth, viability and death, morphological changes and cell organization within multicellular tumour spheroids, a 3D avascularised tumour model, are evaluated. Two different cell lines are used: human colorectal cancer cells HCT-116 and peritoneal ovarian cancer cells SKOV-3. We show that PAL induce a specific cellular events cascade: intracellular ATP leakage, DNA damages and mitochondrial dysfunction, that lead to a rapid apoptosis of cells localized in the rim of spheroid (~6 hours after PAL treatment). Moreover, plasma-activated PBS display higher cytotoxicity and genotoxicity that plasma-activated NaCl, directly correlated with the amount of RONS generated in the PAL. Eradication efficiency of these PAL is limited to the peripheral cells. Several treatments were necessary to obtain spheroid total eradication.

Thus, in the second part of the project, in order to alleviate penetration limits of PAL within spheroids, we propose to use reversible EP conditions. The combination of the two approaches lead to PAL cytotoxicity and genotoxicity potentiation, and induces cell death within whole spheroid. This potentiation is partly due to cellular junction's reorganization and autophagic cell death allowed by reversible EP.

*In vivo* transposition of this new treatment modality, which can lead to solid tumour eradication, was initiated at the last part of the PhD on several tumour types, murine and human, and show variable tumour responses, depending on tumour model.

The work carried out during this PhD contribute to, on the one hand, a better understanding of cell death mechanisms induced by PAL. On the other hand, we show for the first time that EP can be proposed as a way to potentiate PAL anti-cancer effects, thus leading to another cell death: the autophagy. This novel strategy, combination of PAL and EP, could complete anti-cancer therapies arsenal.



## TABLE DES FIGURES

<b>Figure 1 : Classement des tumeurs solides par incidence estimée en 2017 en France métropolitaine selon le sexe.</b> * Les données de projection 2017 ne sont pas fournies pour ce cancer. Il s'agit de l'estimation pour 2013. Source : Partenariat Francim/HCL/Santé publique France/INCa (Jéhannin-Ligier K, 2017). D'après le rapport de l'INCa de 2017.....	30
<b>Figure 2 : Caractéristiques des cellules cancéreuses.</b> Figure adaptée de (Hanahan and Weinberg, 2011). .....	31
<b>Figure 3 : Implication des espèces réactives de l'oxygène (ROS) dans la régulation des processus cellulaires chez les cellules cancéreuses.</b> Des événements tumorigènes tel que l'activation d'oncogène (K-ras), la dérégulation du métabolisme, l'hypoxie, et l'infiltration de macrophages peuvent induire une augmentation du niveau de ROS intracellulaires et participer à la progression tumorale (prolifération, survie, migration, transition épithélio-mésenchymateuse (EMT), instabilité génomique, angiogénèse). Le niveau élevé de ROS peut être contrôlé via l'action d'antioxydants thérapeutiques. Figure issue de (Liou and Storz, 2010).....	33
<b>Figure 4 : Différents modèles d'études biologiques et leurs complexités.</b> .....	36
<b>Figure 5 : Caractéristiques biochimiques du sphéroïde, modèle 3D de tumeur.</b> Combinaison d'images analytiques représentant les différents gradients d'oxygène, de glucose, de lactate et d'ATP ; ainsi que des gradients de prolifération cellulaire. Figure extraite de (Hirschhaeuser et al. , 2010). .....	38
<b>Figure 6 : Les méthodes de génération des sphéroïdes.</b> Figure tirée de (Nath and Devi, 2016). .....	39
<b>Figure 7 : Les modèles murins en oncologie.</b> Les légendes des caractéristiques cellulaires de chaque modèle tumoral sont présentées sur le panel (c) en bas à gauche. Figure adaptée de (Gould et al. , 2015).....	40
<b>Figure 8 : Classification des agents utilisés en chimiothérapie et leurs mécanismes d'action cellulaire.</b> Source : <a href="https://www.amboss.com/us/knowledge/Chemotherapeutic_agents">https://www.amboss.com/us/knowledge/Chemotherapeutic_agents</a> .....	48
<b>Figure 9 : Les principales composantes physiques et chimiques du plasma.</b> UV : ultraviolet ; IR : infrarouge ; ROS : espèces réactives de l'oxygène ; RNS ; espèces réactives de l'azote. ....	58
<b>Figure 10 : Dispositif expérimental de la décharge à barrière diélectrique à électrode flottante (fe-DBD).</b> A gauche : configuration de la fe-DBD. A droite : photographie de la génération du plasma entre le dispositif et la cible jouant le rôle de seconde électrode flottante (ici un doigt). .....	59
<b>Figure 11 : Dispositif expérimental du jet de plasma.</b> À gauche : configuration du jet de plasma. À droite : photographie de la propagation de la plume plasma à l'extérieur du tube diélectrique.....	60
<b>Figure 12 : Dispositifs à plasma froids développés et utilisés en clinique humaine.</b> (A) le Kinpen® ( <a href="https://neoplas-tools.eu/en/kinpen-med.html">https://neoplas-tools.eu/en/kinpen-med.html</a> ) (B) Le MicroPlaSter® ( <a href="http://www.adtecplasma.com/about.html">http://www.adtecplasma.com/about.html</a> ) (C) Le PlasmaDerm® ( <a href="http://www.cinogy.de/_EN/plasmaderm.php">http://www.cinogy.de/_EN/plasmaderm.php</a> ). .....	62
<b>Figure 13 : Traitement par plasma d'un ulcère variqueux chez un patient de 61 ans.</b> (a) Plaie avant le traitement plasma, après 7 et 11 traitements (b et c, respectivement). La plaie est exposée 2 minutes au dispositif plasma MicroPlaSter® introduit précédemment. Figure issue de (Isbary et al. , 2010).....	65
<b>Figure 14 : Stimulation de l'angiogénèse par traitement plasma chez le rat.</b> (a) Images de tomographie par cohérence optique (OCT) non-invasive de la plaie chez la souris, la profondeur en z est donnée par le code couleur jaune (vaisseaux superficiels), rouge (vaisseaux profonds). La limite de l'épiderme de la plaie est représentée par la ligne bleue pointillée (SWB, skin wound boundary) et la limite des vaisseaux de la plaie avec la ligne verte pointillée (VWB, vascular wound boundary) (b) Images stéréoscopiques correspondantes. Figure issue de (Kim et al. , 2016) .....	66
<b>Figure 15 : Les deux modalités de traitement par plasma, direct et indirect, utilisées pour la thérapie anti-cancéreuse et les composantes physiques et chimiques associées.</b> .....	68
<b>Figure 16 : Influence du temps de transfert et du stockage de milieu activé par plasma sur la génotoxicité induite.</b> Les dommages à l'ADN sont marqués par les histones H2AX (bleu cyan) et le noyau est marqué avec du DAPI (bleu foncé) sur des coupes de sphéroïdes de cellules de cancer colorectal humain HCT 116. (A) Influence du temps de transfert, temps écoulé entre l'exposition du milieu de culture au jet de plasma et le transfert sur les sphéroïdes. (B) Influence du stockage du PAM. Échelle : 100 µm. Figure adaptée de (Judée et al. , 2016a)... ..	72
<b>Figure 17 : Fission et désorganisation du réseau mitochondrial induits par le PAM et mécanismes d'action chez les cellules cancéreuses versus cellules saines.</b> Observation de l'organisation du réseau mitochondrial des cellules cancéreuses (A) et cellules saines (B) après traitement par milieu activé par plasma (AGP). La sonde fluorescente MitoTracker Red CMXRos (rouge) est utilisée pour détecter les mitochondries. (C) Cascade de signalisation engendrée chez les cellules saines et les cellules cancéreuses traitées par PAM. Chez les cellules cancéreuses, le stress oxydatif engendre une prédominance de la forme pDrp1 Ser 616 et une diminution de la forme pDrp1 Ser 637 (cf. légende), causant la fission mitochondriale et la mort cellulaire caspase indépendante. En revanche, chez les cellules saines, une accumulation de ROS moindre est observée et donc pas de	

prédominance de la forme pDrp1 616, les cellules survivent et le réseau mitochondrial n'est pas affecté.  
Légende : NT : non traité, NSCLC : non-small-cell lung carcinoma AGP : atmospheric gas plasma, mdivi-1 : inhibiteur de la fission mitochondriale, pDRP1 : dynamin-related protein 1 phosphorylée, protéine impliquée dans la régulation de la fission mitochondriale (forme pSer616 active fission ; forme pSer63 inhibe fission).  
Figure adaptée de (Saito et al. , 2016)..... 73

**Figure 18 : Effet synergique du traitement par PAM et de l'administration d'un agent chimiothérapeutique sur la croissance tumorale in vivo.** Des mélanomes B16 F10 sous-cutanées ont été traité par jet de plasma direct (direct treatment, jaune) ; PAM (indirect treatment, noire) ; cyclophosphamide (drug, bleu) ; ou PAM combiné à la cyclophosphamide (indirect treatment + drug, rouge). (A) Suivi de la croissance tumorale après traitement (\*\*\*)P-values<0.001 (B) Taux de survie des souris (C) Radiologie et scanners sagittal et axial des tumeurs après les 25 jours de traitement. Figure adaptée de (Saadati et al. , 2018). ..... 75

**Figure 19 : Les ROS dans la pathologie cancéreuse : une cible potentiel pour la thérapie.** Une augmentation des ROS par une source exogène dans les cellules cancéreuses est susceptible de provoquer une élévation supérieure au seuil de toxicité. Figure adaptée de (Trachootham et al. , 2009)..... 76

**Figure 20 : Sensibilité accrue vis-à-vis du plasma (cold-atmospheric plasma, CAP) chez les cellules cancéreuses : le modèle des aquaporines.** Les cellules cancéreuses expriment plus d'aquaporines (AQPs) et moins de catalases que les cellules saines, provoquant ainsi une forte accumulation des ROS intracellulaires. Figure issue de (Yan et al. , 2016). ..... 77

**Figure 21 : Interaction plasma-liquide et génération des espèces réactives de l'oxygène et de l'azote et des radicaux libres.** Figure issue de (Samukawa et al. , 2012). ..... 79

**Figure 22 : Cascade d'événements cellulaires induit par les liquides activés par plasma et l'implication des RONS.** (1) Exposition des liquides et génération de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> et de NO<sub>2</sub><sup>-</sup>. (2) Transfert PAL sur les cellules, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> et NO<sub>2</sub><sup>-</sup> se retrouvent à proximité de la membrane. (3) Oxygène singulet <sup>1</sup>O<sub>2</sub> est généré par l'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> et la NO<sub>2</sub><sup>-</sup> via la voie du conjugué acide du peroxy-nitrite (O<sub>2</sub>NOOH). (4) <sup>1</sup>O<sub>2</sub> inactive les catalases. (5) H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> et le peroxy-nitrite ONOO<sup>-</sup> ne sont donc plus métabolisés. (6) Le mécanisme d'auto-amplification dans la cellule est en route : des molécules d'oxygène singulet secondaire sont produites <sup>1</sup>O<sub>2</sub>. (7) cette forte production de <sup>1</sup>O<sub>2</sub> inactive encore plus de catalase, la cellule ne peut plus réguler les RONS et l'homéostasie, une boucle réactionnelle se met en place (flèche orange). (8) H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> pénètre dans la cellule via les aquaporines AQPs et inhibe l'action des mécanismes antioxydant. (9) Génération d'HOCl et HO<sup>•</sup>. (9') Génération \*NO/ONOO<sup>-</sup>..... 80

**Figure 23 : Schéma récapitulant les divers effets cellulaires et les applications thérapeutiques médiés par les champs électriques.** Figure issue de (Kolosnjaj-Tabi et al. , 2019). ..... 82

**Figure 24 : Principe de l'électropéabilisation de la cellule.** Représentation de la membrane plasmique cellulaire soumise à un champ électrique, avec visualisation du potentiel membranaire natif Δψ<sub>0</sub>, représenté par des flèches bleues, et le potentiel induit par le champ électrique Δψ<sub>i</sub> représenté par des flèches orange pleines. Figure adaptée de (Teissié and Rols, 1993). ..... 83

**Figure 25 : Influence des paramètre électriques, N le nombre d'impulsions, T la durée de ces impulsions et E l'intensité du champ, sur la surface membranaire affectée par l'EP.** E<sub>p</sub> représente la valeur seuil pour induire la formation des pores membranaires. La surface de la cellule pour laquelle la valeur seuil est atteinte, E > E<sub>p</sub>, est représentée en gris sur le schéma. Cette surface se voit augmentée avec l'intensité du champ (en haut à droite), tandis que le nombre de défauts membranaires (efficacité de perméabilisation), mais non pas la surface, est augmentée si N et T sont augmentés avec un champ d'intensité E constant (surface noire, en bas à droite). Figure tirée de (Rols, 2006). ..... 85

**Figure 26 : Le cycle de vie d'un électropore membranaire.** Cette simulation moléculaire est obtenue sur une bicouche de lipides POPC. Le cycle se divise en deux grandes étapes : la formation du pore puis le retour à l'état initial. Ici, dans un souci de clarté, uniquement les molécules d'eau (H<sub>2</sub>O, rouge et blanc) et les têtes polaires des lipides (P, vert) sont représentées. La création du pore est induite par des défauts de la répartition des molécules d'eau à l'interface eau-lipide (initiation) ; les têtes polaires se réorganisent ensuite autour de ces défauts (construction). Le mouvement des molécules d'eau et des têtes polaires s'en suit jusqu'à stabilisation du pore (maturation). Dès lors que le champ électrique n'est plus appliqué, le retour à l'état initial se met en place en passant par les mêmes étapes en sens inverse (annihilation). Figure tirée de (Levine and Vernier, 2010)..... 87

**Figure 27 : Altérations du cytosquelette d'actine et de la protéine impliquées dans les jonctions des cellules endothéliales VE-cadherin après application de champs électriques pulsés.** Immunofluorescences de l'actine filamenteuse et de la protéine VE-cadhérine de cellules en monocouches non traitées (n/e, A et B) et traités avec des μsPEF (C-F) (directement après l'EP). Barre d'échelle : 40 μm. Figure de (Kanthou et al. , 2006). ..... 89

**Figure 28 : Transfert multi-étapes de plasmide d'ADN médié par l'EP.** Figure adaptée (Rosazza et al. , 2011). ..... 91

<b>Figure 29 : Visualisation des cellules perméabilisées au sein d'un sphéroïde de cellules de fibrosarcome murin (LPB).</b> L'iodure de propidium est utilisé pour marquer et visualiser les cellules perméabilisées (rouge). Les images de fluorescence représentent une projection 3D de 15 sections optiques (140 µm de profondeur). L'image de gauche représente la projection sur l'axe X-Y, et l'image de droite représente la projection sur l'axe Z. Echelle : 200 µm. Figure adaptée de (Wasungu et al. , 2009) .....	93
<b>Figure 30 : Suivi après EP du flux de molécules fluorescentes injectées en intra-veineux dans les vaisseaux sanguins.</b> Barre d'échelle : 1 mm. Figure issue (Bellard et al. , 2012). .....	95
<b>Figure 31 : Changement induit par l'EP sur les jonctions cellulaires CD31 dans les différents types de vaisseaux.</b> CD31 est marqué en rouge ici. Le volume de CD31 a été mesuré pendant les 90 minutes suivant le traitement. Les volumes obtenus sont normalisés avec le contrôle (ligne pointillé). Le groupe « EP_return » représente les souris pour lesquels une restauration du marquage de CD31 s'est mise en place à partir de 30 minutes et jusqu'à 90 minutes (restauration complète pour les veinules et les capillaires). Le groupe « EP_no return » représente les souris qui n'ont pas eu de restauration (50% des cas). Barre d'échelle : 50µm. Moyenne ± SEM. P<0.05. Figure adaptée de (Bellard et al. , 2012).....	95
<b>Figure 32 : Les différentes géométries d'électrodes utilisées en clinique pour l'ECT.</b> (A) Planes et parallèles (B) Aiguilles linéaires (C) Aiguilles linéaires, vue profil (D) Aiguilles hexagonales (E) A doigt avec aiguilles perpendiculaires (F) A doigt avec aiguilles axiales. Figure issue de (Miklavčič et al. , 2014). .....	98
<b>Figure 33 : Chronologie des majeures avancées pour l'application en clinique de l'ECT.</b> Abréviations : EP, electroporation ; ESOPE : European Standard Operating Procedures of ECT; GET, gene electro transfer; Tx, treatment. Figure issue de (Campana et al. , 2019). .....	99
<b>Figure 34 : Evaluation de la toxicité de la bléomycine, de la cisplatine et de la doxorubicine sur sphéroïde de cellules cancéreuses (HCT 116).</b> (A) Effets des molécules ± EP sur la morphologie des sphéroïdes 3, 6, 9 et 24 heures après le traitement. Barre d'échelle : 100 µm. (B) Suivi de la croissance des sphéroïdes après traitement, exprimée ici par l'aire des sphéroïdes normalisée par la valeur avant traitement. (C) Quantification des cellules apoptotiques sur sphéroïdes dissociés (exprimée en pourcentage de cellule), 9 heures après le traitement. Figure adaptée de (Gibot et al. , 2013). .....	100
<b>Figure 35 : Schéma illustrant la réponse immunitaire induite par l'IRE dans une tumeur du pancréas.</b> Pre IRE : environnement immunosuppresseur. Post IRE : stimulation de la réponse immunitaire via le relargage d'antigènes (rond noir) reconnus par les cellules dendritiques. Les cellules dendritiques matures migrent vers les ganglions lymphatiques où elles vont activer les cellules T cytotoxiques. Ces dernières migrent vers le site de la tumeur traité mais également sur les potentiels sites distants. Figure issue de (Geboers et al. , 2020). .....	102
<b>Figure 36 : Diamètre et volume des sphéroïdes de cellules HCT 116 sauvage (WT) et exprimant la Green Fluorescent Protein (GFP).</b> Diamètres mesurés et volumes calculés à partir des micrographes en contraste de phase des sphéroïdes (Volume sphéroïde = $4\pi*(r^3/3)$ avec r le rayon du sphéroïde). .....	111
<b>Figure 37 : Suivi de croissance des sphéroïdes HCT 116- GFP (B) et WT (C) traités avec du milieu de culture DMEM exposés différents temps au jet de plasma.</b> (A) Micrographes de contraste de phase et de fluorescence GFP des sphéroïdes HCT 116-GFP avant traitement (J0), 1 (J1) et 5 (J5) jours après traitement. Barre d'échelle : 100 µm. (B) Courbes de croissance des sphéroïdes HCT 116-GFP présentées en (A), les volumes sont calculés à partir des micrographes de fluorescence GFP (Volume sphéroïde = $4\pi*(r^3/3)$ avec r le rayon du sphéroïde). N=1 expérience, n= 12 sphéroïdes, volume moyen ± déviation standard. (C) Courbes de croissance de sphéroïdes de cellules HCT 116-WT issues de (Judée et al. , 2016b) traités avec du P-A DMEM exposé 60, 120 ou 240 secondes au plasma. .....	112
<b>Figure 38 : Influence des solutions PBS et NaCl non exposées au jet de plasma ou exposées au flux d'hélium seul sur la croissance des sphéroïdes de cellules HCT 116-GFP.</b> Les solutions de PBS et de NaCl sont exposées au flux d'hélium (sans mise sous tension) pendant 4 minutes, temps nécessaire pour avoir une évaporation équivalente à celle obtenue lors d'une exposition de 2 minutes au jet de plasma froid. À la fin de l'incubation de 4 heures, les sphéroïdes sont rincés puis transférés dans du nouveau milieu de culture DMEM complet (sans pyruvate) et remis en culture à 37°C pour un suivi de croissance sur 7 jours. Les courbes de croissance sont obtenues à partir de la mesure de l'aire de la fluorescence GFP (cellules viables) comme décrit dans le matériel et méthode section 8. N=1 expérience, n=6 sphéroïdes/condition, moyenne ± déviation standard.....	115
<b>Figure 39 : Influence du pH extracellulaire sur la cytotoxicité du NaCl enrichies en RONS.</b> Courbes de croissance des sphéroïdes HCT 116-GFP incubés dans du NaCl (témoin), du P-A NaCl, et du NaCl contenant 515 µM de peroxyde d'hydrogène ± nitrite (160 µM) ± nitrate (180 µM) pH 6,5 ou pH 4. N=1 expérience, n=8 sphéroïdes, moyenne ± déviation standard.....	116
<b>Figure 40 : Résumé graphique de l'article 2.</b> .....	117

<b>Figure 41 : Effet des traitements successifs par P-A PBS et P-A NaCl sur la morphologie et la croissance des sphéroïdes de cellules HCT 116-GFP.</b> Les sphéroïdes sont incubés 4 heures dans du P-A PBS ou du P-A NaCl (exposés 120 secondes au jet de plasma) successivement à J0, J3, J6 et J9 avant d'être remis dans du milieu de culture. (A) Images de microscopie des sphéroïdes en lumière blanche et en fluorescence GFP avant et 24 heures après chacun des traitements. (B) Zoom des sphéroïdes après 3 et 4 traitements, Barre d'échelle (A et B) : 200µm. (C) Courbes de croissances des sphéroïdes, les flèches noires indiquent les traitements successifs. t-test sur N= 2 expériences, n= 6 sphéroïdes/condition/expérience, moyenne ± erreur standard à la moyenne. . 120	
<b>Figure 42 : Chronologie des événements induits par le traitement milieu de culture DMEM activé par plasma froid entraînant la mort cellulaire dans les sphéroïdes de cellules HCT 116-WT.</b> .....	121
<b>Figure 43 : Perméabilisation induite et croissance des sphéroïdes de cellules HCT 116-GFP par champs électriques pulsés.</b> Les sphéroïdes de cellules HCT 116-GFP de 5 jours de croissance ont été soumis à des champs électriques pulsés de différentes intensités dans du tampon de pulsation (A, B, C) ou du tampon phosphate salin PBS (D, E, F) contenant de l'iodure de propidium à 100 µM (PI). Le marquage PI (rouge) des cellules au sein des sphéroïdes est visible sur les images de microscopie à champs large à fluorescence (A et D). L'intensité de fluorescence a été quantifiée sur les images de microscopie et est présentée sur les histogrammes (B et E). En parallèle, les mêmes expériences ont été réalisées sans ajout de PI pour suivre la croissance des sphéroïdes post EP (C et F). Quantification PI en tampon de pulsation : N=1 seule expérience avec 4 sphéroïdes ; en PBS : N=2 expériences indépendantes avec 4 sphéroïdes, moyenne ± erreur standard à la moyenne. Suivi de croissance : tampon de pulsation et PBS : N= 2 expériences indépendantes avec 6 sphéroïdes. Moyenne ± erreur standard à la moyenne. ....	127
<b>Figure 44 : Les différentes étapes de l'autophagie : formation des vésicules et protéines impliquées dans la régulation.</b> (A) Les majeures protéines impliquées dans le processus d'autophagie et sa régulation sont montrées ici (mTOR, le complexe ULK1, P62, LC3-II, hydrolase et perméase). Schéma adapté de (Kaushal et al. , 2019). (B) Images de microscopie électronique à transmission (MET) issues de (Jung et al. , 2019) montrant les différentes vacuoles d'autophagie (flèches rouges). M : mitochondries. Barre d'échelle : 500 nm. ....	131
<b>Figure 45 : Observation en microscopie électronique à transmission des vacuoles d'autophagie sur les cellules HCT 116-GFP des couronnes externes des sphéroïdes traités par EP et P-A PBS (1 heure d'incubation avant fixation).</b> Les flèches rouges montrent ce qui semblent être des vacuoles d'autophagie. Barres d'échelle : haut gauche : 5 µm ; milieu droit : 2 µm ; haut droit, milieu gauche et bas gauche : 1 µm ; bas droit : 500 nm.....	133
<b>Figure 46 : Analyse par Western Blot de l'expression de p62 et LC3-II.</b> Extraits protéiques issues de sphéroïdes de cellules HCT 116-GFP non traités (NT) et traités par EP suivi d'une incubation d'une heure dans du P-A PBS (T). L'actine est utilisée comme contrôle de charge. ....	134
<b>Figure 47 : Analyse par Western Blot de l'expression de protéines impliquées dans la voie de l'autophagie.</b> Extraits protéiques issues de sphéroïdes de cellules HCT 116-GFP non traité (NT) et traités par EP suivi d'une incubation de 3 heures dans du P-A PBS (T3). (A) Analyse de l'expression de P62, p4EBP-1 et LC3I/II. (B) Analyse de l'expression de p-ULK-1. L'actine est utilisée comme contrôle de charge.....	135
<b>Figure 48 : Titration des anticorps pour le marquage par immunofluorescence de l'actine-F et de ZO-1.</b> Micrographies des cryocoupes (5 µm d'épaisseur) de sphéroïdes de cellules HCT 116-GFP non traités (cultivés dans le DMEM pendant 5 jours). Les noyaux sont marqués avec du DAPI (bleu cyan). (A) Micrographies de fluorescence obtenues avec différentes dilutions de la phalloïdine couplé à l'Alexa Fluor 594 (AF594, rouge). Grossissement x20, barre d'échelle : 100 µm. (B) Micrographies de fluorescence obtenues avec différentes dilutions de l'anticorps primaire dirigé contre ZO-1, l'anticorps secondaire couplé à l'Alexa Fluor 594 (AF594, rouge) est utilisé à une concentration fixée. Grossissement x100 à huile, barre d'échelle : 10 µm L'acquisition des images se fait au microscope à fluorescence champ large. Les images sont représentatives de n=5 coupes de 5 sphéroïdes différents. ....	138
<b>Figure 49 : Immunofluorescence de l'actine-F sur des coupes de sphéroïdes de cellules HCT 116-GFP.</b> Les sphéroïdes sont soumis à l'EP seul dans le PBS (EP), ou incubés 30 minutes ou 3 heures dans le PBS (PBS) ou dans le P-A PBS (P-A PBS) seulement ou précédé de l'EP (P-A PBS + EP). Epaisseur de coupes : 5 µm à 30 minutes, 10 µm à 3 heures. Microscope de fluorescence à champs large, objectif x100 à huile, barre d'échelle : 100 µm. Les images sont représentatives de n = 5 coupes.....	140
<b>Figure 50 : Immunofluorescence de ZO-1 sur des coupes de sphéroïdes de cellules HCT 116-GFP.</b> Les sphéroïdes sont soumis à l'EP seul dans le PBS (EP), ou incubés 30 minutes ou 3 heures dans le PBS (PBS) ou dans le P-A PBS (P-A PBS) seulement ou précédé de l'EP (P-A PBS + EP). Epaisseur de coupes : 5 µm à 30 minutes, 10 µm à 3 heures. Microscope de fluorescence à champs large, objectif x100 à huile, barre d'échelle : 100 µm. Les images sont représentatives de n = 5 coupes.....	141

<b>Figure 51 : Effets du traitement P-A PBS, seul ou combiné à l'EP, sur les sphéroïdes de cellules FaDu. (A)</b> Micrographes des sphéroïdes de cellules FaDu avant traitement (J0), 1 et 5 jours après les différents traitement (grossissement x10), barre d'échelle : 200 µm. <b>(B)</b> Croissance des sphéroïdes obtenues à partir des micrographes. n= 8 sphéroïdes/groupe. ....	143
<b>Figure 52 : Changements de morphologie des sphéroïdes de cellules B16-F10-tdTomato en réponse au traitement par P-A PBS.</b> Les sphéroïdes de cellules B16-F10-tdTomato sont mis en contact avec du PBS (2 heures) ou du P-A PBS pendant 30 minutes, 1 heure ou 2 heures. Les sphéroïdes sont imagés avant le traitement et directement après le traitement au microscope à fluorescence à champ large. La morphologie des sphéroïdes est visible sur les micrographes de contraste de phase et la fluorescence tdTomato (utilisée ici comme témoin de la viabilité cellulaire). Images représentatives de n= 8 sphéroïdes d'une seule expérience. Barre d'échelle : 200 µm. ....	145
<b>Figure 53 : Réponse des sphéroïdes de cellules B16-F10-tdTomato au traitement combiné P-A PBS et EP.</b> Les sphéroïdes sont incubés dans du PBS ou du P-A PBS pendant 1 heure ± EP (600 V/cm). Les changements de morphologie et la fluorescence tdTomato sont suivis au microscope à fluorescence à champ large. Barre d'échelle : 200 µm. Images représentatives de n= 6 sphéroïdes d'une seule expérience. ....	146
<b>Figure 54 : Bilan des résultats (partie I et II).</b> .....	152
<b>Figure 55 : Évaluation de la réponse à l'injection de PBS activé par plasma, seul ou combiné à l'EP, des tumeurs intradermiques B16-F10-tdTomato chez des souris immunocompétentes (C57Bl/6).</b> J0 représente le jour du traitement. <b>(A)</b> Protocole mis en place pour le traitement des tumeurs. <b>(B)</b> La croissance des tumeurs est suivie par mesure journalière au pied à coulisse digital, le volume tumoral est obtenu tel que décrit dans le matériel et méthode section 16.a. Les valeurs sont comparées avec un test ANOVA à deux facteurs entre le J0 et le J5 avec ****p < 0.0001 ; **p < 0.01. <b>(C)</b> La survie des animaux de chaque groupe est présentée en pourcentage. <b>(D)</b> Graphe représentant la variation du poids des animaux au cours de l'expérimentation. Données des groupes témoin, P-A PBS et P-A PBS + EP issues de 4 expériences indépendantes. Données du groupe EP seul issues de 2 expériences indépendantes dont n= 3 EP avec injection placebo de PBS et n=2 EP sans injection de placebo. Les données des graphes représentent les moyennes ± SEM. ....	158
<b>Figure 56 : Évolution morphologique des tumeurs intradermiques B16-F10-tdTomato au cours de l'expérimentation.</b> <b>(A)</b> Photographie d'une tumeur témoin, prise avant la mise à mort de la souris et présentant une nécrose centrale non cicatrisée et ouverte (flèche noire). <b>(B)</b> Photographie d'une tumeur traitée avec du P-A PBS prise 48 heures après l'injection. <b>(C)</b> Photographie d'une tumeur doublement traitée (injection de P-A PBS suivie de l'EP), 48 heures après le traitement montrant un gonflement autour de la tumeur, témoin d'une inflammation. ....	159
<b>Figure 57 : Stratégie expérimentale mise en place pour le traitement par P-A PBS, seul ou combiné à l'EP, des tumeurs sous-cutanées HCT 116-GFP chez des souris immunodéficientes (nudes).</b> Le J0 représente le jour du 1 <sup>er</sup> traitement (10 à 18 jours post greffe des cellules). Un volume de PBS ou P-A PBS équivalent à un V/2 de la tumeur est injecté dans les tumeurs des souris. Une mesure journalière au pied à coulisse de la tumeur est effectuée tout au long de l'expérimentation. ....	160
<b>Figure 58 : Évaluation de la réponse à l'injection de PBS activé par plasma, seul ou combiné à l'EP, des tumeurs sous-cutanées HCT 116-GFP chez des souris immunodéficientes (expérience 1).</b> J0 représente le jour du premier traitement. <b>(A)</b> La croissance des tumeurs est suivie par mesure journalière au pied à coulisse digital, le volume tumoral est obtenu tel que décrit dans le matériel et méthode section 16.b. <b>(B)</b> La survie des animaux de chaque groupe est représentée en pourcentage. <b>(C)</b> Graphe représentant la variation du poids des animaux dans chaque groupe au cours de l'expérimentation. ....	161
<b>Figure 59 : Évaluation de la réponse à l'injection de PBS activé par plasma des tumeurs sous-cutanées HCT 116-GFP chez des souris immunodéficientes (expérience 2).</b> J0 représente le jour du premier traitement. <b>(A)</b> La croissance des tumeurs est suivie par mesure journalière au pied à coulisse digital, le volume tumoral est obtenu tel que décrit dans le matériel et méthode section 16.b. <b>(B)</b> La survie des animaux de chaque groupe est représentée en pourcentage. <b>(C)</b> Graphe représentant la variation du poids des animaux dans chaque groupe au cours de l'expérimentation. ....	162
<b>Figure 60 : Stratégie expérimentale mise en place pour le traitement de la carcinose péritonéale SKOV-3 GFP Luc par l'injection intrapéritonéale de PBS activé par plasma chez des souris immunodéficientes (nudes).</b> J0 représente le jour de la greffe des cellules <b>(A)</b> Stratégie expérimentale. <b>(B)</b> Photographies d'une souris traitée avec le P-A PBS imagée dans le dispositif de bioluminescence, l'intensité de bioluminescence est représentée en échelle de Fourier Image REsolution (FIRE). <b>(C)</b> Suivi de l'intensité de bioluminescence des cellules SKOV-3 GFP Luc au cours de l'expérimentation. <b>(D)</b> Graphe représentant la variation du poids des animaux au cours de	

<i>l'expérimentation. Données issues d'une seule expérience, groupe témoin n=4, groupe P-A PBS n=5. Les données des graphes C et D représentent les moyennes ± SEM.</i>	165
<b>Figure 61 : Schéma bilan représentant les hypothèses des mécanismes moléculaires et cellulaires induits par le traitement combiné par champs électriques pulsés (EP) et PBS activé par plasma (P-A PBS). Les cellules au sein du modèle 3D concernées par les mécanismes cellulaires décrit sont représentées sur les sphéroïdes miniatures avec un cercle gris. RONS : espèces réactives de l'oxygène et de l'azote, ? perspectives et hypothèses à valider.</b>	171
<b>Figure 62 : Photographie (A) et schéma (B) du dispositif jet de plasma mis en place au laboratoire.</b>	179
<b>Figure 63 : Photographie du dispositif d'activation des liquides par le jet de plasma froid.</b>	180
<b>Figure 64 : Principe de la détection des ions nitrite et nitrate par colorimétrie.</b>	181
<b>Figure 65 : Courbes d'étalonnage pour le dosage des ions nitrite et des ions nitrate dans les solutions. Les courbes sont obtenues en utilisant des solutions de NaNO<sub>2</sub> et NaNO<sub>3</sub> à différentes concentrations par la lecture de l'absorbance à 540 nm en triplicata. (A) Courbe d'étalonnage de la détection de NO<sub>2</sub><sup>-</sup>. (B) Courbe d'étalonnage de la détection de NO<sub>2</sub><sup>-</sup> + NO<sub>3</sub><sup>-</sup>.</b>	181
<b>Figure 66 : Courbes d'étalonnage pour le dosage du peroxyde d'hydrogène dans les solutions. Les points de la courbe sont obtenus en utilisant une solution standard de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> par la lecture de la fluorescence à 590 nm à différentes concentrations en triplicata.</b>	182
<b>Figure 67 : Photographie du générateur ELECTROCELL S20 βtech (A) avec le profil des impulsions unipolaires en vague carrée (B).</b>	183
<b>Figure 68 : Schéma du dispositif pour l'électroperméabilisation des sphéroïdes.</b>	184
<b>Figure 69 : Procédure d'analyse des micrographes pour l'obtention des cinétiques de pénétration du PI.</b>	186
<b>Figure 70 : Procédures d'injection du P-A PBS (A) et d'électroperméabilisation (B) des tumeurs intradermiques B16-F10-tdTomato.</b>	193
<b>Figure 71 : Procédure expérimentale pour le traitement et le suivi de croissance des tumeurs sous-cutanée HCT 116-GFP chez la souris nMRI.</b>	193
<b>Figure 72 : Procédure expérimentale pour le traitement et le suivi de croissance par bioluminescence des tumeurs SKOV-3 GFP Luc chez la souris nMRI.</b>	194
<b>Figure 73 : Images de bioluminescence de la luciférine sur le logiciel ImageJ et position des ROI (Region Of Interest).</b>	195



## TABLE DES TABLEAUX

---

<b>Tableau 1 : Récapitulatif des traitements actuels utilisés en oncologie.</b> Le mécanisme d'action, les types de cancer traités ainsi que les avantages et les limites de chacune de ces méthodes sont présentés ici. RI : réponse immunitaire ; SRIS : syndrome de réponse inflammatoire systémique ; RT : radiothérapie ; CT : chimiothérapie. ....	53
<b>Tableau 2 : Caractéristiques du jet de plasma et de la décharge à barrière diélectrique à électrodes flottante.</b> Tableau adaptée de (Heinlin et al. , 2010). ....	61
<b>Tableau 3 : Synthèse des effets des milieux de cultures et autres liquides activés par plasma froid sur les cellules cancéreuses in vitro et in vivo.</b> Légende : $\sphericalangle$ inhibition/diminution ; $\nearrow$ activation/augmentation ; voie <b>AKT/PI3K/mTOR</b> : voie de régulation de l'apoptose et du cycle cellulaire ; <b>PDK1</b> : pyruvate déshydrogénase kinase ; <b>TRPM2</b> : Transient receptor potential cation channel M2, protéine de type canal calcique ; <b>PRDM1 <math>\alpha</math></b> : PR domain zinc finger protein 1, represseur des $\beta$ -interferon et suppresseur de tumeur; <b>MMP-9</b> : Matrix metallopeptidase 9 impliquée dans la dégradation de la matrice extracellulaire; <b>BAX/BCL2</b> : facteurs apoptotiques; <b>CRT</b> : calreticulin; <b>HSP70</b> : heat shock protein 70; <b>HMGB1</b> : high-mobility-group-protein B1 ; <b>I.T.</b> : intra tumoral ; <b>I.P.</b> : intrapéritonéal ; <b>NT</b> : non traité ; <b>T</b> : traité ; <b>CSC</b> : cellules souches cancéreuses ; <b>DMEM</b> : Dulbecco's Modified Eagle's Medium ; <b>RPMI</b> : Roswell Park Memorial Institute medium ; <b>IMDM</b> : Iscove's Modified Dulbecco's Medium ; <b>SLR</b> : solution de lactate Ringer. ....	71
<b>Tableau 4 : Stratégie expérimentale pour les immunomarquages des protéines sur coupes de sphéroïdes.</b> <b>BSA</b> : albumine de veau fœtal ; <b>AF 594</b> : Alexa Fluor 594 ; <b>CST</b> : Cell Signaling Technology. ....	189



## ACRONYMES ET ABRÉVIATIONS

---

<b><sup>*</sup>NO</b> : oxyde nitrique	<b>GEMM</b> : souris génétiquement modifiées
<b><sup>*</sup>OH</b> : radicaux hydroxylés	<b>GFP</b> : green fluorescent protein
<b><sup>1</sup>O<sub>2</sub></b> : oxygène singulet	<b>GUV</b> : vésicule unilamellaire géante
<b><sup>1</sup>O<sub>2</sub></b> : oxygène singulet	<b>H<sub>2</sub>O<sub>2</sub></b> : peroxyde d'hydrogène
<b>2D</b> : deux dimensions	<b>HIF-1</b> : hypoxia-inducible factor-1
<b>3D</b> : trois dimensions	<b>HMGB1</b> : high-mobility-group-protein B1
<b>4EBP-1</b> : 4E-binding protein-1	<b>HNO<sub>2</sub></b> : acide nitreux
<b>AF</b> : alexa fluor	<b>HNO<sub>3</sub></b> : acide nitrique
<b>AMO</b> : ablation par micro-ondes	<b>HSP70</b> : heat shock protein 70
<b>AQP</b> : aquaporine	<b>I.P.</b> : intrapéritonéal
<b>ARF</b> : ablation par radiofréquence	<b>I.T.</b> : intra tumoral
<b>ATG13</b> : autophagy related gene 13	<b>IF</b> : immunofluorescence
<b>ATP</b> : adénosine triphosphate	<b>IL</b> : Interleukine
<b>BAX/BCL2</b> :	<b>IMDM</b> : Iscove's Modified Dulbecco's Medium
<b>C152</b> : cluster de différenciation 52	<b>INCa</b> : Institut National du Cancer
<b>CAP</b> : cold-atmospheric plasma	<b>IR</b> : infrarouge
<b>CAR</b> : récepteur antigène chimérique	<b>IRE</b> : électroporation irréversible
<b>CHO</b> : ovaire de hamster de chine	<b>IRM</b> : imagerie de résonance magnétique
<b>Cl-O<sup>-</sup></b> : anion hypochlorite	<b>JAM</b> : junction adhesion molecules
<b>CRT</b> : calreticulin	<b>LC3-I</b> : light chain 3
<b>CSC</b> : cellules souches cancéreuses	<b>Luc</b> : luciférase
<b>CTLA4</b> : cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4	<b>MCTS</b> : multicellular tumor spheroids
<b>DAMP</b> : Damage Associated Molecular Pattern	<b>MEC</b> : matrice extracellulaire
<b>DMEM</b> : Dulbecco's Modified Eagle's Medium	<b>MMP-9</b> : matrix metallopeptidase 9
<b>DOPC</b> : Dioleoyl-sn-Glycero-3-Phosphocholine	<b>mPTP</b> : transition de perméabilité mitochondriale
<b>ECT</b> : électrochimiothérapie	<b>mTOR</b> : mammalian/mechanistic target of rapamycin
<b>EGT</b> : électrogénéthérapie	<b>Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub></b> : sodium orthovanadate
<b>EMT</b> : transition épithélio-mésenchymateuse	<b>NaCl</b> : chlorure de sodium
<b>EP</b> : électroporation/électroperméabilisation	<b>NADPH</b> : nicotinamide adénine dinucléotide phosphate
<b>EPR</b> : enhanced permeability and retention	<b>NaF</b> : fluorure de sodium
<b>ESOPE</b> : European Standard Operating Procedures of ECT	<b>NO</b> : monoxyde d'azote
<b>fe-DBD</b> : décharge à barrière diélectrique à électrode flottante	<b>NO<sub>2</sub><sup>-</sup></b> : nitrite
<b>FIP200</b> : AK-family interacting protein of 200 kDa	<b>NO<sub>3</sub><sup>-</sup></b> : nitrate
<b>FITC</b> : fluorescein isothiocyanate	<b>NT</b> : non traité
	<b>O<sub>2</sub><sup>•-</sup></b> : anion superoxyde
	<b>O<sub>3</sub></b> : ozone
	<b>ONOO<sup>-</sup></b> : peroxydinitrite

**P/S** : pénicilline/streptomycine  
**P-A DMEM** : DMEM activé par plasma  
**P-A NaCl** : NaCl activé par plasma  
**P-A PBS** : PBS activé par plasma  
**PAL** : plasma-activated liquid  
**PAM** : plasma-activated medium  
**PBS** : tampon phosphate salin  
**PD1** : programmed cell death protein 1  
**PDK1** : pyruvate déshydrogénase kinase  
**PDL-1** : programmed cell death ligand 1  
**PDT** : thérapie photo dynamique  
**PDX** : xéno greffe dérivée de patient  
**PECAM** : Platelet endothelial cell adhesion molecule  
**PEF** : pulsed electric fields  
**PI** : iodure de propidium  
**pIRE** : électroporation irréversible partielle  
**POPC** : 1-palmitoyl-2-oleoyl-sn-glycero-3-phosphocholine  
**PRDM1  $\alpha$**  : PR domain zinc finger protein 1  
**PS** : photo sensibilisante  
**RI** : réponse immunitaire  
**RNS** : espèces réactives de l'azote  
**ROI** : region of interest  
**RONS** : espèces réactives de l'oxygène et de l'azote  
**ROS** : espèces réactives de l'oxygène  
**RPMI** : Roswell Park Memorial Institute medium  
**RT** : radiothérapie  
**SCID** : severe combined immunodeficiency  
**SDS** : sodium dodecyl sulfate  
**SLR** : solution de lactate Ringer  
**SOD** : superoxyde dismutase  
**SOP** : Standard Operating Procedure,  
**SRIS** : syndrome de réponse inflammatoire systémique  
**SVF** : sérum de veau fœtal  
**T** : traité  
***Te*** : température des électrons  
**TEM** : microscopie électronique à transmission  
***Tg*** : température du gaz  
**TGF** : transforming growth factor  
***Ti*** : température des ions et des particules chargées  
**TIL** : lymphocytes infiltrant la tumeur  
**TRPM2** : Transient receptor potential cation channel M2  
**ULK1** : UNC51-like kinase  
**UV** : ultraviolet  
**VADS** : cancers des voies aérodigestives supérieures  
**VEGF** : facteur de croissance vasculaire endothélial  
**WB** : western blot  
**WT** : wild type  
**ZO-1** : Zonula Occludens-1



# INTRODUCTION

---

## Partie I : La physiopathologie des cancers

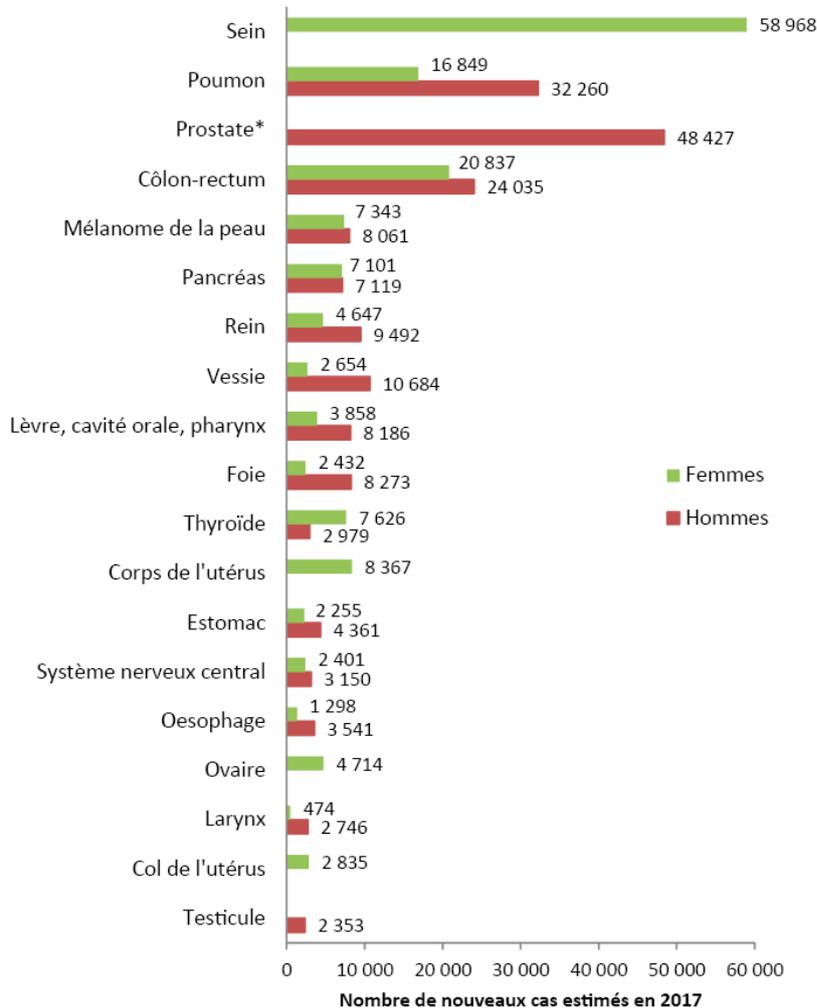
### 1. Épidémiologie des cancers

Le dernier rapport de l'Institut National du Cancer (INCa) « Les cancers en France » ([www.e-cancer.fr/ressources/cancers\\_en\\_france/](http://www.e-cancer.fr/ressources/cancers_en_france/)) estime à 399 626 nouveaux cas de cancer en 2017 (dont 214 021 hommes et 185 605 femmes). Le nombre de décès causé par la maladie est estimé à 150 303 en France métropolitaine (84 100 hommes et 66 203 femmes). Sur la période de 2005 à 2010, la survie nette varie de 9% (pancréas) à 93% (prostate) chez l'homme et de 10% (pancréas) à 97% (thyroïde) chez la femme. Toutefois, le risque de développer un second cancer est augmenté en moyenne de 36% chez ces personnes et est particulièrement marqué pour les cancers liés à la consommation d'alcool et de tabac, tels que les cancers des voies aérodigestives supérieures (VADS) et du poumon. Chez l'homme, les trois tumeurs solides les plus fréquentes sont celles de la prostate, du poumon et du côlon-rectum (avec 48 427, 32 260 et 24 035 nouveaux cas en 2017, respectivement). Chez la femme, il s'agit des cancers du sein, du côlon-rectum et du poumon (avec 58 968, 20 837 et 16 849 nouveaux cas en 2017, respectivement) (**Figure 1**). La France se situe parmi les pays européens à fort taux d'incidence de cancer chez l'homme comme chez la femme et présente également une mortalité par cancer élevée, soit 115 158 décès en 2017 chez les plus de 65 ans (dont 55,5% d'hommes). Concernant l'incidence annuelle des cancers chez les enfants (entre 0 et 14 ans), elle atteint 1780 nouveaux cas en moyenne, ceci représente un enfant sur 440. Les enfants sont principalement atteints de leucémies (29% des cas), de lymphomes (10%), de tumeurs du système nerveux central (25%) et 20% sont des tumeurs embryonnaires. Les cancers pédiatriques restent la 4<sup>ème</sup> cause de décès chez les 0-14 ans.

Les données internationales montrent que le cancer du poumon demeure le plus meurtrier (1,8 million de nouveaux cas en 2017 et 1,6 million de décès). Le cancer colorectal est le 3<sup>ème</sup> cancer incident chez l'homme et le second chez la femme, avec 1,4 millions de nouveaux cas dans le monde et 693 933 décès en 2012.

Les facteurs de risque évitables importants du cancer sont : le tabagisme, la consommation d'alcool, l'excès de viandes rouges et de charcuteries, la faible consommation de fruits, de légumes et de fibres, le surpoids et l'obésité, l'insuffisance de pratique d'activité physique. Parmi les principaux facteurs de risques infectieux, trois disposent de stratégies préventives :

les papillomavirus humains (HPV), les virus des hépatites B et C (VHB et VHC) et la bactérie *Helicobacter pylori*.



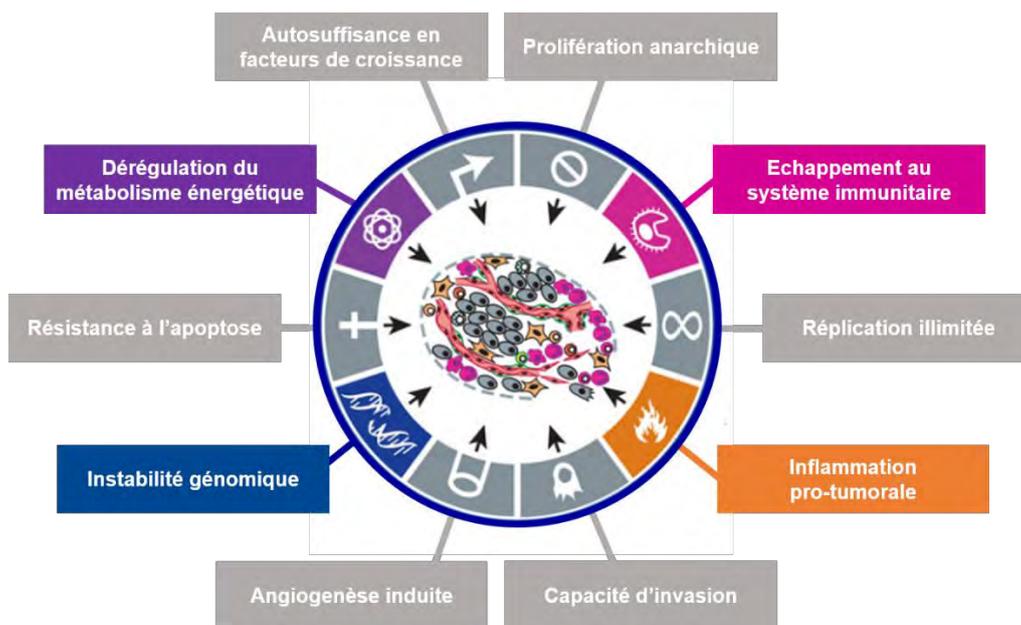
**Figure 1 : Classement des tumeurs solides par incidence estimée en 2017 en France métropolitaine selon le sexe.** \* Les données de projection 2017 ne sont pas fournies pour ce cancer. Il s'agit de l'estimation pour 2013. Source : Partenariat Francim/HCL/Santé publique France/INCa (Jéhannin-Ligier K, 2017). D'après le rapport de l'INCa de 2017.

*Le développement de thérapies anticancéreuses s'est d'abord basé sur des observations empiriques dues au manque de connaissances sur les caractéristiques des cellules cancéreuses et de leur microenvironnement ainsi que leur rôle dans la progression tumorale. Au fil du temps, de meilleures connaissances de la biologie des tumeurs humaines ont pu être proposées permettant ainsi le développement de nouvelles stratégies thérapeutiques plus adaptées.*

## 2. La biologie des tumeurs

### a. Caractéristiques des cellules cancéreuses

Un cancer se caractérise par l'envahissement progressif d'un organe cible par des cellules devenues peu ou insensibles aux mécanismes d'homéostasie cellulaire et tissulaire. Une tumeur est une structure tridimensionnelle, organisée, dont la croissance est régie à la fois par la perte de contrôle de la prolifération des cellules tumorales, et également par l'influence du microenvironnement. Au sein des tumeurs, une vascularisation anormale se met en place ce qui induit l'apparition de gradient d'oxygène et de nutriments dans certaines microrégions. Ceci se traduit par le développement d'une population hétérogène de cellules. Elles partagent tout de même des propriétés communes qui les différencient des cellules saines. La **figure 2** représente les principales caractéristiques communes à toutes les cellules cancéreuses.



**Figure 2 : Caractéristiques des cellules cancéreuses.** Figure adaptée de (Hanahan and Weinberg, 2011).

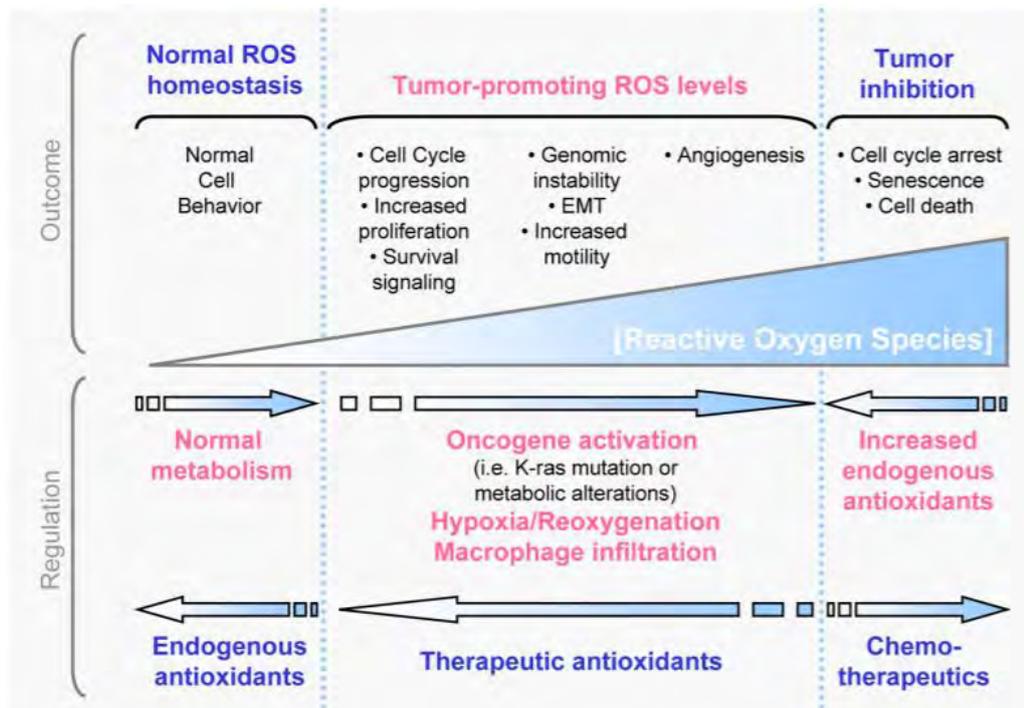
Chacune de ces caractéristiques sont présentées plus en détails ci-dessous :

- **Prolifération anarchique** (ou immortalité réplivative). La prolifération des cellules est régie par un cycle cellulaire finement régulé. En effet, la vie d'une cellule est rythmée par différentes phases : la phase G1, S et G2 qui déterminent l'interphase c'est-à-dire la période comprise entre une division et le début de la suivante ; une phase de division, la mitose (M), une cellule mère forme deux cellules filles et enfin

une phase de quiescence G0 où la cellule sort du cycle cellulaire. Toutes ces phases sont régulées par des points de contrôle et de restrictions activés en réponse à des stimuli environnementaux et permettant de vérifier que toutes les conditions cellulaires sont bien réunies pour passer à l'étape suivante. Chez la cellule cancéreuse, des mutations entraînent une levée de ces points de restriction, à l'origine de cette prolifération anarchique.

- **Autosuffisance en facteurs de croissance** (Aaronson, 1991). Les cellules tumorales, d'une part surexpriment les récepteurs membranaires des facteurs de croissance et les présentent également sous une forme constitutivement active ; et d'autre part ont la capacité de produire leurs propres facteurs de croissance les rendant ainsi indépendantes vis-à-vis des facteurs de croissance environnementaux.
- **Résistance à l'apoptose.** Lors d'un stress trop important, les cellules normales ont la capacité de se détruire via l'activation de voies de signalisation aboutissant à une mort cellulaire : on parle de suicide cellulaire ou d'apoptose (Elmore, 2007; Kerr *et al.* , 1972). Ce type de mort est caractérisé par des dommages induits à l'ADN. Dans une cellule normale ces dommages vont être détectés par des senseurs, le cycle cellulaire va alors être bloqué via l'action de protéines (p53), la cellule va alors activer des mécanismes de réparation ou alors le cas échéant entrer en apoptose. Les cellules cancéreuses présentent des mutations sur les protéines impliquées dans le blocage du cycle cellulaire, ces protéines sont inactives. Ainsi dans certains cas la cellule ne sera pas en mesure de réparer les dommages causés à l'ADN, ce qui a pour conséquence d'induire des instabilités génétiques et de conférer à la cellule une résistance à l'apoptose (Zhivotovsky and Kroemer, 2004).
- **Dérégulation du métabolisme énergétique** (Jang *et al.* , 2013). Le métabolisme des cellules cancéreuses a été décrit en 1930 par le Dr. Otto Warburg (Koppenol *et al.* , 2011) et est caractérisé par une glycolyse très accrue dû à une très forte consommation en glucose, c'est l'effet Warburg. En conséquence de cette suractivité glycolytique, les cellules cancéreuses ont une respiration cellulaire défectueuse et ont développé un métabolisme anaérobie, ainsi elles ont des besoins en oxygène moindre par rapport aux cellules normales. Du fait de cette activité métabolique augmentée, il y a, chez les cellules cancéreuses, une surproduction de nicotinamide adénine dinucléotide phosphate (NADPH), cofacteur de nombreuses réactions enzymatiques et agent antioxydant, et un taux d'espèces réactives de

l'oxygène (ROS) plus élevé que chez les cellules saines (Cairns *et al.* , 2011). Parmi ces ROS, les plus connues dans la pathologie cancéreuse sont l'anion superoxyde ( $O_2^{\cdot-}$ ), le peroxyde d'hydrogène ( $H_2O_2$ ) et les radicaux hydroxylés ( $\cdot OH$ ). Ces ROS sont impliquées dans la régulation de plusieurs voies signalétiques et participent fortement à la progression tumorale (**Figure 3**). Des taux élevés de ROS chez les cellules saines peuvent être létales, en revanche la cellule cancéreuse via des mutations et des phénomènes d'adaptation a mis en place des mécanismes pour tolérer ces niveaux anormalement élevés de ROS. Néanmoins, la cellule cancéreuse du fait de cette surproduction de ROS utilise plus fortement ses systèmes antioxydants tel que la superoxyde dismutase (SOD) ou la catalase, ces systèmes s'épuisent donc plus vite chez les cellules cancéreuses par rapport aux cellules saines (Liou and Storz, 2010; Trachootham *et al.* , 2009).



**Figure 3 : Implication des espèces réactives de l'oxygène (ROS) dans la régulation des processus cellulaires chez les cellules cancéreuses.** Des événements tumorigènes tel que l'activation d'oncogène (K-ras), la dérégulation du métabolisme, l'hypoxie, et l'infiltration de macrophages peuvent induire une augmentation du niveau de ROS intracellulaires et participer à la progression tumorale (prolifération, survie, migration, transition épithélio-mésenchymateuse (EMT), instabilité génomique, angiogénèse). Le niveau élevé de ROS peut être contrôlé via l'action d'antioxydants thérapeutiques. Figure issue de (Liou and Storz, 2010).

- **Angiogenèse induite** (Nishida *et al.* , 2006). C'est en 1971 que le chirurgien Judah Folkman émet pour la première fois l'hypothèse que la progression tumorale se fait grâce à une néovascularisation ou angiogénèse : il introduit le principe de switch

angiogénique (Folkman and Kalluri, 2003). En effet, pour assurer sa croissance, la tumeur requiert un apport en nutriments et en oxygène supplémentaire ce qui nécessite la création de nouveaux vaisseaux sanguins. Ce switch angiogénique peut être activé par différents facteurs : via la sécrétion de facteurs pro-angiogéniques (principalement le facteur de croissance vasculaire endothélial, VEGF), un stress métabolique (hyperglycémie, pH acide) ou mécanique (forte pression exercée par les cellules au sein de la tumeur), ou encore une réponse inflammatoire (Kerbel, 2000). La formation de nouveaux vaisseaux est également régulée par le taux d'oxygénation de la tumeur via l'activité de la protéine HIF-1 (Hypoxia-Inducible Factor-1). En condition de normoxie, cette protéine subit une cascade de modifications post-traductionnelles (hydroxylation et ubiquitinylation) qui permettent son adressage au protéasome pour sa dégradation. Dans les cellules tumorales en hypoxie, HIF-1 $\alpha$  n'est plus adressée au protéasome (modifications post-traductionnelles oxygène-dépendantes). Elle est donc surexprimée, transloquée dans le noyau, et va former un hétérodimère avec la protéine HIF-1  $\beta$  pour aller réguler l'expression de certains gènes dont certains impliqués dans l'angiogénèse (Rankin and Giaccia, 2008; Zimna and Kurpisz, 2015). Il a également été montré plus récemment dans les glioblastomes un autre mode de vascularisation tumorale relevant directement des propriétés des cellules cancéreuses (Ricci-Vitiani *et al.*, 2010) : la transdifférenciation de cellules cancéreuses leur conférant un caractère de cellule souche et un phénotype pseudo-endothélial, ces cellules sont alors capables de tapisser la paroi interne des vaisseaux.

- **Vascularisation anormale.** Le système vasculaire normal est organisé en une hiérarchie de vaisseaux régulièrement espacés et bien différenciés (artères, artérioles, capillaires, veinules et veines). En revanche, les vaisseaux créés au sein de la tumeur sont anormaux et présentent une morphologie anarchique et désorganisée : absence de membrane basale, canaux à paroi mince (veinules), courts et avec de nombreux culs-de-sac, peu ou pas d'innervation et de nombreux espaces vasculaires bordés directement par les cellules tumorales (Nagy *et al.*, 2010). Cette vascularisation anormale entraînant une mauvaise absorption des nutriments dans la tumeur est à l'origine d'une hyperperméabilité, provoquant l'accumulation de certaines molécules au niveau de la tumeur : on parle d'effet EPR pour « Enhanced Permeability and Retention » (Matsumura and Maeda, 1986). Combiné à un

drainage lymphatique insuffisant, cette hyperperméabilité tumorale peut être exploitée pour la délivrance sélective de molécules anti-cancéreuses (ciblage passif de la tumeur) (Golombek *et al.* , 2018).

- **Capacité d'invasion des tissus** (métastase). La cellule cancéreuse est capable de faire la transition épithélio-mésenchymateuse et ainsi d'acquérir des propriétés de migration et d'invasion (Zhang and Weinberg, 2018). Cette transformation phénotypique contribue également aux mécanismes de résistance développés par les cellules cancéreuses ainsi qu'à l'hétérogénéité des tumeurs et à l'apparition de cellules souches cancéreuses.
- **Échappement au système immunitaire.** Les cellules cancéreuses ont la capacité de détourner la surveillance exercée par les cellules immunologiques (Beatty and Gladney, 2015; Chen and Mellman, 2017). Un moyen efficace d'échapper à la vigilance du système immunitaire est de prévenir leur détection : on parle d'échappement de la réponse immunitaire. Les cellules cancéreuses ont la capacité d'activer des points de contrôle négatifs via l'interaction avec des cellules immunitaires, alors la tumeur peut devenir « invisible aux yeux » du système immunitaire. Les deux points de contrôles les plus connus à ce jour et impliqués dans l'échappement des cellules tumorales sont : la protéine CTLA4 (cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4) aussi connu sous le nom de C152 (cluster de différenciation 52), et la protéine PD1 (programmed cell death protein 1) (Sharma and Allison, 2015). Les cellules cancéreuses peuvent exprimer à leur surface les ligands de ces protéines, CD80/CD86 et PDL-1 (programmed cell death ligand 1), respectivement, inhibant ainsi l'activation des lymphocytes T. L'immunothérapie, présentée dans la **section 3.f** ci-après, repose sur l'utilisation d'anticorps bloquants ces interactions afin de réactiver la réponse immunitaire. Plus récemment, un lien entre le métabolisme des cellules cancéreuses et l'échappement de la réponse immunitaire a été proposé (Siska *et al.* ). Il apparaît que les lymphocytes, les macrophages et les fibroblastes associés aux tumeurs contribuent à l'accumulation de lactate dans le microenvironnement tumoral, un phénomène appelé effet Warburg inversé. L'acide lactique accumulé joue le rôle de métabolite immunosuppresseur (Calcinotto *et al.* , 2012; Lardner, 2001; Mazzio *et al.* , 2012). Ainsi, Siska et ses collaborateurs ont proposé d'attribuer un score « metabolic-tumor-stroma » afin de mieux prédire la réponse immunitaire associé à la tumeur.

Le microenvironnement tumoral module également les capacités de développement de la tumeur, il comporte plusieurs éléments tel que les facteurs sécrétés (hormones, facteurs de croissance), les cellules de la matrice extracellulaire (immunitaires, fibroblastes), les composants protéiques (fibronectine, collagène) et enfin les contraintes mécaniques (tension de surface, pression). La cancérisation des cellules est donc un processus progressif échelonné par diverses étapes. La compréhension et la caractérisation des mécanismes impliqués dans les voies de cancérisation ainsi que le développement de nouvelles stratégies thérapeutiques reposent essentiellement sur ces caractéristiques physiologiques des cellules cancéreuses.

### b. Les modèles d'études en cancérologie : avantages et limites

La recherche en biologie du cancer utilise de nombreux modèles d'études, *in vitro* et *in vivo*, afin d'une part, apporter une meilleure compréhension des voies de cancérisation, et d'autre part évaluer au mieux la réponse aux traitements. Ces modèles biologiques présentent des niveaux de complexité différents et il n'existe pas de modèle d'étude universel. Le choix du modèle utilisé repose également sur la question biologique posée. La **figure 4** regroupe les principaux modèles biologiques utilisés en recherche en fonction de leur complexité ; de la vésicule unilamellaire géante utilisée pour l'étude des membranes biologiques, au petit animal utilisé en expérimentation pré-clinique *in vivo*. Le sphéroïde, un modèle en trois dimensions, ainsi que les modèles animaux ont été utilisés dans notre projet et sont donc détaillés dans la suite de la section.

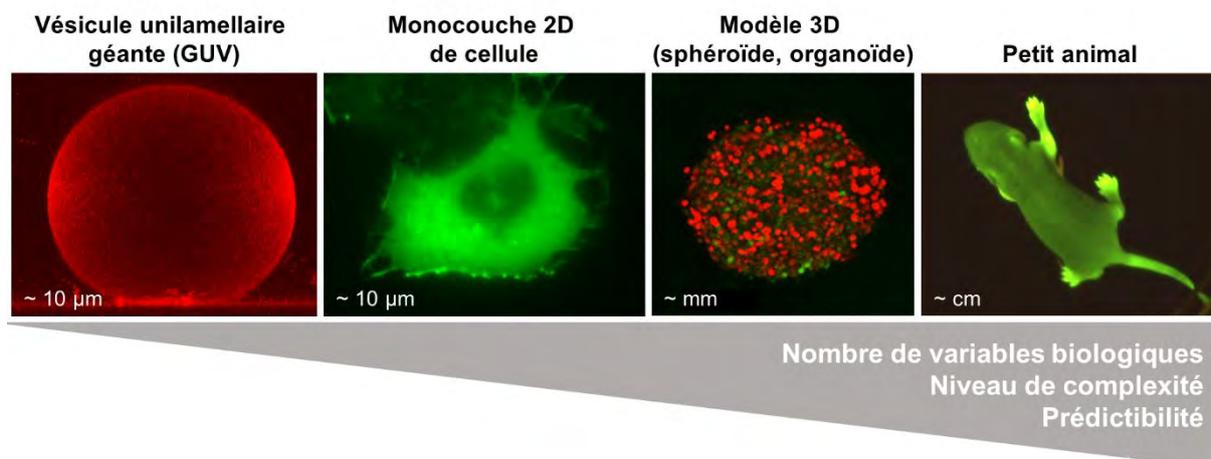


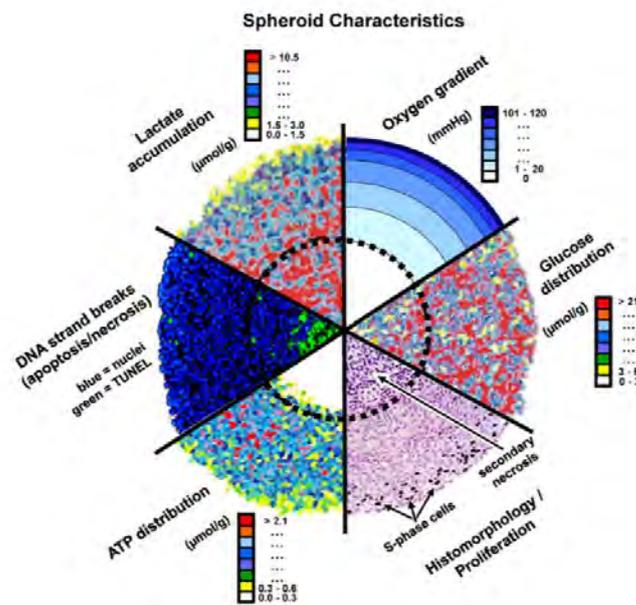
Figure 4 : Différents modèles d'études biologiques et leurs complexités.

*i. Le sphéroïde : un modèle d'étude in vitro en trois dimensions*

La culture cellulaire conventionnelle, ou monocouche de cellules, représente un modèle très simplifié en deux dimensions (2D), non représentatif de la complexité et de l'hétérogénéité du tissu tumoral. Ainsi, en première intention, l'utilisation de ce type de modèle peut apporter des réponses à certaines questions biologiques mais la validation sur des modèles plus complexes et plus prédictifs est nécessaire avant d'envisager des études pré-cliniques sur le petit animal. C'est au milieu du 20<sup>ème</sup> siècle que le concept de culture en trois dimensions (3D) a été proposé pour étudier la morphogénèse et la biologie du développement (Holtfreter, 1944; Moscona, 1952). La croissance en 3D de lignées cellulaires ou cultures primaires cancéreuses donne accès à un niveau de complexité supérieur. Des agrégats cellulaires ont été utilisés comme modèle *in vitro* pour étudier la réponse des cellules tumorales à diverses thérapies. Robert M. Sutherland et ses collaborateurs ont mis en place un modèle de microtumeur, de son nom anglais Multicellular Tumor Spheroids (MCTS) (Inch *et al.* , 1970; Sutherland *et al.* , 1971). Il a ensuite été utilisé afin d'évaluer *in vitro* la réponse à la radiothérapie (Sutherland *et al.* , 1970) et les résistances observées dans les tumeurs (Desoize *et al.* , 1998). Ce modèle 3D reconstitue l'hétérogénéité cellulaire présent au sein des tumeurs. En effet, des expériences ont permis de mettre en évidence l'apparition d'une régionalisation cellulaire due aux gradients d'oxygène, de nutriments et de pH qui se mettent en place au sein du sphéroïde au cours de sa croissance, tout comme dans les microrégions des tumeurs (Hirschhaeuser *et al.* , 2010; Sutherland, 1988). Une couronne de cellules prolifératives est observable en périphérie des sphéroïdes, et les cellules se situant dans les couches internes sont en quiescence. Lorsqu'une certaine taille est atteinte, un cœur nécrotique peut apparaître (Zanoni *et al.* , 2016) (**Figure 5**). Ce modèle 3D présente également de multiples interactions cellule-cellule, les contacts entre cellules et la communication qui en découlent ont une influence sur la réponse aux thérapies (Oloumi *et al.* , 2002). Byers et ses collaborateurs ont étudié le rôle des molécules d'adhésions, les cadhérines, dans la dissémination des cellules cancéreuses au sein de ce modèle (Byers *et al.* , 1995)

Tout comme pour les gradients en oxygène et en nutriments, des limites de diffusion et de pénétration des molécules, thérapeutiques par exemple, vont être observés dans le sphéroïde, similaire au tissu *in vivo*. Le sphéroïde est également un modèle pertinent pour étudier l'analyse des propriétés mécaniques des tumeurs. En effet, il a été mis en évidence que les sphéroïdes accumulent un stress mécanique au cours de leur croissance, on parle de propriétés rhéologiques (Guillaume *et al.* , 2019). De plus, la compression des sphéroïdes induit la mise en place de

forces de tension tout comme dans les tumeurs solides (Dolega *et al.* , 2017). L'angiogenèse tumorale a également été étudiée sur ces modèles 3D (Ghosh *et al.* , 2007; Laschke and Menger, 2017). Une analyse génomique et phénotypique sur des cellules de cancer du poumon issues de culture en monocouche ou en 3D montre que la carte d'expression génique des sphéroïdes est comparable à des tumeurs solides *in vivo* et diffère de celle obtenue pour les monocouches 2D, avec notamment une surexpression de gènes impliqués dans la progression tumorale retrouvée chez les sphéroïdes tout comme dans les tumeurs (Han *et al.* , 2020).



**Figure 5 : Caractéristiques biochimiques du sphéroïde, modèle 3D de tumeur.** Combinaison d'images analytiques représentant les différents gradients d'oxygène, de glucose, de lactate et d'ATP ; ainsi que des gradients de prolifération cellulaire. Figure extraite de (Hirschhaeuser *et al.* , 2010).

Les différents modes de culture et d'obtention des sphéroïdes donnent accès à des modèles 3D plus ou moins complexe permettant ainsi de répondre à différentes questions biologiques, énoncées précédemment. Il est possible d'incorporer à l'intérieur de ces sphéroïdes plusieurs types cellulaires, on parle de co-culture, (fibroblastes (Khawar *et al.* , 2018; Majety *et al.* , 2015; Ware *et al.* , 2016), kératinocytes, cellules immunitaires (Courau *et al.* , 2019)) afin d'étudier l'influence de chacune de ces composantes ainsi que le rôle de la matrice extracellulaire par exemple (Glimelius *et al.* , 1988).

Il existe différentes méthodes pour produire des sphéroïdes qui peuvent se répartir en deux grandes catégories : en suspension (scaffold-free, **figure 6A-D**), méthodes adaptées à la culture de cellules capable de s'auto-agréger ; ou dans une matrice (scaffold-based, **figure 6E-G**), ici la matrice ne soutient pas seulement les cellules, elle joue aussi le rôle de substrat et induit

également la formation de matrice extracellulaire. Ces différentes techniques peuvent induire la formation de sphéroïdes individualisés ou multiples, de tailles régulières ou variables. À ce jour, une des méthodes la plus facile à mettre en œuvre et démontrant une bonne répétabilité repose sur l'utilisation de plaque à fond rond possédant un revêtement empêchant aux cellules d'y adhérer (« ultra low attachment plate », **figure 6E**). Ainsi, les cellules qui ne peuvent s'accrocher au revêtement au fond des puits sont contraintes à se regrouper et forment spontanément des agrégats cellulaires qui formeront des sphéroïdes. Il est important de noter que la méthodologie utilisée pour la formation des sphéroïdes en laboratoire peut influencer sur les propriétés mécaniques et biologiques des sphéroïdes obtenus (Guillaume *et al.*, 2019).

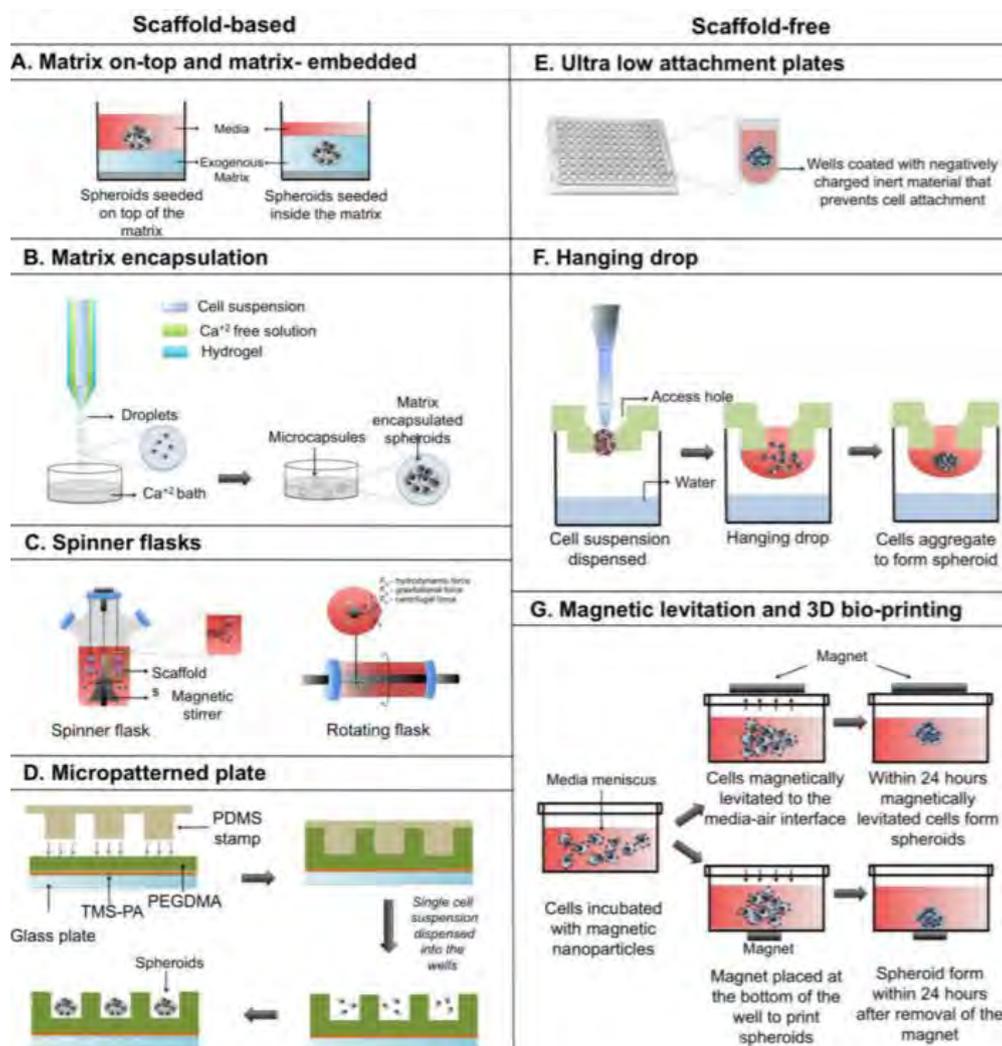


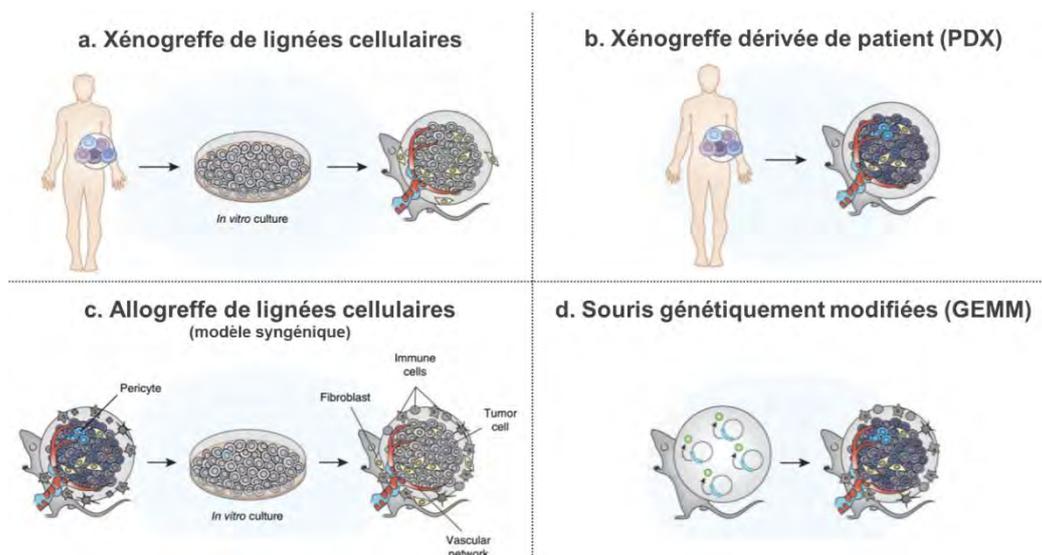
Figure 6 : Les méthodes de génération des sphéroïdes. Figure tirée de (Nath and Devi, 2016).

*C'est grâce aux connaissances de la biologie des tumeurs et au concept de mimétisme qu'est née le développement de nouveaux modèles in vitro en trois dimensions. Ainsi, le sphéroïde*

*de cellules tumorales constitue un modèle pertinent pour évaluer l'efficacité de thérapies anti-cancéreuses, permettant une meilleure prédictibilité de la réponse tumorale. Il constitue donc une bonne étape entre la recherche in vitro et la recherche pré-clinique sur le petit animal.*

*ii. Les modèles murins : avantages et limites des modèles d'études in vivo*

Comme introduit en **section 2**, diverses composantes de l'environnement tumoral, non intégrées au modèle *in vitro*, ont une influence sur la progression de la tumeur et *in fine* sur la réponse aux traitements. Parmi ces composantes, il y a le stroma de la tumeur, c'est-à-dire tout ce qui est présent au sein de la tumeur mais qui n'est pas une cellule cancéreuse. Ce stroma comprend : le tissu dont dérive la tumeur (épithélial, conjonctif, nerveux, germinal...), les vaisseaux sanguins, les cellules immunitaires (leucocytes) ainsi que la matrice extracellulaire. L'utilisation de modèles murins en recherche pré-clinique permet de prendre en compte ses composantes et est donc une étape essentielle dans l'évaluation de nouvelles stratégies thérapeutique anti-cancéreuse et le développement de nouveau médicament. Dans les années 90, la génération de modèles murins à partir tumeurs spontanées, chimio- ou viro-induites, a été développée pour la caractérisation de la tumorigénèse multi-étapes des carcinomes (DiGiovanni, 1992). À ce jour, 4 grandes catégories de modèles de tumeurs chez la souris (Gould *et al.* , 2015), plus ou moins proche de la situation clinique chez l'Homme, sont utilisées et présentées dans la **figure 7**.



**Figure 7 : Les modèles murins en oncologie.** Les légendes des caractéristiques cellulaires de chaque modèle tumoral sont présentées sur le panel (c) en bas à gauche. Figure adaptée de (Gould *et al.* , 2015).

Les xénogreffes de lignées cellulaires (**Figure 7.a**) reposent sur l'injection de lignées cellulaires établies à partir de cellules humaines chez une souris immuno-déficiente ou nude. Ces souris immunodéficientes sont des souris génétiquement modifiées qui présentent une absence ou une atrophie du thymus (Spang-Thomsen and Visfeldt, 1976), et ne peuvent donc pas produire de lymphocytes T (absence de réponse immunitaire adaptative). Les xénogreffes dérivées de patients (PDX pour « patient-derived xenograft ») (**Figure 7.b**) reposent sur l'injection de cellules ou d'explants provenant directement de tumeur de patient chez la souris immunodéficiente (Nude ou SCID pour severe combined immunodeficiency). Les PDX ont l'avantage de conserver une grande partie des marqueurs de la tumeur d'origine, et présentent une forte diversité de populations de cellules plus représentative de l'hétérogénéité intra- et inter-patient. Une des limites de ces deux modèles non syngéniques (**a et b**) est que lors du développement des tumeurs, les composants du stroma seront issus de la souris tandis que les cellules tumorales proviennent de l'Homme, on parle de déconnexion inter-espèces.

L'allogreffe (**Figure 7.c**) consiste à la greffe de lignées cellulaires cancéreuses murines, le plus souvent obtenues à partir de tumeurs chimio-induites, chez des souris immuno-compétentes, on parle alors de modèles syngéniques. L'un des avantages de ce modèle est l'utilisation de souris immuno-compétentes permettant ainsi d'étudier l'implication du système immunitaire dans la réponse au traitement. Néanmoins, ce modèle présente des limites : les cellules tumorales murines diffèrent biologiquement de leur équivalents humains (moins de métastases, croissance plus rapide, tumeur plus immunogène pouvant induire des régressions spontanées), et il existe de nombreuses différences dans la régulation de la réponse à un traitement et des types cellulaires impliqués entre homme et souris (Gould *et al.* , 2015).

Enfin, les souris génétiquement modifiées (GEMM pour « genetically engineered mouse models ») (**figure 7.d**) reposent sur la manipulation du génome conduisant à l'induction de l'expression d'oncogènes ou l'inactivation de gène suppresseurs de tumeurs. Ainsi, la tumeur se développe dans son tissu d'origine. Ce modèle donne accès à l'étude du microenvironnement tumoral et de l'influence du système immunitaire. Toutefois, l'ingénierie nécessaire pour l'obtention de ces modèles est coûteuse et nécessite des temps très longs ainsi qu'un programme de sélection compliqué.

Parmi les modèles tumoraux chez la souris, la greffe des cellules tumorales peut s'effectuer à différents endroits en dehors du tissu d'origine (sous-cutanée, intradermique ou intrapéritonéale). Il y a donc des modèles de greffes dits orthotopiques lorsque la tumeur est

située à son emplacement anatomique habituel, et par opposition, la greffe ectopique pour laquelle la tumeur n'est pas greffée à sa localisation d'origine. Les modèles ectopiques sont souvent des greffes en sous-cutanées, la tumeur qui se développe est très facilement palpable, permettant ainsi le suivi de la croissance tumorale (au pied à coulisse). Les modèles orthotopiques présentent une plus grande ressemblance avec les tumeurs initiales que les modèles ectopiques, toutefois leur prédictibilité reste limitée. Il est important de noter que 80 % des essais cliniques de phase II et 50 % des essais de phase III en cancérologie conduisent à des résultats négatifs (Begley and Ellis, 2012). Ces chiffres montrent néanmoins que le modèle murin présente également des limites. Bien que les greffes de tumeurs, murines ou humaines, chez la souris présentent des caractéristiques histologiques similaires à celles observées chez l'Homme, ces cancers présentent peu de mutations et ne représentent que partiellement le métabolisme et le microenvironnement tumoral.

L'utilisation de modèles murins pour l'expérimentation animale est à ce jour règlementée par la directive européenne 2010/63/EU. Cette directive vise à assurer un niveau élevé de protection des animaux utilisés à des fins expérimentales ou à d'autres fins scientifiques. Cette protection passe, entre autres, par le suivi du bien-être animal mais également par la règle des 3R : **r**éduire le nombre d'animaux utilisés dans un projet sans compromettre les objectifs scientifiques, **r**emplacer une procédure<sup>1</sup>, une méthode ou une stratégie d'expérimentation par une autre n'impliquant pas l'utilisation d'animaux vivants si possible et **r**affiner les conditions d'élevage, d'hébergement et de soins ainsi que les méthodes utilisées dans les procédures afin d'éliminer ou de réduire toute douleur, souffrance, angoisse ou tout dommage durable susceptible d'être infligé aux animaux.

### 3. Les traitements actuels

Lorsque le diagnostic d'un cancer est posé, différentes stratégies de traitements peuvent être proposées dépendant du type de cancer et du stade de progression de ce dernier. Les trois grandes catégories de traitements actuels sont : la chirurgie, la chimiothérapie et la radiothérapie. Les stratégies thérapeutiques employées en clinique combinent la plupart du temps ces différents traitements afin d'en augmenter l'efficacité. Plus récemment, des

---

<sup>1</sup> Procédure: toute utilisation, invasive ou non, d'un animal à des fins expérimentales ou à d'autres fins scientifiques, dont les résultats sont connus ou inconnus, ou à des fins éducatives, susceptible de causer à cet animal une douleur, une souffrance, une angoisse ou des dommages durables équivalents ou supérieurs à ceux causés par l'introduction d'une aiguille conformément aux bonnes pratiques vétérinaires (d'après la directive européenne 2010/63/EU).

immunothérapies ont été proposées en combinaisons avec ces traitements de référence (Oiseth and Aziz, 2017).

### **a. L'ablation tumorale**

Le principe de l'ablation tumorale a été décrit pour la première fois il y a plus de 100 ans (Halsted, 1894). Il s'agit de la première étape de la prise en charge d'un patient. Cette méthode repose sur l'ablation ou la réduction de la masse tumorale si celle-ci est possible. L'éradication de tissu tumoral non accessible par chirurgie se fera ensuite avec d'autres traitements. L'ablation de la tumeur peut également être précédée par d'autres traitements tel que la radiothérapie ou la chimiothérapie dans le but de diminuer l'étendue de la tumeur avant l'acte chirurgical. L'ablation tumorale est praticable sur des tumeurs solides bien localisée. Elle peut s'effectuer de différentes manières :

- **Par acte chirurgicale**, aussi appelé exérèse, qui revient à opérer le patient afin de lui retirer la tumeur ou l'organe atteint, une partie des tissus sains avoisinants la tumeur sera également retiré ainsi que les ganglions et les vaisseaux lymphatiques voisins pour éviter tout risque d'extension, ainsi l'exérèse tumorale reste un acte de chirurgie qui peut être lourd et invasif selon l'importance de la masse tumorale.
- **Par cryoablation**, qui consiste à détruire le tissu tumoral en abaissant fortement sa température par l'utilisation d'une ou plusieurs cryosondes refroidies à l'azote liquide (-40°C, via des cycles de congélation/décongélation successifs). Il existe également des techniques de cryoablation à des températures plus basses (-80°C) reposant sur l'utilisation d'argon refroidi sous haute pression au sein d'aiguilles. Les aiguilles ou cryosondes utilisées sont introduites par voie percutanée ou par laparoscopie directement dans la tumeur. Un tel abaissement de la température affecte alors la viabilité des cellules tumorales et leur microenvironnement (Erinjeri and Clark, 2010; Theodorescu, 2004). Cette technique s'accompagne d'une forte réponse inflammatoire entraînant un processus de nettoyage des débris cellulaires au niveau du site de l'ablation qui peut perdurer pendant plusieurs semaines ou plusieurs mois après l'opération (Chapman *et al.* , 2000; Weber *et al.* , 1997). Un autre avantage de cette technique est la possibilité de suivre en temps réel l'ablation, de réduire le risque de toucher les tissus sains voisins et donc une meilleure précision. En effet, l'abaissement de la température induit une transition de phase liquide à solide de l'eau contenu dans les tissus, formant ainsi une boule de glace visible par scanner ou par imagerie de

résonnance magnétique (IRM). Le refroidissement des tissus ayant un effet anesthésique, il apparaît que la cryoablation tend à être moins douloureuse que les autres techniques d'ablation thermique décrite ci-après (radiofréquences et microondes). Dans le cas de larges cryoablations, la forte réponse immunitaire engendrée peut induire un syndrome de réponse inflammatoire systémique (SRIS) chez certains patients (Erinjeri and Clark, 2010) qui se manifeste par de l'hypotension, une défaillance respiratoire ainsi qu'une forte coagulation du sang. Des fissures ou fractures des tissus avoisinants la zone congelée peuvent également survenir au cours de l'opération.

- **Par hyperthermie, via l'utilisation de radiofréquence ou micro-ondes.** Ces techniques sont utilisées pour des tumeurs dont la localisation ne permet pas la résection chirurgicale. Les techniques décrites ci-après reposent sur la destruction thermique, gouvernée par trois phénomènes : la production thermique soit l'énergie délivrée ainsi que son interaction avec les tissus ; la conduction thermique soit le moyen par lequel la chaleur est obtenue (qui diffère d'un tissu à un autre) ; la convection thermique c'est-à-dire la dissipation de la chaleur via son transport par les fluides qui traversent les tissus (les vaisseaux sanguins de plus de 2-3 mm agissent comme dissipateurs thermiques, cet effet est plus connu sous le nom de « heat sink effect », et est responsable d'une moindre efficacité de l'ablation de tumeurs proches des vaisseaux) (Ringe *et al.* , 2015). Ces trois phénomènes sont dépendant de la distance à l'électrode, du type et de la quantité d'énergie libérée, de la durée du traitement et enfin du type de tissu ciblé ainsi que de sa vascularisation.

L'ablation par radiofréquence (ARF) utilise la chaleur produite par la conduction du courant électrique à haute fréquence (460-480 kHz) (Hong and Georgiades, 2010). Les températures atteintes au niveau du site traité sont de l'ordre de 60 à 100°C. Les radiofréquences sont délivrées au moyen d'électrodes-aiguilles déployables (aussi appelées électrodes parapluie) par voie percutanée ou par laparoscopie selon la localisation de la tumeur. L'ARF est à ce jour la technique la plus utilisée pour l'ablation des tumeurs du foie (Sindram *et al.* , 2010). En revanche certains tissus, tels que les vaisseaux sanguins et les voies biliaires hépatiques, absorbent très fortement le courant, ceci peut perturber le bon réchauffement des zones d'ablation. L'ablation par micro-ondes (AMO) (Lubner *et al.* , 2010; Simon *et al.* , 2005), quant à elle, utilise une antenne interstitielle guidée jusqu'à la tumeur via les vaisseaux sanguins et qui est mise en oscillations très rapides faisant ainsi osciller les molécules d'eau des tissus sur elle-même (friction), ce qui entraîne une élévation de la température jusqu'à 180°C dans les

tissus cibles (sans passage de courant). La fréquence des micro-ondes utilisées pour application médicale varie entre 915 MHz et 2450 MHz. Les températures sont atteintes plus rapidement qu'avec l'ARF. De plus, l'AMO semble moins sujette à induire un « heat sink effect » que l'ARF. Les microondes sont capables de se propager dans différents types de tissus, même ceux à faible conductivité thermique ou forte impédance contrairement aux radiofréquences. Les organes présentant une forte différence de permittivité (diffusion des micro-ondes) entre les tumeurs et les tissus sains sont les plus favorables à cette technique (le sein et le poumon par exemple, dû à la présence de graisse et d'air, respectivement).

- **Par électroporation irréversible (IRE)**, lorsque la thermo-ablation s'avère trop risquée. C'est en 2005 qu'il a été montré pour la première fois que l'IRE pouvait être utilisée de manière efficace pour l'ablation de tissu tumoral (Davalos *et al.* , 2005). Des champs électriques pulsés très intenses (jusqu'à 3000 V/cm et d'une durée de quelques  $\mu$ s) sont délivrés au moyen d'électrodes au niveau de la tumeur (Al-Sakere *et al.* , 2007; Silk *et al.* , 2014). Ces champs électriques très intenses vont alors déstabiliser la membrane des cellules, et induire la formation non réversible de pores membranaires, létale pour la cellule. Ce phénomène appelé électroporation irréversible (IRE) permet de tuer les cellules de la tumeur puisque ces dernières ne recouvrent plus leur homéostasie cellulaire (N.B : la théorie de l'électroporation réversible et irréversible sera approfondie dans la partie III de l'introduction). L'énergie délivrée est du même ordre que celle délivrée via les radiofréquences, cependant il ne s'agit pas d'une ablation thermique puisqu'il n'y a pas de diffusion de chaleur et ainsi moins de risques d'endommager les vaisseaux sanguins. Un des facteurs limitant de cette méthode est que la zone efficace de traitement est définie par le champ électrique crée entre les électrodes, il faudra donc insérer plusieurs électrodes pour couvrir une plus grande zone (6 électrodes pour une tumeur comprise entre 3 et 5 cm de diamètre par exemple).

Une étude comparative des différentes méthodes d'ablation tumorale a été publiée récemment (Seror, 2015). L'avantage de toutes ces techniques d'ablation est la possibilité d'être guidée par différents types d'imagerie, réduisant ainsi la morbidité et la mortalité chez les patients. Ces techniques peuvent également être réalisées dans un cadre ambulatoire.

Il n'existe finalement pas de méthode d'ablation universelle. Le choix des cliniciens se fera en fonction de la taille, de la forme et du site des tumeurs, ainsi que de l'état d'avancement de la maladie (tumeur solide, sites multiples, métastases, patient non traité auparavant ou en rechute).

## **b. La radiothérapie**

C'est en Juillet 1896 à Lyon que le Dr. Despeignes annonce le premier traitement du cancer par rayons X. Puis entre 1904 et 1906, Jean Bergonié (radiologiste) et Louis Tribondeau (histologiste) apportent un premier fondement biologique à l'utilisation de la radiothérapie aux rayons X en montrant que les cellules cancéreuses sont plus sensibles aux rayons X que les cellules saines (Bergonié and Tribondeau, 2003). À ce jour, plus de la moitié des patients atteints de cancer ont recours à la radiothérapie dans leur parcours de soins, la plupart du temps en combinaison avec d'autres traitements tel que la chimiothérapie ou en complément d'une exérèse chirurgicale.

La radiothérapie (RT) repose sur l'utilisation de radiations ionisantes (rayons X, gamma, radiations avec protons, neutrons, électrons, ions carbone) qui induisent une réponse locale au niveau de la zone traitée. L'interaction entre les atomes des tissus biologiques et les radiations par transfert d'énergie (ionisation), entraîne une action directe (altération de l'ADN) et indirecte des rayonnements (formation de radicaux libres). La RT externe (ou transcutanée) utilise une source de radiation (généralement gamma) à l'extérieur du patient placée à proximité du site à traiter. Elle est envisagée sur des tumeurs profondes tel que le pancréas, le rectum, les bronches et l'œsophage. Tandis que la RT interne utilise une source de rayonnement (généralement une source radioactive) implantée directement à proximité immédiate des cellules cancéreuses. Une troisième modalité de RT peut être envisagée : métabolique ou hormonale qui consiste à administrer, par voie orale ou par injection intraveineuse, une substance radioactive, qui se fixe préférentiellement sur les cellules cancéreuses. Cette modalité de traitement est utilisée pour traiter les cancers de la thyroïde et des métastases osseuses.

Des lésions radio-induites peuvent être causées aux tissus avoisinants les sites irradiés. L'efficacité du traitement par RT dépend du type de radiations utilisées, de la dosimétrie (quantité de radiations reçues par le patient), de leur fréquence d'administration, ainsi que des propriétés biologiques et de la radiosensibilité de la tumeur et des tissus sains environnants.

## **c. La thérapie photo dynamique**

Le potentiel thérapeutique de la lumière est connu depuis bien longtemps et a déjà été utilisé en combinaison avec des substances chimiques pour le traitement de maladies cutanées tel que le vitiligo, le psoriasis ou le cancer de la peau (Daniell and Hill, 1991). La thérapie photo

dynamique (PDT) repose sur l'administration intraveineuse d'une substance chimique photo sensibilisante (PS) en combinaison avec l'utilisation d'une source lumineuse. Du fait de leur nature chimique, ces PS ne sont pas toxiques en l'absence d'énergie lumineuse et, de plus, il a été montré qu'ils s'accumulent dans les cellules cancéreuses grâce à l'effet EPR (Dos Santos *et al.* , 2019; Sorrin *et al.* , 2020). L'oxydation de ces molécules présentes à l'intérieur de la cellule cancéreuse conduit à deux mécanismes d'action (Dos Santos *et al.* , 2019):

- **Les mécanismes de type I** où l'énergie lumineuse est transportée des molécules excitées jusqu'aux biomolécules de la cellule (protéines, lipides), s'en suit alors des réactions en chaîne conduisant à la génération de radicaux libres et de ROS,
- **Les mécanismes de type II** où l'énergie d'excitation est directement transférée aux molécules d'oxygène, induisant la formation d'oxygène singulet ( $^1\text{O}_2$ ), électrophile et donc hautement réactif, qui cause des dommages aux membranes, aux protéines et à l'ADN.

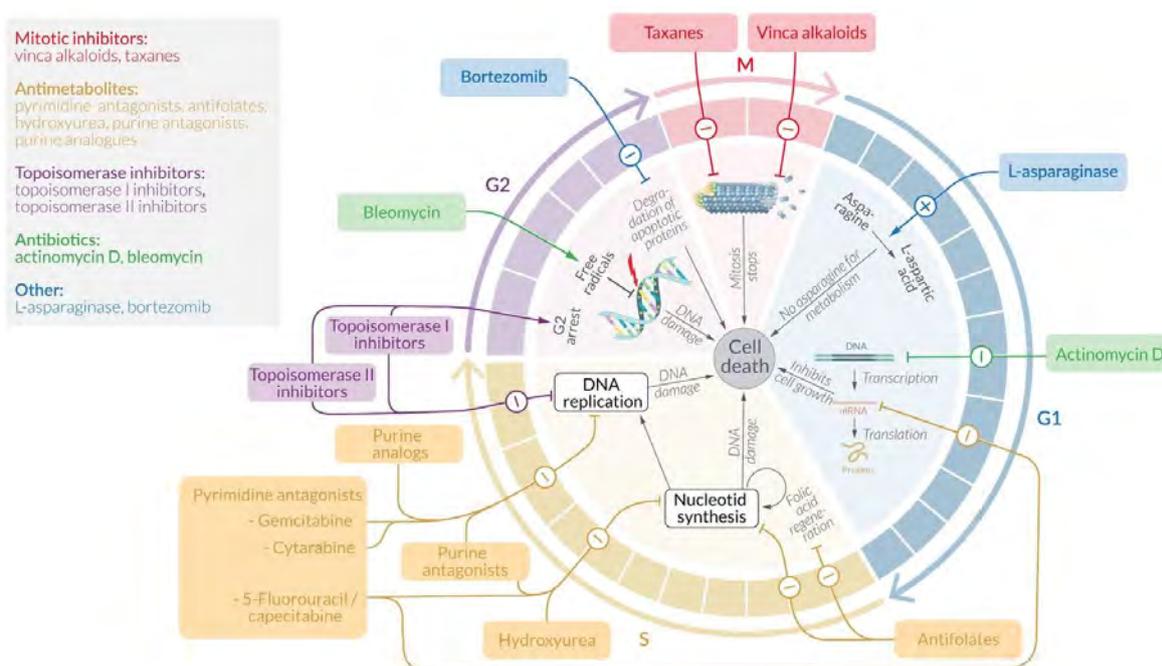
La formation de radicaux libres via le mécanisme de type I, et d'oxygène singulet via le mécanisme de type II, conduit à la peroxydation lipidique des membranes cellulaires, provoquant ainsi sa rupture, processus récemment décrit (Bacellar *et al.* , 2018) et qui est à l'origine de l'efficacité de la PDT. Cette thérapie fragilise également le réseau vasculaire des tumeurs (Buzzá *et al.* , 2019) et induit une réponse inflammatoire (Van Straten *et al.* , 2017). La thérapie photo dynamique peut être utilisée en combinaison avec d'autres traitements tel que la chimiothérapie (Richter and Kahaleh, 2010). Une des limites de cette méthode a longtemps été la profondeur de pénétration limitée de la lumière excitatrice utilisée, et la PDT fut longtemps proposée comme un traitement de surface uniquement. Avec le développement de fibres optiques endoscopiques guidées par imagerie, des tumeurs plus profondes et des localisations bien particulières peuvent désormais être traitées (Mallidi *et al.* , 2016).

#### **d. La chimiothérapie**

L'utilisation d'agents alkylants pour éradiquer les cellules cancéreuses a été proposée pour la première fois en 1942 lorsque Louis Goodman et Alfred Gilman, sur la base d'autopsies de soldats morts après exposition au gaz moutarde (arme chimique utilisée au cours de la Première Guerre mondiale), utilisèrent avec succès des moutardes azotées pour traiter un patient atteint de lymphome non hodgkinien (Gilman, 1963). Ils ont alors établi le principe selon lequel un

médicament pouvait être administré par voie systémique afin de réduire une masse tumorale, la chimiothérapie était née.

La chimiothérapie, comme son nom l'indique, repose sur l'usage de substances chimiques. Elles se classent en quatre catégories : les agents alkylants (cisplatine, carboplatine), les antimétabolites (gemcitabine, fluorouracil), les inhibiteurs de topoisomérases (topotecan, étoposide) et les antimitotiques (paclitaxel, vinblastine) (**Figure 8**). La plupart des chimiothérapies anticancéreuses sont destinées à ralentir ou arrêter la prolifération cellulaire (via différentes voies de signalisation cellulaire, cf. **Figure 8**) en inhibant la mitose (Gascoigne and Taylor, 2009) et sont rarement utilisées seules mais en combinaison afin d'augmenter leur efficacité.



**Figure 8 : Classification des agents utilisés en chimiothérapie et leurs mécanismes d'action cellulaire.**  
Source : [https://www.amboss.com/us/knowledge/Chemotherapeutic\\_agents](https://www.amboss.com/us/knowledge/Chemotherapeutic_agents).

La chimiothérapie peut être utilisée comme molécule néoadjuvante afin de réduire le volume d'une tumeur en amont de son ablation ou d'une RT. À l'inverse, elle peut être utilisée après chirurgie ou RT afin d'éliminer les cellules cancéreuses potentiellement restantes, on parle alors de chimiothérapie adjuvante. Il existe différentes modalités d'administration de ces médicaments selon la zone à traiter : par voie orale, intraveineuse, intramusculaire ou sous-cutanée, intrathécale (espace sous-arachnoïdien, afin d'atteindre le liquide céphalorachidien), intrapéritonéale, intra-artérielle, ou par voie topique. La chimiothérapie étant un traitement systémique, son activité cytotoxique peut également affecter les cellules et tissus sains causant

ainsi de nombreux effets secondaires chez les patients : inflammation des muqueuses, nausées et vomissements, neuropathies périphériques, hématopoïèse et myélosuppression induisant de la fatigue et des risques d'infection, alopecie.

De plus, certaines cellules cancéreuses peuvent développer des multirésistances aux agents chimiothérapeutiques, diminuant ainsi l'efficacité du traitement (Housman *et al.* , 2014). Le développement de ces résistances par les cellules cancéreuses est causé par plusieurs mécanismes indépendants, intrinsèques ou extrinsèques à la tumeur, qui subviennent à différents niveaux cellulaires. Les phénomènes à l'origine de ces résistances sont : un transport membranaire défaillant, leur inactivation métabolique, la modification de leurs cibles cellulaires, la détoxification des intermédiaires réactifs, et /ou une augmentation des phénomènes de réparation de l'ADN (Belpomme, 1991). Ces résistances peuvent se déclarer rapidement après les premiers cycles de traitements (~semaines), ou plus lentement (~mois ou années), on parle alors de récurrence. La résistance des cellules tumorales aux agents cytotoxiques représente donc un obstacle majeur à l'utilisation de molécule chimiothérapeutique. Néanmoins, certaines stratégies sont employées afin de détourner ces mécanismes de résistances telle que la co-administration de molécules présentant des modes d'actions différents (Al-Lazikani *et al.* , 2012).

#### **e. Les thérapies ciblées**

Bien que très efficaces, les chimiothérapies présentées ci-dessus ont de nombreux effets secondaires. Ainsi, il a été nécessaire de développer de nouvelles thérapies tout aussi efficaces mais causant moins de dommages aux cellules saines : il s'agit des thérapies ciblées. Toutefois, une thérapie ciblée peut être associée à un traitement par chimiothérapie afin d'augmenter l'efficacité. La découverte et le développement des stratégies thérapeutiques citées ci-dessus, ont pour la plupart été faite avant d'entreprendre des recherches sur les caractéristiques des cellules cancéreuses et leur microenvironnement ainsi que leurs rôles dans la progression tumorale. Les thérapies ciblées se basent justement sur l'avancée de ces connaissances et l'utilisation de médicaments ciblant des mécanismes spécifiques aux cellules cancéreuses. Il existe deux grandes familles de traitements ciblés anti-cancéreux :

- **Les inhibiteurs de récepteurs à activité tyrosine kinase** administrés aux patients présentant des tumeurs avec des mutations sur le gène codant pour ces récepteurs. Ces

mutations engendrent une activation constitutive de ces récepteurs dans les cellules cancéreuses induisant ainsi une prolifération anarchique. Ainsi, les inhibiteurs de récepteurs à activité tyrosine kinase vont lever cette activation constitutive de façon à réguler la prolifération (Yamaoka *et al.* , 2018). Ces inhibiteurs peuvent être de nature enzymatique (gefitinib, imatinib, dasatinib...) ou des anticorps monoclonaux (pertuzumab, trastuzumab, cetuximab...).

- **Les inhibiteurs de l'angiogenèse** qui empêchent la formation de nouveaux vaisseaux sanguins et affament ainsi la tumeur (Lin *et al.* , 2016; Liu *et al.* , 2006). Ils peuvent être également de deux natures : enzymatique (sunitinib, sorafénib...) ou des anticorps monoclonaux (bevacizumab...).

Toutes ces molécules sont administrées par voie orale ou intraveineuse. En amont des traitements, des tests moléculaires doivent être effectués afin de déterminer la présence ou l'absence de certains biomarqueurs dans les tumeurs des patients. Ceci sert comme point de départ pour le développement d'un protocole de thérapie ciblée. Ces thérapies sont aujourd'hui utilisées sur plus de 15 types de cancer différents dont le cancer du sein, de la prostate, du colon et du poumon et sont encore en cours de développement (Mousa, 2018; Su and Wu, 2017).

#### **f. L'immunothérapie**

Comme décrit ci-dessus dans la section 2 (La biologie des tumeurs), les cellules cancéreuses ont développé des mécanismes d'échappement à la vigilance du système immunitaire (Schreiber *et al.* , 2011), permettant ainsi à la tumeur de progresser. Le principe de l'immunothérapie repose sur l'utilisation de stratégies visant à stimuler la réponse immunitaire des patients. Les principales immunothérapies utilisées à ce jour sont :

- **Les inhibiteurs des points de contrôle immunitaires**, des molécules qui suppriment les points de contrôle afin de restaurer la réponse immunitaire. En effet, notre système immunitaire est un réseau très complexe et finement régulé, entre autres, par la présence de points de contrôle dont le rôle est d'empêcher la réponse immunitaire de s'exacerber. Les récepteurs les plus étudiés sont la protéine PD1 présente à la surface des lymphocytes T qui reconnaît la protéine PDL-1 exprimée à la surface des cellules cancéreuses. Cette interaction PD1/PDL-1 joue le rôle de point de contrôle et empêche donc le système immunitaire de détruire les cellules cancéreuses. Il y a également la protéine CTLA4 exprimée à la surface des lymphocytes T CD8<sup>+</sup>. Cette dernière interagit

avec les cellules présentatrices d'antigène (cellules dendritiques) via l'interaction avec le récepteur B7. Cette interaction CTLA4/B7 inactive les lymphocytes T CD8<sup>+</sup>.

Ainsi, les inhibiteurs de points de contrôle utilisés pour ces thérapies visent à reconnaître les protéines exprimées à la surface des cellules cancéreuses (PDL-1), les rendant à nouveau visible par le SI, ou les protéines exprimées à la surface des cellules immunitaires (CTLA4) afin de bloquer l'interaction avec B7 et ainsi de lever le frein associé à une immunotolérance vis-à-vis des cellules tumorales, les cellules T peuvent détruire les cellules tumorales (Pardoll, 2012; Sharma and Allison, 2015),

- **La thérapie « CAR T-cell » ou immunothérapie adoptive**, est une thérapie génique et cellulaire qui consiste à prélever les lymphocytes T dans le sang des patients, les modifier afin qu'ils expriment le récepteur antigène chimérique (CAR) impliqué dans la reconnaissance d'antigènes présents à la surface des cellules tumorales (Mohanty *et al.*, 2019). Une fois obtenues, les cellules CAR-T sont injectées par voie intraveineuse au patient. Le processus d'expansion des cellules peut prendre entre 2 et 8 semaines, ainsi, les patients se verront administrer de la chimiothérapie ou radiothérapie sur cette période. Le but étant d'éliminer les autres cellules du système immunitaire pour permettre *in fine* aux CAR-T transférées d'éliminer plus efficacement la tumeur. Sur le même principe, il existe également **la thérapie « TIL »**, pour lymphocytes infiltrant la tumeur, cette fois-ci les cellules prélevées sont des lymphocytes T présents au niveau de la tumeur (Geukes Foppen *et al.*, 2015). Après prélèvement, les cellules sont testées afin de sélectionner celles qui sont le plus aptes à reconnaître et infiltrer la tumeur. Un avantage de cette thérapie est que l'utilisation de cellules immunologiques du patient implique moins de risque de rejet de greffe ;
- **L'utilisation d'anticorps monoclonaux** qui marquent les cellules cancéreuses afin de les rendre détectables par le système immunitaire et d'induire leur destruction (Scott *et al.*, 2012). Cette thérapie repose sur le même principe que les thérapies ciblées présentées plus haut, à l'exception que la cible est le système immunitaire lui-même. Le rituximab largement utilisé est un anticorps connu pour se lier au récepteur CD20 des cellules B et de certains types de cellules cancéreuses, entraînant leur destruction par le système immunitaire (Weiner, 2010). Le blinatumomab se lie à la fois au CD19 présent à la surface des cellules leucémiques et au récepteur CD3 des cellules T, permettant ainsi d'amener les cellules T à proximité des cellules leucémiques (Kantarjian *et al.*, 2017);

- **La vaccination** qui permet aux cellules du système immunitaire de reconnaître plus efficacement les antigènes présents à la surface des cellules cancéreuses, pour une meilleure éradication de ces dernières. Pour ce faire, les vaccins peuvent être élaborés de différentes façons : soit à partir des cellules tumorales du patient, ou à partir des cellules dendritiques (cellules présentatrices d'antigènes), qui stimulent le système immunitaire à répondre à un antigène présent sur les cellules tumorales. Plus récemment, une autre approche a été proposée et repose sur l'utilisation de virus oncolytique (existant ou produit en laboratoire), connu pour infecter les cellules cancéreuses mais pas les cellules saines (Andtbacka *et al.* , 2015).

Toutes ces immunothérapies peuvent être administrées par voie orale, intraveineuse ou intravésicale. Ces immunothérapies peuvent en revanche causer un syndrome de relargage de cytokines conduisant à de la fièvre, des nausées, des maux de tête et des difficultés à respirer.

Un comparatif de toutes ces stratégies thérapeutiques est présenté dans le **tableau 1**, incluant les mécanismes d'action, les types de cancer traités, ainsi que les avantages et les limites de chacune d'elle.

Traitements	Mécanisme d'action	Types de cancer	Avantages	Inconvénients
<b>Ablation tumorale</b>				
<i>Exérèse</i>	Retrait chirurgicale de la tumeur	Tumeurs solides foie, rein, os et poumons	Chirurgie large, élimination des risques	Chirurgie lourde et invasive Risque d'infection
<i>Cryoablation</i>	Destruction de la tumeur par le froid	Rétinoblastome, cancer cervical, cancer de la peau, foie, rein, os et poumons, seins	Guidage par imagerie Stimulation RI Peu douloureuse Bonne cicatrisation Moins de dommages articulaires (os)	Cold sink effect SRIS Fissures/ fractures des tissus voisins Risque hémorragique
<i>Hyperthermie (RF, MO)</i>	Destruction de la tumeur par la chaleur	Poumons, seins, reins, foie (< 5 cm)	Très efficace en combinaison avec RT car sensibilise cellules	Heat sink effect Non utilisé seul, à combiner avec RT/CT
<i>Electroporation</i>	Destruction de la tumeur par champs électriques pulsés	Pancréas, foie	Pas d'hypo ou hyperthermie, Préservation des tissus/vaisseaux voisins	Limitée en taille, si > 2,5 cm, multiples électrodes requises
<b>Radiothérapie</b>	Destruction de la tumeur par des radiations	Tumeurs solides et profondes	Sélectivité d'action Guidage par imagerie	Lésions tissus voisins et limite d'exposition aux radiations
<b>PDT</b>	Destruction de la tumeur via stress oxydatif	Plutôt cancer de la peau, développement d'outils pour traiter tous types de cancer	Sélectivité d'action Très peu invasif Pas d'effets secondaires	Non applicable sur larges tumeurs Sensibilité à la lumière post traitement
<b>Chimiothérapie</b>	Substances chimiques stop la prolifération des cellules cancéreuses	Tous types de tumeurs	Efficace sur métastases	Traitement systémique ++ effets secondaires
<b>Thérapies ciblées</b>	Inhibitions de mécanismes impliqués dans la progression tumorale	Encore en développement, à adapter selon marqueurs	Ciblée donc spécifique du patient	Difficile à développer car spécifique Résistances Traitement long
<b>Immunothérapies</b>	Stimulation de la RI Rendre les cellules cancéreuses visibles	Tous types de cancer	Peu d'effets secondaires ++ efficace métastases	Syndrome de relargage de cytokine

**Tableau 1 : Récapitulatif des traitements actuels utilisés en oncologie.** Le mécanisme d'action, les types de cancer traités ainsi que les avantages et les limites de chacune de ces méthodes sont présentés ici. RI : réponse immunitaire ; SRIS : syndrome de réponse inflammatoire systémique ; RT : radiothérapie ; CT : chimiothérapie.

*Malgré l'arsenal de thérapie anti-cancéreuse, de nombreuses limites demeurent à ce jour. En effet, les stratégies thérapeutiques utilisées présentent des problèmes de spécificité vis-à-vis des cellules tumorales causant ainsi des effets secondaires élevés. Le ciblage précis des tumeurs par traitement local n'est pas toujours réalisable et le développement de multirésistances, ainsi que la faible induction de mort immunogénique restent encore des facteurs limitants. Ainsi, d'autres stratégies thérapeutiques reposant sur de nouvelles*

*approches sont requises, notamment les méthodes physiques qui permettent un traitement local et qui sont moins sujet au développement de résistance chez les cellules cancéreuses. Au cours de ces dernières décennies, l'arsenal des thérapies anticancéreuses basées sur des principes physiques tels que les radiofréquences, les ultrasons, le laser, l'électroporation, la thérapie photo dynamique et les plasmas a considérablement augmenté. Ces approches permettent d'éradiquer les cellules cancéreuses, directement ou via la stimulation du système immunitaire. Elles sont aussi proposées en tant que méthodes de vectorisation pour délivrer des molécules d'intérêt thérapeutique. Les deux prochaines parties de l'introduction s'intéresseront à l'utilisation des plasmas froids et des champs électriques pulsés en thérapie anti-cancéreuse.*



## Partie II : Les plasmas froids

### 1. La théorie du plasma

#### a. Généralités sur le plasma

Le plasma ; au même titre que le solide, le liquide ou le gaz ; est un état de la matière. Le passage d'un état à l'autre est réalisé par un apport d'énergie  $\Delta E$  :



C'est en 1928 que le terme plasma lui est attribué par le physicien et chimiste anglais Irving Langmuir (Langmuir, 1928), du fait de sa complexité par analogie au plasma sanguin (Compton and Langmuir, 1930). Le plasma est un milieu gazeux hautement ionisé et électriquement neutre dans lequel les particules chargées peuvent se déplacer plus ou moins librement. Il existe différents mécanismes de génération de plasma. L'application d'un champ électrique peut induire une énergie suffisante pour produire une collision entre les électrons germes présents naturellement dans l'air et les particules neutres. Cette première collision va produire un deuxième électron qui peut être accéléré par le champ électrique et s'en suit des réactions en cascade. On parle alors de mécanisme d'avalanche électronique, et de production de plasma de densité finie. Une élévation de la température par apport de chaleur ou une absorption de photons énergétiques (photo ionisation) peuvent également générer du plasma. Le plasma est donc produit suite à l'ionisation d'un gaz par apport d'énergie suffisant. Cette ionisation des atomes du gaz conduit à la formation d'ions, d'électrons, de radicaux et d'espèces excitées. Tous ces atomes ou molécules composant le plasma présentent un déficit ou un excès d'électrons, induisant ainsi une charge positive ou négative. Du fait de la présence de toutes ces molécules chargées, le plasma est hautement réactif et conducteur, et est donc très sensible aux champs électromagnétiques (Eliezer and Eliezer, 2001).

Le comportement du plasma est similaire à celui du gaz dans la mesure où le plasma n'a pas de volume défini comme peuvent l'avoir un liquide ou un solide, il se contient donc dans le volume qui lui sera disponible. La génération de plasma s'accompagne également d'une émission de radiation (principalement des ultraviolets et infrarouges, UV et IR), de la génération d'un champ électrique transitoire et de l'émission de photons de différentes longueurs d'ondes dû au retour à l'état fondamental des particules excitées (Eliezer and Eliezer, 2001).

Le plasma peut se former à l'état naturel à de très haute température (plusieurs milliers de degrés Celsius), lorsque l'énergie fournie est suffisamment élevée pour arracher des électrons aux

atomes de la matière. La formation des aurores boréales est un bel exemple, elle repose sur le même principe que celui décrit précédemment : l'atmosphère terrestre des cercles polaires aussi appelé ionosphère est constituée de gaz fortement ionisé (par le rayonnement UV solaire) et est caractérisée par sa concentration en particules chargées. Lorsque les particules du vent solaire arrivent dans l'ionosphère, elles rentrent en contact avec ces particules chargées, ceci va induire l'ionisation des molécules et atomes de l'air ambiant et la formation d'un environnement hautement conducteur. Dans cet environnement, les nuages vont alors se décharger de leur énergie induisant des températures très élevées ( $\sim 30\,000\text{ °C}$ ), le plasma est généré et l'émission de photons de différentes longueurs d'onde s'en suit, ce qui donne sa couleur à l'aurore boréale (<https://sites.google.com/site/lesauroresborealespebury2011/3-interpretation>).

Le maintien du plasma, naturel comme artificiel, sur des temps longs passe par l'état d'équilibre de ce dernier. En effet, les espèces chargées qui le compose (ions et électrons) sont générées par l'ionisation mais perdues par diffusion ou recombinaison de charge. Ce sont ces phénomènes physiques qui dictent l'équilibre du plasma.

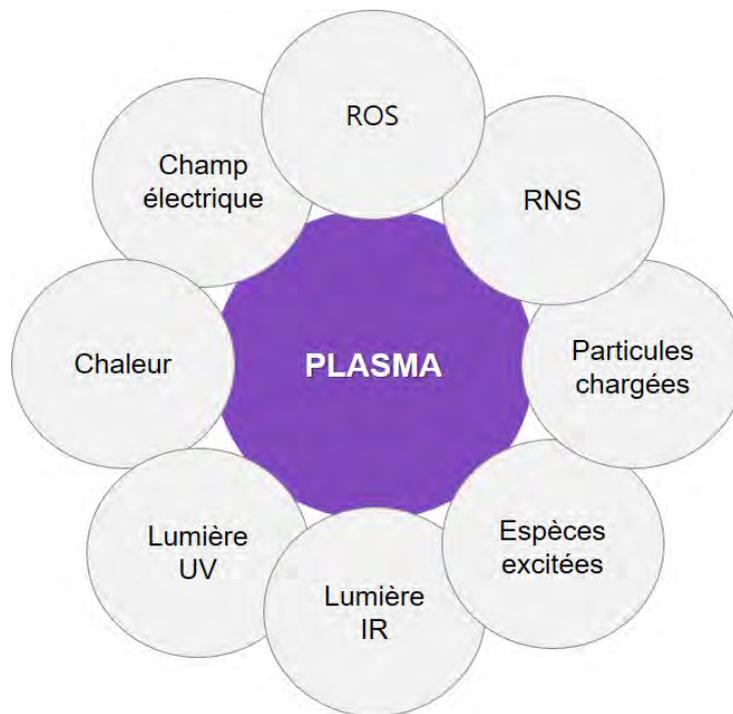
### **b. Équilibre thermodynamique des plasmas**

Une autre définition du plasma est : « Un plasma est un mélange quasi-neutre de particules chargées caractérisées par un comportement collectif » (Eliezer and Eliezer, 2001). En effet, la densité des électrons du plasma est égale à la densité des espèces ionisées, ainsi le plasma est électriquement neutre. Une caractéristique à considérer dans la physique des plasmas est la température des électrons  $T_e$ , des ions  $T_i$  et des particules chargées, et du gaz  $T_g$ . Les grandeurs associées à ces températures influent sur l'équilibre thermodynamique du plasma généré. La température des électrons est en général très élevée (supérieure à  $10\,000\text{ K}$ ). Tandis que la température des ions et particules chargées, peut varier.

Une première classification des plasmas peut être effectuée en fonction de ces différentes températures  $T_e$ ,  $T_i$  et  $T_g$ . Les plasmas chauds ont une température des électrons égale à celle des ions et particules chargées ( $T_i = T_e = 10^7\text{ K}$ ), on parle alors de plasmas à l'équilibre thermodynamique. On distingue deux types de plasmas chauds : ceux à l'équilibre thermodynamique complet (tel que les étoiles et les tokamaks) où  $T_i = T_e \approx 10^6\text{-}10^8\text{ K}$  ; et ceux en équilibre thermodynamique local qui sont des plasmas très collisionnels tels que les torches et les arcs pour lesquels  $T_e \approx T_i = T_g = 2\text{-}3 \cdot 10^4\text{ K}$ . Il existe également des plasmas dit froids

dont la température n'excède pas les 40°C (313,15 K) et dont le taux d'ionisation est très faible. On parle de plasmas froids hors équilibre et faiblement ionisés puisque  $T_e > T_i > T_g$ .

Le plasma froid à pression atmosphérique hors équilibre thermodynamique est le plasma le plus adapté à notre échelle d'énergie et de température et peut être généré en laboratoire. Les différentes composantes de ce plasma froid lui confèrent des propriétés physico-chimiques exploitables pour des applications biomédicales (**Figure 9**). Les rayonnements UV du plasma possèdent des propriétés bactéricides et germicides (Laroussi, 1996). L'interaction des espèces excitées et particules chargées avec l'air environnant et la cible induit la formation d'espèces réactives de l'oxygène et de l'azote (ROS et RNS, respectivement), conférant des propriétés biologiques (génétoxiques et cytotoxiques) au plasma froid (Yousfi *et al.*, 2014). Les propriétés biologiques du plasma froid seront développées plus en détails dans la **section 2**.



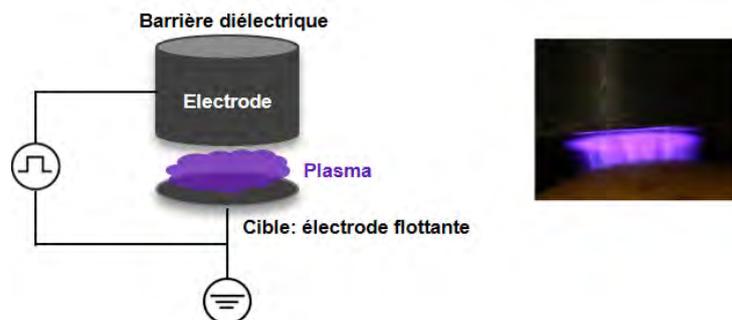
**Figure 9 : Les principales composantes physiques et chimiques du plasma.** UV : ultraviolet ; IR : infrarouge ; ROS : espèces réactives de l'oxygène ; RNS ; espèces réactives de l'azote.

### c. Les sources de plasmas froids hors équilibre

#### i. La décharge à barrière diélectrique à électrode flottante

Théodose du Moncel, physicien et électronicien du 19<sup>ème</sup> siècle a découvert en 1853, qu'une décharge peut être induite entre deux plaques conductrices séparées par deux plaques de verre. C'est sur ce concept fondamental que repose le principe de la décharge à barrière diélectrique (DBD). L'un des dispositifs le plus répandu pour générer des plasmas froids est le dispositif

DBD. Les DBD utilisent des matériaux diélectriques pour recouvrir une ou les deux électrodes et nécessitent des tensions élevées avec des gammes de fréquences de fonctionnement de l'ordre du kHz pour amorcer la décharge. Dans les DBD, l'accumulation de charge sur la couche diélectrique qui recouvre la ou les électrodes provoque une chute de tension à travers le plasma et induit son extinction sans passage à l'arc. De ce fait, les DBD sont des décharges auto-pulsées qui ne permettent pas au courant de décharge d'augmenter à un niveau qui induit un arc électrique (Kanazawa *et al.* , 1988). La configuration de dispositif DBD à électrode flottante (fe-DBD) est particulièrement intéressante pour les applications médicales. En effet, la fe-DBD utilise une seule électrode connectée à la haute tension recouverte d'un diélectrique. La cible va alors jouer le rôle de seconde électrode, qualifiée d'électrode flottante d'où le terme de fe-DBD, pour la génération du plasma dans l'air ambiant (**Figure 10**). Ce dispositif a été utilisé par exemple dans le but de réduire les dommages aux tissus cibles et d'accéder à une plus large surface de traitement (Fridman *et al.* , 2007). La distance entre le dispositif (électrode haute tension) et la cible (contre électrode) est en général de l'ordre du millimètre. La configuration de ce dispositif expérimental implique que la cible est très proche de la zone de génération de la décharge et est donc fortement exposée au champ électrique transitoire généré dans le plasma et à une densité de particules chargées bien plus élevée que dans le dispositif décrit ci-après (jet de plasma) (Yousfi *et al.* , 2014).

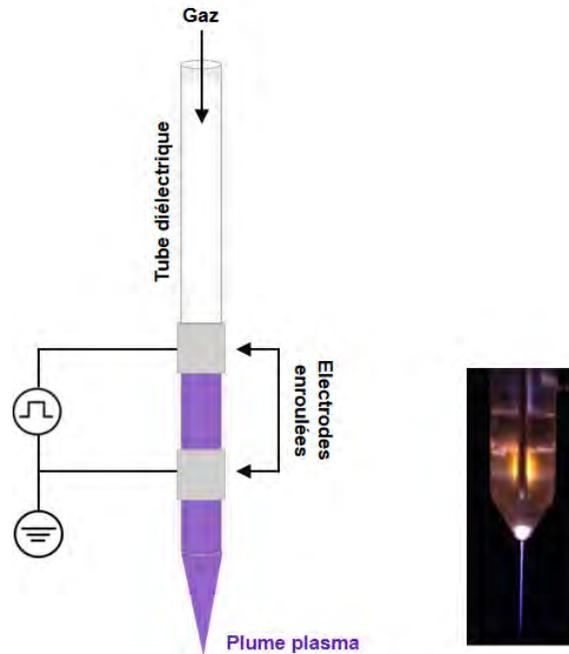


**Figure 10 : Dispositif expérimental de la décharge à barrière diélectrique à électrode flottante (fe-DBD).** A gauche : configuration de la fe-DBD. A droite : photographie de la génération du plasma entre le dispositif et la cible jouant le rôle de seconde électrode flottante (ici un doigt).

## ii. Le jet de plasma

Contrairement à la fe-DBD générée dans l'air ambiant, le jet de plasma est produit quant à lui par apport d'un gaz (généralement des gaz rares tel que le dioxygène, l'hélium ou l'argon) entre deux électrodes. Un flux de gaz constant est envoyé dans un tube diélectrique enroulé de deux électrodes. Lorsque le gaz rencontre les électrodes, connectées à la haute tension, le plasma est

génééré, puis il se propage jusqu'à la zone d'application via le flux de gaz (**Figure 11**). Ce dispositif est celui que nous avons développé au laboratoire Laplace et utilisé au cours de la thèse. Il existe également des jets de plasma avec une unique électrode connectée à la haute tension où la cible fait office de contre électrode.



**Figure 11 : Dispositif expérimental du jet de plasma.** À gauche : configuration du jet de plasma. À droite : photographie de la propagation de la plume plasma à l'extérieur du tube diélectrique.

Le plasma étant généré dans une enceinte confinée, les espèces initialement présentes seront principalement dérivées du gaz utilisé. En revanche, lorsque le plasma atteint la sortie du tube, il va rencontrer l'air ambiant et ainsi provoquer l'excitation des molécules présentes dans l'air, et la génération de nouvelles espèces chargées (Karakas and Laroussi, 2010). Dans cette zone, on parle alors de plume plasma. Des simulations numériques (Yousfi *et al.*, 2012) ont montré que des mécanismes de collisions prédominent la formation de l'onde d'ionisation de ce type de plasma, ce type d'onde peut se propager jusqu'à quelques centimètres après la sortie du tube. En revanche, aussitôt que le gaz rare se retrouve trop fortement dilué dans l'air ambiant, l'avalanche de réactions à l'origine de la production des espèces et de leur propagation est stoppée, la plume plasma se dissipe. La caractéristique de ce jet de plasma froid est que les molécules générées dans le plasma sont transportées via le flux de gaz à distance de la zone de décharge. La plume plasma générée dans et à l'extérieur du tube diélectrique ne dépasse pas les quelques millimètres de diamètre, ce qui permet une bonne précision de traitement. De plus, des dispositifs multi-jets sont développés pour le traitement de grandes surfaces (Lietz *et al.*, 2019). La grande proximité de la cible, comme pour la fe-DBD, n'est pas nécessaire dans ce

dispositif pour assurer le bon fonctionnement du plasma, le plasma peut donc être acheminé vers une cible située à distance de la zone de génération ce qui simplifie son utilisation (Heinlin *et al.*, 2010). Toutes ces caractéristiques en font un bon outil pour des applications biomédicales.

*Les deux grandes catégories de plasmas froids hors équilibre à pression atmosphérique décrites ci-dessus se distinguent donc par leur mode de génération et de propagation, ainsi que les particules chargées générées. Leurs caractéristiques principales ont été regroupées dans le tableau 2 ci-contre.*

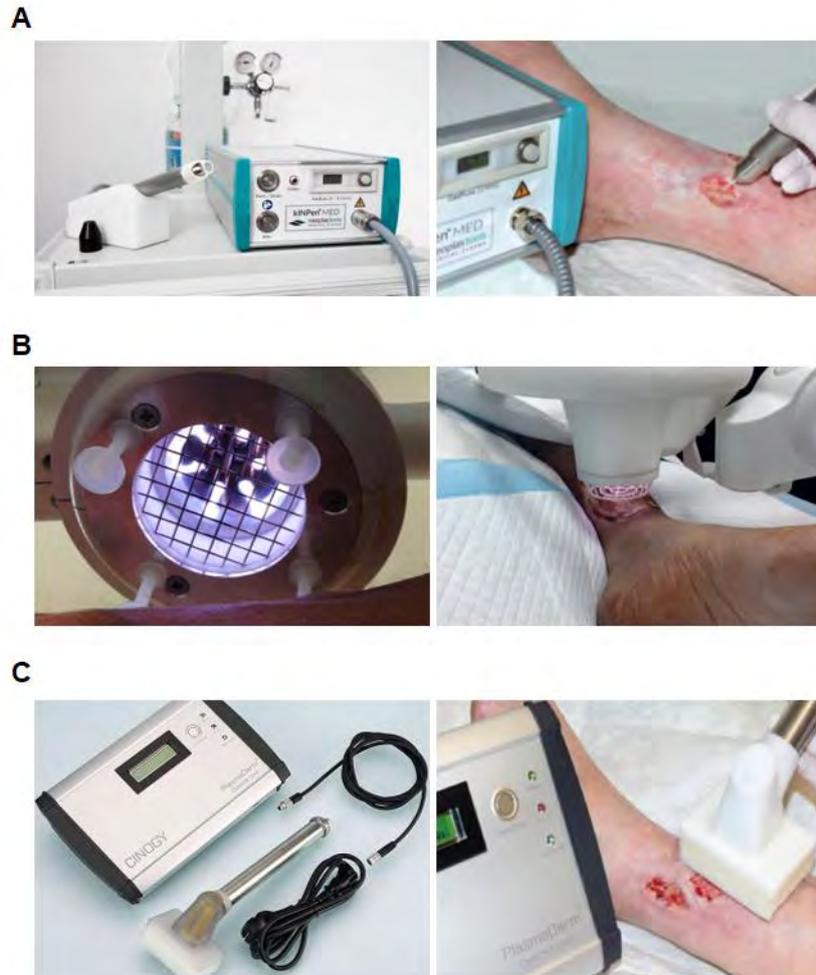
	<b>Fe-DBD</b>	<b>Jet de plasma</b>
<b>Mode de génération</b>	Cible (matériel biologique) fait office de contre électrode	Une ou deux électrodes dans le dispositif, transport via flux de gaz
<b>Gaz</b>	Air ambiant	Gaz rare/Air ambiant
<b>Distance plasma-cible</b>	~ mm	~ mm-cm
<b>Densité des particules chargées</b>	Elevée	Faible
<b>Radiation UV</b>	Faible	Elevée
<b>Température</b>	Ambiante	~ 40-60 °C en sortie du tube diélectrique

**Tableau 2 : Caractéristiques du jet de plasma et de la décharge à barrière diélectrique à électrodes flottante.** Tableau adaptée de (Heinlin *et al.* , 2010).

## 2. Les plasmas froids comme outil thérapeutique

Ces dernières décennies, des avancées importantes ont été réalisées sur les applications des plasmas froids dans le domaine des biotechnologies et le domaine biomédical. À côté des secteurs déjà bien identifiés tel que l'ingénierie de surface, les biomatériaux et l'ingénierie des tissus, la stérilisation et la décontamination de matériels biologiques, les applications thérapeutiques des plasmas connaissent un fort développement (Fridman *et al.* , 2008; Kong *et al.* , 2009). À ce jour, aucune standardisation des protocoles opératoires pour les diverses applications biomédicales n'a été proposée. Ainsi, il est important de relever qu'uniquement trois dispositifs de plasma sont utilisés en clinique. Le Kinpen®, développé et commercialisé par la société allemande NeoPlasTool®, un dispositif jet de plasma utilisé pour la désinfection et la cicatrisation des plaies chroniques en clinique humaine (Bekeschus *et al.* , 2016) et vétérinaire (Classen *et al.* , 2017). Le MicroPlaSter β®, développé et commercialisé par

Adtec®, Londres (Herbst *et al.* , 2018), est un dispositif torche plasma d'argon multi-électrodes utilisé pour la désinfection des plaies chroniques (Isbary *et al.* , 2012), le traitement des infections post-opératoire (Isbary *et al.* , 2013) et le traitement des maladies dermatologiques (Isbary *et al.* , 2014; Wirtz *et al.* , 2018). Et enfin le PlasmaDerm® développé par la société Cinogy® en Allemagne, utilisé pour la désinfection et la cicatrisation des plaies (**Figure 12**).



**Figure 12 : Dispositifs à plasma froids développés et utilisés en clinique humaine. (A) le Kinpen®** (<https://neoplas-tools.eu/en/kinpen-med.html>) **(B) Le MicroPlaSterβ®** (<http://www.adtecpasma.com/about.html>) **(C) Le PlasmaDerm®** ([http://www.cinogy.de/\\_EN/plasmaderm.php](http://www.cinogy.de/_EN/plasmaderm.php)).

Tous les autres dispositifs utilisés dans les études citées dans les sections ci-après sont des dispositifs plasmas froids développés en laboratoire (fait-maison), propre à chaque équipe de recherche, avec des paramètres physiques différents tel que la tension appliquée pour l'excitation du gaz, le type de diélectrique, le type, la durée et la fréquence des impulsions (ns,  $\mu$ s, Hz, kHz ou radiofréquences) et enfin le temps d'exposition de la cible. Ces paramètres dictent les propriétés physico-chimiques du plasma ainsi généré et *in fine* son potentiel thérapeutique.

### a. Stérilisation-Décontamination

La stérilisation du matériel biologique pour les hôpitaux et les laboratoires se fait par différentes méthodes incluant l'utilisation d'autoclaves à très forte température (121°C) (Palenik and Golden, 1994), l'usage d'agents chimiques ou de gaz (oxyde d'éthylène, ozone) (Bremner, 2008). Ces méthodes, bien qu'efficaces, soulèvent de nombreuses questions concernant la détérioration des dispositifs thermosensibles ainsi que l'impact environnemental et la santé publique dans le cas d'utilisation d'agents chimiques. Ainsi, des méthodes alternatives sont requises. C'est en 1996 que les propriétés biocides du plasma froid à pression atmosphérique ont été démontrées pour la première fois (Laroussi, 1996). Laroussi et ses collaborateurs ont éradiqué des bactéries et des microorganismes présents sur des outils et des liquides après quelques minutes d'exposition au plasma sans endommager le matériel traité. De plus, ils ont montré qu'aucun système de vide ou de pressurisation n'était nécessaire contrairement aux méthodes utilisées en routine, ce qui est donc plus simple en pratique et plus économique. Après cette première preuve de concept, de nombreuses études ont ensuite été entreprises sur différents types de microorganismes incluant des bactéries gram positives et gram négatives (Judée *et al.* , 2014); les formes positives apparaissent plus sensibles (Mai-Prochnow *et al.* , 2016) ; des virus (Guo *et al.* , 2018) , et du biofilm (Alkawareek *et al.* , 2012; Marchal *et al.* , 2012; Zhu *et al.* , 2020). Ces études ont permis d'élucider trois principaux mécanismes d'action (Moisan *et al.* , 2001; Shintani *et al.* , 2010):

- La destruction directe par les radiations UV du matériel génétique du microorganisme,
- La dégradation indirecte par les radiations UV, l'interaction de ces radiations avec le microorganisme va induire sa photodésorption,
- La dégradation via la combustion des atomes d'oxygène et des radicaux générés par le plasma.

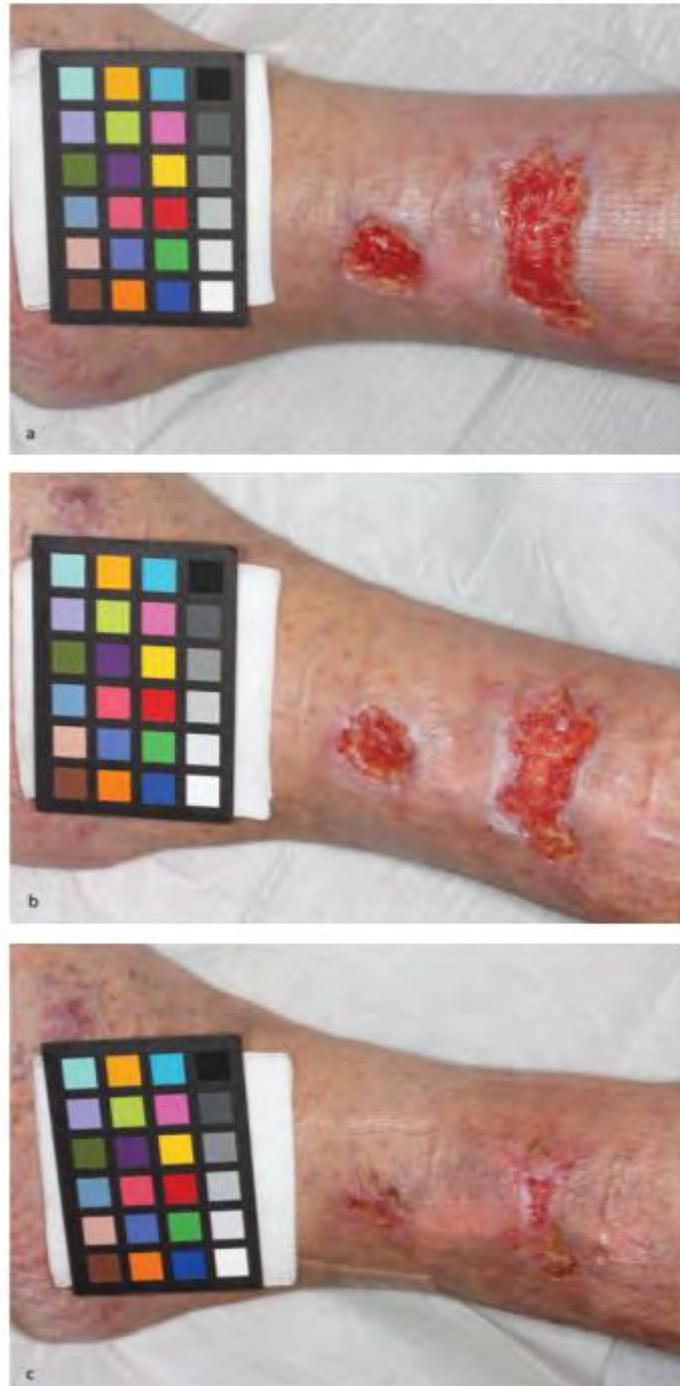
L'efficacité du plasma pour l'éradication de bactéries sous forme de spores, très résistantes, a également été démontrée (Boudam *et al.* , 2006; Klämpfl *et al.* , 2012; Puligundla and Mok, 2018). Certaines équipes de recherche ont ensuite concentré leur effort sur le développement de dispositif plasma portable pour la décontamination (Lin *et al.* , 2015; Morfill *et al.* , 2009). À noter que lors de l'utilisation du plasma pour l'éradication de microorganisme, les paramètres physiques et conditions opératoires doivent être optimisés pour s'assurer d'une inactivation efficace tout en minimisant les dommages causés au matériel stérilisé (Lerouge *et al.* ). Le potentiel bactéricide du plasma a ensuite été exploité pour la décontamination de tissu

biologiques comme les plantes (Deng *et al.* , 2007; Selcuk *et al.* , 2008) ou la peau (Daeschlein *et al.* , 2012).

### **b. Cicatrisation et régénération tissulaire**

Outre son potentiel d'éradication des bactéries exploité pour la désinfection des plaies, le plasma possède des propriétés de stimulation des cellules de la peau. Ce sont ces propriétés qui ont été exploitées pour la cicatrisation et la régénération tissulaire. Le processus de cicatrisation des plaies se fait en trois grandes étapes : la phase de détersion ou inflammation, la phase de bourgeonnement ou prolifération (formation d'un nouveau tissu) et la phase d'épidermisation ou régénération (Gurtner *et al.* , 2008). Si une seule de ces trois étapes est perturbée, le mécanisme de cicatrisation est déficient, on parle alors de plaies chroniques. Ces plaies chroniques concernent entre autres les personnes atteintes de maladies cardiovasculaires, les diabétiques et les personnes âgées du fait de leur faible mobilité. La prise en charge de ses patients est complexe puisqu'elle associe le traitement des plaies mais aussi le traitement des pathologies à l'origine de la formation de ces plaies. L'hospitalisation de ces patients peut durer jusqu'à un mois et s'accompagne très souvent de complications tel que de la septicémie pouvant conduire à une amputation. Ainsi, il est primordial de trouver des solutions thérapeutiques pour restaurer les processus de cicatrisation chez ses patients, de manière efficace, rapide, sur le long terme et plus facile à mettre en œuvre.

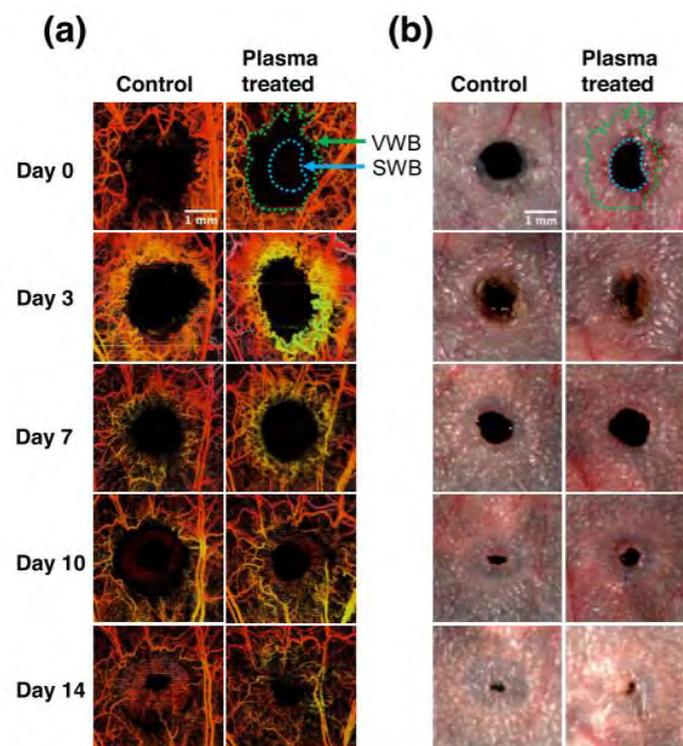
Le premier essai clinique mondial, contrôlé et randomisé, pour l'utilisation du dispositif torche à plasma MicroPlaSter® pour la cicatrisation de plaies chroniques a été publié en 2010 (Isbary *et al.* , 2010). Trente-huit plaies chroniques infectées (sur 36 patients) ont été exposées au plasma tous les jours, entre 2 et 5 minutes. La charge bactérienne des plaies traitées a également été suivie au cours de l'essai, une diminution de 34% a été observée, permettant ainsi une nette amélioration de la cicatrisation de la plaie (**Figure 13**). De plus, le traitement est bien toléré par les patients et aucuns effets secondaires n'a été relevé.



**Figure 13 : Traitement par plasma d'un ulcère variqueux chez un patient de 61 ans. (a) Plaie avant le traitement plasma, après 7 et 11 traitements (b et c, respectivement). La plaie est exposée 2 minutes au dispositif plasma MicroPlaSter® introduit précédemment. Figure issue de (Isbary *et al.* , 2010).**

L'éradication des bactéries colonisant les plaies chroniques explique en partie la meilleure cicatrisation qui en résulte, en effet la colonisation de plaies par des bactéries ralentit le processus de cicatrisation. Parallèlement, il a été montré que le plasma affecte les propriétés des cellules de l'épiderme (fibroblastes) et de la couche superficielle de la peau (kératinocytes) ainsi que d'autres processus impliqués dans les phases de la cicatrisation. En effet, Arndt et ses

collaborateurs ont montré *in vitro* et *in vivo* qu'un traitement de 2 minutes par plasma induit l'expression de gènes impliqués dans le processus d'inflammation ; la défensine  $\beta$ , l'interleukine 8 et le TGF- $\beta$ 2 ; sans pour autant activer la prolifération, la migration ou la mort cellulaire des kératinocytes (Arndt *et al.* , 2015). L'effet du plasma sur les kératinocytes est encore controversé à ce jour, une autre étude a montré que de courte exposition à de faible puissance (18 W durant 5 secondes) induit la prolifération des kératinocytes *in vitro* (Korolov *et al.* , 2016). Il est très important de noter ici que la configuration du jet, les paramètres électriques mais également le milieu ou l'environnement dans lequel sont contenues les cellules, *in vitro et in vivo*, influent sur les effets biologiques du plasma, ceci peut expliquer les discordances retrouvées dans la littérature. Globalement, de courts temps d'exposition à faible puissance stimulent la prolifération des kératinocytes tandis que de plus longs temps d'exposition à forte puissance induisent la mort de ces cellules. Ainsi, la réponse cellulaire est dose-dépendante. L'effet du plasma sur les fibroblastes a également été étudié, il a été montré que le plasma augmente la prolifération et la migration des fibroblastes via le relargage du facteur de croissance fibroblastique-7 (Ngo *et al.* , 2014). Des études *in vitro* (Arndt *et al.* , 2018) et *in vivo* chez le rat et la souris (Kim *et al.* , 2016; Zhang *et al.* , 2019) ont montré que le traitement plasma favorise la cicatrisation par la stimulation de l'angiogenèse, la contraction et la ré épithélialisation de la plaie (**Figure 14**).



**Figure 14 : Stimulation de l'angiogenèse par traitement plasma chez le rat. (a)** Images de tomographie par cohérence optique (OCT) non-invasive de la plaie chez la souris, la profondeur en z est donnée par le code couleur

jaune (vaisseaux superficiels), rouge (vaisseaux profonds). La limite de l'épiderme de la plaie est représentée par la ligne bleue pointillée (SWB, skin wound boundary) et la limite des vaisseaux de la plaie avec la ligne verte pointillée (VWB, vascular wound boundary) (b) Images stéréoscopiques correspondantes. Figure issue de (Kim *et al.*, 2016).

Le plasma a également été proposé comme solution pour le traitement des dermatoses, tel que la dermatite atopique ou l'ichtyose. Ces maladies de la peau sont causées par un déséquilibre du film hydrolipidique de la peau. Ce déséquilibre induit un changement dans le pH de la peau, passant de ~ 5,5 à un pH supérieur à 6. C'est cet environnement qui est propice à la colonisation par des agents pathogènes responsable des dermatoses (Fredricks, 2001). Helmke et ses collaborateurs ont étudié l'effet du traitement plasma sur le film hydrolipidique de la peau et les variations de pH associées (Helmke *et al.*, 2009). Ils ont montré, chez le porc et l'homme, que la génération d'acide nitrique  $\text{HNO}_3$  par le plasma induit une acidification du film lipidique, stabilisée pendant plus de deux heures après le traitement.

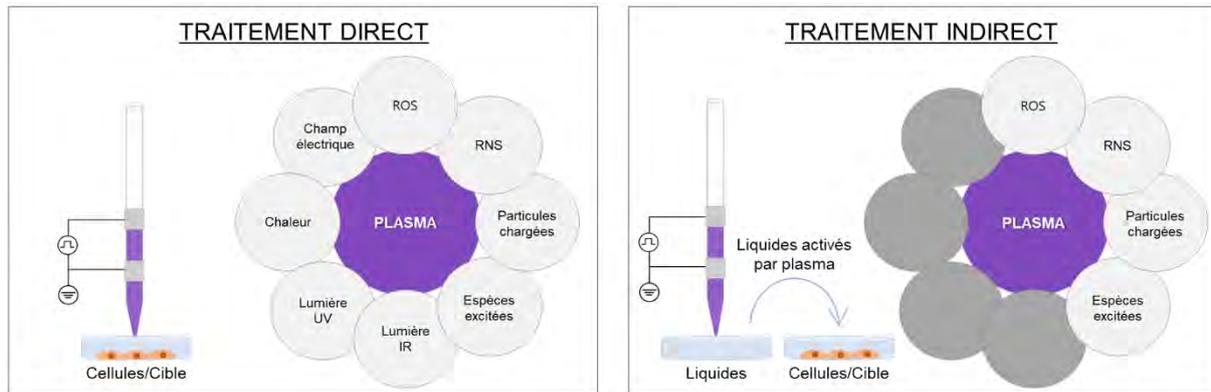
### **c. Thérapie anti-cancéreuse**

C'est en 2007 que le potentiel anti tumoral du plasma froid est démontré pour la première fois, une équipe américaine met alors en évidence l'induction de l'apoptose, *in vitro*, dans des cellules de mélanome humain traité avec un dispositif Fe-DBD (Fridman *et al.*, 2007). Cette étude a ouvert la voie à de multiples équipes de recherche pour démontrer et valider le potentiel anti-cancéreux sur d'autres types de cancer, *in vitro* et *in vivo*, et avec d'autres dispositifs plasmas. Les premiers chercheurs investis dans ces études étaient principalement des physiciens ainsi les mécanismes biologiques régissant ces phénomènes sont longtemps restés peu connus et sont, à ce jour, encore en cours d'investigation.

#### *i. Modalités de traitement*

Chronologiquement, les plasmas froids ont d'abord été utilisés par exposition directe sous le plasma. Puis, il a été mis en évidence que l'interaction du plasma avec la phase liquide de la cible (milieu de culture ou tampon sur cellules *in vitro*, couche d'hydratation des cellules *in vivo*) est impliquée dans un processus de seconde génération d'espèces chimiques radicalaires et d'espèces réactives de l'oxygène et de l'azote (RONS). Cette découverte a donné lieu au développement d'une autre stratégie de traitement indirecte. Elle implique l'exposition de liquides (milieux de culture pour cellules, solutions salines, solutions tampons ...) sous le plasma. On parle alors de milieux ou liquides « activés » par plasma (de l'acronyme anglais

plasma-activated media or liquids, PAM ou PAL respectivement) (**Figure 15**). Le terme « activé » est utilisé puisqu'il a été montré que l'exposition au plasma de ces phases liquides engendre la génération de RONS à longue durée de vie mais également d'espèces radicalaires à courte durée de vie (Chauvin *et al.* , 2017).



**Figure 15 : Les deux modalités de traitement par plasma, direct et indirect, utilisées pour la thérapie anti-cancéreuse et les composants physiques et chimiques associés.**

*Depuis quelques années, il y a une émergence autour de l'utilisation de ces PAM et PAL en traitement anti-cancéreux. En effet, le traitement indirect présente de nombreux avantages face au traitement direct. En utilisant ces liquides pour le traitement des cellules cancéreuses, on s'affranchit des composants physiques du plasma : les radiations UV et IR, le champ électrique transitoire et l'augmentation de température, pouvant avoir une influence non négligeable sur les effets observés. L'utilisation de ces liquides faciliterait l'administration in vivo et en clinique. Dans les sections suivantes, les effets biologiques induits et l'implication des RONS dans la cytotoxicité des PAL et des PAM seront développés. Les mécanismes impliqués dans le traitement direct par jet de plasma ne seront pas discutés ici, puisque les travaux de thèse ci-après présentés se sont uniquement intéressés à l'effet de traitement indirect par des PAL.*

*ii. Effets des liquides activés par plasma sur les cellules cancéreuses : état de l'art*

Le potentiel anti-cancéreux de solutions exposées aux jets de plasma froid a d'abord été évalué en utilisant des milieux de culture cellulaire tel que le Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM), le Roswell Park Memorial Institute medium (RPMI), ou l'Iscove's Modified Dulbecco's Medium (IMDM). L'utilisation de ces milieux de culture complexes a soulevé quelques questions. En effet, leur composition riche en acides aminés, vitamines, sucres et sels

inorganiques à une forte influence sur les espèces réactives générées et leur stabilité. Il a été mis en évidence que le pyruvate, produit final des voies de dégradation du glucose et substrat de la fermentation lactique alcoolique des cellules en anaérobiose, est un piègeur de ROS (Tauffenberger *et al.* , 2019). Sa présence induit donc une résistance au stress oxydatif des cellules et diminue la cytotoxicité des milieux de culture en contenant (Bergemann *et al.* , 2019; Tornin *et al.* , 2019). L'exposition au plasma de ces milieux de culture induit également des modifications des acides aminés qui le composent tel que la dégradation de la cystéine (Yan *et al.* , 2015a), l'hydroxylation et la nitration de la tyrosine, du tryptophane, la sulfoxydation de la méthionine, l'hydroxylation de l'arginine (Chauvin *et al.* , 2017). La présence de ces acides aminés dégradés va impacter sur la réactivité des radicaux générés dans les milieux de culture activés, modifiant ainsi leur stabilité.

D'autres stratégies ont donc été proposées par la suite et reposent sur l'utilisation de solutions plus simple d'un point de vue de leur composition tel que des solutions salines (solution de lactate de sodium ou solution de Ringer lactate SLR, chlorure de sodium NaCl) ou des solutions tampons (tampon phosphate salin PBS). L'utilisation de ces solutions physiologiques activées par plasma est plus pertinente pour une future transposition *in vivo* et en clinique comme agent anti-cancéreux.

De nombreuses études effectuées *in vitro* et *in vivo* et sur différents modèles de cancer ont démontré les effets anti tumoral des PAM et PAL, via l'induction de l'apoptose, l'inhibition de la migration et donc du potentiel métastatique et d'autres mécanismes cellulaires. Dans un but de clarté, les résultats majeurs de ces études sont regroupés dans le **tableau 3** ci-après, ainsi que les différentes lignées cellulaires cancéreuses utilisées, le modèle d'étude et les mécanismes de mort cellulaire engendrés.

<i>Lignées cellulaire</i>	<i>Modèle d'étude</i>	<i>PAM/PAL Dispositif plasma</i>	<i>Effets sur les cellules Mécanismes d'action</i>	<i>Références</i>
Glioblastome humain U251SP	<i>In vitro</i> , cellules adhérentes	DMEM Jet de plasma (argon)	Apoptose caspase dépendante Clivage caspase 3/7 ⤵ phosphorylation kinases des voies PI3K/AKT/ mTOR, PI3K, ⤵ PDK1	(Tanaka <i>et al.</i> , 2011, 2012)
Carcinome humain pulmonaire A549, du foie HepG2 et mammaire MCF7, Neuroblastome humain SH-SY5Y	<i>In vitro</i> , cellules adhérentes	DMEM (stock -80°C) Jet de plasma (argon)	Apoptose caspase indépendante ⤴ TRMP2, ⤴ stress mitochondrial  Mort cellulaire Zn <sup>2+</sup> dépendante, ⤴ Zn <sup>2+</sup> , ⤵ NAD <sup>+</sup> , ⤵ ATP	(Adachi <i>et al.</i> , 2015)  (Hara <i>et al.</i> , 2015, 2017)

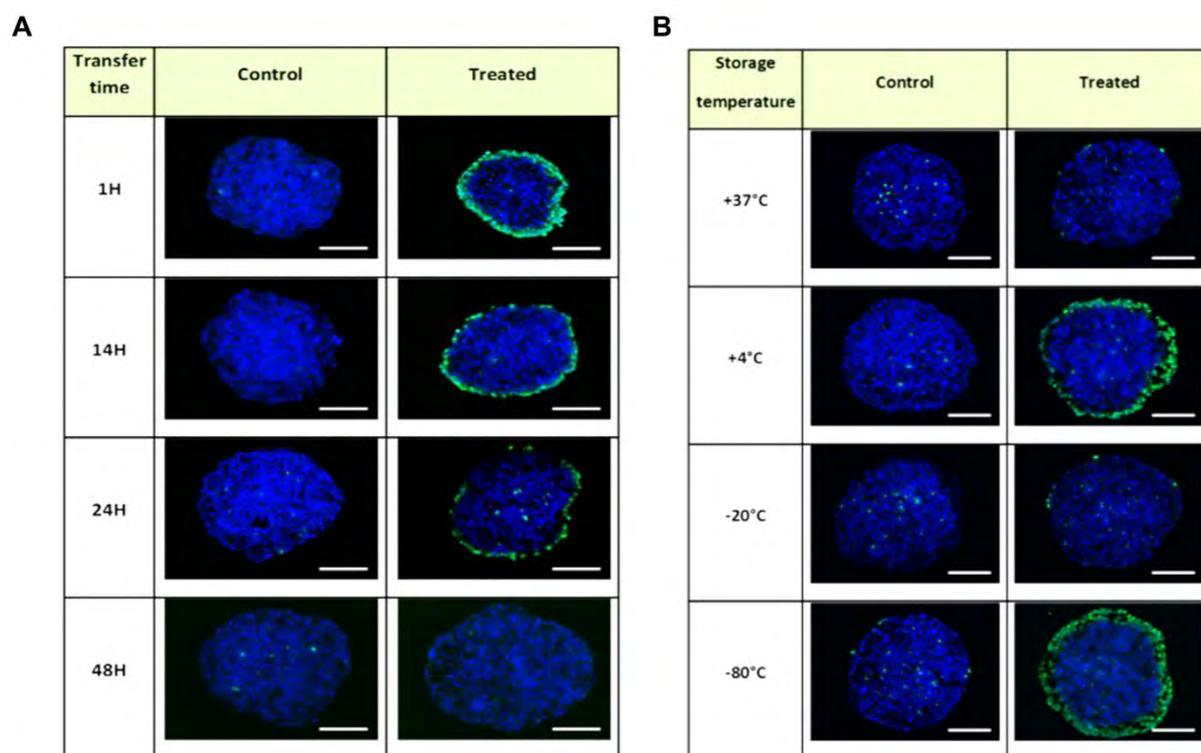
Carcinomes pancréatiques humains, PANC-1, Capan-2, BxPC-3, MIA PaCa-2	<i>In vitro</i> , cellules adhérentes  <i>In vivo</i> , tumeur sous-cutanée (injection PAM I.T. 24h post greffe)	RPMI Jet de plasma (argon)	Apoptose caspase dépendante Clivage caspase 3/7 ↘ taux de prolifération  ↘ volume des tumeurs	(Hattori <i>et al.</i> , 2015)
Carcinome du col de l'utérus humain HeLa	<i>In vitro</i> , cellules en suspension	DMEM, PBS DBD	↘ ré-adhésion cellulaire et croissance PBS + cytotoxique que DMEM DMEM potentiel mutagène sur longue période d'incubation (plusieurs semaines)	(Boehm <i>et al.</i> , 2016)
Carcinome du col de l'utérus humain SiHa	<i>In vivo</i> , tumeur sous-cutanée (injection PAM I.T. 24h post greffe)	SLR Jet de plasma (argon)	↘ volume des tumeurs	(Tanaka <i>et al.</i> , 2016)
Carcinome colorectal humain HCT 116	<i>In vitro</i> , sphéroïde	DMEM (stock -80°C, 4°C) Jet de plasma (hélium)	↘ croissance des sphéroïdes Dommages à l'ADN (cellules couches externes) Cf. <b>Figure 16</b>	(Judée <i>et al.</i> , 2016a)
Carcinome humain pulmonaire A549, ostéosarcomes humain HOS, SAOS-2, MG63 et mélanome humain A2058	<i>In vitro</i> , cellules adhérentes	DMEM (stock 4°C) Jet de plasma (hélium)	Apoptose caspase indépendante Accumulation de ROS dans les mitochondries Fission et désorganisation du réseau mitochondrial Cf. <b>Figure 17</b>	(Saito <i>et al.</i> , 2016)
Carcinomes ovariens humains OVCAR-3, NOS2, TOV21G, ES-2	<i>In vitro</i> , cellules adhérentes	RPMI Jet de plasma (argon)	Rétraction cellulaire, blebbing et détachement ↘ prolifération  TOV21G, ES-2 ++ sensible car morphologie mésenchymateuse	(Utsumi <i>et al.</i> , 2016)
Lymphome lymphoplasmocytaire humain MWCL-1, RPCI-WM1	<i>In vitro</i> , cellules en suspension	IMDM Jet de plasma (hélium)	↗ différenciation cellulaire ↗ PRDM1 $\alpha$ ↘ population tumorigénique	(Wada <i>et al.</i> , 2017)
Carcinome de la bouche humain SCC15	<i>In vitro</i> , cellules adhérentes	DMEM Jet de plasma (oxygène)	↘ viabilité cellulaire  Analyse transcriptomique ↗ voie p53, voie de l'hypoxie	(Shi <i>et al.</i> , 2017)
Carcinomes gastriques humains SC-2-NU, AGS	<i>In vitro</i> , cellules adhérentes  <i>In vivo</i> , tumeur intrapéritonéale (injection PAM I.P. 24h post greffe)	RPMI Jet de plasma (argon)	↘ adhésion et migration cellulaire  ↘ prise tumorale ↘ 60% nombre de nodules métastatiques	(Takeda <i>et al.</i> , 2017)
Carcinomes ovariens humains ES-2, SKOV-3	<i>In vitro</i> , cellules adhérentes  <i>In vivo</i> , tumeur intrapéritonéale (injection PAM I.P. directement après la greffe)	RPMI Jet de plasma (argon)	↘ motilité cellulaire ↘ MMP-9  ↘ prise tumorale ↘ 60% nombre de nodules métastatiques	(Nakamura <i>et al.</i> , 2017)

Carcinome humain de la tête et du cou FaDu	<i>In vitro</i> , sphéroïdes	DMEM Jet de plasma (hélium)	Détachement des cellules en périphérie suivi d'une très forte reprise de croissance (+ élevé que contrôle) 4 traitements successifs pour éradiquer totalité des sphéroïdes	(Chauvin <i>et al.</i> , 2018)
Carcinomes pancréatiques humains, Capan-2, BxPC-3, ASPC-1, MIA PaCa-2	<i>In vitro</i> , cellules adhérentes <i>In vivo</i> , tumeur intrapéritonéale (injection PAM I.P. 24h post greffe)	SLR Jet de plasma (argon)	Apoptose caspase dépendante Fragmentation ADN (TUNEL assay) ↘ prolifération  ↘ prise tumorale ↘ nombre de nodules métastatiques	(Sato <i>et al.</i> , 2018)
Carcinome gastrique humain GCIY peu différenciées (CSC + résistance aux ROS)	<i>In vitro</i> , cellules en suspension	DMEM Jet de plasma (argon)	↘ viabilité cellulaire ↘ ALDH dans les CSC	(Ikeda <i>et al.</i> , 2018)
Mélanome murin B16-F10	<i>In vivo</i> , tumeur sous-cutanée (injection PAM I.T. 7 jours post greffe)	DMEM Jet de plasma (hélium)	↘ croissance tumorale ↗ BAX/BCL2, apoptose  Traitement direct par jet de plasma ++ efficace que PAM	(Saadati <i>et al.</i> , 2018)
Glioblastome humain U251SP	<i>In vitro</i> , cellules adhérentes	DMEM Jet de plasma (argon)	Analyse métabolomique ↗ glycolyse ↘ voie des pentoses phosphates	(Kurake <i>et al.</i> , 2019)
Carcinomes colorectaux murins MC38 et CT26	<i>In vitro</i> , cellules adhérentes et sphéroïdes <i>In vivo</i> , tumeur intrapéritonéale (injection PAM I.P. 48h post greffe)	PBS Jet de plasma Kinpen®	Blocage du cycle cellulaire Réorganisation du réseau d'actine ↗ protrusions d'actine ↗ CRT, HSP70 et HMGB1 ↗ mort immunogénique  ↘ prise tumorale ↗ macrophages, lymphocytes T	(Freund <i>et al.</i> , 2019)

**Tableau 3 : Synthèse des effets des milieux de cultures et autres liquides activés par plasma froid sur les cellules cancéreuses *in vitro* et *in vivo*.** Légende : ↘ inhibition/diminution ; ↗ activation/augmentation ; **voie AKT/PI3K/mTOR** : voie de régulation de l'apoptose et du cycle cellulaire ; **PDK1** : pyruvate déshydrogénase kinase ; **TRPM2** : Transient receptor potential cation channel M2, protéine de type canal calcique ; **PRDM1 α** : PR domain zinc finger protein 1, represseur des β-interferon et suppresseur de tumeur; **MMP-9** : Matrix metallopeptidase 9 impliquée dans la dégradation de la matrice extracellulaire; **BAX/BCL2** : facteurs apoptotiques; **CRT** : calreticuline; **HSP70** : heat shock protein 70; **HMGB1** : high-mobility-group-protein B1 ; **I.T.** : intra tumoral ; **I.P.** : intrapéritonéal ; **NT** : non traité ; **T** : traité ; **CSC** : cellules souches cancéreuses ; **DMEM** : Dulbecco's Modified Eagle's Medium ; **RPMI** : Roswell Park Memorial Institute medium ; **IMDM** : Iscove's Modified Dulbecco's Medium ; **SLR** : solution de lactate Ringer.

Les études *in vitro* convergent vers un mécanisme de cytotoxicité commun médié par les RONS, et plus spécifiquement le peroxyde d'hydrogène H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Des quantités très élevées de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> dans la cellule induisent un épuisement de ses mécanismes antioxydants et *in fine* de son métabolisme énergétique. Toutefois, le niveau de toxicité engendré par la présence d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> reste lignée-dépendant, la majorité des lignées cellulaires cancéreuses sont affectées par le stress oxydatif, néanmoins certaines lignées tel que les cellules FaDu (cancer tête et cou humain) voient leur prolifération cellulaire augmentée (Chauvin *et al.*, 2018). Parallèlement, l'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> est connu pour induire des dommages à l'ADN (Halliwell *et al.*, 2000); on parle de génotoxicité.

Le potentiel génotoxique des PAM a été montré sur des sphéroïdes de cellules de cancer colorectal humain HCT 116 par Judée et ses collaborateurs (Judée *et al.* , 2016b, 2016a). Ils ont également mis en évidence que la quantité de dommages à l'ADN causés par le PAM était directement dépendante du temps de transfert et du stockage du PAM. En effet, si ce dernier est transféré directement sur les cellules ou sphéroïdes après exposition au plasma, la génotoxicité est optimum, puis elle décroît proportionnellement avec le temps de transfert (**Figure 16.A**). De même, stocké à 4°C ou -80°C, l'activité génotoxique du PAM n'est pas modifiée, en revanche à 37°C ou -20°C les dommages causés à l'ADN sont moindres (**Figure 16.B**).

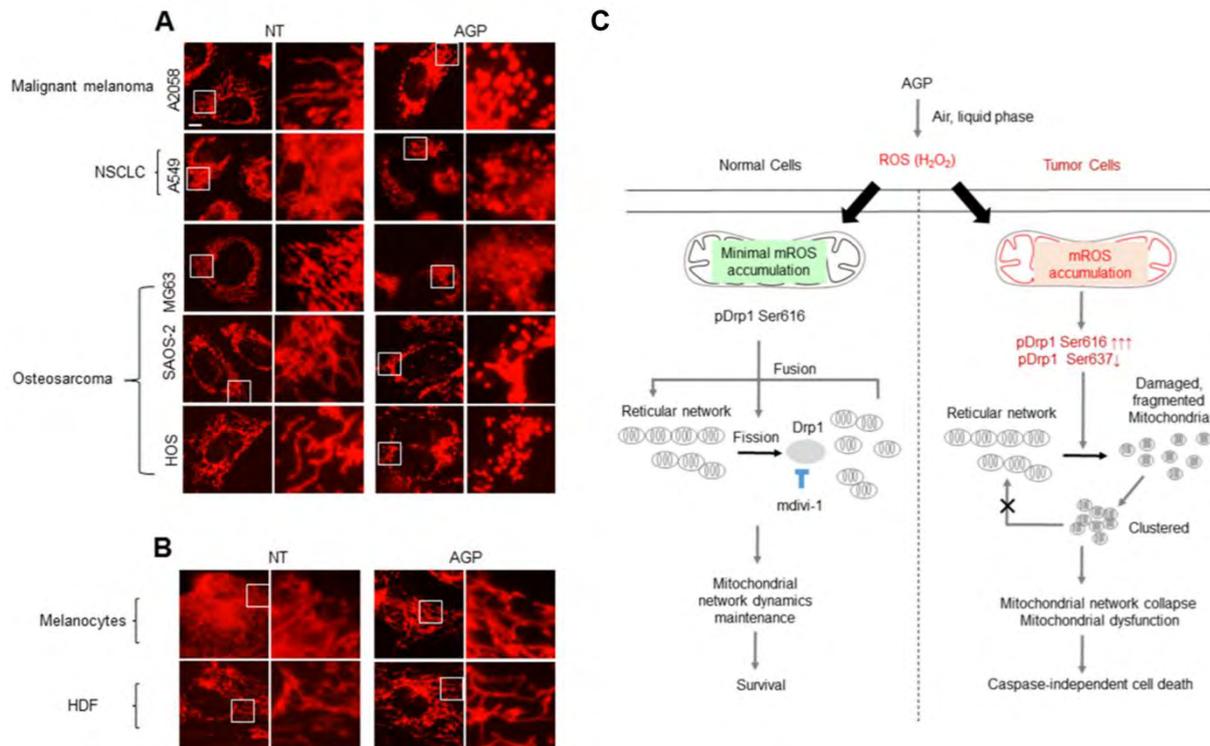


**Figure 16 : Influence du temps de transfert et du stockage de milieu activé par plasma sur la génotoxicité induite.** Les dommages à l'ADN sont marqués par les histones H2AX (bleu cyan) et le noyau est marqué avec du DAPI (bleu foncé) sur des coupes de sphéroïdes de cellules de cancer colorectal humain HCT 116. **(A)** Influence du temps de transfert, temps écoulé entre l'exposition du milieu de culture au jet de plasma et le transfert sur les sphéroïdes. **(B)** Influence du stockage du PAM. Échelle : 100 µm. Figure adaptée de (Judée *et al.* , 2016a).

Le stress oxydatif et les dommages à l'ADN causés par les PAM ou PAL peuvent conduire à différents mécanismes de mort cellulaire : caspase dépendant ou indépendant. Le clivage des caspase 3/7 et la fragmentation de l'ADN après traitement a été mis en évidence par de nombreuses équipes, indiquant ainsi une mort cellulaire par apoptose (**cf. tableau 3**).

Saito et ses collaborateurs quant à eux ont mis en évidence sur certaines lignées cellulaires cancéreuses (ostéosarcome, mélanome et adénocarcinome du poumon) que la mort cellulaire induite par le PAM peut être caspase indépendante (Saito *et al.* , 2016). Ils ont montré qu'une

accumulation d' $H_2O_2$  au niveau des mitochondries subvient après traitement par PAM entraînant une désorganisation du réseau mitochondrial et une fission des mitochondries à l'origine de la mort cellulaire (**Figure 17**).

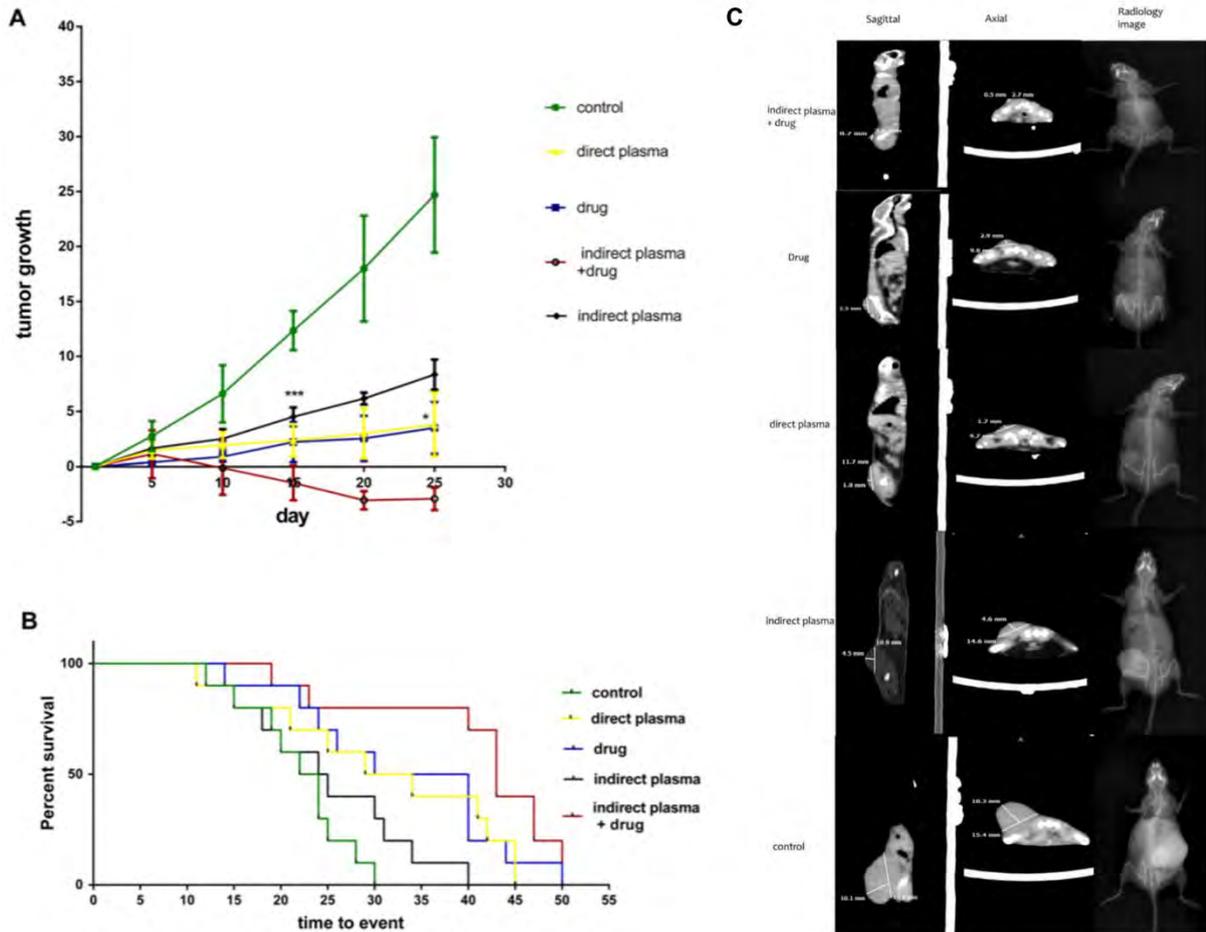


**Figure 17 : Fission et désorganisation du réseau mitochondrial induits par le PAM et mécanismes d'action chez les cellules cancéreuses versus cellules saines.** Observation de l'organisation du réseau mitochondrial des cellules cancéreuses (**A**) et cellules saines (**B**) après traitement par milieu activé par plasma (AGP). La sonde fluorescente MitoTracker Red CMXRos (rouge) est utilisée pour détecter les mitochondries. (**C**) Cascade de signalisation engendrée chez les cellules saines et les cellules cancéreuses traitées par PAM. Chez les cellules cancéreuses, le stress oxydatif engendre une prédominance de la forme pDrp1 Ser 616 et une diminution de la forme pDrp1 Ser 637 (cf. légende), causant la fission mitochondriale et la mort cellulaire caspase indépendante. En revanche, chez les cellules saines, une accumulation de ROS moindre est observée et donc pas de prédominance de la forme pDrp1 616, les cellules survivent et le réseau mitochondrial n'est pas affecté. Légende : NT : non traité, NSCLC : non-small-cell lung carcinoma AGP : atmospheric gas plasma, mdivi-1 : inhibiteur de la fission mitochondriale, pDRP1 : dynamin-related protein 1 phosphorylée, protéine impliquée dans la régulation de la fission mitochondriale (forme pSer616 active fission ; forme pSer637 inhibe fission). Figure adaptée de (Saito *et al.*, 2016).

La plupart des études *in vivo* regroupées dans le **tableau 3** (Freund *et al.*, 2019; Hattori *et al.*, 2015; Nakamura *et al.*, 2017; Takeda *et al.*, 2017; Tanaka *et al.*, 2016) ont utilisé des protocoles de greffe de tumeurs chez la souris qui soulève une question de pertinence biologique. En effet, l'injection des PAM, soit directement à l'intérieur de la tumeur, soit dans le péritoine (modèle dépendant, sous-cutané ou intrapéritonéale), se fait dans les 24 heures suivant l'injection des cellules. À ce stade, les cellules greffées n'ont pas encore formé de tissu tumoral (microenvironnement, vascularisation ...) comme pour des tumeurs chez l'Homme. Ainsi, c'est la prise de la greffe qui est inhibée par l'injection des PAM et non pas la croissance

tumorale elle-même. Or, pour l'évaluation et la validation des effets d'une thérapie anticancéreuse *in vivo*, il est primordial d'avoir un modèle relevant et proche des situations cliniques.

Plus récemment, certaines équipes de recherches ont investi de nouvelles modalités de traitement reposant sur la combinaison des PAM ou PAL avec la chimiothérapie. Chen et ses collaborateurs ont mis en évidence des effets de synergie avec un traitement par PAM supplémenté de doxorubicine sur cellules traitées *in vitro* (Chen *et al.* , 2018). Ceci a également été validé *in vivo* sur le mélanome murin B16-F10 dans une étude comparative de l'effet du plasma en traitement direct et des PAM seul ou combiné avec l'administration d'un agent anticancéreux, la cyclophosphamide (Saadati *et al.* , 2018). Ici, l'injection du PAM dans la tumeur est suivie de l'injection intrapéritonéale de l'agent chimiothérapeutique. La **Figure 18** montre les courbes de croissance des tumeurs et courbe de survie des animaux pour chacun des protocoles de traitement, ainsi que les images de scanner prises avant sacrifice des animaux. La combinaison de PAM avec l'injection de cyclophosphamide apparaît comme la modalité de traitement la plus efficace en termes de diminution de croissance tumorale et de survie. Tandis que l'injection de PAM seul est moins efficace que le traitement direct par plasma ou l'injection de cyclophosphamide seule. Ainsi, il y a un effet de synergie de l'utilisation d'agents chimiothérapeutiques avec le PAM.



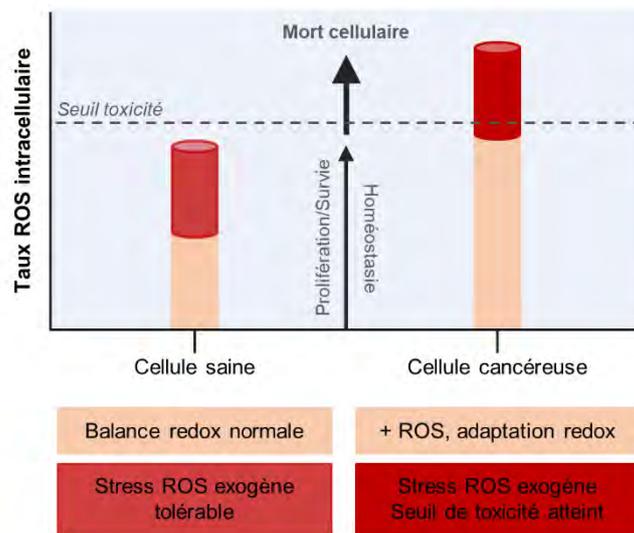
**Figure 18 : Effet synergique du traitement par PAM et de l'administration d'un agent chimiothérapeutique sur la croissance tumorale *in vivo*.** Des mélanomes B16 F10 sous-cutanées ont été traité par jet de plasma direct (direct treatment, jaune) ; PAM (indirect treatment, noire) ; cyclophosphamide (drug, bleu) ; ou PAM combiné à la cyclophosphamide (indirect treatment + drug, rouge). (A) Suivi de la croissance tumorale après traitement (\*\*P-values<0.001) (B) Taux de survie des souris (C) Radiologie et scanners sagittal et axial des tumeurs après les 25 jours de traitement. Figure adaptée de (Saadati *et al.* , 2018).

### iii. Susceptibilité des cellules cancéreuses

Contrairement à la plupart des thérapies anti-cancéreuses utilisées en clinique, l'exposition directe au plasma froid ou un traitement par PAL/PAM démontrent une cytotoxicité sélective envers les cellules cancéreuses (Georgescu and Lupu, 2010; Judée *et al.* , 2016b; Tanaka *et al.* , 2016; Yan *et al.* , 2015b, 2017a). Plusieurs hypothèses ont été proposées pour expliquer cette sensibilité accrue des cellules cancéreuses vis-à-vis du plasma.

De nombreuses études *in vitro* ont montré que le niveau de ROS intracellulaire détecté après exposition au plasma ou au PAL est significativement supérieure pour les cellules cancéreuses comparé aux cellules saines (Ja Kim *et al.* , 2013; Judée *et al.* , 2016b; Pereira *et al.* , 2019; Yan *et al.* , 2017a). Cette différence peut s'expliquer par le fait que les cellules cancéreuses

présentent un niveau basal de ROS intracellulaire plus élevé que les cellules saines (cf. Partie I de l'Introduction, section 2.a). Ceci les rend plus vulnérables aux dommages pouvant être causés par une augmentation de ROS via une source exogène. On parle d'une balance d'homéostasie cellulaire, le seuil de toxicité induit par les ROS est atteint plus vite chez les cellules cancéreuses que chez les cellules saines (**Figure 19**). Cette hypothèse peut donc expliquer le taux intracellulaire de ROS plus élevé et donc la sensibilité accrue des cellules cancéreuses au plasma qui en découle.

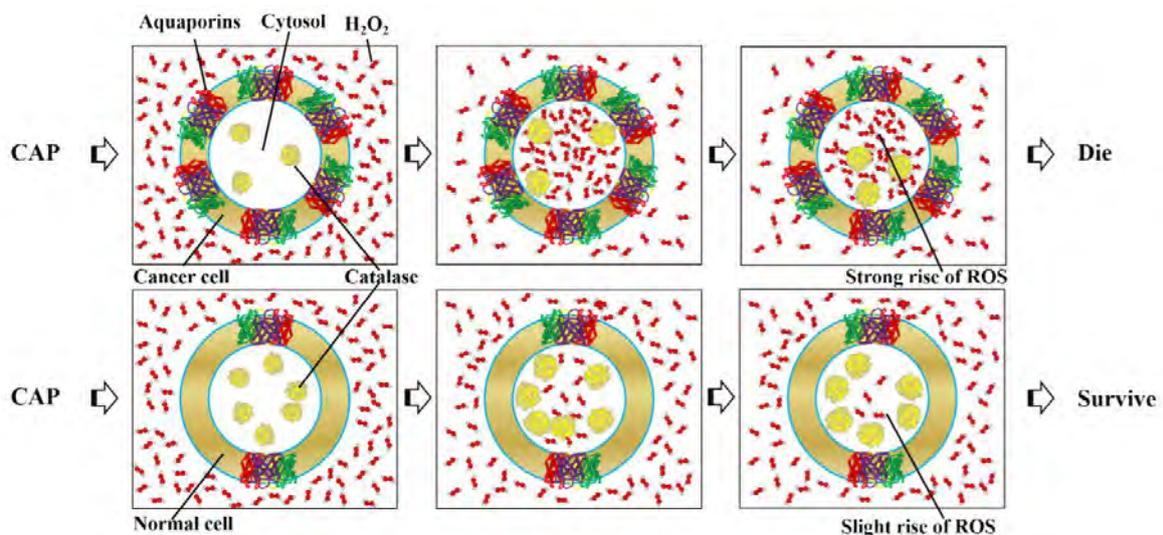


**Figure 19 : Les ROS dans la pathologie cancéreuse : une cible potentiel pour la thérapie.** Une augmentation des ROS par une source exogène dans les cellules cancéreuses est susceptible de provoquer une élévation supérieure au seuil de toxicité. Figure adaptée de (Trachootham *et al.*, 2009).

Une autre hypothèse reposant sur le taux d'expression des aquaporines a ensuite été proposée. Les aquaporines (AQPs) sont une famille de canaux protéiques membranaires facilitant le transport de l'eau à travers la membrane cellulaire. Les aquaporines participent également au transport du  $H_2O_2$ . Ces molécules peuvent diffuser à travers la membrane mais également être transférées dans la cellule via ces canaux en réponse aux gradients osmotiques (Verkman, 2012). La plupart des cellules cancéreuses ont une expression membranaire plus élevée d'AQPs que les cellules normales (Papadopoulos and Saadoun, 2015). Les ROS exogènes apportées par le plasma ou les PAL/PAM pourront pénétrer plus rapidement et préférentiellement dans les cellules cancéreuses. Étant donné que les cellules cancéreuses ont un potentiel antioxydant moindre comparé aux cellules saines, et qu'elles présentent une diminution de la capacité à éliminer les molécules d' $H_2O_2$  (Doskey *et al.*, 2016), la prise en charge de ces ROS sera alors défaillante (**Figure 20**). Yan et ses collaborateurs ont validé cette théorie en montrant que des

cellules de glioblastomes dont l'expression des AQP a été bloquée, par l'utilisation de siARN ou d'agents chimiques bloquants, sont moins sensibles au PAM et présentent un niveau de ROS intracellulaire plus faible après traitement (Yan *et al.* , 2017b).

Par ailleurs, le taux d'expression des AQP peut être corrélé au stade d'extension tumoral, ou grade. En effet, les tumeurs très avancées tendent à exprimer plus d'AQP que les tumeurs à des stades précoces de développement. Ainsi, la sensibilité vis-à-vis du plasma ou des PAL/PAM dépendrait également de ce stade tumoral (Zhu *et al.* , 2013).



**Figure 20 : Sensibilité accrue vis-à-vis du plasma (cold-atmospheric plasma, CAP) chez les cellules cancéreuses : le modèle des aquaporines.** Les cellules cancéreuses expriment plus d'aquaporines (AQP) et moins de catalases que les cellules saines, provoquant ainsi une forte accumulation des ROS intracellulaires. Figure issue de (Yan *et al.* , 2016).

Il a également été proposé que les caractéristiques morphologiques des cellules impactent sur la sensibilité au PAL (Utsumi *et al.* , 2016). En effet, Utsumi et ses collaborateurs ont évalué l'effet de PAM sur différents types de cellules de cancer ovarien présentant des caractéristiques morphologiques différentes. Ils ont montré que des cellules ayant effectuée la transition épithélio-mésenchymateuse, ayant un phénotype plus invasif, et dont le taux d'expression de la E-cadhérine a donc diminué sont plus sensibles au PAM. L'hypothèse formulée par ce groupe de recherche est que les adhésions cellule-cellule, assurées par la E-cadhérine et d'autres protéines, protègent les cellules contre le stress oxydatif, les rendant plus résistantes aux PAM.

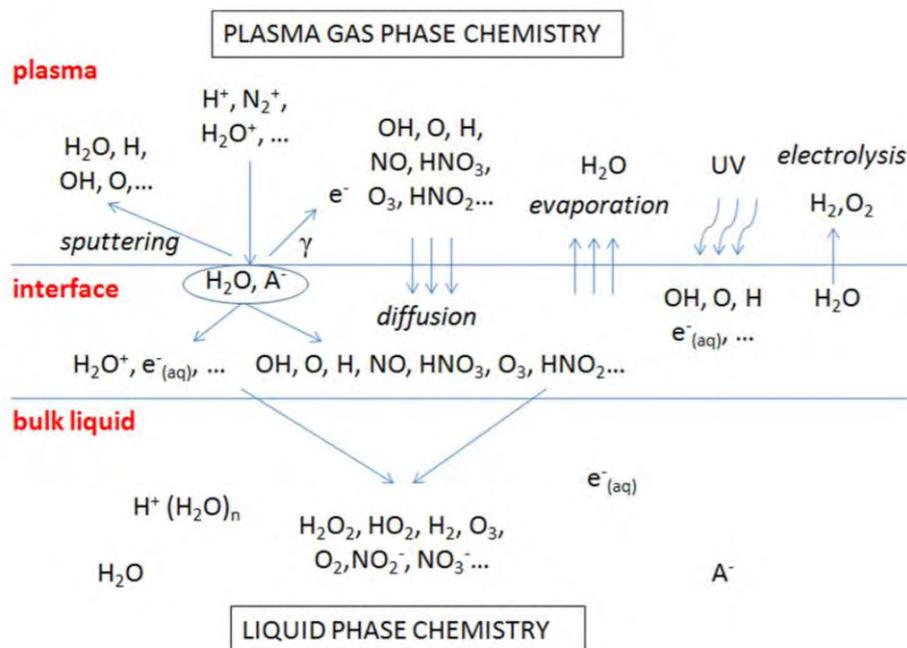
#### iv. La chimie des liquides activés par plasma

Tout comme pour la radiothérapie et la thérapie photo dynamique, le potentiel anti-cancéreux des PAM ou PAL repose essentiellement sur la génération de RONS à proximité ou directement dans la cellule, ainsi que dans les liquides exposés au plasma.

Les RONS sont définies comme des espèces chimiques très réactives contenant un ou plusieurs atomes d'oxygène ou d'azote. Il existe deux types de RONS : les radicaux libres, qui contiennent un ou plusieurs électrons célibataires sur leurs couches orbitales, hautement réactifs et à courte durée de vie (anion superoxyde  $O_2^{\cdot-}$ , radicaux hydroxylés  $HO^{\cdot}$ , oxygène singulet  $^1O_2$ , monoxyde d'azote ou oxyde nitrique  $^{\cdot}NO$ ) et les RONS non radicaux qui ne contiennent pas d'électrons célibataires, qui sont donc plus stables et à longue durée de vie (peroxyde d'hydrogène  $H_2O_2$ , ozone  $O_3$ , anion hypochlorite  $Cl-O^{\cdot-}$ , nitrite  $NO_2^{\cdot-}$ , nitrate  $NO_3^{\cdot-}$ , peroxydinitrite  $ONOO^{\cdot-}$ ). Lors de l'exposition de liquides tel que les milieux de culture, les solutions salines et solutions tampons, les interactions entre le jet de plasma froid et la phase liquide induisent la formation de toutes ces espèces. Adamovitch et Bruggeman et leurs collaborateurs ont décrit la physique et la chimie des interactions entre le plasma et les liquides (Adamovich *et al.*, 2017; Bruggeman *et al.*, 2016; Samukawa *et al.*, 2012). Ces études cherchent à comprendre et à mieux caractériser le transfert de réactivité du gaz vers la phase liquide. La densité des liquides, bien plus élevée que celle du gaz (1000 fois supérieure), induit des décharges lors du contact avec le plasma, on parle de processus multi-collisionnel. Les décharges qui se mettent en place lors de l'interaction entre un liquide et le plasma et qui participent à la génération d'espèces peuvent être dissociées en trois groupes : (i) décharges de la phase de gaz (ii) décharges directes de la phase liquide (iii) décharges de surface aussi appelées bulles de décharge. Un schéma des principales interactions ayant lieu à l'interface plasma-liquide est représenté en **Figure 21**. Cette interface liquide est qualifiée de puits thermique puisque de très fortes températures y sont détectées (Bruggeman and Leys, 2009). Ce sont ces températures élevées qui induisent des mécanismes collisionnels très intenses entre particules chargées et permet la génération et le transfert à la phase liquide de sous-espèces.

Il est important de noter que la nature et la quantité des espèces produites suite à l'exposition de liquides au plasma dépendent de multiples variables (Jablonowski and von Woedtke, 2015; Wende *et al.*, 2015) tel que : la configuration de jet de plasma (DBD, jet de plasma, paramètres électriques...), la nature du gaz (argon, hélium, oxygène, air ambiant...), la nature physicochimique du liquide exposé (pH, composition ...), la distance plasma-liquide, ainsi que le temps d'exposition de la solution au plasma. De nombreuses équipes de recherche ont

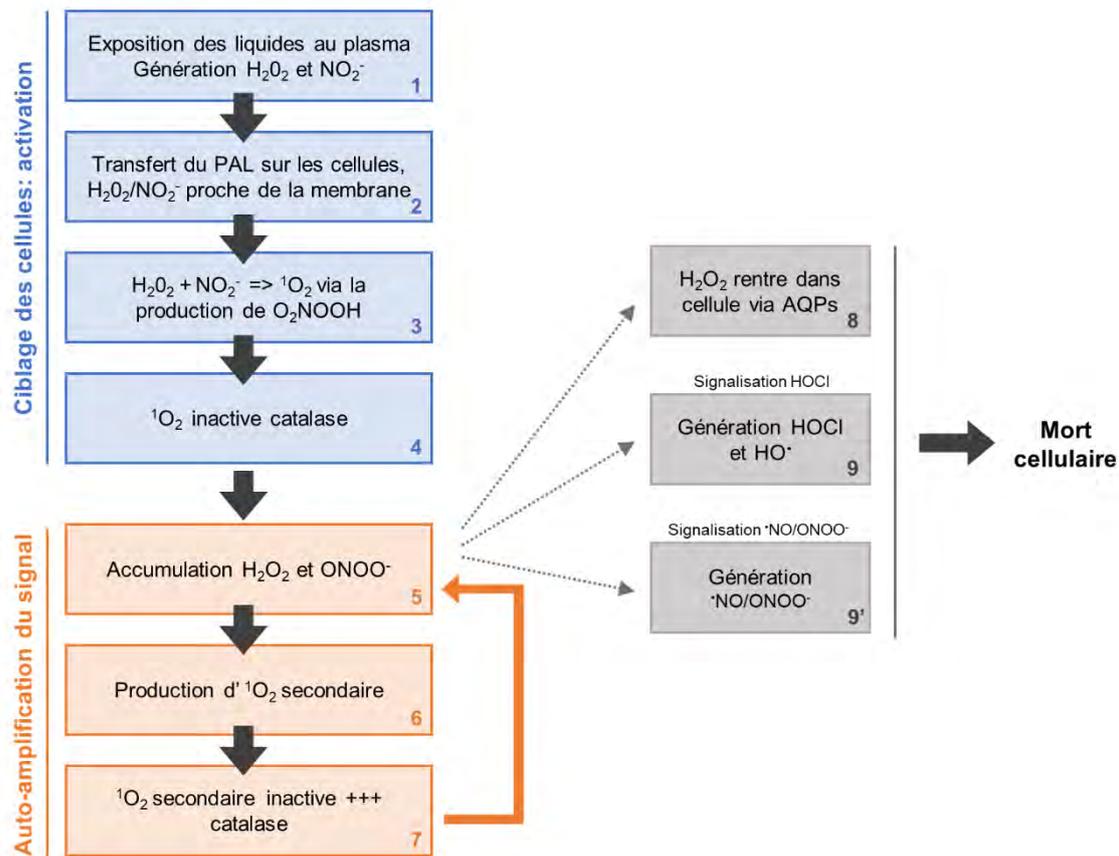
optimisé ces paramètres et ont montré qu'une distance plus courte entre la sortie du jet et le liquide, et un plus petit volume induit une production plus élevée de RONS (Takeda *et al.* , 2017; Van Boxem *et al.* , 2017; Yan *et al.* , 2015a).



**Figure 21 : Interaction plasma-liquide et génération des espèces réactives de l'oxygène et de l'azote et des radicaux libres.** Figure issue de (Samukawa *et al.* , 2012).

Les RONS à longue durée de vie persistent dans ces liquides activés par plasma pendant plusieurs heures après exposition (Chauvin *et al.* , 2017; Judée *et al.* , 2016a). Ainsi, lorsque la stratégie de traitement employée est le traitement dit indirect, les cellules traitées ne seront exposées qu'à ces espèces à longue durée de vie puisque la stabilité des radicaux libres est de l'ordre de la nanoseconde (Pryor, 1986) avant leur transformation par des réactions ou la métabolisation par la cellule. Les RONS à longue durée de vie causent des dommages aux cellules si la détoxification n'est pas efficace. Il a été montré que le  $H_2O_2$  et le nitrite  $NO_2^-$  sont principalement responsables de l'effet cytotoxique de liquide activé par plasma sur les cellules cancéreuses et que ces deux espèces agissent en synergie (Girard *et al.* , 2016). Goerg Bauer et ses collaborateurs ont récemment proposé qu'un mécanisme d'auto-amplification se met en place dans la cellule cancéreuse après le contact avec des liquides activés par plasma enrichis en RONS. Ce sont ces phénomènes d'auto-amplification qui sont à l'origine de la production de sous-produits toxiques (Bauer *et al.* , 2019), les étapes sont décrites dans la **Figure 22**. Les étapes 1 à 4 correspondent au ciblage des cellules par les liquides activés par plasma, plus spécifiquement  $H_2O_2$  et  $NO_2^-$ . Tandis que les étapes 5 à 7 correspondent aux mécanismes

d'auto-amplification ayant lieu à proximité de la cellule. S'en suit la mort de la cellule (étapes 8 à 10). La mort cellulaire est engendrée si, et seulement si, les étapes 5 à 7 sont répétées afin qu'un seuil de stress oxydatif suffisamment élevé soit atteint.



**Figure 22 : Cascade d'évènements cellulaires induit par les liquides activés par plasma et l'implication des RONS.** (1) Exposition des liquides et génération de  $H_2O_2$  et de  $NO_2^-$ . (2) Transfert PAL sur les cellules,  $H_2O_2$  et  $NO_2^-$  se retrouvent à proximité de la membrane. (3) Oxygène singulet  $^1O_2$  est généré par l' $H_2O_2$  et la  $NO_2^-$  via la voie du conjugué acide du peroxy-nitrite ( $O_2NOOH$ ). (4)  $^1O_2$  inactive catalase. (5)  $H_2O_2$  et le peroxy-nitrite  $ONOO^-$  ne sont donc plus métabolisés. (6) Le mécanisme d'auto-amplification dans la cellule est en route : des molécules d'oxygène singulet secondaire sont produites  $^1O_2$ . (7) cette forte production de  $^1O_2$  inactive encore plus de catalase, la cellule ne peut plus réguler les RONS et l'homéostasie, une boucle réactionnelle se met en place (flèche orange). (8)  $H_2O_2$  pénètre dans la cellule via les aquaporines AQPs et inhibe l'action des mécanismes antioxydant. (9) Génération d' $HOCl$  et  $HO^\bullet$ . (9') Génération  $NO/ONOO^-$ .

*Le plasma froid à pression atmosphérique peut donc être utilisé, en application direct ou indirect par l'utilisation de liquides activés par plasma, pour l'éradication sélective des cellules cancéreuses. Néanmoins, les mécanismes cellulaires qui régissent la mort engendrée par ces traitements restent encore à élucider à ce jour. De plus, les liquides activés par plasma présentent des limites lorsqu'ils sont utilisés sur un tissu en trois dimensions (tumeur et sphéroïdes). Ainsi, d'autres stratégies thérapeutiques reposant sur des principes physiques pourraient être proposées pour pallier ces limites.*



### Partie III : Les champs électriques pulsés

Le concept d'électroporation ou électroperméabilisation (EP) a été décrit en 1972 par Neumann et Rosenheck sur des vésicules de cellules chromaffines (Neumann and Rosenheck, 1972). L'EP repose sur la création de défauts au niveau de la membrane plasmique de la cellule lorsqu'elle est soumise à des champs électriques pulsés (Orlowski *et al.* , 1988). Le domaine d'application est large puisque la nature et l'intensité du champ électrique délivré à la cellule dictent une perméabilisation réversible ou irréversible, associées à divers effets sur la cellule (**Figure 23**). Via la formation de pores à la membrane, l'EP réversible peut être qualifiée de méthode de vectorisation puisqu'elle permet le transfert *in vitro* et *in vivo* d'une grande variété de molécules allant des petites molécules telles que les ions, les agents chimiques anti-cancéreux, à des molécules plus grosses telles que des anticorps, des molécules d'ADN ou d'ARN et des oligonucléotides. On parle d'EP irréversible (IRE) lorsque les dommages causés à la cellule sont létaux, cette méthode est utilisée entre autres pour l'ablation tumorale. Dans la suite du manuscrit, nous décrivons les effets cellulaires et tissulaires des champs électriques pulsés induisant une EP réversible uniquement puisqu'il s'agit de la méthode que nous avons utilisée pour le projet de thèse.

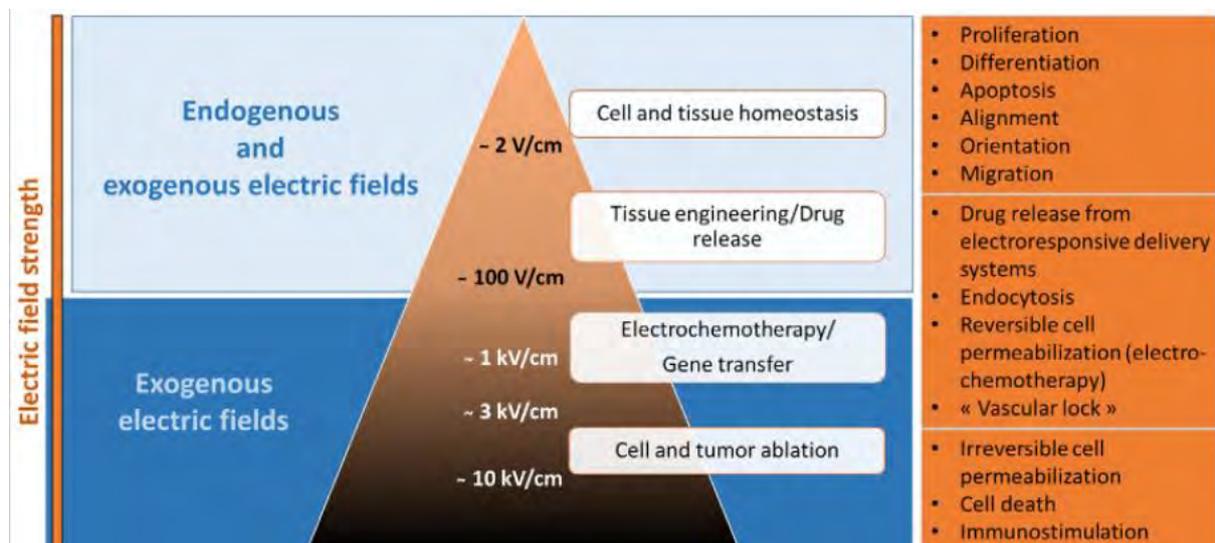


Figure 23 : Schéma récapitulant les divers effets cellulaires et les applications thérapeutiques médiés par les champs électriques. Figure issue de (Kolosnjaj-Tabi *et al.* , 2019).

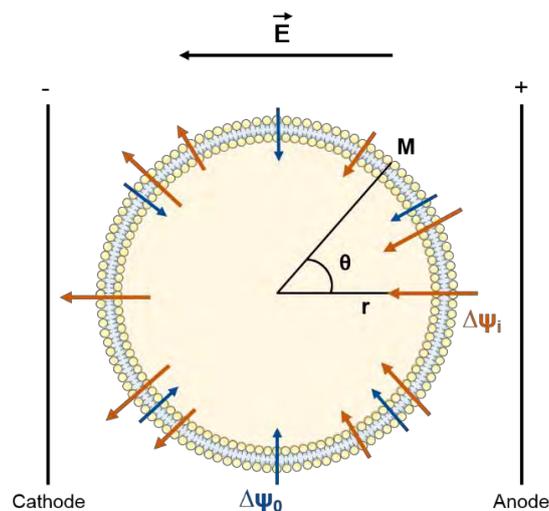
## 1. Effets sur la cellule

### a. Théorie du potentiel transmembranaire induit

La membrane de la cellule présente une perméabilité sélective pour des petites molécules qui vont diffuser à travers cette dernière (Hille, 1978). Cette diffusion est en partie causée par la mise en place de gradients de concentrations ioniques de part et d'autre de la membrane entraînant un potentiel natif transmembranaire nommé  $\Delta\psi_0$ . Lorsque la cellule est soumise au champ électrique, cela engendre une redistribution des charges, ainsi une différence de potentiel transmembranaire est induite (Bernhardt and Pauly, 1973), nommée  $\Delta\psi_i$ . L'équation de Laplace, décrite par Kinosita et Tsong en 1977 (Kinosita and Tsong, 1977), donne l'expression de ce  $\Delta\psi_i$ , dans le cas d'un champ électrique en vague carrée et pour une cellule ronde en suspension; en considérant la cellule comme un volume creux, l'épaisseur de la membrane négligeable par rapport au rayon de la cellule et les milieux interne et externe comme des conducteurs purs :

$$\Delta\psi_i = f. g(\lambda). r. E. \cos \theta (M). (1 - e^{-(t/\tau c)})$$

Où  $f$  le facteur de forme de la cellule,  $g(\lambda)$  le facteur lié aux conductivités de la membrane, du cytoplasme et du milieu extracellulaire (égal à 1 dans le cas où la membrane est considéré comme un diélectrique pur),  $r$  le rayon de la cellule,  $E$  l'intensité du champ électrique appliqué,  $\theta$  l'angle de la direction du champ et la normale au point  $M$  considéré sur la membrane,  $t$  la durée de l'impulsion et  $\tau c$  le temps de charge de la capacité membranaire (de l'ordre de la  $\mu s$ ) (cf. **figure 24** pour visualiser les différentes composantes de l'équation).



**Figure 24 : Principe de l'électroperméabilisation de la cellule.** Représentation de la membrane plasmique cellulaire soumise à un champ électrique, avec visualisation du potentiel membranaire natif  $\Delta\psi_0$ , représenté par des flèches bleues, et le potentiel induit par le champ électrique  $\Delta\psi_i$  représenté par des flèches orange pleines. Figure adaptée de (Teissié and Rols, 1993).

Lorsque la cellule est soumise au champ électrique, le potentiel transmembranaire induit est dirigé de l'anode vers la cathode. Il s'ajoute au potentiel transmembranaire natif ( $\Delta\psi_0$ ), ce qui conduit à une hyperpolarisation de la membrane du côté de l'anode, puisque les valeurs numériques des vecteurs associés au champ (potentiel natif et induit) s'additionnent (Teissié *et al.*, 1999). En revanche, côté cathode les deux potentiels sont en sens inverse, les valeurs se soustraient, on parle de dépolarisation (**Figure 24**). À l'échelle de la cellule unique, la perméabilisation induite par le champ n'est donc pas homogène sur la membrane, la zone faisant face à l'anode se retrouve plus perméabilisée que celle faisant face à la cathode.

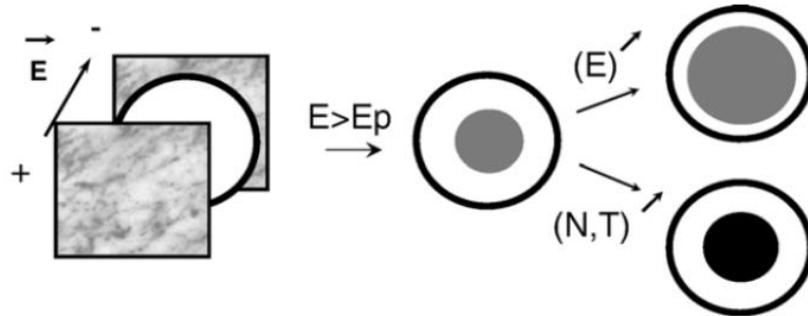
Les différentes étapes impliquées dans la perméabilisation des cellules ont été décrites par le Dr. Teissié et son équipe et sont les suivantes (Teissie *et al.*, 2005):

- **Induction d'un potentiel transmembranaire** plus élevé que le potentiel critique de perméabilisation et création de défauts membranaires (de l'ordre de la  $\mu$ s),
- **Expansion des défauts membranaires**, directement dépendant du temps des impulsions (ms),
- **Stabilisation**, la membrane commence à retourner à son état imperméable (ms),
- **Retour à l'état perméable**, c'est-à-dire retour à une perméabilité sélective de la membrane plasmique (s),
- **Mémoire**, les propriétés des membranes peuvent se retrouver affectées par la perméabilisation transitoire due aux mouvements des lipides pendant plusieurs heures après l'EP.

### **b. Effets des paramètres physiques électriques**

Il a été montré qu'une valeur seuil de différence de potentiel transmembranaire induit ( $\Delta\psi_i + \Delta\psi_0$ ) comprise entre 200 mV et 250mV doit être atteinte pour observer la perméabilisation membranaire. La taille de la cellule soumise aux champs électriques pulsés va moduler également l'EP, plus une cellule est petite plus l'intensité devra être élevée pour atteindre la valeur seuil de perméabilisation (Teissié *et al.*, 1999). Toutefois, l'intensité du champ **E** appliquée apparaît comme le paramètre déterminant pour atteindre cette valeur seuil. Le nombre et la durée des impulsions (respectivement **N** et **T**), ont aussi une influence sur la nature des pores induits. Précisément, la surface de la membrane affectée sera déterminée par **E**, et **N** et **T** détermineront le nombre de défauts membranaires induits (**Figure 25**). La durée des impulsions **T** apparaît cruciale pour conduire à une pénétration efficace de molécules à

l'intérieur de la cellule, tandis que le nombre d'impulsions  $N$  corrèle avec le taux de perméabilisation des cellules (Rols and Teissié, 1998). Il a également été montré que la durée du retour à l'état perméable de la membrane est directement proportionnelle à  $N$ . Il apparait également que la fréquence, c'est-à-dire le temps entre chacune des impulsions, influe sur l'efficacité du transfert de molécules via l'EP (Faurie *et al.*, 2010).



**Figure 25 : Influence des paramètres électriques,  $N$  le nombre d'impulsions,  $T$  la durée de ces impulsions et  $E$  l'intensité du champ, sur la surface membranaire affectée par l'EP.**  $E_p$  représente la valeur seuil pour induire la formation des pores membranaires. La surface de la cellule pour laquelle la valeur seuil est atteinte,  $E > E_p$ , est représentée en gris sur le schéma. Cette surface se voit augmentée avec l'intensité du champ (en haut à droite), tandis que le nombre de défauts membranaires (efficacité de perméabilisation), mais non pas la surface, est augmentée si  $N$  et  $T$  sont augmentés avec un champ d'intensité  $E$  constant (surface noire, en bas à droite). Figure tirée de (Rols, 2006).

La forme ainsi que l'orientation de la cellule par rapport aux lignes de champ affectent aussi l'efficacité de l'EP, ceci est d'autant plus vrai pour les cellules dont la forme est allongée (Valic *et al.*, 2003), la perméabilisation est d'autant plus importante que le rayon apparent de la cellule est grand. Il a été montré que le taux de perméabilisation cellulaire diminue avec l'augmentation du nombre de cellules en suspension, le potentiel transmembranaire induit est affecté par la densité de la suspension (Pavlin *et al.*, 2002, 2007; Pucihar *et al.*, 2007; Susil *et al.*, 1998).

*C'est en variant ces différentes grandeurs que divers phénomènes peuvent être induits, pouvant servir pour diverses applications : soit une sub-perméabilisation membranaire, une perméabilisation dite réversible et enfin une perméabilisation irréversible, toxique pour la cellule, sans retour à un état de perméabilité sélective.*

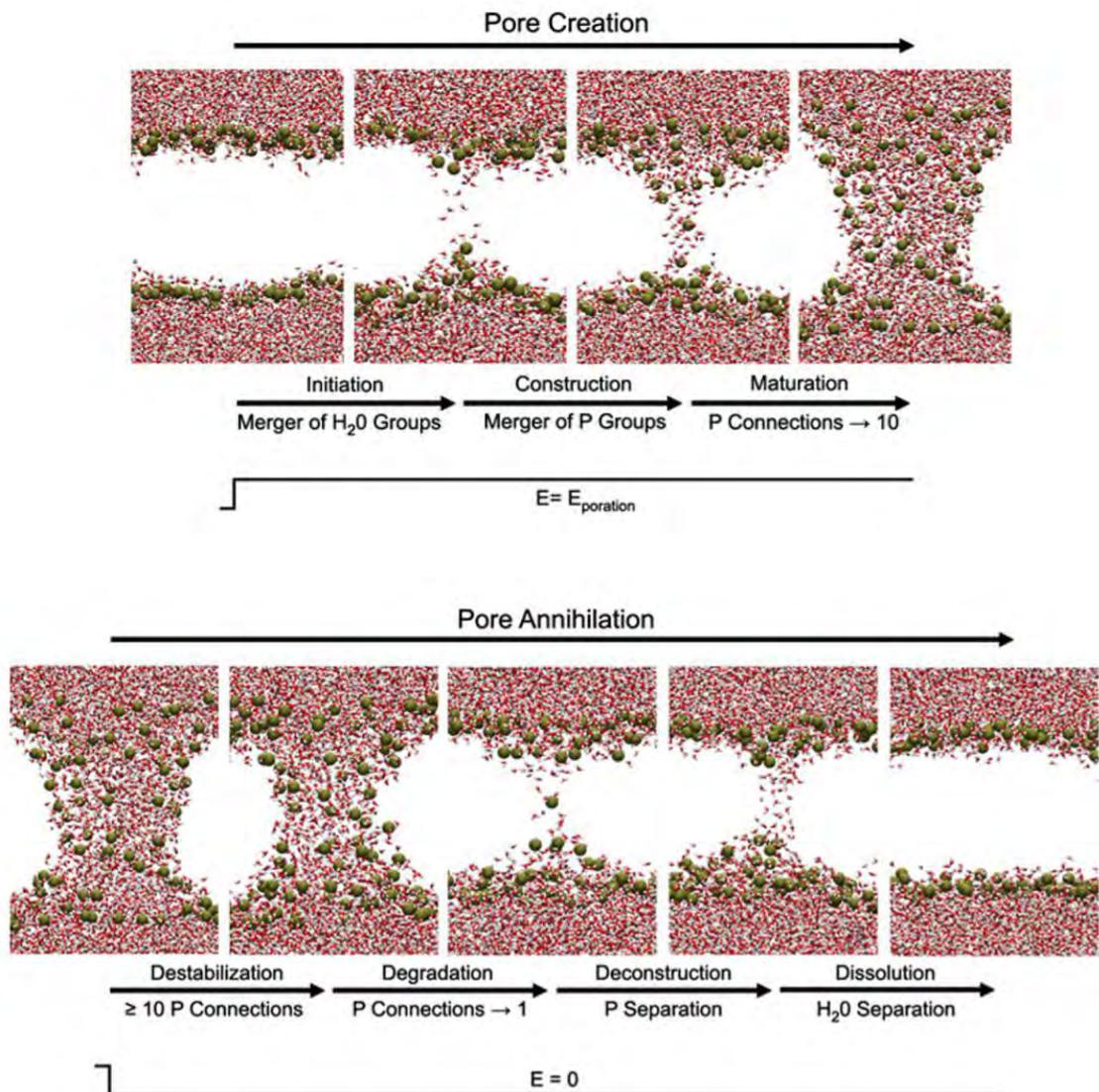
### c. Effets sur les lipides membranaires

Il a été montré que l'état de perméabilité non sélective engendré par l'EP peut persister pendant plusieurs minutes après l'application du champ (Neumann *et al.*, 1998; Rols and Teissié, 1998; Shirakashi *et al.*, 2004). Une membrane biologique est composée de différents

types de lipides (principalement des phospholipides), auto-assemblés, formant ainsi une matrice pour les protéines qui contrôlent le transport des ions et de molécules à l'intérieur de la cellule. Le principe de l'EP repose également sur les propriétés mécaniques de la membrane cellulaire, en effet si une membrane ne peut ni se compresser ni se déformer elle doit développer d'autres mécanismes pour minimiser le stress électrique engendré. Un moyen est donc de devenir perméable, les défauts membranaires créés diminuent l'aire de la membrane, par ce fait la conductivité de cette dernière est augmentée (Escoffre *et al.* , 2007).

Il est important de noter que la valeur seuil d'EP  $\Delta\psi_i + \Delta\psi_0$  qui doit être atteinte pour observer la perméabilisation membranaire dépend de la composition de la bicouche lipidique. En effet, l'ajout de copolymère anionique, augmente le seuil d'EP facilitant ainsi la perméabilité membranaire, une propriété qui est bénéfique pour minimiser les lésions dues au champ électrique (Schmolka, 1994). En revanche, la présence de surfactants non-ioniques dans la membrane abaisse cette valeur seuil. Les différentes étapes impliquées dans la formation des pores membranaires ont été décrites via des simulations dynamiques moléculaires en incrémentant différents types de bicouche lipidique (Levine and Vernier, 2010; Tarek, 2005; Tieleman, 2004). Des résultats obtenus sur des membranes de phosphatidylcholines principalement (1,2-Dioleoyl-sn-Glycero-3-Phosphocholine (DOPC) ou 1-palmitoyl-2-oleoyl-sn-glycero-3-phosphocholine, (POPC)), se rapprochant de celle observées dans les cellules, suggèrent que des gradients de champs électriques se mettent en place à l'interface entre les molécules d'eau et les lipides. En effet, la membrane cellulaire se comporte comme un diélectrique de permittivité relative proche de celle des lipides, les interfaces eau-lipide jouent alors le rôle de régions de transition diélectrique (Teissie, 2007). Les molécules d'eau sont très organisées au niveau de ces interfaces, ce qui les rend très sensible aux variations de potentiel transmembranaire. Le déplacement de ces molécules d'eau sous l'influence du champ électrique dans ces gradients induit alors un flux d'eau à travers la membrane lipidique. Ce sont ces déplacements d'eau qui vont alors générer une augmentation locale du champ électrique et des mouvements des têtes phospholipidiques. Une déformation ou courbure de la membrane s'en suit. Les pores formés sont hydrophiliques, c'est-à-dire que les têtes polaires des lipides s'orientent de façon à faire face aux flux de molécules d'eau et à stabiliser les pores (**Figure 26, « pore creation »**). Le champ électrique induit des tensions de surface au niveau de la membrane lipidique de l'ordre de  $1 \text{ mN}\cdot\text{m}^{-1}$  (Tarek, 2005). Aussitôt que le champ n'est plus appliqué, le retour à l'état perméable va avoir lieu, il se fait également en multi-étapes et suit le même cheminement que pour la création du pore mais en sens inverse (**Figure 26, « pore**

**annihilation** »). À noter que la durée du retour à l'état initial est dépendante de la température (Teissie *et al.*, 2005) : à 37 °C, température physiologique, cette étape est plus rapide qu'à température ambiante. À l'inverse, à 4°C la membrane reste perméable.



**Figure 26 : Le cycle de vie d'un électropore membranaire.** Cette simulation moléculaire est obtenue sur une bicouche de lipides POPC. Le cycle se divise en deux grandes étapes : la formation du pore puis le retour à l'état initial. Ici, dans un souci de clarté, uniquement les molécules d'eau ( $H_2O$ , rouge et blanc) et les têtes polaires des lipides (P, vert) sont représentées. La création du pore est induite par des défauts de la répartition des molécules d'eau à l'interface eau-lipide (initiation) ; les têtes polaires se réorganisent ensuite autour de ces défauts (construction). Le mouvement des molécules d'eau et des têtes polaires s'en suit jusqu'à stabilisation du pore (maturation). Dès lors que le champ électrique n'est plus appliqué, le retour à l'état initial se met en place en passant par les mêmes étapes en sens inverse (annihilation). Figure tirée de (Levine and Vernier, 2010).

Des études plus récentes ont également démontré que la peroxydation lipidique, caractérisée par la formation de groupe hydroperoxyde dans la queue hydrophobe des lipides, engendrée par l'application du champ électrique tient un rôle important dans la formation et la stabilisation des pores membranaires (Rems *et al.*, 2019). La présence de ce type de lipides dans la bicouche

membranaire à de nombreuses répercussions sur les propriétés biophysiques de cette dernière, dont notamment l'augmentation de la mobilité des lipides (flip-flop) (Escoffre *et al.* , 2014) et un changement dans l'hydratation provoquant la formation de défauts d'hydratation (Jurkiewicz *et al.* , 2012; Wong-ekkabut *et al.* , 2007). Basé sur des résultats expérimentaux et de simulation dynamique, l'augmentation de la proportion de ces lipides peroxydés dans la membrane induit une augmentation de la conductivité (Ivorra *et al.* , 2009) et de la perméabilité membranaire (Vernier *et al.* , 2009). Breton et Mir ont également montré, sur des vésicules unilamellaires géantes, que le taux de peroxydation des phospholipides induit par l'application des champs électriques pulsés est directement proportionnel à la durée des impulsions, et que cette peroxydation est permise via le contact direct avec la membrane de ROS endogènes (Breton and Mir, 2018).

#### **d. Effets sur l'architecture de la cellule**

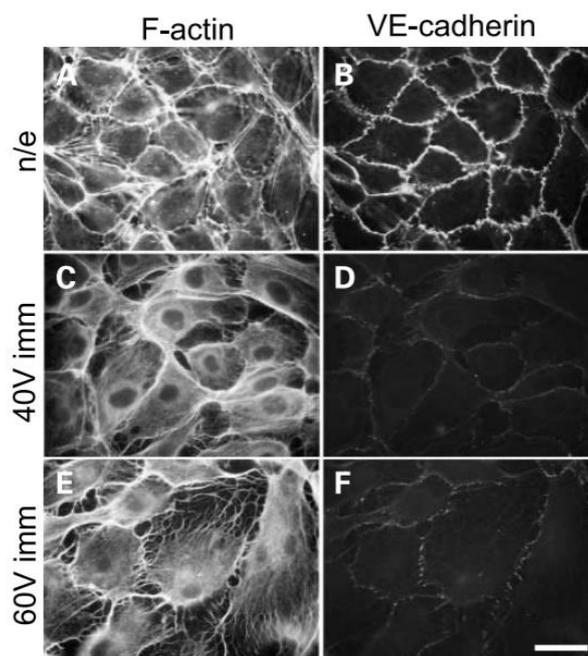
Outre les phénomènes de modifications transitoires des propriétés membranaires des cellules au niveau des lipides, l'EP peut également induire des modifications au niveau des protéines impliquées dans les jonctions cellulaires, ainsi que les protéines du cytosquelette. Ces effets sur la cellule sont impliqués lors du transfert de macromolécules et peuvent s'avérer bénéfiques pour les thérapies basées sur l'EP.

##### *i. Réorganisation des cytosquelettes et des jonctions cellulaires*

Les modifications du cytosquelette des cellules induites par l'EP ont été mise en évidence pour la première fois en 1989 sur des cellules d'ovaire de hamster de chine (CHO) en monocouche (Blangero *et al.* , 1989). Les auteurs ont montré que des impulsions de l'ordre de la microseconde ( $\mu$ sPEF, pour  $\mu$ s « pulsed electric fields ») induisent une disparition des microtubules dans la minute suivant l'EP, sans affecter les microfilaments d'actine. Ils ont proposé que cette réorganisation des microtubules facilite la fusion cellulaire induite par l'EP (**figure 27**). Rols et Teissié ont ensuite montré que le cytosquelette d'actine est impliqué dans la stabilisation des pores membranaires (Rols and Teissié, 1992). Ainsi, l'efficacité de l'électroperméabilisation est directement dépendante du cytosquelette d'actine.

Une autre étude a montré que des impulsions de l'ordre de la nanoseconde (nsPEF) induisent une dépolymérisation et une réorganisation des structures d'actines (microfilaments) sur des cellules CHO, se traduisant à long terme par le gonflement des cellules (Pakhomov *et al.* ,

2014). Une diminution de l'élasticité membranaire est provoquée par ces altérations du cytosquelette d'actine (Dutta *et al.* , 2015). Des observations similaires d'altérations des microfilaments d'actine (**Figure 27. A, C et E**) et des microtubules ont été observées après l'application de  $\mu$ sPEF et corrélées à une diminution de la phosphorylation des chaînes de myosine (Kanthou *et al.* , 2006). La contractilité cellulaire est finement régulée via les interactions myosine-actine dont la mise en place est dépendante de la polymérisation de l'actine et de la phosphorylation des chaînes de myosine (Kohama *et al.* , 1996). En plus d'avoir démontré les effets sur les microfilaments d'actine, Kanthou et ses collaborateurs ont également investi l'effet des  $\mu$ sPEF sur la protéine impliquée dans les jonctions cellulaires, la cadhérine. Ils ont montré qu'il y avait une perte de ces jonctions directement après application des PEF (**Figure 27. B, D et F**) (Kanthou *et al.* , 2006).



**Figure 27 : Altérations du cytosquelette d'actine et de la protéine impliquées dans les jonctions des cellules endothéliales VE-cadherin après application de champs électriques pulsés.** Immunofluorescences de l'actine filamenteuse et de la protéine VE-cadhérine de cellules en monocouches non traitées (n/e, A et B) et traités avec des  $\mu$ sPEF (C-F) (directement après l'EP). Barre d'échelle : 40  $\mu$ m. Figure de (Kanthou *et al.* , 2006).

*ii. Macropinocytose et endocytose induites lors du transfert des macromolécules (ADN plasmidique)*

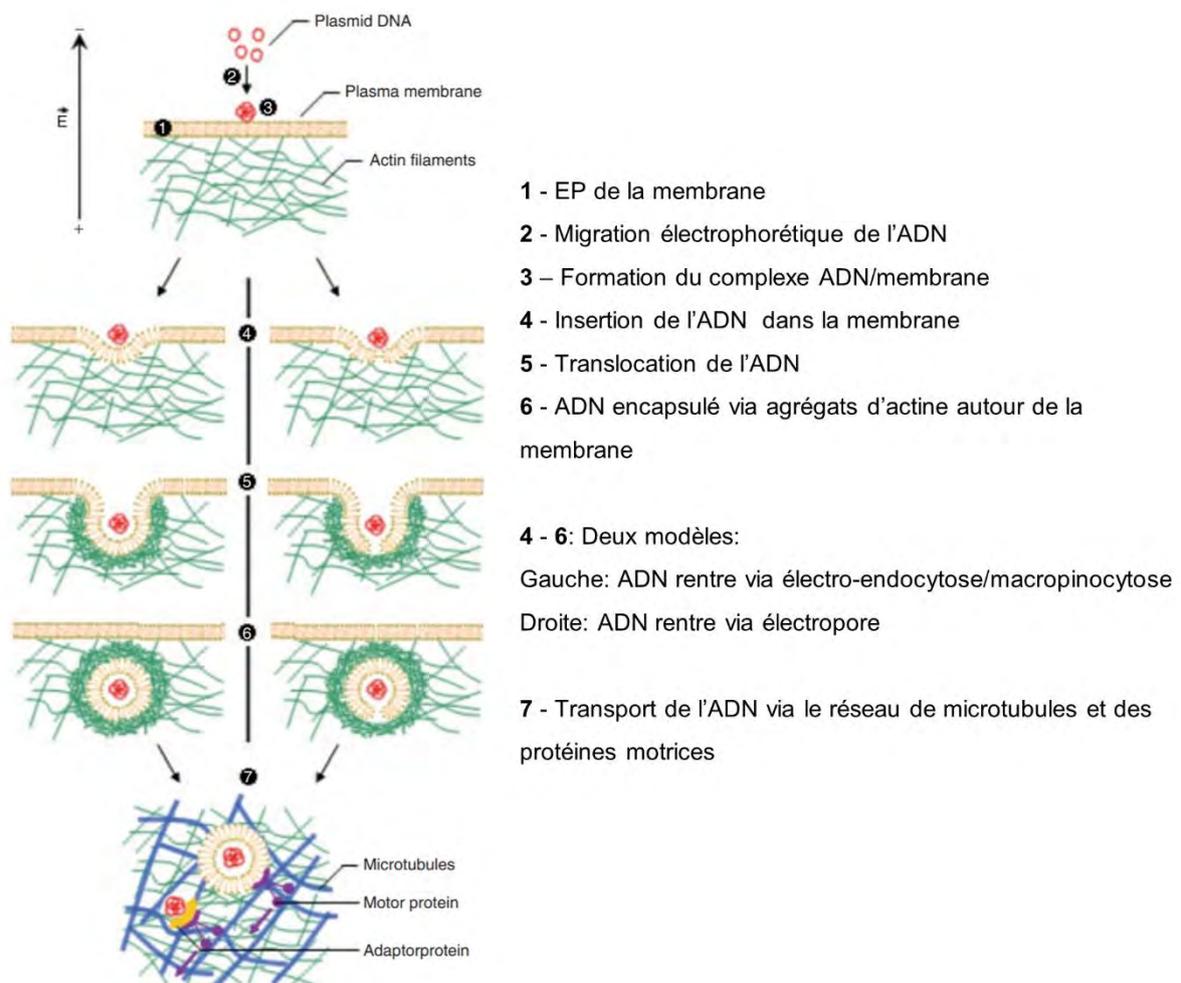
Il existe différents types de profil de champs électriques pulsés qui ne conduisent pas aux mêmes phénomènes physiques et ainsi sont utilisés pour différentes applications. Des impulsions électriques courtes (de l'ordre de la  $\mu$ s) de forte intensité (kV/cm) sont utilisées pour transférer des molécules de petite taille à l'intérieur de la cellule (Rols, 2006). Dans ce cas, le

mécanisme est décrit par une simple diffusion à travers la membrane électroperméabilisée. En revanche, pour permettre le transport de molécules plus grosses, comme des molécules d'ADN, d'ARN ou des oligonucléotides, des impulsions de l'ordre de plusieurs millisecondes sont requises, qui induisent des forces électrophorétiques pour les molécules chargées (Golzio *et al.* , 2002; Rols, 2006).

Le transfert des macromolécules médié par l'EP met en jeu différents mécanismes. Il a été montré en 1995 que l'électrotransfert de la  $\beta$ -galactosidase (protéine) est un phénomène passif de diffusion pendant l'application du champ, puis plusieurs minutes après application du champ, le transfert se déroule grâce au processus de macropinocytose (Rols *et al.* , 1995). Ce processus semble également impliqué dans le transfert d'ADN puisque l'inhibition de l'endocytose par des drogues *in vitro* et *in vivo* réduit l'efficacité de transfert de gène (Markelc *et al.* , 2015). De plus, il a été montré *in vitro* que environ 50% du transfert d'ADN passe par de l'endocytose médié par la cavéoline, 25% par endocytose médié par la clathrine et enfin 25 % par macropinocytose (Rosazza *et al.* , 2016). L'électrotransfert de gène est donc directement dépendant de ces phénomènes cellulaires (réarrangement du cytosquelette et macropinocytose/endocytose induite).

Des études effectuées *in vitro* sur cellules en suspension ou adhérentes ont montré que le transfert de plasmide est un mécanisme en multi étapes qui requiert des séquences d'impulsions bien spécifiques, de par leur grande taille et leur nature hydrophile. Une méthodologie particulière en deux étapes permet de décrire l'entrée de ces molécules. Une première étape utilisant des impulsions électriques courtes (de l'ordre de la  $\mu$ s) et intenses (1000 V/cm) induit la perméabilisation membranaire (Bureau *et al.* , 2000; Mir *et al.* , 1999; Sukharev *et al.* , 1992). S'en suit l'application d'impulsions plus longues (ms) et peu intenses (100V/cm) favorisant l'interaction entre l'ADN et la membrane via la migration électrophorétique. La formation d'un complexe ADN/membrane (Golzio *et al.* , 2002) est suivie de la translocation de l'ADN à l'intérieur de la cellule (de l'ordre de plusieurs minutes). Cette translocation est requise pour le transport jusqu'au noyau via le cytosquelette (jusqu'à 24 heures post EP) (Rosazza *et al.* , 2016) et *in fine* l'expression du gène. L'efficacité du transfert est donc directement dépendante de la stabilité et de la durée de vie du complexe ADN/membrane formé avant sa prise en charge par le cytosquelette (Faurie *et al.* , 2010). La durée de vie de ce complexe peut être affectée en changeant la polarité du champ et en augmentant la fréquence de répétition des impulsions électriques (Faurie *et al.* , 2010). Ce complexe ADN/membrane s'accumule au niveau de la membrane après application des PEF, et co-localise avec des agrégats d'actine (Rosazza *et al.*

, 2011). Une disruption des microfilaments via l'action de drogues (Latranculine B) réduit l'accumulation des molécules d'ADN au niveau de la membrane et *in fine* l'expression du gène. Plusieurs mécanismes ont été proposés concernant l'insertion et la translocation du complexe ADN/membrane. La molécule d'ADN pourrait appliquer une pression sur la membrane induisant la formation d'une vésicule d'endocytose (Antov *et al.*, 2005) ou de macropinocytose (décrit précédemment). Un autre mécanisme reposerait sur l'insertion de la molécule d'ADN dans un électropore qui induirait ensuite la formation d'une « vésicule » lipidique. Il a également été proposé que l'ADN se retrouve « nu » dans le cytoplasme, sa translocation serait ici uniquement médiée par l'interaction avec des protéines cytoplasmiques (Vaughan and Dean, 2006). La **figure 28** montre les mécanismes cellulaires induit par l'EP impliqués dans le transfert de gène décrit ci-dessus.



**Figure 28 : Transfert multi-étapes de plasmide d'ADN médié par l'EP.** Figure adaptée (Rosazza *et al.*, 2011).

## 2. Effets sur un tissu en trois dimensions : sphéroïdes et tumeurs

### **a. Électroperméabilisation en 3D**

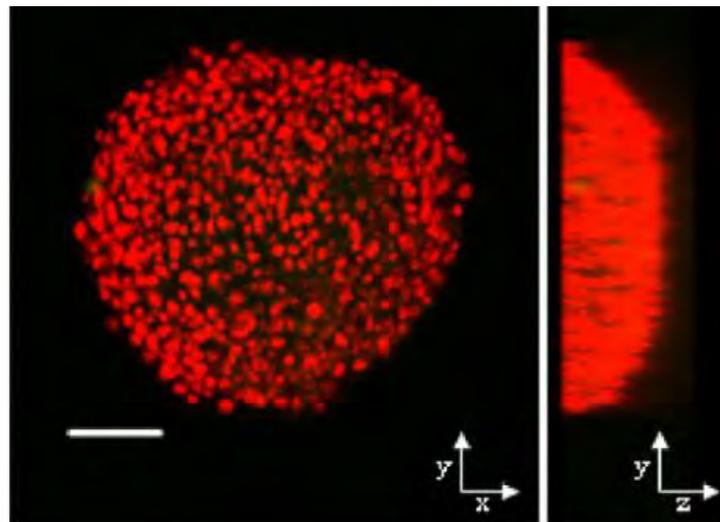
Bien que le modèle à l'échelle de la cellule unique ait permis de décrire les mécanismes fondamentaux régissant l'EP et le transfert de molécules, ce modèle reste limité pour la prédiction de la réponse d'un tissu. La situation est plus complexe dans les tissus qui sont composés de multiples cellules, en contact les unes avec les autres, et qui présentent une hétérogénéité dans leur composition incluant divers types cellulaires aux conductivités différentes, de la matrice extracellulaire de différentes natures, ainsi qu'un réseau vasculaire. Tous ces facteurs ont une influence sur la densité de courant et la distribution du champ électrique.

L'efficacité de l'EP d'un tissu repose essentiellement sur la distribution du champ électrique au sein du tissu, dépendante de la géométrie des électrodes utilisée et des propriétés électriques du tissu (Miklavcic *et al.* , 1998). Un des problèmes majeurs rencontrés est la distribution inhomogène du courant et du champ électrique dû à l'anisotropie du tissu. Des modèles numériques en 3D ont été développés pour prédire la distribution du champ électrique dans les tumeurs (Corovic *et al.* , 2013; Pavselj *et al.* , 2005; Šemrov and Miklavcic, 2000). Les valeurs de conductivité spécifique des tissus ainsi que les valeurs de champ électrique seuil, déterminées expérimentalement, sont introduites dans ces modèles. Les données expérimentales obtenues et les données des simulations étaient en accord. Ainsi, afin de prédire au mieux la réponse du tissu et l'influence des grandeurs physiques sur l'efficacité de l'EP, ces simulations numériques peuvent être réalisées et constitue un bon outil de prédiction.

Les études d'EP sur des sphéroïdes de cellules cancéreuses ont montré que toutes les cellules du sphéroïde, même celles présentes au centre, sont efficacement perméabilisées sous l'application d'un champ électrique pulsé (Wasungu *et al.* , 2009) (**Figure 29**). Ceci est toutefois dépendant des lignées cellulaires utilisées puisque chaque type cellulaire présente des formes différentes et ne s'organisent pas de manière similaire en trois dimensions. Ainsi les paramètres électriques ne seront sensiblement pas les mêmes d'un type cellulaire à un autre pour obtenir une EP efficace. De plus, la sensibilité vis-à-vis des champs électriques pulsés est également dépendante de la taille des sphéroïdes (Gibot and Rols, 2013a). La croissance des sphéroïdes à un stade assez précoce (300  $\mu\text{m}$  de diamètre) se voit plus affectée par les champs électriques pulsés que pour des sphéroïdes de taille plus avancée (650  $\mu\text{m}$ ). Ceci a été expliqué par Canatella et ses collaborateurs (Canatella *et al.* , 2004), qui ont étudié la répartition du

champ électrique au sein de sphéroïde et ont montré que cette dernière était hétérogène dû, entre autres, à l'influence des cellules voisines qui induisent des propriétés électriques différentes au sein du microtissu. Ceci est associé avec un électrotransfert des hétérogène au sein du sphéroïde. L'électrotransfert se limite uniquement aux cellules en périphérie du sphéroïde (Gibot and Rols, 2013b; Wasungu *et al.* , 2009).

Il a également été montré que les jonctions cellule-cellule ont une influence sur la réponse à l'EP puisque deux cellules en contact se comportent comme une seule grande cellule (Fear and Stuchly, 1998; King, 2001).



**Figure 29 : Visualisation des cellules perméabilisées au sein d'un sphéroïde de cellules de fibrosarcome murin (LPB).** L'iodure de propidium est utilisé pour marquer et visualiser les cellules perméabilisées (rouge). Les images de fluorescence représentent une projection 3D de 15 sections optiques (140  $\mu\text{m}$  de profondeur). L'image de gauche représente la projection sur l'axe X-Y, et l'image de droite représente la projection sur l'axe Z. Echelle : 200  $\mu\text{m}$ . Figure adaptée de (Wasungu *et al.* , 2009) .

## **b. Microenvironnement tumoral**

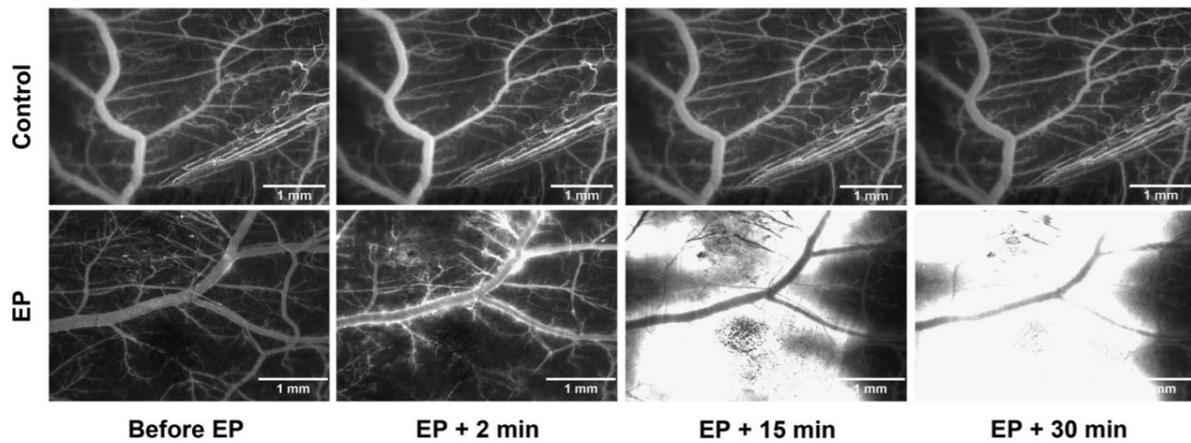
La matrice extracellulaire (MEC) tumorale représente une barrière physiologique pour l'administration de petites molécules anti-cancéreuses ou de plus grosses molécules tel que des anticorps (Grantab *et al.* , 2006; Tannock *et al.* , 2002). Plus particulièrement dans le cas des immunothérapies ou thérapies géniques pour lesquelles le poids moléculaire des molécules à délivrer à la tumeur est élevé.

De la même façon, il a été montré que les propriétés histologiques des tumeurs (MEC, densité cellulaire et organisation des cellules) modulent l'efficacité de l'électrotransfert de gène. Mesojednik et ses collaborateurs ont montré que les tumeurs (dites molles) composées de larges cellules rondes, et dont la MEC contient peu de protéoglycanes et de collagènes sont plus

efficacement transfectées que des tumeurs plus rigides au contenu cellulaire dense (petites cellules plus allongées), riche en protéoglycanes et collagène (Mesojednik *et al.* , 2007). Zaharoff et al ont corrélié l'électromobilité de l'ADN plasmidique dans différents types de tumeurs avec le contenu en collagène : le plasmide était 4 fois plus mobile pour le mélanome B16 F10 que pour le sarcome 4T1 contenant huit fois plus de collagène (Zaharoff *et al.* , 2002). Ainsi, une bonne connaissance des propriétés histologiques des tumeurs est donc requise pour planifier au mieux la transfection de molécules médiées par l'EP.

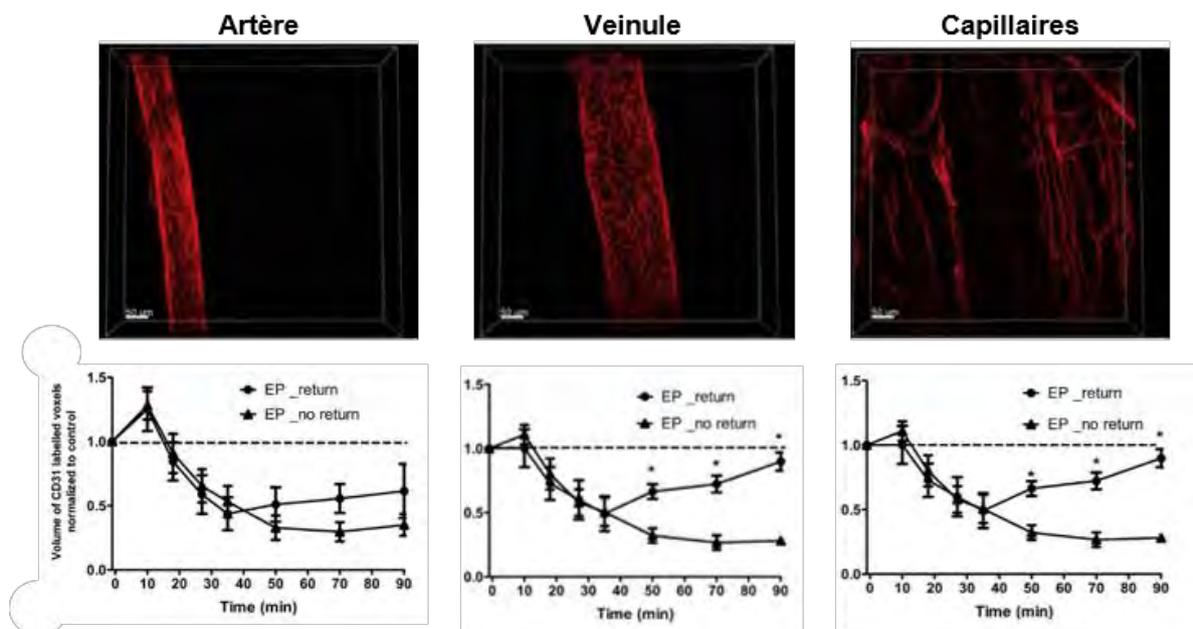
### c. Perméabilité des vaisseaux sanguins

Les effets des champs électriques sur les vaisseaux sanguins ont été mis en évidence chez la souris, dans la tumeur et dans la patte (Gehl *et al.* , 2002; Serša *et al.* , 1998). Le modèle de la chambre dorsale combiné à la microscopie intravitale pour l'observation du système vasculaire *in vivo* (Baron *et al.* ; Palmer *et al.* , 2011) a permis une meilleure compréhension de l'effet de l'EP sur les vaisseaux. Une réduction du diamètre des vaisseaux sanguins, c'est-à-dire un phénomène de vasoconstriction, est notable dans les secondes suivant l'application du champ et qui perdure pendant quelques minutes (~8 minutes après l'EP) (Markelc *et al.* , 2018). Ceci provoque alors une diminution de l'écoulement sanguin aussi appelée le « vascular lock » (Sersa *et al.* , 2008). Une augmentation de la perméabilité des vaisseaux est également engendrée par l'EP, ceci a été mis en évidence en suivant le devenir de molécules fluorescentes (dextran couplé au FITC, 70 kDa) dans les vaisseaux (Bellard *et al.* , 2012; Corovic *et al.* , 2015). Une fuite de ces molécules est observable dans les minutes suivant l'EP (**Figure 30**). Ce phénomène est réversible mais peut tout de même durer jusqu'à une heure après l'application du champ. La restauration du flux sanguin se fait plus lentement pour les vaisseaux sanguins tumoraux que pour les vaisseaux normaux (Gehl *et al.* , 2002).



**Figure 30 : Suivi après EP du flux de molécules fluorescentes injectées en intra-veineux dans les vaisseaux sanguins.** Barre d'échelle : 1 mm. Figure issue (Bellard *et al.* , 2012).

La modification de la perméabilité des vaisseaux sanguins induites par l'EP est directement contrôlée par des changements dans la contractilité cellulaire et les jonctions cellule-cellule. En effet, une étude *in vivo* a montré que la vasoconstriction des vaisseaux après l'application du champ électrique est corrélée avec un changement dans la forme des cellules endothéliales des vaisseaux (Markelc *et al.* , 2018). De même l'augmentation de perméabilité des vaisseaux qui s'en suit s'accompagne d'une disruption des protéines PECAM-1 ou CD31 impliquées dans les jonctions des cellules endothéliales. Un retour à l'état initial du marquage de CD31 a été observé dans 50% des cas, et requiert 90 minutes après le traitement (**Figure 31**). De plus, la restauration de la perméabilité fait intervenir les plaquettes aux endroits les plus perméabilisés.



**Figure 31 : Changement induit par l'EP sur les jonctions cellulaires CD31 dans les différents types de vaisseaux.** CD31 est marqué en rouge ici. Le volume de CD31 a été mesuré pendant les 90 minutes suivant le

traitement. Les volumes obtenus sont normalisés avec le contrôle (ligne pointillé). Le groupe « EP\_return » représente les souris pour lesquels une restauration du marquage de CD31 s'est mise en place à partir de 30 minutes et jusqu'à 90 minutes (restauration complète pour les veinules et les capillaires). Le groupe « EP\_no return » représente les souris qui n'ont pas eu de restauration (50% des cas). Barre d'échelle : 50µm. Moyenne ± SEM. P<0.05. Figure adaptée de (Bellard *et al.* , 2012).

*La perméabilisation, réversible ou irréversible, des membranes ; les effets sur la cellule et sur les tissus médiés par l'application des champs électriques pulsés que nous venons de décrire sont des phénomènes qui ont été exploités pour le développement de thérapies basées sur l'EP. Ces stratégies thérapeutiques comprenant l'électrochimiothérapie, l'électrogénothérapie et l'ablation tumorale seront décrites dans la section suivante.*

### 3. Thérapies basées sur l'électroporation

#### a. Délivrance de molécules thérapeutiques

De par son efficacité à transférer des molécules via les pores membranaires sans affecter la viabilité cellulaire, l'EP a été utilisée dès les années 80 en laboratoire pour la transformation des bactéries et la transfection de cellules (Dower *et al.* , 1988; Taketo, 1988). Parallèlement, l'EP réversible est intéressante afin de potentialiser ou de permettre l'entrée de molécules d'intérêt thérapeutique. Les différentes applications thérapeutiques les plus connues sont l'électrochimiothérapie et l'électrogénothérapie.

##### *i. L'électrochimiothérapie : de la paillasse à la clinique*

La membrane de la cellule, du fait de sa nature amphiphile, est très peu perméable vis-à-vis de molécules hydrophiles. De nombreuses molécules hydrophiles telles que la bléomycine et le cisplatine ont montré une très bonne efficacité contre les cellules cancéreuses *in vitro* mais elles ne diffusent pas ou très difficilement à travers la membrane plasmique (Pron *et al.* , 1994, 1999). Les défauts d'hydratation et la réorganisation des molécules d'eau provoqués par l'EP (**cf. section 1.c**) augmentent le coefficient de perméabilité de ces molécules hydrophiles permettant ainsi leur transfert à l'intérieur de la cellule.

La délivrance d'agents chimiothérapeutiques via l'utilisation de l'EP *in vitro* sur des cellules en suspension puis sur des modèles plus complexes tel que le sphéroïde a permis d'élucider les mécanismes qui régissent le transfert de ces molécules. L'EP induit une accumulation des molécules dans les cellules et ainsi augmente leur cytotoxicité, jusqu'à 1000 fois supérieure pour la bléomycine et 80 fois supérieure pour la cisplatine, par rapport à l'administration sans

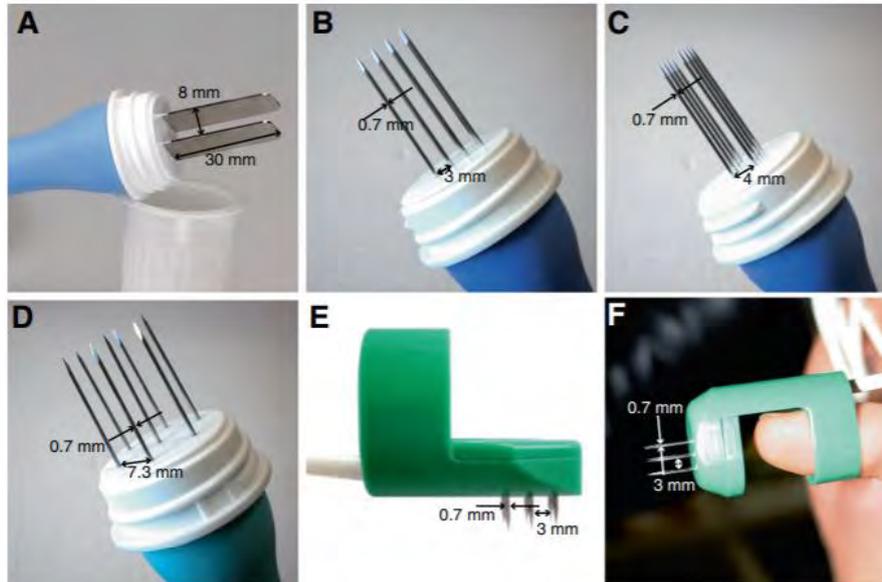
EP (Gehl *et al.* , 1998; Jaroszeski *et al.* , 2000; Orłowski *et al.* , 1988). Ainsi, de plus faibles doses d'agents anti-cancéreux peuvent être administrés et de façon systémique (Mir, 2006).

C'est en 1991 que la première étude *in vivo* a été réalisée, elle a montré l'efficacité de l'ECT pour éradiquer des tumeurs sous cutanées chez la souris (Mir *et al.* , 1991). Un seul traitement est suffisant pour observer une régression complète de la tumeur chez la souris. Une différence de réponse tumorale entre les souris immunocompétentes et les souris immunodéficientes a été observée (Sersa *et al.* , 1997). Le relargage de signaux de dangers (DAMP, Damage Associated Molecular Pattern) associés à une mort immunogénique ont également été mis en évidence *in vitro* (Calvet *et al.* , 2014). *In vivo*, l'ECT induit une réponse immunitaire systémique (Tremble *et al.* , 2019), par conséquent le traitement peut avoir un effet abscopal : des tumeurs situées à distance du site traité peuvent également régresser.

Les investigations *in vivo* chez la souris ont montré que différentes variables sont à prendre en compte dans le protocole d'ECT :

- Les molécules chimiothérapeutiques peuvent être administrées de deux façon différentes, en intraveineuse ou directement dans la tumeur. Un point primordial est qu'au moment d'appliquer l'EP une quantité suffisante d'agents doit être présente à l'intérieur de la tumeur. Seulement quelques minutes sont nécessaires dans le cas de l'administration intraveineuse, cet intervalle de temps est d'autant plus court si la molécule est directement injectée dans la tumeur (Gehl, 2003);
- Afin de potentialiser la toxicité de l'agent chimiothérapeutique, une EP efficace des cellules de la tumeur est un prérequis. Ainsi, la distribution du champ électrique dans le tissu tumoral, dont nous avons parlé dans la **section 2.a**, doit être bien maîtrisée. Elle est directement dépendante de l'intensité du champ appliqué (Miklavcic *et al.* , 2006), de la géométrie des électrodes (Čorović *et al.* , 2008) et de la composition du tissu (Čorović *et al.* , 2007; Miklavcic *et al.* , 1998). Il est donc préconisé d'effectuer une rotation du champ en bougeant les électrodes de 90° et de choisir les électrodes les plus adaptées (plane pour les tumeurs en surface, et aiguille pour les tumeurs profondes, **Figure 32**) ;
- Comme introduit dans la **section 1.b** de cette partie, l'efficacité de l'ECT repose sur les paramètres du champ électrique tels que le nombre, la fréquence et la durée des impulsions appliquées. Dans le cas du traitement de tumeurs en surface avec des électrodes parallèles planes, une intensité comprise entre 1000 et 1300 V/cm est nécessaire pour avoir une perméabilisation efficace (Byrne and Thompson, 2006). En revanche, pour le traitement de tumeurs profondes ces paramètres doivent être

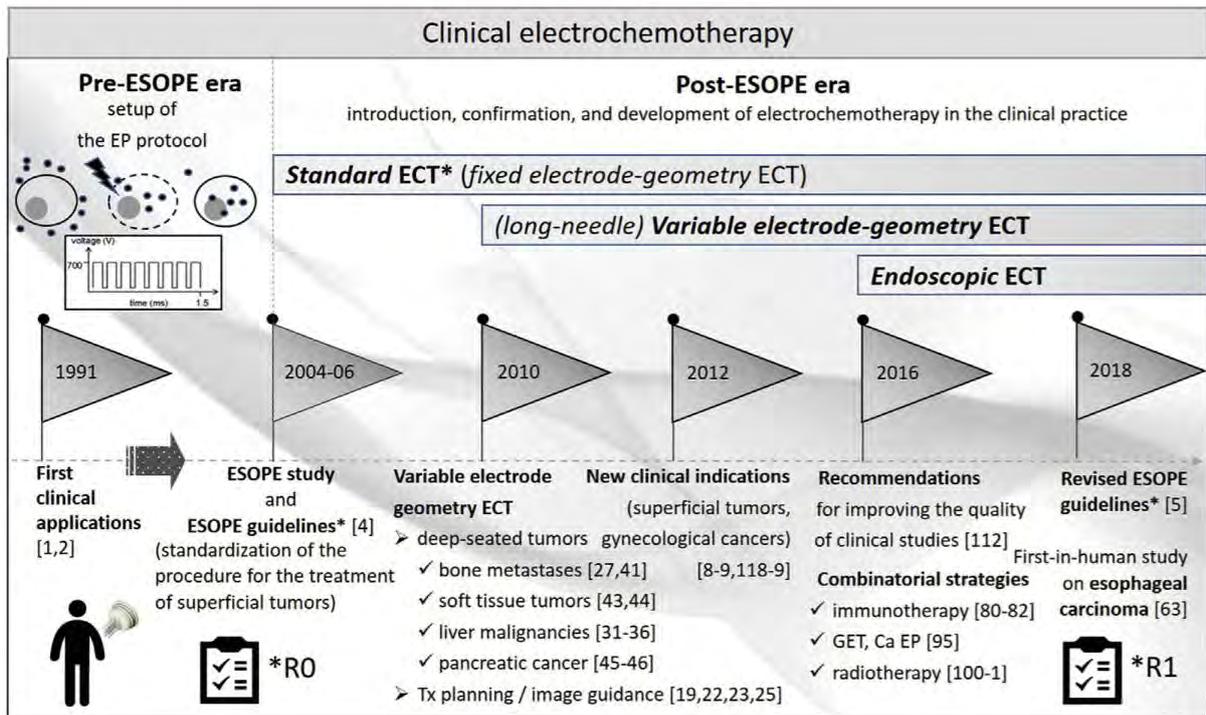
déterminées en amont via des calculs et simulations prenant en compte les caractéristiques physiques de la tumeur.



**Figure 32 : Les différentes géométries d'électrodes utilisées en clinique pour l'ECT. (A) Planches et parallèles (B) Aiguilles linéaires (C) Aiguilles linéaires, vue profil (D) Aiguilles hexagonales (E) A doigt avec aiguilles perpendiculaires (F) A doigt avec aiguilles axiales. Figure issue de (Miklavčič *et al.* , 2014).**

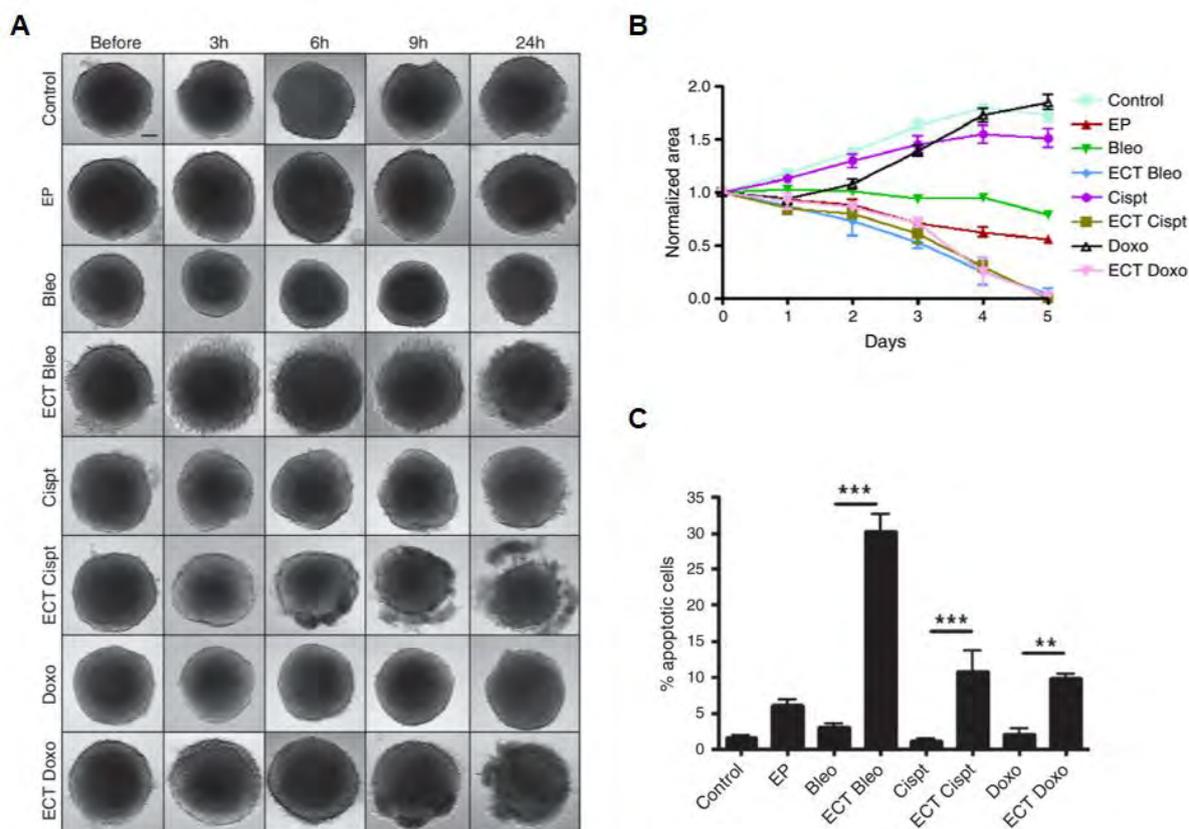
Basé sur ces preuves de concept *in vitro* et *in vivo*, l'ECT a pu être transposée en clinique humaine (Mir *et al.* , 1997; Rols *et al.* , 2002) mais aussi vétérinaire (Tamzali *et al.* , 2012). La standardisation des paramètres électriques pour une application clinique humaine a permis d'introduire l'ECT dans plusieurs pays européens (130 centres hospitalier et cliniques), on parle de procédures opératoire normalisées (Standard Operating Procedure, SOP) (Mir *et al.* , 2006). Les majeures avancées qui ont permis l'utilisation de l'ECT en clinique sont résumées en **Figure 33**.

Deux études majeures prospectives multi-institutionnelles ont été publiées en 2006 (Marty *et al.* , 2006) et en 2016 (Campana *et al.* , 2016), évaluant la réponse à l'ECT selon le type de tumeurs, l'agent chimiothérapeutique administré, son mode d'administration, et le type d'électrodes. Un taux de réponse tumorale de 85 et 88% a été observé pour chacune des études (avec une réponse complète de 73,7 et 50%, respectivement). Très peu d'effets secondaires ont été observés incluant la contraction des muscles et quelques sensations de douleur.



**Figure 33 : Chronologie des majeures avancées pour l’application en clinique de l’ECT.** Abréviations : EP, electroporation ; ESOPE : European Standard Operating Procedures of ECT; GET, gene electro transfer; Tx, treatment. Figure issue de (Campana *et al.* , 2019).

Sur sphéroïde de cellules de cancer colorectal humain, la toxicité de la bléomycine, du cisplatine et de la doxorubicine (agent anti-cancéreux qui diffuse facilement à travers la membrane) est aussi augmentée grâce à l’application de l’EP, induisant une dissociation spontanée des cellules des sphéroïdes (**Figure 34.A**) ainsi qu’une diminution de la taille de ces derniers (**Figure 34.B**) (Gibot *et al.* , 2013; Sauer *et al.* , 1999). Ces études montrent que le sphéroïde est un bon modèle d’étude pour valider la méthode en amont de la recherche pré-clinique *in vivo*.



**Figure 34 : Evaluation de la toxicité de la bléomycine, de la cisplatine et de la doxorubicine sur sphéroïde de cellules cancéreuses (HCT 116).** (A) Effets des molécules ± EP sur la morphologie des sphéroïdes 3, 6, 9 et 24 heures après le traitement. Barre d'échelle : 100  $\mu$ m. (B) Suivi de la croissance des sphéroïdes après traitement, exprimée ici par l'aire des sphéroïdes normalisée par la valeur avant traitement. (C) Quantification des cellules apoptotiques sur sphéroïdes dissociés (exprimée en pourcentage de cellule), 9 heures après le traitement. Figure adaptée de (Gibot *et al.*, 2013).

## ii. L'électrogénéothérapie

Outre le transfert de petites molécules, il est aussi possible de transférer des molécules plus grosses telles que des molécules d'ADN (plasmides) ou d'ARN (siARN) afin de modifier l'expression de gènes cibles dans la cellule : c'est ce qu'on appelle l'électrogénéothérapie (EGT). Les mécanismes cellulaires qui orchestrent le transfert de ces molécules aux cellules ont été décrit dans la **section 1.d. ii**.

C'est dans les années 90 que les premiers essais d'électrotransfert de gène ont été effectués *in vivo* sur peau de souris et dans le foie de rat (Heller *et al.*, 1996; Titomirov *et al.*, 1991). Par la suite, l'électrotransfert d'ADN (plasmide) dans des mélanomes murins a été réalisé avec une efficacité de 4% (Rols *et al.*, 1998). Cette étude a également montré l'existence d'un seuil de transfection et qu'un grand délai entre l'injection de la molécule et l'EP diminue significativement l'efficacité de transfert. L'efficacité de transfection par l'EGT est directement dépendante de la taille de la tumeur (Cemazar *et al.*, 2002). Une autre méthode plus efficace

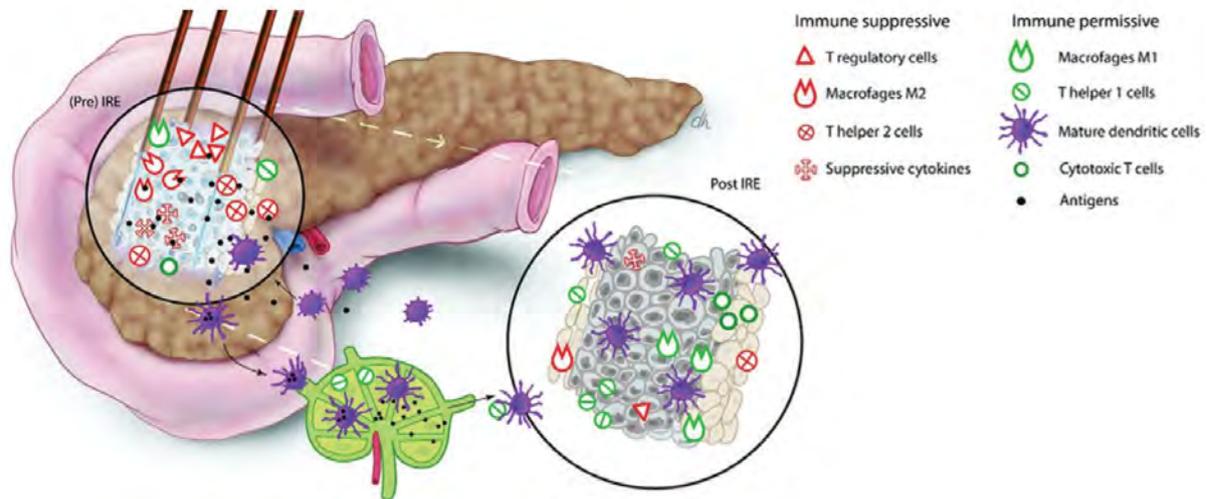
pour la transfection de complexe ADN-liposome par EGT a été proposé et montrerait un meilleur taux de transfection (6% dans des mélanomes murins) (Cemazar *et al.* , 2002). Toutefois, le transfert de gène par électroporation reste moins efficace que la transfection virale mais serait une méthode plus sûre du fait de la non-intégration du transgène (Van den Broeke and Burny, 2003). De plus, cette méthode peut être effectuée dans de multiples tissus (Mir *et al.* , 2005). Plus récemment, il a été montré que l'EGT peut être utilisée pour le transfert de gène codant pour des cytokines tel que l'interleukine-12 dans le but de stimuler la réponse immunitaire (Pasquet *et al.* , 2018, 2019).

L'EGT est encore en cours de développement et des essais cliniques sont en cours pour être utilisée en thérapie génique anti-cancéreuse ou en vaccination génétique (Daud *et al.* , 2008; Remic *et al.* , 2020).

#### **b. L'utilisation de l'électroporation irréversible pour l'ablation tumorale**

Les champs électriques peuvent également être utilisé en chirurgie pour l'ablation tumorale (**cf. partie I section 3.**) on parle alors d'EP irréversible (IRE). En effet, Une perméabilisation irréversible peut aussi se produire dans le cas où l'intensité des champs électriques est très intense (jusqu'à 3000 V) et donc la cellule ne peut pas retourner à son état initial, ces paramètres électriques ont été décrit en 2003 par Davalos et ses collaborateurs (Davalos *et al.* , 2003). Tout comme pour l'ECT et l'EGT, les champs électriques pulsés sont délivrés au moyen d'électrodes au niveau de la tumeur (Al-Sakere *et al.* , 2007; Silk *et al.* , 2014). Ces champs électriques vont alors déstabiliser la membrane des cellules, s'en suit la création de pores (par les mêmes mécanismes que ceux décrit en **section 1 de cette partie**) mais de façon non réversible. Ce phénomène permet de tuer les cellules de la tumeur puisque ces dernières ne recouvrent plus leur homéostasie cellulaire. La mort cellulaire qui s'en suit peut-être apoptotique ou nécrotique, induite directement par la rupture de la membrane ou indirectement via la fuite d'électrolytes et d'ATP (Ringel-Scaia *et al.* , 2019). L'IRE ne provoque pas d'incrément de chaleur, il ne s'agit donc pas d'une ablation thermique, les dommages causés aux tissus et aux vaisseaux sanguins voisins sont limités et ainsi le risque d'hémorragie est moindre (Davalos *et al.* , 2005). De plus, tout comme pour l'ECT, l'IRE induit une activation du système immunitaire (Rossi *et al.* , 2019a, 2019b; Skeate *et al.* , 2018). Contrairement à l'exérèse (ablation par chirurgie), le tissu tumoral n'est pas retiré du patient, les cellules affectées par le traitement relarguent des cytokines et des signaux de dangers (DAMP, Damage Associated Molecular Pattern) reconnus par les cellules immunitaires (**Figure 35**). Les vaisseaux sanguins n'étant pas affectés par l'IRE,

ceci va permettre un recrutement et une infiltration efficace des cellules présentatrices d'antigènes (José *et al.* , 2012).



**Figure 35 : Schéma illustrant la réponse immunitaire induite par l'IRE dans une tumeur du pancréas.** Pre IRE : environnement immunosuppresseur. Post IRE : stimulation de la réponse immunitaire via le relargage d'antigènes (rond noir) reconnus par les cellules dendritiques. Les cellules dendritiques matures migrent vers les ganglions lymphatiques où elles vont activer les cellules T cytotoxiques. Ces dernières migrent vers le site de la tumeur traité mais également sur les potentiels sites distants. Figure issue de (Geboers *et al.* , 2020).

Un des facteurs limitant de cette méthode est que la zone efficace de traitement est définie par le champ électrique créé entre les électrodes, il faudra donc insérer plusieurs électrodes pour couvrir une plus grande zone (6 électrodes pour une tumeur entre 3 et 5 cm par exemple). L'ablation tumorale par IRE peut être effectuée par laparotomie (Martin *et al.* , 2013), laparoscopie (Cannon *et al.* , 2013) et incision percutanée (Narayanan *et al.* , 2012), ce qui permet de traiter différents types de tumeurs incluant les tumeurs non résécables par les autres techniques d'ablation. Cette technique présente peu d'effets secondaires : contractions musculaires, arythmie cardiaque. Réalisée sous anesthésie générale et en synchronisant les impulsions électriques au rythme cardiaque du patient, ces effets peuvent être diminués. Elle est à ce jour déjà utilisée en clinique, le meilleur taux de réponse observé est entre 50 et 98 % et a été décrit par Kingham et ses collaborateurs sur des tumeurs de petites tailles (moins de 1 cm) localisées dans des zones à risque tel que les régions périvasculaires (Kingham *et al.* , 2012).

Une nouvelle stratégie reposant sur la combinaison d'une IRE partielle avec l'EGT (Immune-Gene Electro-Therapy IGET) pour le traitement du mélanome chez la souris a été proposée très récemment (Pasquet *et al.* , 2019). Les auteurs ont montré que l'application d'une IRE partielle suivi de l'électrotransfert de plasmide codant pour l'interleukine-12 induit un ralentissement de

la croissance tumorale et une activation systémique de la réponse immunitaire adaptative chez les souris. Les animaux traités ont également montré un meilleur taux de survie. Ainsi, de nouvelles stratégies thérapeutiques reposant sur la combinaison de diverses méthodes peuvent être proposées dans le but de palier les limites de chacune d'elle.

*L'électroporation ou électroperméabilisation est une technique physique maîtrisée pouvant induire des modifications transitoires des propriétés biologiques des cellules au niveau des lipides membranaires, des protéines membranaires et du cytosquelette. Ces altérations transitoires et locales peuvent être mises à profit pour potentialiser l'entrée et donc l'efficacité de substances actives contre les cellules cancéreuses (électrochimiothérapie). L'EP est donc une modalité de traitement physique qui peut être proposée pour potentialiser les effets d'autres stratégies thérapeutiques dans le but d'augmenter la délivrance aux tumeurs mais également d'induire une déstabilisation du tissu tumoral et une réponse immunitaire. C'est dans ce contexte que nous avons proposé de combiner les liquides activés par plasma avec l'EP.*



## OBJECTIFS DE LA THÈSE

---

Malgré l'arsenal de thérapie anti-cancéreuse, de nombreuses limites demeurent à ce jour. Les stratégies thérapeutiques anti-cancéreuses présentent des problèmes de spécificité vis-à-vis des cellules tumorales causant ainsi des effets secondaires élevés. Le ciblage précis des tumeurs par traitement local n'est pas toujours réalisable et le développement de multirésistances, ainsi que la faible induction de mort immunogénique restent encore des facteurs limitants. Ainsi, pour faire progresser le traitement des cancers, d'autres stratégies thérapeutiques reposant sur de nouvelles approches sont requises, notamment les méthodes physiques qui permettent un traitement local et qui sont moins sujet au développement de résistance chez les cellules cancéreuses. Au cours de la dernière décennie, les milieux et liquides activés par plasma (PAM et PAL), suscitent un intérêt particulier dans le domaine de la thérapie anti-cancéreuse. En effet, comme décrit dans l'introduction, les PAL peuvent éradiquer de façon sélective les cellules cancéreuses. La plupart des études publiées à ce jour reposent sur l'utilisation de cellules cancéreuses en monocouche pour l'évaluation de la réponse au traitement. Néanmoins, l'utilisation de modèles plus complexes tridimensionnel (3D), tel que le sphéroïde, pourrait apporter une meilleure compréhension des mécanismes d'action des PAM et des PAL, plus proche des mécanismes de réponse cellulaire *in vivo*. Les protocoles d'administration de ces solutions *in vivo* sur le petit animal sont encore très peu étudiés à ce jour et sont nécessaires pour une future transposition en clinique. Pour l'administration de ces solutions, l'électroporation ou électroperméabilisation (EP) réversible, qui a démontré une bonne efficacité en tant que méthode de délivrance de molécules thérapeutiques comme l'électrochimiothérapie (ECT), peut être utilisée pour entraîner de manière ciblée la mort des cellules cancéreuses. Ainsi, l'EP pourrait être proposée afin d'améliorer la délivrance de ces PAL aux tumeurs, via la création de pores membranaires transitoires d'une part, et via la déstabilisation de la cohésion de la tumeur d'autre part.

C'est dans ce cadre de recherche qu'ont été réalisés les travaux de thèse du projet PETCANCER financé par la Région Occitanie et la COMUE. Ce projet de recherche interdisciplinaire regroupe un consortium de deux équipes : l'équipe de Biophysique Cellulaire de l'Institut de Pharmacologie et de Biologie Structurale (IPBS), experte en électroporation et biologie/biochimie du cancer et l'équipe des Plasmas Réactifs Hors Equilibre (PRHE) du Laboratoire des Plasmas et de Conversion d'Énergie (LAPLACE), experte dans l'ingénierie, le

développement, la caractérisation et l'utilisation des sources plasmas froids à pression atmosphérique. Les travaux de thèse seront présentés ci-après en trois grandes parties.

### **Partie I- Évaluation de l'effet anti-cancéreux de solutions salines activées par plasma froid dans un modèle de microtumeur en 3D**

Dans la continuité des travaux de thèse du Dr. Julie Chauvin « Étude des mécanismes anti-cancéreux induits par milieux activés par jet de plasma froid : vers une nouvelle approche thérapeutique » (Chauvin, 2018), des expériences complémentaires ont été effectuées en début de thèse. Ces travaux ont permis d'élucider les événements cellulaires induit sur des sphéroïdes de cellules HCT 116, cancer colorectal humain, dans les heures suivant un traitement par DMEM activé par plasma et ont fait l'objet d'une publication d'un article au journal *Scientific Reports* qui sera présenté en tant que résultats introductifs-généralités.

Nous avons, par la suite, évalué les effets du tampon phosphate salin (PBS) et du chlorure de sodium (NaCl) exposés au jet de plasma (P-A PBS et P-A NaCl, respectivement) sur des sphéroïdes de cellules HCT 116-GFP et de cellules de carcinome ovarien SKOV-3-GFP-Luc. Les deux lignées cellulaires expriment la protéine fluorescente verte GFP (Green Fluorescent Protein). Ce marqueur fluorescent a ainsi été utilisé comme marqueur indirect de viabilité cellulaire. La croissance/viabilité des sphéroïdes ainsi que la cinétique de mort cellulaire pour chacune des lignées après traitement par P-A PBS ou P-A NaCl ont été évaluées. Les propriétés physico-chimiques de ces deux solutions après exposition au jet de plasma ont été déterminé (pH, osmolarité et quantité d'espèces réactives de l'oxygène et de l'azote produites, RONS). L'implication du peroxyde d'hydrogène, du nitrite et du nitrate dans la toxicité des PAL a également été étudiée. Ces travaux ont été valorisé dans un article scientifique pour une édition spéciale « Plasma for Cancer Treatment » du journal *Cancers* qui est inséré dans le manuscrit.

### **Partie II- Utilisation des champs électriques pulsés pour potentialiser l'effet des solutions salines activés par plasma froid *in vitro***

Dans une deuxième partie de la thèse, nous avons proposé une approche innovante reposant sur la combinaison des PAL et de l'EP, afin de potentialiser les effets cytotoxiques et génotoxiques des PAL sur les cellules du sphéroïde. Pour ce faire, nous avons tout d'abord déterminé les paramètres des champs électriques pulsés dans le but d'induire une EP réversible des cellules du sphéroïde, qui n'affectent pas leur viabilité cellulaire. Ensuite, l'effet de la combinaison des deux approches a été étudié sur les sphéroïdes de cellules HCT 116-GFP.

Différents tests fonctionnels ont été effectués pour déterminer les effets du traitement combiné : suivi de la croissance/viabilité des sphéroïdes ; marquage de l'apoptose sur sphéroïdes entiers ; immunofluorescences des dommages à l'ADN, du cytosquelette d'actine et des jonctions cellulaires sur coupes de sphéroïdes; microscopie électronique à transmission (morphologie des cellules et des organites); évaluation de l'expression de protéines par Western Blot (protéines du cytosquelette et des jonctions cellulaires, protéines impliquées dans les voies de l'autophagie). L'universalité du traitement combiné a également été évalué sur des sphéroïdes d'autres lignées cancéreuses, les cellules de mélanome murin B16-F10 ainsi que les cellules de carcinome squameux du pharynx humain FaDu. Une partie des travaux réalisés dans cette section de la thèse ont fait l'objet d'une publication dans le journal *Scientific Reports* qui est introduite dans le manuscrit.

### **Partie III- Mise en place de protocoles *in vivo* pour le traitement par liquides activés par plasma et champs électriques pulsés de différents modèles de tumeurs**

Enfin, les résultats obtenus *in vitro* dans ces deux premiers axes nous ont servi de point de départ pour la mise en place de protocoles *in vivo*. Différents modèles de tumeurs humaines et murines ont été utilisées chez des souris immuno-compétentes ou déficientes : greffe intradermique de cellules de mélanome murin B16-F10-tdTomato dans des souris C57Bl/6 ; greffe sous-cutanée de cellules HCT 116-GFP, et greffe intrapéritonéale de cellules SKOV-3-GFP-Luc dans des souris nude. Les paramètres d'EP utilisés en ECT ont été appliqués, le but étant d'augmenter la délivrance des PAL et de déstabiliser l'architecture et la vascularisation tumorale pour les tumeurs intradermiques et sous-cutanées. L'effet du P-A PBS injecté dans la tumeur, en injection répétées, seuls ou combiné avec l'EP, a été évalué par le suivi de la croissance tumorale (pied à coulisse ou bioluminescence) dans les modèles sous-cutané et intrapéritonéal. Les résultats préliminaires sont présentés dans cette partie.



## RÉSULTATS ET DISCUSSIONS

---

### Partie I : Évaluation des effets anti-cancéreux de solutions salines activées par plasma froid dans un modèle de microtumeur en 3D

#### 1. Résultats introductifs-Généralités

Comme nous l'avons vu dans l'introduction, les milieux de culture et liquides activés par plasma (PAM et PAL, respectivement) induisent la mort cellulaire de plusieurs lignées de cellules cancéreuses *in vitro*. Sur un modèle 3D de microtumeur, le sphéroïde de cellules de cancer colorectal humain HCT 116, un seul traitement par du Dulbecco's Modified Eagle's Medium activé par plasma (P-A DMEM) induit des dommages à l'ADN dans les cellules des couches externes du sphéroïde (Judée *et al.* , 2016a). Ceci a été corrélé avec le détachement de ces mêmes cellules 24 heures après traitement. Dans la continuité de ces travaux, le Dr. Julie Chauvin a étudié les mécanismes anti-cancéreux du P-A DMEM sur le même modèle, le sphéroïde de cellules HCT 116 (Chauvin, 2018). Une chronologie des mécanismes de mort cellulaire engendrée par le P-A DMEM a pu être proposée à l'issue de ces travaux (**Figure 6, article 1**). L'incubation pendant 4 heures des sphéroïdes dans le P-A DMEM affecte la viabilité cellulaire via une fuite d'ATP intracellulaire dès la première heure suivant le traitement (50% en moins). Cette perte d'ATP ainsi que l'accumulation de peroxyde d'hydrogène dans la cellule induit un stress mitochondrial (forte production de superoxyde par les mitochondries) qui emmène les cellules à rentrer en apoptose et/ou nécrose environ 6 heures après le traitement.

*Ma contribution à ce travail a concerné les expériences de cytométrie en flux sur sphéroïdes dissociés dans le but de renforcer les résultats obtenus sur sphéroïdes entier (marquage caspase 3/7) et de déterminer le taux des cellules apoptotiques et nécrotiques 1, 4 et 6 heures après le traitement (expériences et analyses des résultats **figure 4.C, article 1**).*

2. Article 1: Elucidation of in vitro cellular steps induced by antitumor treatment with plasma-activated medium. Julie Chauvin, Laure Gibot, Elena Grisetti, Muriel Golzio, Marie-Pierre Rols, Nofel Merbahi, Patricia Vicendo. Scientific Reports (2019) 9:4866.

# SCIENTIFIC REPORTS



OPEN

## Elucidation of *in vitro* cellular steps induced by antitumor treatment with plasma-activated medium

Julie Chauvin<sup>1,3</sup>, Laure Gibot<sup>2</sup>, Elena Griseti<sup>1,2</sup>, Muriel Golzio<sup>2</sup>, Marie-Pierre Rols<sup>2</sup>, Nofel Merbahi<sup>1</sup> & Patricia Vicendo<sup>3</sup>

Numerous studies have reported cold atmospheric plasma cytotoxic activities in various cancer cell lines, either by direct exposure to non-thermal plasma or indirectly by activating a medium (plasma-activated medium, PAM) prior to cell treatment. We suggested the use of *in vitro* 3D tumor model spheroids to determine the potential of PAM for cancer therapy at the tissue scale, especially in human tumor tissue. This work aimed to better understand the effect of PAM on human colorectal tumor spheroids by describing the *in vitro*-induced-cell death kinetics and associated mechanisms to further improve its therapeutic potential. Tumor spheroid growth was delayed depending on contact time with PAM. Medium osmolarity was increased by activation with low temperature Helium plasma jet but it did not fully explain the observed growth delay. PAM impaired tumor cell viability through intracellular ATP depletion, leading within hours to both cell apoptosis and necrosis as well as mitochondrial oxidative stress. When successive treatments were spaced over time, cumulative effects on the growth delay of spheroids were observed. Taken together, these results demonstrated that plasma-activated liquids may represent a novel and efficient therapeutic method for the treatment of tumors, especially when successive treatments are applied.

In 2012, 1.4 million new cases of colorectal cancer and 700 000 associated deaths were registered, making it the third most diagnosed cancer worldwide<sup>1</sup>. Currently, the main effective treatments are surgery associated with chemotherapy and/or radiotherapy. However, the side effects and drug resistance of these cancer therapies are responsible for a lack of efficacy. To counteract these negative effects, new methods to treat colorectal cancers involving the production of a high level of reactive oxygen species (ROS) have emerged<sup>2,3</sup>.

Under physiological conditions, ROS, controlled by antioxidant molecules, are essential for maintaining cellular functions and homeostasis. In contrast, under pathological processes such as colorectal cancer, there is an excessive level of ROS due to an imbalance between ROS and nonenzymatic and enzymatic antioxidants. Numerous studies have shown that a high level of ROS over the toxic threshold can lead to the preferential killing of cancer cells while not affecting normal cells<sup>4</sup>.

In this area of ROS anticancer therapy, cold atmospheric plasmas have received growing interest. Indeed, for biomedical applications, atmospheric pressure plasma in various configurations has been designed, such as the Dielectric Barrier Discharge (DBD)<sup>5-7</sup> and corona discharge<sup>8,9</sup>, with different carrier gases such as argon<sup>10,11</sup> or helium<sup>12-14</sup>, without or with oxygen<sup>15-17</sup>.

Their first medical applications of these plasmas were in the disinfection and healing of wounds, but plasmas are now increasingly studied for their anti-cancer properties. Several studies have reported their cytotoxic activities in various cancer cell lines, such as breast cancer<sup>10,12</sup>, oral cavity squamous cell carcinoma<sup>15</sup>, ovarian clear-cell carcinoma<sup>11</sup>, prostate cancer<sup>16</sup>, head and neck cancer<sup>18-20</sup> and colorectal cancer<sup>13,21</sup>.

Two main approaches are being investigated in plasma cancer treatment, namely, directly exposing cells or tissue to the plasma jet<sup>22,23</sup> or indirectly by activating a medium that will later be put into contact with tumors cells<sup>4,10,13,20,24</sup>. Plasma-activated medium (PAM) offers the advantage of being produced beforehand as a “drug” that can be stably stocked for several days<sup>13</sup> and is easily usable for direct injection into target tissues. PAM can

<sup>1</sup>Université de Toulouse, UPS, CNRS, Laplace UMR CNRS, 5213, Toulouse, France. <sup>2</sup>Institut de Pharmacologie et Biologie Structurale, IPBS, Université de Toulouse, CNRS, UPS, Toulouse, France. <sup>3</sup>Université de Toulouse; UPS, CNRS, IMRCP, 118 route de Narbonne, F-31062, Toulouse, Cedex 9, France. Julie Chauvin and Laure Gibot contributed equally. Correspondence and requests for materials should be addressed to N.M. (email: [merbahi@laplace.univ-tlse.fr](mailto:merbahi@laplace.univ-tlse.fr)) or P.V. (email: [vicendo@chimie.ups-tlse.fr](mailto:vicendo@chimie.ups-tlse.fr))

	pH	Osmolarity (mosmol/kg)	Volume after exposition ( $\pm 1 \mu\text{L}$ )
Medium	7,5	295 $\pm$ 2	100
Medium exposed to gas alone for 120 s	7,5	319 $\pm$ 3	92
Medium exposed to plasma for 120 s (PAM)	7,5	358 $\pm$ 23	80
Medium exposed to gas alone for 300 s	7,5	360 $\pm$ 26	80

**Table 1.** Characterization of media exposed to plasma and gas alone in terms of pH and osmolarity (mosmol/kg) after exposition to Helium plasma jet. At least 6 independent measurements were conducted. Data are expressed as mean  $\pm$  SD.

effectively kill tumor cells or tissues just as direct plasma exposure does. Plasma, as the fourth state of matter, reacts with its environment and produces reactive oxygen and nitrogen oxide species (RONS). RONS, such as hydrogen peroxide, nitrite and nitrate, have been identified as reactive species playing a major role in cancer cell death<sup>4,10,14,25,26</sup>. However, even if the PAM anti-cancer activities are mainly due to the presence of species such as  $\text{H}_2\text{O}_2$ ,  $\text{NO}_3^-$ , or  $\text{NO}_2^-$ , the presence of RONS is not sufficient to fully explain the cytotoxic effects of PAM. Most of the *in vitro* studies performed on cell culture monolayers showed that PAM mainly induced cell death *via* apoptosis induction<sup>10,11,15,17,21</sup>. Recently, *in vivo* studies demonstrated that PAM is able to significantly reduce xenograft tumors in mouse models of pancreatic and ovarian cancers<sup>27,28</sup>. Due to these aspects, PAM may be considered as a potential anti-cancer agent. However, the small number of *in vivo* studies carried out with PAM does not allow the therapeutic protocol for tumor treatment to be defined. To predict and improve the performance of PAM as an *in vivo* antitumor treatment, investigations carried out *in vitro* in a 3D tumor model are necessary. 3D tissue models, such as tumor spheroids, are closer to the *in vivo* context by reproducing the architecture of a tumor<sup>29–31</sup> and can help to elucidate mechanisms underlying the antitumor properties of PAM. Indeed, similar to the avascular regions of tumors, spheroids present gradients of oxygen, nutrients and metabolites, producing a gradient in cell proliferation from the center, with the presence of a necrotic core, to the proliferative surface<sup>32</sup>. Thus, the spheroid model is a useful tool to determine the biological effects of PAM on human tumor cell growth. While tumor spheroids have been widely used in numerous fields of biology, only a few studies have investigated the cellular-induced mechanisms associated with PAM. Thus, spheroids will help determine the potential of plasma for cancer therapy at the tissue scale, especially in human tissues.

This work aimed to better understand the sequence of processes involved in the cytotoxicity of the plasma-activated medium in spheroids and to thereby provide insight into methods to increase its potential as an anticancer treatment. Experiments were performed *in vitro* in human colorectal tumor spheroids. ATP levels were measured using luminescence analysis, and fluorescence microscopy was used to detect membrane integrity, caspases activities, and the presence of superoxide in the mitochondria. Finally, the best combination of successive treatments to efficiently reduce tumor growth was investigated.

## Results

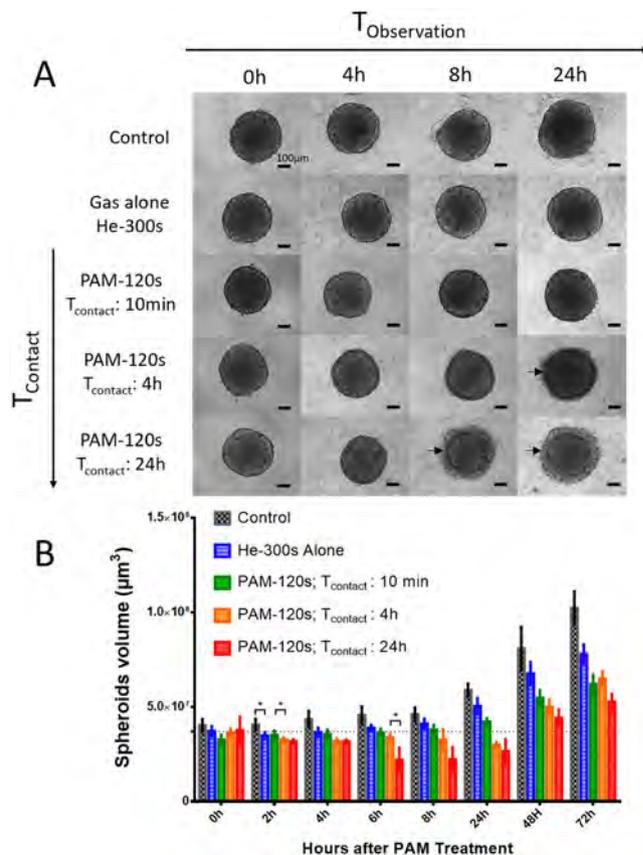
**Medium osmolarity is increased by low-temperature helium plasma jet exposure.** With the settings applied to produce helium plasma-activated medium, an increase in osmolarity was observed (Table 1). Indeed, nontreated cell culture medium has an osmolarity of  $295 \pm 1.5$  mosmol/kg while it increased to  $358 \pm 23$  mosmol/kg after 120 seconds of exposure to a helium plasma jet. Since osmolarity can modify cell behavior, an osmolarity control was added to the subsequent experiments, named “gas alone”. It was produced by cell culture medium exposure to helium flow alone, without plasma production, for 300 seconds. Under these conditions, medium exposed to gas flow alone presented an osmolarity of  $360 \pm 26$  mosmol/kg, similar to the osmolarity of PAM.

Activation of medium with plasma can cause changes in the pH of the medium<sup>33</sup> however, in our experimental setup, the differences in pH were negligible before and after plasma activation due to the use of a buffered cell culture solution. However, we measured that the osmolarity was significantly increased, probably due to medium evaporation because of helium flow. Interestingly, the regulation of osmolarity is a promising research path in the field of cancer treatment<sup>34</sup>.

**Spheroid growth is delayed by increasing contact time with PAM.** The macroscopic aspect of spheroids was observed by wide-field microscopy over 24 h after exposure to non-activated medium (control), gas alone (osmolarity control) or PAM with different contact times,  $T_{\text{Contact}}$  (10 min, 4 h or 24 h; Fig. 1A).  $T_{\text{Contact}}$  is the duration for which spheroids were immersed in PAM. At the macroscopic scale, spheroid integrity was preserved when exposed over 24 h to medium treated with helium only (gas alone) or for 10 min with PAM, in accordance with the control condition. In contrast, when exposed to PAM for more than 10 min, the spheroid margins became blurry and started to disintegrate. Two distinct components appeared, namely, a cohesive core surrounded by a crown of detached cells. For spheroids in contact with PAM for 24 h, macroscopic effects were observed as soon as 4 h and up to 8 h posttreatment, whereas spheroids in contact with PAM for 4 h only showed deleterious effects at 24 h. Thus, the deleterious effects exerted by PAM on spheroid integrity depend on contact time.

Following the growth of the cohesive core of spheroids over three days allowed estimation of the PAM treatment effect on tumor cell growth in 3D (Fig. 1B). For conditions inducing cell detachment (i.e.,  $T_{\text{contact}}$  4 h and 24 h), evidence of spheroid decay was observed during the first 24 h, followed by a resumption of growth depending on the time of contact with PAM (Fig. 1A).

For subsequent *in vitro* experiments, the longer exposure of spheroids to PAM ( $T_{\text{contact}}$  24 h) was chosen since this exposure time induced the most drastic effects on spheroids as early as 8 h after treatment. Interestingly, even a



**Figure 1.** Human tumor spheroids macroscopic aspect and growth curve after PAM treatment. (A) Macroscopic aspect of spheroids observed by wide-field microscopy for 24 h after PAM exposition or exposition to gas alone as osmolarity control. Arrows indicate cell detachment in crown. Scale bar 100  $\mu\text{m}$ . (B) Spheroids growth over three days after contact time  $T_{\text{contact}}$  with PAM for 10 minutes, 4 h and 24 h. \* $p < 0,05$ .

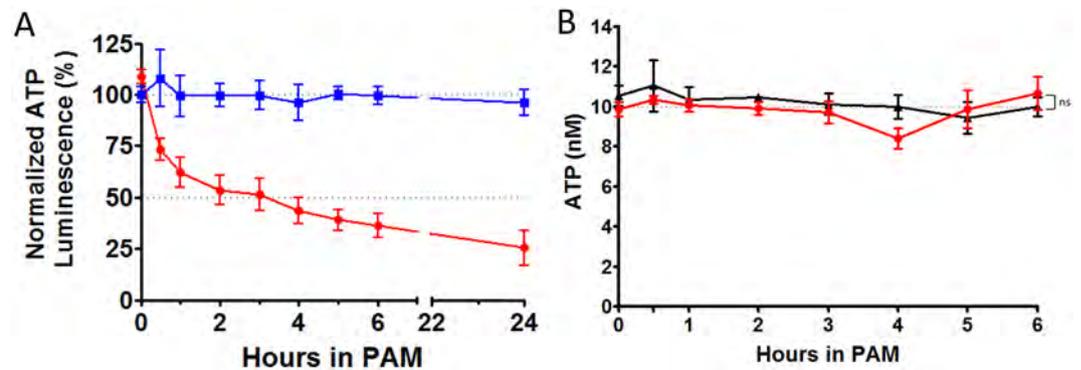
5-min exposure to helium alone had no effect on the macroscopic aspects of spheroids within 24 h. After three days of culture, spheroid growth was significantly reduced compared with that of nontreated spheroids but to a less extent than that associated with PAM treatment. This result means that spheroid modifications induced by PAM are not due to a hyperosmotic effect but mainly to the generation of oxidative compounds, as reported in the literature<sup>14,35</sup>.

Unlike studies with cells grown in monolayers<sup>30</sup>, a unique PAM treatment is not sufficient to induce complete destruction of spheroids, probably due to their 3D architecture<sup>36,37</sup>. To optimize therapeutic protocols, an accurate description of the kinetics of the cellular mechanisms induced by PAM is needed.

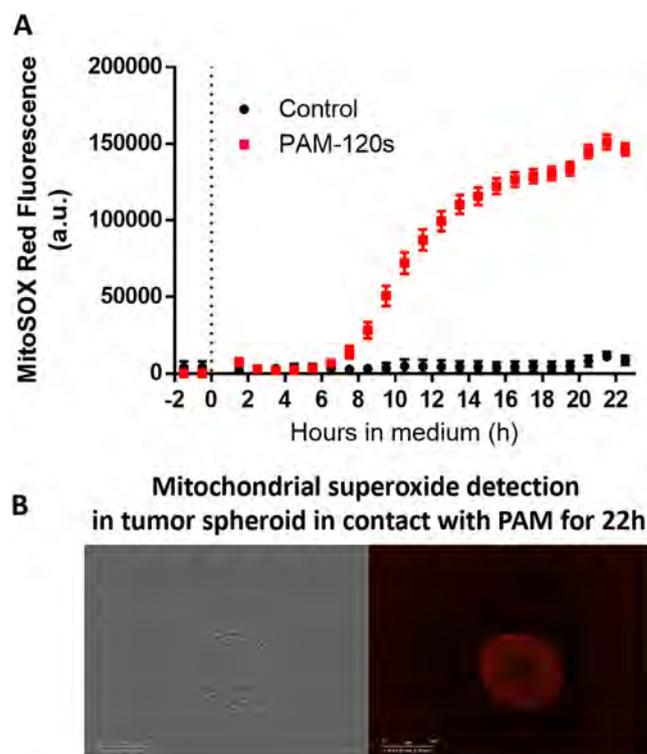
#### **PAM impairs tumor cell viability as observed by intracellular ATP depletion and later mitochondrial dysfunction.**

ATP is generally considered as a good indicator of cell viability<sup>38,39</sup>. For 24 h, we quantified the ATP content of spheroids after PAM treatment ( $T_{\text{contact}}$  24 h). Figure 2A shows the spheroid's ATP levels in PAM. The ATP was calculated based on a normalization of treated spheroids with regard to the control spheroids. While osmolarity control did not affect the ATP content of spheroids, PAM induced a significant and rapid intracellular depletion of ATP within spheroids (Fig. 2A). Two phases were observed: a fast phase during the first 3 h of exposure, leading to a 50% loss of ATP in spheroids, followed by a slower phase until reaching a 75% loss of ATP at the end of the 24 h experiment. Since PAM is known to produce reactive oxygen and nitrogen species, the stability of a standard ATP was checked when exposed to PAM in an acellular context (Fig. 2B). No effect was observed after exposure of ATP to PAM, meaning that the intracellular decrease of ATP in spheroids exposed to PAM is due to a cellular effect. To determine whether the dramatic decrease in intracellular ATP was due to ATP leakage or release, ATP was also quantified in the supernatant. Interestingly, no ATP was detected in the supernatant under these experimental conditions over the 24-h period (data not shown). This result means that either ATP is significantly consumed intracellularly or it is no longer efficiently produced by the mitochondria.

Mitochondria dysfunction was evaluated using the MitoSOX fluorescent probe, which specifically detects the presence of mitochondrial superoxide. Interestingly, this probe is exclusively sensitive to superoxide and not to other ROS or RNS. As soon as 6 h after exposure to PAM, the MitoSOX signal significantly increased, indicating the production of mitochondrial superoxide (Fig. 3A). After 22 h of exposure to PAM, strong MitoSOX labeling was observed in the detached outer layers of the spheroid (Fig. 3B). Superoxide is known to induce oxidative stress, cellular damage and death<sup>40</sup>. We previously reported that the addition of superoxide dismutase (SOD) within PAM reduced DNA damage in outer spheroid layers, highlighting the key role of superoxide<sup>13</sup>.

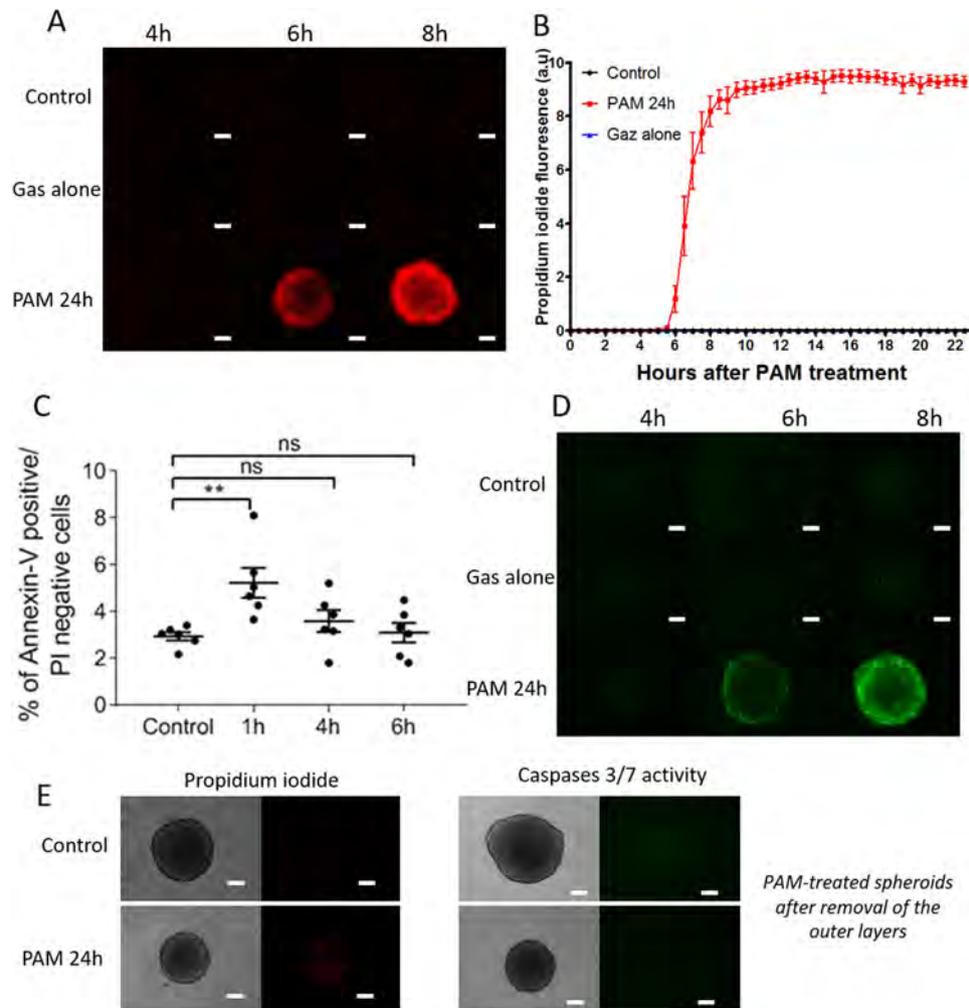


**Figure 2.** PAM treatment induced loss of ATP. (A) Intracellular spheroid's content in ATP measured by luminescence over the time after exposition to PAM. Blue square: osmolarity control gas alone. Red circle: spheroids  $T_{\text{contact}}$  24 h to PAM. (B) ATP stability in PAM (red circles) or in control non-activated medium (black triangle). ns: non-significant.



**Figure 3.** PAM treatment induced mitochondrial dysfunction through mitochondrial superoxide production. (A) Follow-up of the mitochondrial superoxide apparition in control and PAM-120 s spheroids over 22 h. The dotted line indicated when spheroids were exposed to PAM. (B) Fluorescence imaging of mitochondrial superoxide by wide field microscopy after  $T_{\text{contact}}$  of 22 h to PAM. Scale bar: 300  $\mu\text{m}$ .

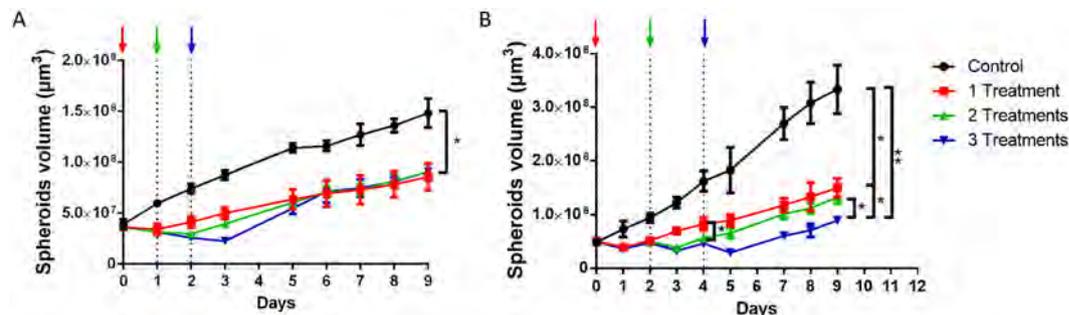
**PAM induced cell death through both apoptosis and necrosis.** Plasma membrane integrity was checked over time with a non-permeant fluorescent probe: propidium iodide. When the plasma membrane is altered, propidium iodide penetrates cells and intercalates in DNA, becoming highly fluorescent due to the increase in its fluorescence quantum yield. Non-selective permeability of plasma membranes is mainly a hallmark of dying cells. Figure 4A shows that membrane integrity was lost between 4 and 6 h of exposure to PAM. An analysis using videomicroscopy allowed real-time analysis of propidium iodide penetration (Fig. 4B and Movie 1). This analysis confirmed that membrane dysfunction is a very rapid phenomenon occurring approximately 6 h after exposure to PAM. Osmolarity control (gas alone) did not affect membrane integrity. As mentioned, a loss of plasma membrane integrity is mainly associated with cell death by both necrosis and apoptosis. Apoptosis was first assessed by quantifying the early externalization of phosphatidylserine by flow cytometry in propidium iodide negative cells (Fig. 4C). Cells in spheroids exposed to PAM displayed a rapid, i.e., within the first hour of treatment, transient and significant externalization of phosphatidylserine, which disappeared after longer



**Figure 4.** PAM treatment induced loss of plasma cell integrity and apoptosis. (A) Plasma membrane integrity observed thanks to propidium iodide (red) penetration. Scale bar: 100  $\mu$ m. (B) Quantification by videomicroscopy of propidium iodide fluorescence in spheroid over the time after exposition to non-activated medium (black circles), PAM (red squares) or gas alone treatment (blue triangles). (C) Quantification by flow cytometry of apoptosis (Annexin-V positive/propidium iodide PI negative cells) through early externalization of phosphatidylserine in cells isolated from spheroids exposed for 1 h, 4 h or 6 h to PAM. (D) Caspases 3/7 activity observed by wide-field fluorescence microscopy after PAM or gas alone treatment or in control condition. (E) Propidium iodide penetration and caspases 3/7 activity observed by wide-field fluorescence microscopy 24 h after exposure to PAM in cohesive spheroid's core. Crown of detached cells was removed by gentle pipetting. Scale bar: 100  $\mu$ m. \*\* $p < 0.005$ , ns: non-significant.

incubation times. Apoptosis was then confirmed via the activation of executioner caspases 3/7 after spheroid exposure to PAM, as shown in Fig. 4D. Apoptosis was detectable after 6 h of exposure to PAM and increased over time. Interestingly, no apoptosis was observable with the osmolarity control (gas alone). It should be noted that the crown of detached and detaching cells is highly fragile. Thus, only *in situ* wide-field fluorescence microscopy within the cell culture dish was performed to assess propidium iodide penetration and apoptosis induction. This means that fluorescence coming from the whole spheroid (cohesive core + crown of detached cells) was detected. To assess the modification of the cohesive core induced by PAM 24 h post-treatment, spheroids were gently pipetted to allow removal of the crown of detached cells (Fig. 4E). Under both the control and PAM conditions, the remaining core of the spheroids did not present a loss of plasma membrane integrity or apoptosis induction, highlighting its viability. These results provide evidence that cells constituting the crown of detached cells underwent PAM-induced apoptosis and necrosis. This result corresponds to the decrease in size observed 24 h after exposure to PAM on the growth curve (Fig. 1B).

The concomitant occurrence of apoptosis and loss of membrane integrity indicates that PAM treatment induced both apoptosis and necrosis in spheroids. Apoptosis and necrosis were shown to be limited to cells detaching from the spheroid surface, namely, those in close contact with PAM. To amplify the destruction of tumor spheroids and target deeper layers, we performed successive treatments with PAM.



**Figure 5.** Successive treatments with PAM display cumulative effects on reducing tumor spheroid growth. At least 6 independent spheroids underwent a unique treatment with PAM (red squares) or two treatments (green triangles) or three successive treatments (blue inverted triangles), compared to control spheroid growth (black circles). Colored arrows indicate day of treatment with freshly produced PAM. **(A)** Treatments were performed every day. **(B)** Treatments were performed two days apart. \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ .

**Successive treatments induced a cumulative effect on the growth delay of spheroids.** We showed that within 24 h, spheroids exposed to PAM presented a crown of necrosis and apoptosis-dying cells and a viable cohesive core. We hypothesize that successive exposure to fresh PAM would help stop tumor growth and/or destroy tumor spheroids.

For that purpose, batches of spheroids were exposed to fresh PAM one, two or three times, and their growth was followed over 9 days. Figure 5 shows the volumes of spheroids after they underwent treatment every day (Fig. 5A) or every two days (Fig. 5B). Successive treatments performed every day (Fig. 5A) showed that although a volume loss is present the day following treatment, after 5 days, each condition (from one to three successive treatments) yielded the same spheroid volume. This result suggested that successive treatment one day apart is not sufficient to increase the PAM anticancer effect more than one treatment does.

In a similar manner, when performing successive treatment two days apart (Fig. 5B), after each exposure to fresh PAM, a reduction in spheroid size was observed, but growth started again within the following 24 h. Two successive exposures helped maintain tumor volume, but growth recovered 24 h later. Encouragingly, three successive treatments reduced the spheroid volume to less than the original volume. Spheroids treated successively 3 times were significantly smaller than those treated only twice. This experiment demonstrates a cumulative effect of successive PAM treatments with the possibility of not only limiting tumor spheroid growth but also reducing tumor size. This *in vitro* result demonstrated the importance of waiting for cell death mechanisms to be induced and completed before performing subsequent PAM treatment.

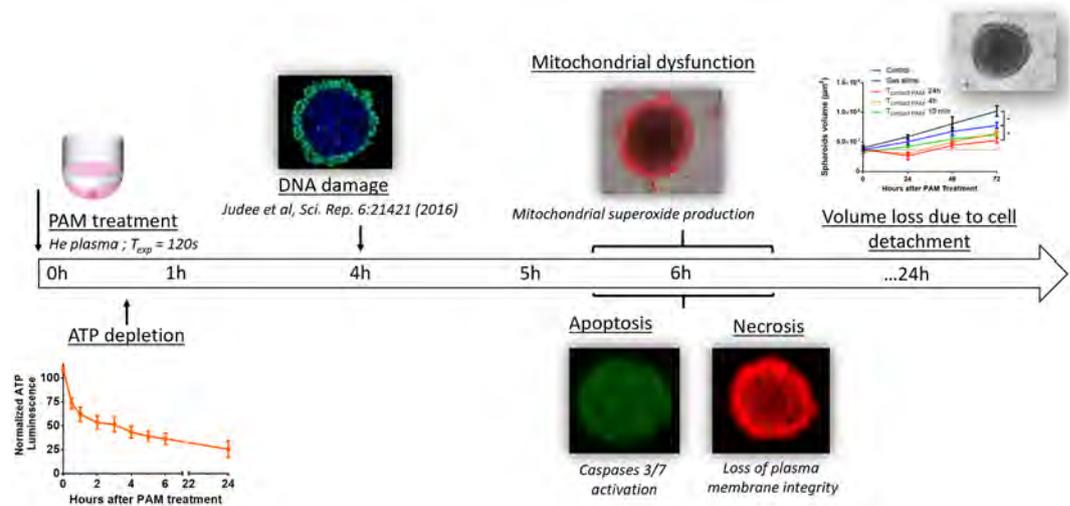
## Discussion

The aim of this work was to better elucidate the effects of PAM on human 3D colorectal tumor spheroids by describing the *in vitro*-induced cell death kinetics and mechanisms to improve its *in vivo* therapeutic potential. The main cellular steps are summarized in Fig. 6.

We have historically made the choice to activate cell culture medium with cold plasma, and we performed a detailed assessment of the medium by several complementary analytical techniques to determine the different reactive oxygen species, such as hydroxyl radical, superoxide anion, and singlet oxygen, and nitrogen species produced<sup>14</sup>, both in water and cell culture medium. We observed that the composition of the medium significantly impacted the pH of the solution during plasma treatment, as well as the stability and reactivity with biomolecules of the different ROS and RONS produced. However, it should be noted that several other types of liquids, such as water and PBS, have been plasma-activated, characterized in terms of the reactive species produced, and tested in terms of anticancer properties *in vitro* or *in vivo*<sup>41–43</sup>. These two liquids may be more suitable for translational applications in clinics. Most of the reactive oxygen and nitrogen species are found in all these plasma-activated liquids but in different quantities depending on the liquid and the plasma experimental set up used.

We previously showed that PAM displayed a genotoxic effect on human tumor cells, mainly by the production of reactive oxygen species such as hydrogen peroxide ( $H_2O_2$ ) and the generation of reactive nitrogen species<sup>4,13,14</sup>. Hydrogen peroxide is well known for its ability to break DNA double strands<sup>4,13</sup>. However, studies with spheroids treated only with  $H_2O_2$  solutions in culture medium demonstrated that  $H_2O_2$  alone cannot induce a long-term effect, even if it generates DNA damage<sup>4,20</sup>. Although  $H_2O_2$  is necessary for PAM anticancer properties, other species involved in PAM play a key role in cancer cell death. Interestingly, we previously reported that the addition of superoxide dismutase (SOD) to PAM reduced DNA damage in the outer layers of spheroids, highlighting the key role of superoxide<sup>13</sup>. These results indicate that several species found in PAM play complementary roles in cellular behaviors.

Others studies further investigated the mechanisms induced at the cellular scale. Oxidative stress was shown to induce intracellular zinc ( $Zn^{2+}$ ) release and provoke  $Zn^{2+}$ -dependent cell death in human neuroblastoma SH-SY5Y cells<sup>44</sup>, while normal human fibroblasts were less susceptible to PAM cytotoxicity, probably because cells with low intracellular mobile  $Zn^{2+}$  are less susceptible to PAM cytotoxicity<sup>45</sup>. Indeed, numerous recently published studies have reported that PAM specifically affects tumor cells while sparing normal cells. We previously demonstrated that PAM induced selective DNA damage in HCT-116 3D spheroids compared with normal



**Figure 6.** Cascade of events leading to cell death and tumor volume reduction after PAM treatment *in vitro*.

human fibroblast GM637 spheroids<sup>4</sup>. In another study, it was shown that an optimal dose of PAM is able to selectively induce significant hepatocarcinoma cell apoptosis while minimizing damage to co-cultured normal hepatic cell lines<sup>46</sup>. This study confirms results obtained previously in two human epithelial ovarian carcinoma cell lines and normal fibroblasts. When treated with PAM, both types of epithelial ovarian carcinoma cell lines were discriminately killed through enhanced apoptosis induction, while normal fibroblast cells were not damaged<sup>47</sup>. These encouraging results demonstrate that PAM could be a promising tool for anti-cancer therapy while sparing normal surrounding tissues.

The recognized luminescence assay<sup>48</sup> was used to quantify intracellular ATP content after exposure to PAM. We proved that dramatic intracellular ATP depletion occurred early (within 1 h) after exposure to PAM. The finding that no ATP was measured in the supernatants indicated that ATP loss occurred due to an intracellular mechanism. Our observations are consistent with those of other groups for cells exposed to plasma-activated liquids<sup>45,49</sup>. Interestingly, to the best of our knowledge, a distinct effect was observed solely with cells directly exposed to cold plasmas, which led to ATP extracellular secretion<sup>50,51</sup>.

Since PAM triggers cellular damage solely in the outer layers of spheroids while sparing the core, we suggested the application of successive treatments to improve anti-tumor efficacy in *in vivo* antitumor treatment perspective. However, the duration between each new treatment proved to be important. Indeed, treatment every day did not show any benefits, while treatment every two days led to tumor regression. Since the induction of cell death is a multistep process, it seems important to allow time for cells to go through all of them before applying a new treatment. In cells grown in monolayer, PAM was previously shown to have an anti-tumor effect on epithelial ovarian carcinoma chemo-resistant cells by inducing caspases 3/7 activation within 4 h after treatment<sup>27</sup>. In monolayer, PAM does not need to diffuse throughout the spheroid's volume, meaning that all the cells grown on a flat surface were homogeneously and directly exposed to PAM. This notion could explain why the apoptosis kinetics were faster in monolayers and underline the importance of successive treatments when targeting tissues in 3D.

To date, all *in vivo* studies with PAM<sup>27,52,53</sup> have demonstrated a promising effect as an antitumor treatment in different types (solid, metastatic, liquid) of tumors. Indeed, after successive *in vivo* injection of fresh PAM, the growth of solid tumors was reduced, showing the anticancer effect of PAM in a murine model<sup>27</sup>. In this study, the authors showed a reduced tumor growth speed that confirmed *in vivo* anti-tumor effects of PAM in nude mice bearing ovarian cancer cells embedded in Matrigel<sup>27</sup>. Interestingly, some *in vivo* studies evaluated the efficacy of PAM administered intraperitoneally (distinct from intratumoral injections) in inhibiting peritoneal metastasis and showed a 60% decrease in the formation of peritoneal metastatic nodules<sup>54</sup>. Another group examined the effect of PAM on lymphoplasmacytic lymphoma cell lines and found that PAM induced plasma cell differentiation and reduced the tumorigenic population<sup>55</sup>. A next step for *in vivo* treatment with PAM is to use mice with a functional immune system, as it has been shown that immunogenic cell death and the stimulation of macrophages can improve the PAM effect<sup>56,57</sup>.

In conclusion, plasma-activated liquids may represent a novel, safe and efficient therapeutic method for the treatment of peritoneal metastases<sup>54</sup>, blood cancers<sup>55</sup> and solid tumors. Furthermore, PAM preferentially activates cell death modalities, including apoptosis and necrosis, in tumor cell lines and primary cancerous cells compared with their normal counterparts. Thus, this therapeutic modality seems to offer the selectivity that is lacking in many other available treatments.

## Materials and Methods

**Low-temperature helium plasma jet production at atmospheric pressure.** The plasma jet device is based on a dielectric barrier discharge configuration as previously described<sup>4,13,14,20</sup>. Two aluminum electrodes are wrapped around a quartz tube, and a generator delivers high-voltage mono-polar square pulses between them. The characteristics of the power supply are as follow: 10-kV voltage, 10-kHz frequency and 1- $\mu$ s pulse duration. Helium is delivered through the quartz tube with a flow rate of 3 L/min.

**Plasma-activated medium production.** PAM was produced by exposure of 100  $\mu\text{L}$  of Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) without pyruvate (Thermo Fisher Scientific, #41965) in 96-well plates to a low-temperature plasma jet. Cell culture medium was exposed to the plasma jet for 120 seconds. All PAM production was performed under the same experimental setup (applied voltage, frequency, pulse duration and gas flow) and at the same distance between the plasma jet tube output and the upper surface of the liquid medium, i.e., 2 cm. PAM was freshly produced when needed for the experiments; it was not stored before use.

**Cell culture.** Human colorectal carcinoma cell line HCT-116 was purchased from ATCC (# CCL-247). These cells were chosen for their ability to produce tumor spheroids<sup>4,58,59</sup>. Cells were grown in DMEM containing glucose, L-glutamine and pyruvate (Thermo Fisher Scientific, #41966), supplemented with 10% (v/v) heat-inactivated fetal calf serum, 100 U/ml penicillin and 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$  streptomycin. Cells were cultured at 37 °C in a humidified atmosphere containing 5%  $\text{CO}_2$ . Cells were regularly tested (every two weeks) for mycoplasma contamination using the MycoAlert Mycoplasma detection kit (Lonza).

**Spheroid generation.** For spheroid production, 500 cells were seeded in ultralow attachment 96-well plates with a round bottom (Corning, Fisher Scientific) and allowed to grow for 5 days in DMEM with glucose, L-glutamine and pyruvate (Thermo Fisher Scientific, #41966), supplemented with 10% (v/v) heat-inactivated fetal calf serum, 100 U/ml penicillin and 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$  streptomycin in the incubator before use as previously described<sup>4,58</sup>.

**Spheroid treatment with PAM.** Three distinct contact times ( $T_{\text{contact}}$ ) of spheroids with PAM were applied: 10 min, 4 h and 24 h. Briefly, after PAM production, spheroids were immersed in 96-well plates in 80  $\mu\text{L}$  of freshly produced PAM for 10 min, 4 h or 24 h. After exposure to PAM, they were then immersed in fresh non-activated complete cell culture medium for the remaining culture time.

In the case of successive treatments, spheroids were exposed to freshly produced PAM once, two times or three times at one- or two-day intervals and continuously cultivated within this PAM. Their growth curve was followed over 9 days as described below.

**Osmolarity and pH measurements.** Osmolarity of PAM was measured using a cryoscopic osmometer (Osmomat 030; Gonotec). The osmometer was calibrated using 50  $\mu\text{L}$  of solution of known osmolarity of 300 mosmol/kg. A total of 50  $\mu\text{L}$  of three independent samples were then measured for each condition (DMEM, PAM, He only). The pH of these solutions was measured using a microprocessor pH meter (pH 210) from Hanna Instruments from three independent samples for each condition (DMEM, PAM, He only).

**Spheroid growth curve analysis.** Growth of spheroids was followed by taking photographs with a wide-field light microscope before treatment and regularly after treatment for 3 or 9 days depending on the experiments using a Leica DMIRB microscope coupled to a coolSNAP HQ camera (Roper Scientific, Photometrics). The volume of the spheroids was determined following average diameter measurements using ImageJ software (NIH, Bethesda, USA) as previously described<sup>4,13,20</sup>.

**ATP quantification.** Cell viability in spheroids was determined using the CellTiter-Glo<sup>®</sup> 3D Cell Viability Assay (Promega) according to the manufacturer's instructions. Briefly, spheroids were incubated with 80  $\mu\text{L}$  of PAM for 24 h in a 96-well white plate. At different time points, the same volume of reagent (i.e., 80  $\mu\text{L}$ ) was added to the well and incubated at room temperature under strong agitation for 30 min. Then, luminescence was read with a microplate reader (CLARIOstar, BMG LabTech). Alternatively, spheroids were manually removed from wells to quantify ATP released in the PAM supernatant. A similar procedure to that described above was applied, namely, addition of the same volume of reagent, incubation under agitation at room temperature and luminescence quantification with a microplate reader. Finally, to assess whether reactive species generated in PAM affect ATP integrity, an experiment was performed with a standard solution of ATP (10 nM) incubated over 6 h in PAM.

**Mitochondrial dysfunction detection.** MitoSOX Red Mitochondrial SuperOxide indicator is a fluorogenic dye used for selective detection of superoxide in the mitochondria of living cells. Once in the mitochondria, this reagent is oxidized by superoxide to exhibit red fluorescence. Spheroids were immersed in 5  $\mu\text{M}$  of MitoSOX reagent solution and incubated for 10 min at 37 °C, protected from light. MitoSOX fluorescence ( $\lambda_{\text{ex}} = 510$ ;  $\lambda_{\text{em}} = 580$  nm) was observed within spheroids using a Leica DMIRB microscope coupled to a coolSNAP HQ camera (Roper Scientific, Photometrics). ImageJ software was used to process the fluorescence images.

**Plasma membrane integrity determination.** Propidium iodide is a probe that becomes highly fluorescent when intercalated within DNA<sup>60</sup>. However, it is a non-permeant probe, meaning it will only penetrate inside cells presenting defects in plasma membrane integrity. Briefly, at different time points after exposure to PAM, propidium iodide at a final concentration of 100  $\mu\text{M}$  was added to the wells to label cells presenting a defect in plasma membrane integrity. Propidium iodide fluorescence ( $\lambda_{\text{ex}} = 538$ ;  $\lambda_{\text{em}} = 617$  nm) was assessed with a Leica DMIRB microscope coupled to a coolSNAP HQ camera (Roper Scientific, Photometrics). ImageJ software was used to process fluorescence images. To quantify live propidium iodide penetration over time, spheroids exposed to PAM and 1  $\mu\text{M}$  propidium iodide were placed within an IncuCyte ZOOM live cell imaging system (Essen Bioscience). Acquisitions were obtained every 30 min for one day, and quantifications were performed with the software associated with the videomicroscope. A movie demonstrating propidium iodide penetration into spheroids exposed to PAM is available as Movie 1.

**Apoptosis detection.** The Image-iT™ LIVE Red Caspase-3 and -7 Detection Kit from Molecular Probes was used according to the manufacturer's protocol to visualize, by fluorescence microscopy, apoptosis induction in spheroids over time after exposure to PAM. Briefly, at different time points, spheroids exposed to PAM were incubated with FLICA kit reagent for 1 h in an incubator at 37 °C. After three washing steps in a large volume of PBS, the red fluorescence signal detected with a Leica DMIRB microscope coupled to a coolSNAP HQ camera is a direct measure of the amount of active caspase 3/7 in the treated spheroid. For convenience, images of apoptosis induction will be presented in green instead of red. To corroborate cell death induction through apoptosis, we also performed flow cytometry analysis of isolated cells from spheroids to detect precocious externalization of phosphatidylserine, detected with an annexin V-FITC probe while being vigilant that cells remained negative to propidium iodide staining. After incubation with PAM (Tcontact = 1, 4 and 6 h), spheroids were gently dissociated for 6 min in trypsin at 37 °C. For each replicate, four spheroids were dissociated and pooled to obtain enough cells for flow cytometry. Cells were processed according to the manufacturer's instructions (BioVision, Mountain View, CA, USA). Differences between values were assessed by one-way ANOVA followed by Dunnett's multiple comparisons post-test.

**Statistical analysis.** For every set of *in vitro* experiments, at least six biological replicates were analyzed. The reported data correspond to the means ± SEM of at least two independent experiments or to representative images from these experiments. Differences between data were assessed by Student's t-test. Overall statistical significance was set at  $p < 0.05$ .

## References

1. Arnold, M. *et al.* Global patterns and trends in colorectal cancer incidence and mortality. *Gut* **66**, 683–691 (2017).
2. Trachootham, D., Alexandre, J. & Huang, P. Targeting cancer cells by ROS-mediated mechanisms: a radical therapeutic approach? *Nat. Rev. Drug Discov.* **8**, 579 (2009).
3. Pelicano, H., Carney, D. & Huang, P. ROS stress in cancer cells and therapeutic implications. *Drug Resist. Updat.* **7**, 97–110 (2004).
4. Judee, F., Merbahi, N. & Yousfi, M. Genotoxic and Cytotoxic Effects of Plasma-Activated Media on Multicellular Tumor Spheroids. *Plasma Med.* **6**, 47–57 (2016).
5. Kaushik, N., Kumar, N., Kim, C. H., Kaushik, N. K. & Choi, E. H. Dielectric Barrier Discharge Plasma Efficiently Delivers an Apoptotic Response in Human Monocytic Lymphoma. *Plasma Process. Polym.* **11**, 1175–1187 (2014).
6. Laroussi, M. Nonthermal decontamination of biological media by atmospheric-pressure plasmas: review, analysis, and prospects. *IEEE Trans. Plasma Sci.* **30**, 1409–1415 (2002).
7. Lu, X. & Laroussi, M. Dynamics of an atmospheric pressure plasma plume generated by submicrosecond voltage pulses. *J. Appl. Phys.* **100**, 063302 (2006).
8. Duan, Y., Huang, C. & Yu, Q. Low-temperature direct current glow discharges at atmospheric pressure. *IEEE Trans. Plasma Sci.* **33**, 328–329 (2005).
9. Yousfi, M., Eichwald, O., Merbahi, N. & Jomaa, N. Analysis of ionization wave dynamics in low-temperature plasma jets from fluid modeling supported by experimental investigations. *Plasma Sources Sci. Technol.* **21**, 045003 (2012).
10. Adachi, T. *et al.* Plasma-activated medium induces A549 cell injury via a spiral apoptotic cascade involving the mitochondrial–nuclear network. *Free Radic. Biol. Med.* **79**, 28–44 (2015).
11. Utsumi, F. *et al.* Selective cytotoxicity of indirect nonequilibrium atmospheric pressure plasma against ovarian clear-cell carcinoma. *SpringerPlus* **3**, 398 (2014).
12. Wang, M. *et al.* Cold atmospheric plasma for selectively ablating metastatic breast cancer cells. *PLoS One* **8**, e73741 (2013).
13. Judée, F. *et al.* Short and long time effects of low temperature Plasma Activated Media on 3D multicellular tumor spheroids. *Sci. Rep.* **6**, 21421 (2016).
14. Chauvin, J., Judée, F., Yousfi, M., Vicendo, P. & Merbahi, N. Analysis of reactive oxygen and nitrogen species generated in three liquid media by low temperature helium plasma jet. *Sci. Rep.* **7**, 4562 (2017).
15. Chang, J. W. *et al.* Non-thermal atmospheric pressure plasma induces apoptosis in oral cavity squamous cell carcinoma: Involvement of DNA-damage-triggering sub-G1 arrest via the ATM/p53 pathway. *Arch. Biochem. Biophys.* **545**, 133–140 (2014).
16. Hirst, A. M. *et al.* Low-temperature plasma treatment induces DNA damage leading to necrotic cell death in primary prostate epithelial cells. *Br. J. Cancer* **112**, 1536–1545 (2015).
17. Yang, H. *et al.* Effects of atmospheric pressure cold plasma on human hepatocarcinoma cell and its 5-fluorouracil resistant cell line. *Phys. Plasmas* **22**, 122006 (2015).
18. Guerrero-Preston, R. *et al.* Cold atmospheric plasma treatment selectively targets head and neck squamous cell carcinoma cells. *Int. J. Mol. Med.* **34**, 941–946 (2014).
19. Kang, S. U. *et al.* Nonthermal plasma induces head and neck cancer cell death: the potential involvement of mitogen-activated protein kinase-dependent mitochondrial reactive oxygen species. *Cell Death Dis.* **5**, e1056 (2014).
20. Chauvin, J., Judée, F., Merbahi, N. & Vicendo, P. Effects of Plasma Activated Medium on Head and Neck FaDu Cancerous Cells: comparison of 3D and 2D response. *Anticancer Agents Med. Chem.* **18** (2018).
21. Ishaq, M., Evans, M. D. M. & Ostrikov, K. (Ken). Atmospheric pressure gas plasma-induced colorectal cancer cell death is mediated by Nox2–ASK1 apoptosis pathways and oxidative stress is mitigated by Srx–Nrf2 anti-oxidant system. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Mol. Cell Res.* **1843**, 2827–2837 (2014).
22. Kalghatgi, S., Friedman, G., Fridman, A. & Clyne, A. M. Endothelial cell proliferation is enhanced by low dose non-thermal plasma through fibroblast growth factor-2 release. *Ann. Biomed. Eng.* **38**, 748–757 (2010).
23. Yan, D., Sherman, J. H. & Keidar, M. Cold atmospheric plasma, a novel promising anti-cancer treatment modality. *Oncotarget* **8**, 15977–15995 (2017).
24. Mohades, S., Laroussi, M., Sears, J., Barezki, N. & Razavi, H. Evaluation of the effects of a plasma activated medium on cancer cells. *Phys. Plasmas* **22**, 122001 (2015).
25. Cooper, M. *et al.* Decontamination of surfaces from extremophile organisms using nonthermal atmospheric-pressure plasmas. *IEEE Trans. Plasma Sci.* **37**, 866–871 (2009).
26. Fridman, A. *Plasma chemistry*. (Cambridge university press, 2008).
27. Utsumi, F. *et al.* Effect of indirect nonequilibrium atmospheric pressure plasma on anti-proliferative activity against chronic chemo-resistant ovarian cancer cells *in vitro* and *in vivo*. *PLoS One* **8**, e81576 (2013).
28. Hattori, N. *et al.* Effectiveness of plasma treatment on pancreatic cancer cells. *Int. J. Oncol.* **47**, 1655–1662 (2015).
29. Pampaloni, F., Reynaud, E. G. & Stelzer, E. H. K. The third dimension bridges the gap between cell culture and live tissue. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **8**, 839–845 (2007).
30. Schwartz, M. A. & Chen, C. S. Deconstructing dimensionality. *Science* **339**, 402–404 (2013).
31. Yamada, K. M. & Cukierman, E. Modeling tissue morphogenesis and cancer in 3D. *Cell* **130**, 601–610 (2007).

32. Hirschhaeuser, F. *et al.* Multicellular tumor spheroids: an underestimated tool is catching up again. *J. Biotechnol.* **148**, 3–15 (2010).
33. Pannong, K. *et al.* Preferential killing of human lung cancer cell lines with mitochondrial dysfunction by nonthermal dielectric barrier discharge plasma. *Cell Death Dis.* **4**, e642 (2013).
34. Shiozaki, A., Ichikawa, D., Kosuga, T., Marunaka, Y. & Otsuji, E. Regulation of osmolality for cancer treatment. *J. Physiol. Sci.* **67**, 353–360 (2017).
35. Gorbanev, Y., Stehling, N., O'Connell, D. & Chechik, V. Reactions of nitroxide radicals in aqueous solutions exposed to non-thermal plasma: limitations of spin trapping of the plasma induced species. *Plasma Sources Sci. Technol.* **25**, 055017 (2016).
36. Costa, E. C. *et al.* 3D tumor spheroids: an overview on the tools and techniques used for their analysis. *Biotechnol. Adv.* **34**, 1427–1441 (2016).
37. Friedrich, J., Ebner, R. & Kunz-Schughart, L. A. Experimental anti-tumor therapy in 3-D: spheroids—old hat or new challenge? *Int. J. Radiat. Biol.* **83**, 849–871 (2007).
38. Maehara, Y., Anai, H., Tamada, R. & Sugimachi, K. The ATP assay is more sensitive than the succinate dehydrogenase inhibition test for predicting cell viability. *Eur. J. Cancer Clin. Oncol.* **23**, 273–276 (1987).
39. Ng, T. Y., Ngan, H. Y., Cheng, D. K. & Wong, L. C. Clinical applicability of the ATP cell viability assay as a predictor of chemoresponse in platinum-resistant epithelial ovarian cancer using nonsurgical tumor cell samples. *Gynecol. Oncol.* **76**, 405–408 (2000).
40. Mailloux, R. J. Teaching the fundamentals of electron transfer reactions in mitochondria and the production and detection of reactive oxygen species. *Redox Biol.* **4**, 381–398 (2015).
41. Van Boxem, W. *et al.* Anti-cancer capacity of plasma-treated PBS: effect of chemical composition on cancer cell cytotoxicity. *Sci. Rep.* **7**, 16478–16478 (2017).
42. Freund, E. *et al.* Physical plasma-treated saline promotes an immunogenic phenotype in CT26 colon cancer cells *in vitro* and *in vivo*. *Sci. Rep.* **9**, 634–634 (2019).
43. Gorbanev, Y., O'Connell, D. & Chechik, V. Non-Thermal Plasma in Contact with. *Water: The Origin of Species. Chem. Weinh. Bergstr. Ger.* **22**, 3496–3505 (2016).
44. Hara, H., Taniguchi, M., Kobayashi, M., Kamiya, T. & Adachi, T. Plasma-activated medium-induced intracellular zinc liberation causes death of SH-SY5Y cells. *Arch. Biochem. Biophys.* **584**, 51–60 (2015).
45. Hara, H., Sueyoshi, S., Taniguchi, M., Kamiya, T. & Adachi, T. Differences in intracellular mobile zinc levels affect susceptibility to plasma-activated medium-induced cytotoxicity. *Free Radic. Res.* **51**, 306–315 (2017).
46. Duan, J., Lu, X. & He, G. The selective effect of plasma activated medium in an *in vitro* co-culture of liver cancer and normal cells. *J. Appl. Phys.* **121**, 013302 (2017).
47. Iseki, S. *et al.* Selective killing of ovarian cancer cells through induction of apoptosis by nonequilibrium atmospheric pressure plasma. *Appl. Phys. Lett.* **100**, 113702 (2012).
48. Morciano, G. *et al.* Use of luciferase probes to measure ATP in living cells and animals. *Nat. Protoc.* **12**, 1542 (2017).
49. Adachi, T., Kano, A., Nonomura, S., Kamiya, T. & Hara, H. Histone deacetylase inhibitors stimulate the susceptibility of A549 cells to a plasma-activated medium treatment. *Arch. Biochem. Biophys.* **606**, 120–127 (2016).
50. Lin, A. *et al.* Uniform nanosecond pulsed dielectric barrier discharge plasma enhances anti-tumor effects by induction of immunogenic cell death in tumors and stimulation of macrophages. *Plasma Process. Polym.* **12**, 1392–1399 (2015).
51. Lin, A. *et al.* Nanosecond-Pulsed DBD Plasma-Generated Reactive Oxygen Species Trigger Immunogenic Cell Death in A549 Lung Carcinoma Cells through Intracellular Oxidative Stress. *Int. J. Mol. Sci.* **18**, 966 (2017).
52. Tanaka, H. *et al.* Non-thermal atmospheric pressure plasma activates lactate in Ringer's solution for anti-tumor effects. *Sci. Rep.* **6**, 36282 (2016).
53. Sato, Y. *et al.* Effect of Plasma-Activated Lactated Ringer's Solution on Pancreatic Cancer Cells *In Vitro* and *In Vivo*. *Ann. Surg. Oncol.* **25**, 299–307 (2018).
54. Takeda, S. *et al.* Intraperitoneal administration of plasma-activated medium: proposal of a novel treatment option for peritoneal metastasis from gastric cancer. *Ann. Surg. Oncol.* **24**, 1188–1194 (2017).
55. Wada, N. *et al.* Effect of plasma-activated medium on the decrease of tumorigenic population in lymphoma. *Pathol.-Res. Pract.* **213**, 773–777 (2017).
56. Lin, A. *et al.* Uniform Nanosecond Pulsed Dielectric Barrier Discharge Plasma Enhances Anti-Tumor Effects by Induction of Immunogenic Cell Death in Tumors and Stimulation of Macrophages. *Plasma Process. Polym.* **12**, 1392–1399 (2015).
57. Miller, V., Lin, A. & Fridman, A. Why Target Immune Cells for Plasma Treatment of Cancer. *Plasma Chem. Plasma Process.* **36**, 259–268 (2016).
58. Gibot, L. & Rols, M.-P. 3D spheroids' sensitivity to electric field pulses depends on their size. *J. Membr. Biol.* **246**, 745–750 (2013).
59. Gibot, L., Wasungu, L., Teissié, J. & Rols, M.-P. Antitumor drug delivery in multicellular spheroids by electroporation. *J. Controlled Release* **167**, 138–147 (2013).
60. Hezel, M., Ebrahimi, F., Koch, M. & Dehghani, F. Propidium iodide staining: a new application in fluorescence microscopy for analysis of cytoarchitecture in adult and developing rodent brain. *Micron* **43**, 1031–1038 (2012).

## Acknowledgements

We would like to thank Elisabeth Bellard for her help in fluorescence imaging and the Imaging and anexplo Core Facilities TRI-IPBS. This study was supported by research grant from the University Paul Sabatier, Occitanie Regional Council and Cancéropôle Grand Sud Ouest (GSO) grant 2017 E21 (L.G.). Julie Chauvin was supported by a fellowship from Occitanie Regional Council and University Paul Sabatier. Role of the Sponsor: The sponsor had no role in any aspect of the study, including data collection and analysis, manuscript preparation, or authorization for publication.

## Author Contributions

J.C. carried out experiments, prepared figures and provided assistance in manuscript writing. L.G. conceived and carried out the *in vitro* experiments, provided data analysis, contributed to the writing of the manuscript and obtained GSO funding. E.G. performed flow cytometry experiments. M.G. gave critical analysis of the results and revised the manuscript, M.-P.R. gave critical analysis of the results and revised the manuscript. N.M. conceived and supervised the study project, provided data analysis and interpretation, wrote the manuscript and obtained funding. P.V. conceived and supervised the study project, provided data analysis and interpretation, wrote the manuscript and obtained funding. All authors reviewed and approved the final manuscript.

## Additional Information

**Supplementary information** accompanies this paper at <https://doi.org/10.1038/s41598-019-41408-6>.

**Competing Interests:** The authors declare no competing interests.

**Publisher's note:** Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

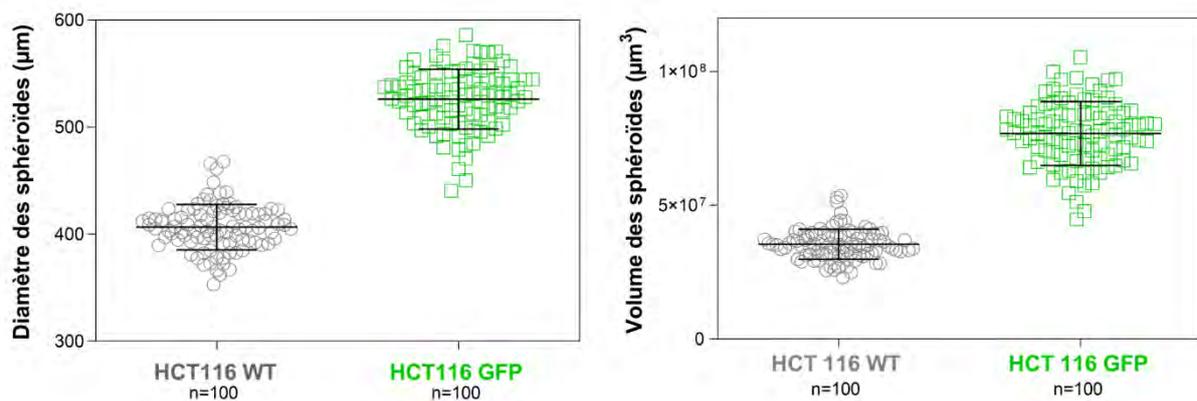


**Open Access** This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons license, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons license, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons license and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this license, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>.

© The Author(s) 2019

### 3. Validation de l'effet du P-A DMEM sur le sphéroïde de cellules HCT 116 exprimant la GFP

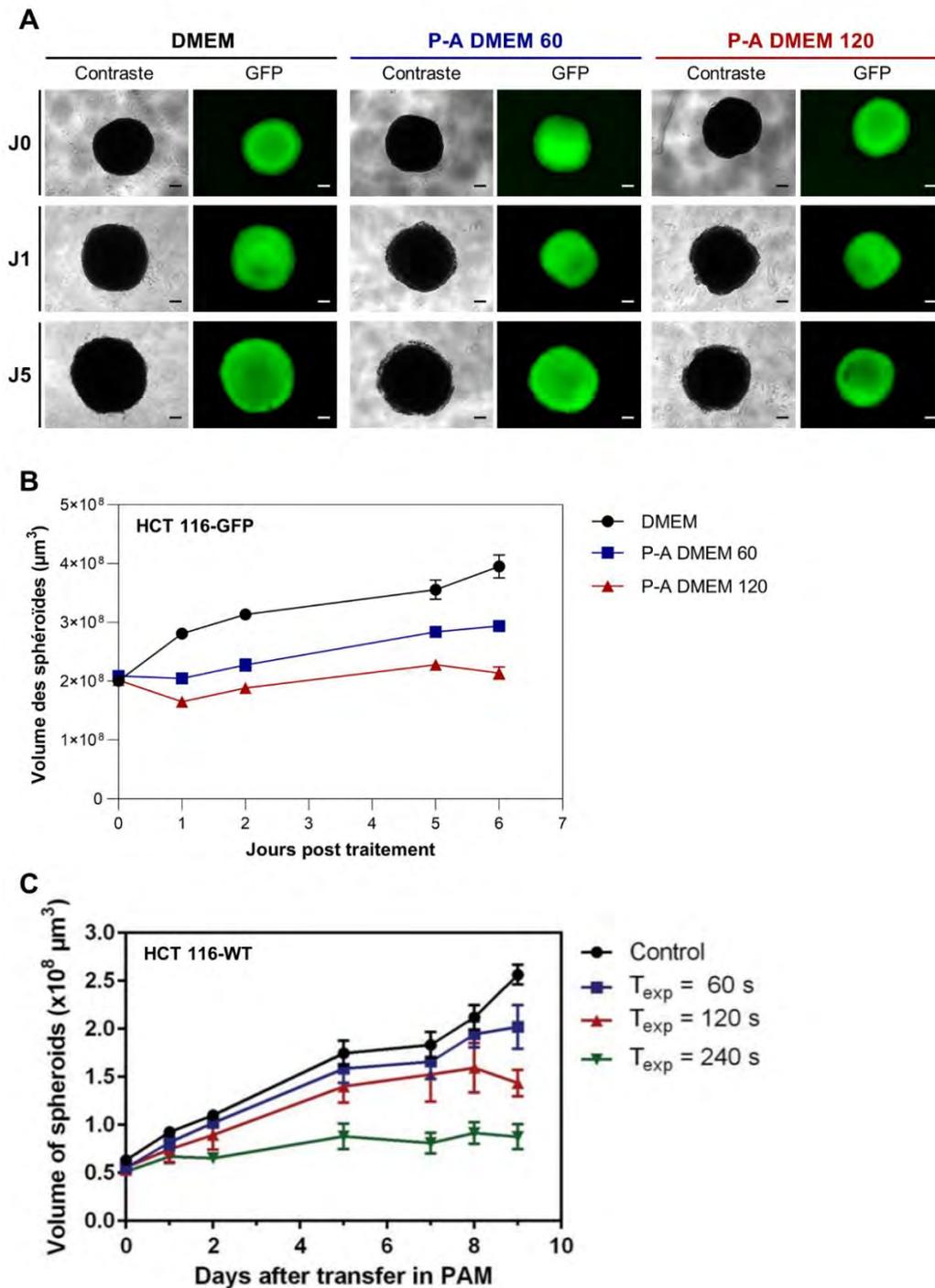
Pour la suite des travaux de thèse, nous avons décidé d'utiliser des cellules HCT 116 exprimant de manière constitutive la GFP (transduite précédemment dans l'équipe (Pelofy *et al.*, 2012). En effet, nous avons choisi cette lignée plutôt que la lignée sauvage (WT) dans le but d'utiliser la GFP comme marqueur indirect de viabilité et ainsi de suivre en temps réel, grâce à la fluorescence, le devenir des cellules au sein du sphéroïde. Les cellules HCT 116-GFP, ont un temps de doublement en culture monocouche plus faible que la lignée WT (16 heures versus 18 heures). Lorsque ces deux lignées cellulaires sont utilisées pour produire des sphéroïdes, avec un nombre de cellules identique à l'ensemencement de 500/ puits, nous avons mesuré que la taille des sphéroïdes atteinte 5 jours post-ensemencement est plus élevée pour les HCT 116-GFP que pour les HCT 116-WT (**Figure 36**).



**Figure 36 : Diamètre et volume des sphéroïdes de cellules HCT 116 sauvage (WT) et exprimant la Green Fluorescent Protein (GFP).** Diamètres mesurés et volumes calculés à partir des micrographes en contraste de phase des sphéroïdes (Volume sphéroïde =  $4\Pi*(r^3/3)$  avec  $r$  le rayon du sphéroïde).

Dans un premier temps, nous avons évalué l'effet du DMEM activé par plasma sur les sphéroïdes de cellules HCT 116-GFP en termes de croissance afin de comparer avec les résultats obtenus avec la lignée WT. Des sphéroïdes de cellules HCT 116-GFP ont été traités à cinq jours de croissance avec du P-A DMEM exposé pendant 60 ou 120 secondes (temps utilisés précédemment). Les sphéroïdes sont baignés pendant 4 heures dans le P-A DMEM puis remis dans du milieu de culture sans pyruvate pour un suivi de croissance pendant 6 jours post traitement. Le suivi de croissance est effectué tous les jours par microscopie à fluorescence à champ large. Les courbes de suivi de croissance obtenues à partir des micrographes de fluorescence GFP (tel que décrit dans la **section 11.a du matériel et méthode**) des sphéroïdes contrôles (non traité et laissés dans le DMEM sans pyruvate) et des sphéroïdes traités avec du

P-A DMEM exposés 60 ou 120 secondes (P-A DMEM 60 et 120, respectivement) sont présentées et comparées aux résultats obtenus précédemment avec la lignée WT en **Figure 37**.



**Figure 37** : Suivi de croissance des sphéroïdes HCT 116- GFP (B) et WT (C) traités avec du milieu de culture DMEM exposés différents temps au jet de plasma. (A) Micrographes de contraste de phase et de fluorescence GFP des sphéroïdes HCT 116-GFP avant traitement (J0), 1 (J1) et 5 (J5) jours après traitement. Barre d'échelle : 100  $\mu\text{m}$ . (B) Courbes de croissance des sphéroïdes HCT 116-GFP présentées en (A), les volumes sont calculés à partir des micrographes de fluorescence GFP (Volume sphéroïde =  $4\Pi*(r^3/3)$  avec  $r$  le rayon du sphéroïde). N=1 expérience, n= 12 sphéroïdes, volume moyen  $\pm$  déviation standard. (C) Courbes de croissance de sphéroïdes de cellules HCT 116-WT issues de (Judée *et al.*, 2016b) traités avec du P-A DMEM exposé 60, 120 ou 240 secondes au plasma.

Les cellules affectées par le traitement sont visibles sur les images en contraste de phase 24 heures après traitement, ces dernières sont exclues du sphéroïde et forment une couronne moins contrastée que les autres cellules. Néanmoins, les micrographes de fluorescence GFP permettent de valider que ces cellules sont bien mortes puisqu'elles n'expriment plus la GFP et n'apparaissent donc pas sur ces images de microscopie à fluorescence. Ainsi, il est apparu plus pertinent d'effectuer les mesures sur ces images sans introduire de biais lié à l'appréciation de l'expérimentateur.

Tout comme pour les sphéroïdes de cellules HCT 116-WT, la proportion de cellules mortes qui se détachent dans les 24 heures suivant le traitement est directement corrélée au le temps d'exposition des milieux au jet de plasma d'hélium, plus ces derniers ont été exposés longtemps, plus une grande quantité de cellules se retrouve affectée par le traitement. Il est notable que pour une incubation dans du P-A DMEM exposé 120 secondes au jet de plasma (courbe rouge), les sphéroïdes de cellules HCT 116-GFP sont plus affectés que les sphéroïdes de cellules HCT 116-WT. Deux jours après le traitement, aux vues des pentes des courbes, les sphéroïdes HCT 116-GFP traités reprennent une croissance similaire à celle du contrôle.

Ainsi, ces expériences nous ont permis, d'une part, de montrer que les sphéroïdes de cellules HCT 116-GFP sont sensibles au traitement par P-A DMEM, et d'autre part, de valider l'utilisation du marqueur fluorescent GFP comme outil pour évaluer la viabilité des cellules et ainsi différencier les cellules viables des cellules mortes et réaliser le suivi de croissance.

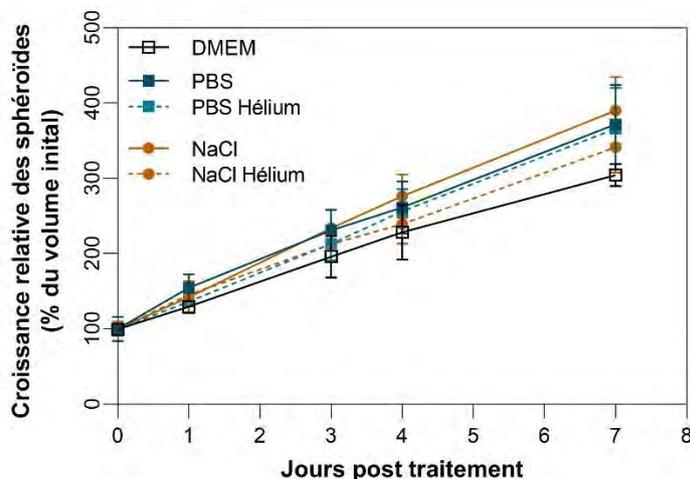
#### 4. Effets anti-cancéreux de solutions salines activées par plasma froid - Résumé de l'article

##### 2

La composition complexe des milieux de culture impacte fortement sur la composition finale de ces milieux après exposition au plasma. Il est difficile de prévoir et de contrôler la composition des PAM, de plus ces milieux enrichis en nutriments (acides aminés, protéine) ne sont pas injectables à l'homme, ce qui rend donc leur utilisation peu pertinente pour une application en clinique. C'est pour cette raison que nous avons par la suite évalué le potentiel anti-cancéreux de solutions dites physiologiques, c'est-à-dire isotonique, parfaitement toléré par les cellules, injectable à l'homme et donc transposables pour des applications en clinique. Deux solutions salines ont été utilisées pour cette étude : le tampon phosphate salin sans calcium et sans magnésium (PBS) et le chlorure de sodium à 0,9 % (NaCl). Sur la base des expériences effectuées précédemment, nous avons choisi un temps d'exposition de 120 secondes du PBS et du NaCl. Dans ces conditions une évaporation maximale de 20% des liquides lors de l'exposition au jet de plasma est observée. Les effets de ces solutions activées par plasma (P-A PBS et P-A NaCl, pour plasma-activated PBS et NaCl) ont été évalués sur deux lignées cellulaires : les cellules HCT 116-GFP utilisées précédemment et les cellules chimio-résistantes de carcinome ovarien, transduites pour exprimer la GFP et la Luciférase, SKOV-3-GFP-Luc (lignée doublement transduite avec la Luciférase pour des applications *in vivo*) (Coustets *et al.*, 2020) dans le but de voir si la réponse au traitement est lignée cellulaire dépendante.

Nous avons, dans un premier temps, vérifié qu'une incubation de 4 heures des sphéroïdes dans du PBS ou du NaCl non exposés au jet de plasma n'avait pas d'effet sur leur croissance. Nous avons également vérifié que l'augmentation d'osmolarité du PBS et NaCl due à l'évaporation lors de l'exposition au jet de plasma, reportée précédemment (Article 1, tableau 1) ainsi que dans l'article 2 (Figure 4), n'avait pas d'effet sur la croissance des sphéroïdes. Pour ce faire, les solutions de PBS et de NaCl ont été exposées au flux d'Hélium sans mise sous tension, afin d'obtenir une évaporation similaire à celle obtenue lors de l'exposition au jet de plasma. Les courbes de croissance des sphéroïdes témoins incubés dans les différents milieux (DMEM, PBS, NaCl, PBS Hélium et NaCl Hélium) sont présentées en **figure 38**. Les courbes montrent que l'incubation de 4 heures dans les solutions non exposées au jet de plasma ou exposées au flux d'hélium seul n'affectent pas de façon significative la croissance des sphéroïdes. Ainsi, les effets que nous observerons lors des traitements par P-A PBS et P-A NaCl pourront être attribués à l'exposition au jet plasma et non pas à l'incubation de 4 heures dans ces liquides ou

à la variation d'osmolarité induite lors de l'exposition au jet de plasma. Ces expériences ont été effectuées uniquement sur les sphéroïdes de cellules HCT 116-GFP.



**Figure 38 : Influence des solutions PBS et NaCl non exposées au jet de plasma ou exposées au flux d'hélium seul sur la croissance des sphéroïdes de cellules HCT 116-GFP.** Les solutions de PBS et de NaCl sont exposées au flux d'hélium (sans mise sous tension) pendant 4 minutes, temps nécessaire pour avoir une évaporation équivalente à celle obtenue lors d'une exposition de 2 minutes au jet de plasma froid. À la fin de l'incubation de 4 heures, les sphéroïdes sont rincés puis transférés dans du nouveau milieu de culture DMEM complet (sans pyruvate) et remis en culture à 37°C pour un suivi de croissance sur 7 jours. Les courbes de croissance sont obtenues à partir de la mesure de l'aire de la fluorescence GFP (cellules viables) comme décrit dans le matériel et méthode section 8. N=1 expérience, n=6 sphéroïdes/condition, moyenne ± déviation standard.

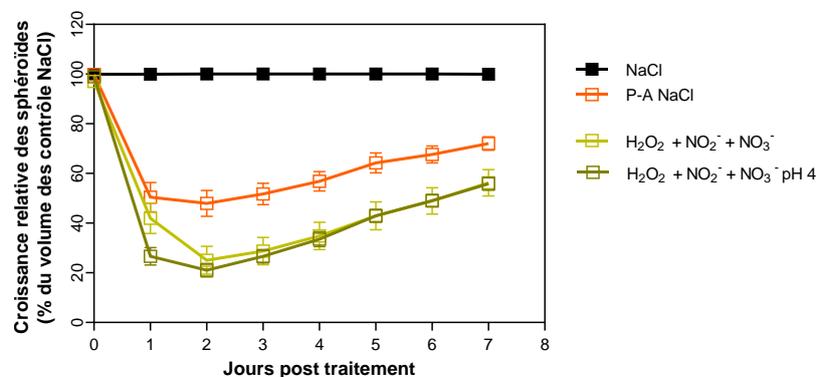
Article 2 : Anti-cancer potential of two plasma-activated liquids : implication of long-lived reactive oxygen and nitrogen species. Elena Griseti, Nofel Merbahi, Muriel Golzio. *Cancers* (2020) 12, 721.

Pour la suite des travaux de thèse, nous avons décidé de garder les paramètres optimisés avec les milieux de culture, soit une exposition au jet de plasma de 2 minutes et une incubation des sphéroïdes avec le P-A PBS et le P-A NaCl de 4 heures à 37°C. Nous avons montré que le P-A PBS tue plus efficacement les cellules cancéreuses car la couronne de cellules affectées par le traitement qui se détachent à 24 heures est plus épaisse avec le P-A PBS qu'avec le P-A NaCl, et pour les deux lignées. La différence est néanmoins moins marquée pour les sphéroïdes de cellules SKOV-3-GFP-Luc. Nous avons utilisé de l'iodure de propidium (1  $\mu$ M), intercalant de l'ADN fluorescent rouge qui rentre uniquement dans les cellules dont l'intégrité membranaire est affectée, pour visualiser en temps réel la population de cellules mortes. Des cinétiques de mort cellulaire ont été tracées et ont confirmé les résultats obtenus sur les courbes de croissance des sphéroïdes : la population de cellules mortes (PI positives) augmente plus rapidement avec le P-A PBS, et se situe dans les couches plus profondes du sphéroïde.

Par la suite, nous avons vérifié si les différences observées entre le P-A PBS et le P-A NaCl, en termes de toxicité et de cinétique de mort cellulaire, sont dues à l'enrichissement en espèces réactives de l'oxygène et de l'azote (RONS) des deux solutions pendant l'exposition au plasma. Comme dit dans l'introduction, parmi les RONS qui sont produites dans les PAM et PAL, le peroxyde d'hydrogène ( $H_2O_2$ ), le nitrite ( $NO_2^-$ ) et le nitrate ( $NO_3^-$ ) semblent être principalement responsables des effets cytotoxiques et génotoxiques attribués. Ainsi, nous avons dosé le  $H_2O_2$ , le  $NO_2^-$  et le  $NO_3^-$  directement après l'exposition de 2 minutes au jet de plasma des solutions. Des quantités plus faibles des trois espèces ont été détectées dans le NaCl par rapport au PBS. De plus, une acidification du NaCl est notable après l'exposition au jet de plasma tandis que le PBS, solution tamponnée, ne présente pas de modification de pH.

Enfin, le  $H_2O_2$ , le  $NO_2^-$  et le  $NO_3^-$  ont été ajoutés, seuls ou combinés, dans les solutions de PBS et de NaCl afin de traiter les sphéroïdes et d'étudier l'effet de chacune des espèces sur la croissance et donc leur implication dans la toxicité du P-A PBS et du P-A NaCl. Ces expériences nous ont permis de mettre en évidence que la mortalité engendrée dans les sphéroïdes correspond à une réponse RONS dose-dépendante et que le  $H_2O_2$  et le  $NO_2^-$  sont nécessaires pour affecter la croissance des sphéroïdes HCT 116-GFP aussi efficacement que le P-A PBS et le P-A NaCl. En revanche, le  $H_2O_2$  seul suffit à affecter les sphéroïdes de cellules SKOV-3-GFP-Luc de la même façon que les PAL.

Il est important de noter ici que la variable pH n'a pas été prise en compte dans ces expériences. En effet, lorsque les RONS ont été ajoutés au NaCl, nous n'avons pas acidifié la solution afin de mimer les propriétés du P-A NaCl. Nous avons donc par la suite effectué cette expérience, en aval de la publication de l'article 2, sur les sphéroïdes de cellules HCT 116-GFP et aucune différence n'a été observée entre le NaCl additionné des RONS à pH 6,5 et le NaCl additionné des RONS acidifié à pH 4 (**Figure 39**).



**Figure 39 : Influence du pH extracellulaire sur la cytotoxicité du NaCl enrichies en RONS.** Courbes de croissance des sphéroïdes HCT 116-GFP incubés dans du NaCl (témoin), du P-A NaCl, et du NaCl contenant 515  $\mu$ M de peroxyde d'hydrogène  $\pm$  nitrite (160  $\mu$ M)  $\pm$  nitrate (180  $\mu$ M) pH 6,5 ou pH 4. N=1 expérience, n=8 sphéroïdes, moyenne  $\pm$  déviation standard.

5. Article 2 : Anti-cancer potential of two plasma-activated liquids : implication of long-lived reactive oxygen and nitrogen species. Elena Grisetti, Nofel Merbahi, Muriel Golzio. *Cancers* (2020) 12, 721.

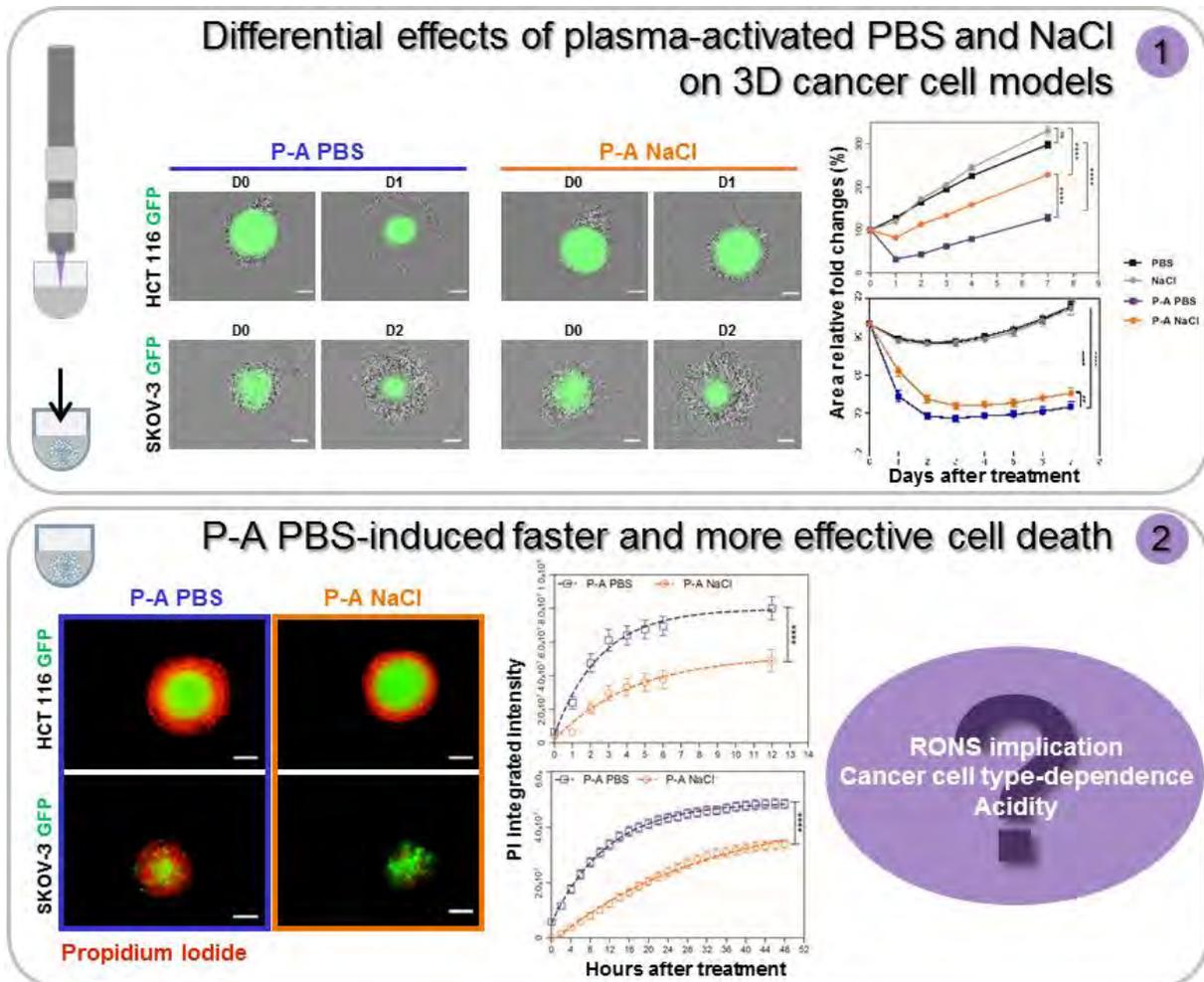


Figure 40 : Résumé graphique de l'article 2.

Article

# Anti-Cancer Potential of Two Plasma-Activated Liquids: Implication of Long-Lived Reactive Oxygen and Nitrogen Species

Elena Griseti <sup>1,2</sup>, Nofel Merbahi <sup>2,\*</sup> and Muriel Golzio <sup>1,\*</sup> 

<sup>1</sup> CNRS UMR 5089, Institut de Pharmacologie et de Biologie Structurale, IPBS, 205 Route de Narbonne, 31077 Toulouse, France; elena.griseti@ipbs.fr

<sup>2</sup> CNRS UMR 5213, Laboratoire des Plasmas et Conversion d'Énergie, Université Toulouse III- Paul Sabatier, LAPLACE, 118 Route de Narbonne-Bât, 3R3-31062 Toulouse, France

\* Correspondence: nofel.merbahi@laplace.univ-tlse.fr (N.M); Muriel.golzio@ipbs.fr (M.G)

Received: 14 February 2020; Accepted: 13 March 2020; Published: 19 March 2020



**Abstract:** Cold atmospheric plasma-exposed culture medium may efficiently kill cancer cells in vitro. Due to the complexity of the medium obtained after plasma exposure, less complex physiological liquids, such as saline solutions and saline buffers, are gathering momentum. Among the plethora of reactive oxygen and nitrogen species (RONS) that are produced in these plasma-activated liquids, hydrogen peroxide, nitrite and nitrate appear to be mainly responsible for cytotoxic and genotoxic effects. Here, we evaluated the anti-cancer potential of plasma-activated phosphate-buffered saline (P-A PBS) and sodium chloride 0.9% (P-A NaCl), using a three-dimensional tumor model. Two epithelial cancer cell lines were used to evaluate cellular effects of either P-A PBS or P-A NaCl. Human colorectal cancer cells HCT 116 and human ovarian carcinoma, SKOV-3 were used to investigate the manner by which different cell types respond to different plasma-activated liquids treatments. Our investigations indicate that P-A PBS is more efficient than P-A NaCl mainly because RONS are produced in larger quantities. Indeed, we show that the cytotoxicity of these liquids directly correlates with the concentration of hydrogen peroxide and nitrite. Moreover, P-A PBS induced a faster-occurring and more pronounced cell death, which arose within deeper layers of the 3D multicellular spheroid models.

**Keywords:** cancer; plasma-activated liquids; multicellular tumor spheroids; long-lived reactive oxygen and nitrogen species

## 1. Introduction

Cold atmospheric plasma (referred as ‘plasma’) is described as a room temperature ionized gas generated at atmospheric pressure. Plasma generates reactive oxygen and nitrogen species (RONS), which, once applied to cancer cells, have the potential to induce DNA damages leading to cell apoptosis [1] or cause immunogenic cell death [2–4]. More importantly, cancer cells appear to be more sensitive to plasma than healthy cells [5–9]. This selectivity could be explained by the RONS-induced stress tolerance threshold, which is higher in normal cells than cancer cells, due to their increased production of reactive oxygen species [10–12]. Thus, this feature could be exploited as a strategy for selective cancer therapy. As direct treatment by plasma is spatially limited to the surface, another strategy has been developed and involves the use of solutions exposed to plasma. The latter can be injected into deep-seated tissues, and could overcome the spatial limits of plasma direct applications. The exposure of cell culture media, water, or saline solutions that contain a high amount of RONS is widely studied for biomedical applications, such as regenerative medicine or cancer therapy [13,14].

Hydrogen peroxide ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ), nitrite ( $\text{NO}_2^-$ ) and nitrate ( $\text{NO}_3^-$ ) have been described as the three main RONS responsible for plasma-exposed solutions antitumor effects [15], as other short-lived species are quenched very rapidly [16]. The complex process that drives RONS diffusion/penetration within cells and the subsequent chemical reactions remain unclear. More recently, a chemical model has been proposed by Bauer, speculating that an auto-amplificatory response of tumor cells, caused by singlet oxygen, occurs after being in direct contact with plasma or with plasma-activated solutions, leading to subsequent reaction and self-perpetuation of toxicity [17].

Most of the studies focusing on plasma-activated culture media for cancer cell treatment show that the contents of these solutions play a key role in their anticancer effects. Indeed, the presence of amino acids, fetal bovine serum, and pyruvate have an impact on the final composition of the plasma-activated solutions and the rate of RONS produced [18,19]. Therefore, there is now a growing interest in switching to physiological and stable solutions, such as water, physiological buffers, and saline solutions, in order to have better control over the species generated after plasma exposure, with the objective of translating it to in vivo applications. A comparative study with six different physiological liquids has been reported recently and referenced their effects in vitro on 2D plated CT26 colorectal cancer cells in terms of cell death, metabolic activity, and cell morphology and displacement [20].

SKOV-3 and HCT-116 are both epithelial cancer cell lines. In a recent study, we demonstrated that a plasma-activated medium was efficient to kill HCT-116 cells in three-dimensional spheroid models [21]. We described the cascade of events leading to cell death: ATP depletion, DNA damages, and mitochondrial dysfunction. These effects induce cell apoptosis and spheroid volume decrease after treatment in vitro. SKOV-3 cells are known as a chemo-resistant ovarian cancer cell line. Once injected in mice, SKOV-3 disseminates and form small nodules in the peritoneal cavity. Thus, the eradication of the small aggregates formed by these cells is more challenging. Moreover, SKOV-3 are among ovarian cells, which are the most resistant to plasma treatment [22]. When treated with plasma-exposed culture medium, SKOV-3 cells were less sensitive than ES2 cells (clear cell ovarian adenocarcinoma) [23]. Using these two different cell lines pave the way for future in vivo investigations to test two different strategies of plasma-exposed solutions injection on mice (intratumoral or intraperitoneal).

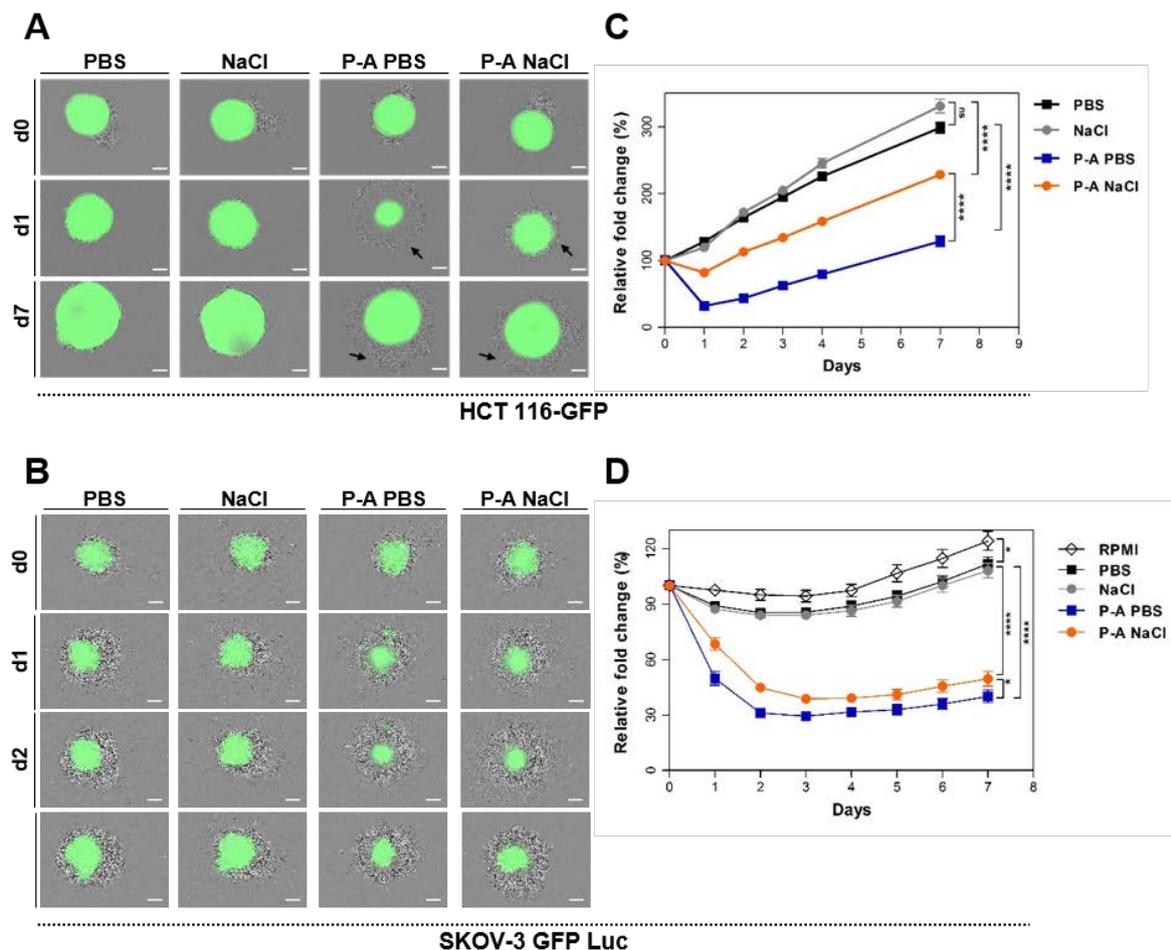
In this context, we here present a comparative study involving two different physiological liquids: the phosphate-buffered saline (PBS) and the sodium chloride 0.9% solution (NaCl). In this study, we investigated the anti-cancer properties of both PBS and NaCl exposed to plasma (referred to as 'P-A PBS' and 'P-A NaCl', respectively) using a three-dimensional model, the multicellular spheroid. This model mimics an avascular micro-tumor, and is more complex than standard 2D cell cultures, enabling us to better predict in vivo response [24]. HCT 116 human colorectal cancer cell line expressing green fluorescent protein (GFP) and SKOV-3 human ovarian adenocarcinoma cell line expressing GFP and luciferase (Luc) (were used, in order to investigate the cell-line dependency on the treatment's outcome. We evaluated the effect of P-A PBS and P-A NaCl on spheroids' growth and correlated the treatment with the cell death kinetics. We also show that the long-lived RONS,  $\text{H}_2\text{O}_2$ , and  $\text{NO}_2^-$  are the main factors inducing cell death within the spheroid in a dose-dependent manner.

## 2. Results

### 2.1. Plasma-Activated PBS (P-A PBS) Affects Spheroids Growth to a Greater Extent than Plasma-Activated NaCl (P-A NaCl)

We first evaluated the effect of P-A PBS and P-A NaCl on HCT 116-GFP and SKOV-3 Luc GFP spheroids' growth (Figure 1A–D). We previously optimized the plasma exposure time and cell contact-time to 120 s and 4 h, respectively [25]. At day 5 after cells' seeding, the spheroids underwent treatment with either P-A PBS or P-A NaCl. At the time of treatment, the spheroids exhibited different sizes, depending on the cell line (~500  $\mu\text{m}$  of diameter for HCT-116 GFP and ~300  $\mu\text{m}$  of diameter for SKOV-3 GFP-Luc). Figure 1A,B show bright-field and GFP fluorescence overlay micrographs. Spheroids' growth, represented as a relative fold change in spheroid equatorial area over time, is shown in Figure 1C,D. For HCT 116-GFP spheroids, dead detached cells were observed at the external layer of

the spheroids 24 h after treatment (day 1) after treatment with both plasma-activated liquids. This phenomenon reflects in growth curves, where a loss of 55% and 20% of the areas was observed 24 h after treatment with P-A PBS and P-A NaCl, respectively. During the following days, spheroids displayed a similar growth rate to the controls. After 7 days of culture, spheroids treated with P-A PBS still displayed a smaller size than spheroids treated with P-A NaCl.



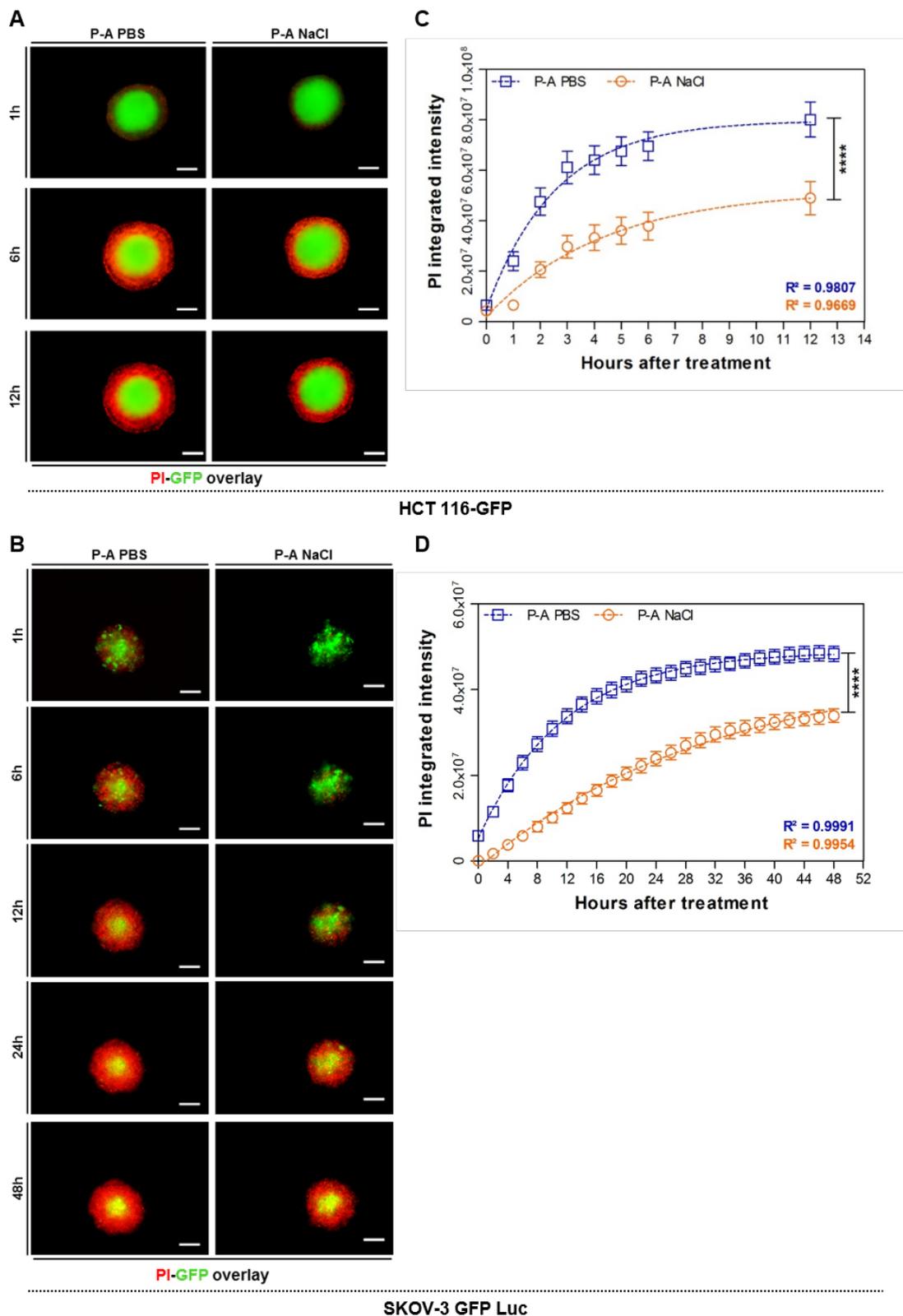
**Figure 1.** Spheroids' responsiveness to plasma-activated PBS (P-A PBS) and plasma-activated NaCl (P-A NaCl). Spheroids were incubated in PBS, NaCl, P-A PBS or P-A NaCl for 4 h before being cultured for 7 days for growth follow-up. (A,B) Bright-field and green fluorescence micrograph overlays (viable cells) of HCT 116-GFP (A) and SKOV-3 GFP Luc (B) spheroids at d0 (before treatment), d1, d2, and d7 after treatment. The scale bar is set at 200  $\mu$ m. Black arrows indicate cell debris. (C,D) Graphs representing the relative fold change (percentage) of spheroid areas as a function of time. Areas were measured from the GFP fluorescence micrographs. Two-way ANOVA, \*\*\*\*  $p < 0.0001$ ; ns: non-significant  $p > 0.05$ .  $N = 6$  and 3 independent experiments for HCT 116-GFP and SKOV-3 GFP Luc, respectively, with  $n = 8$  spheroids per experiment.

A decrease of 60% and 40% of the SKOV-3 GFP Luc spheroid areas was observed one day after treatment with P-A PBS and P-A NaCl, respectively. The SKOV-3 GFP Luc spheroids appeared to be less proliferative than HCT-116 GFP as visible on growth curves of PBS and NaCl control spheroids. Thus, during the 7 days following the treatment, the spheroids growth decreased in comparison to controls. For both cell lines, spheroids responded differently to P-A PBS and P-A NaCl treatments; more precisely, P-A PBS appeared to be more efficient than P-A NaCl.

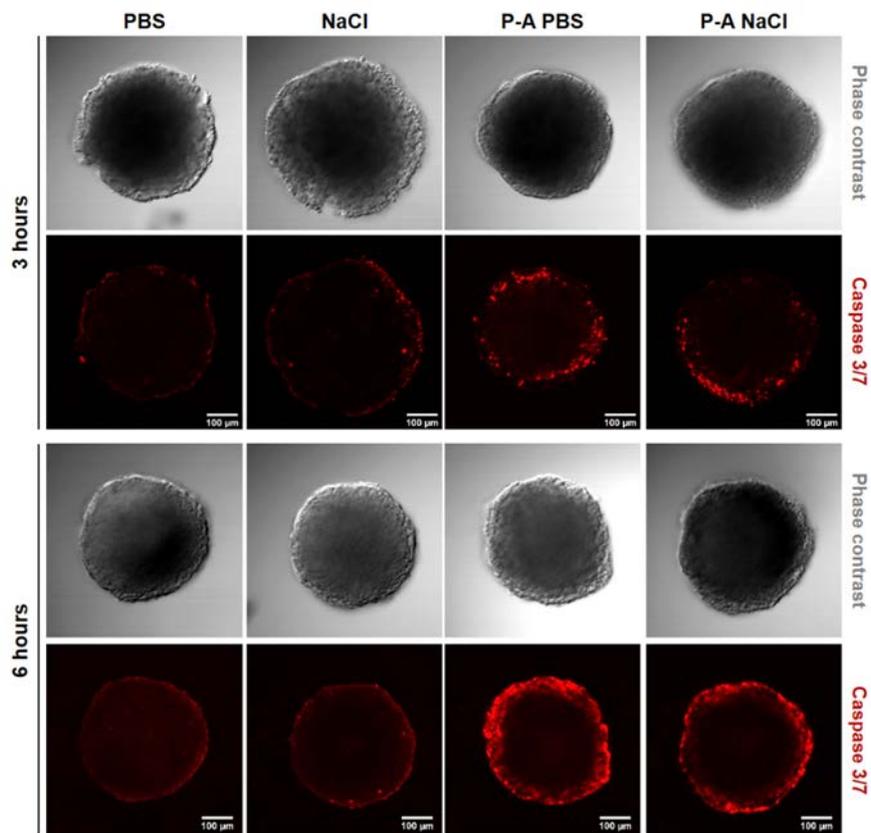
## 2.2. Plasma-Activated PBS (P-A PBS) Induces Deeper and Faster Cell Death

To determine the depth of cell death within the layers of multicellular spheroids, we assessed the real-time propidium iodide uptake. Propidium iodide (PI) is a red-fluorescent intercalating agent that penetrates the cells and binds to the DNA when the plasma membrane loses its integrity. PI uptake thus reflects cell mortality. As we observed that one day after treatment HCT 116-GFP spheroids were restored to a normal growth rate, we appraised the PI uptake within the 24 h following the treatment. Figure 2A shows overlaid micrographs of the PI and GFP fluorescence 1, 6, and 12 h after treatment (time-lapse video microscopy films are available in the supplementary data) on HCT 116-GFP spheroids. These micrographs confirmed that PI uptake was higher with P-A PBS treatment, compared to P-A NaCl-treated spheroids. Interestingly, these differences were visible 6 h after treatment. The PI fluorescence across the spheroid depth was plotted on an hourly basis during the first 24 h. The plots are shown in supplementary Figure S1, where each solid line corresponds to a time point (from 1 to 6, and 24 h after treatment). For both treatments, two peaks were observed at the edge of the spheroids, with the highest peak area when P-A PBS treatment was performed compared to P-A NaCl treatment. From these analyses, we set a data analysis protocol to remove the out-of-focus PI fluorescence, as described in section H of the “Materials and Methods” and SI (supplementary Figure S2). The kinetic of PI uptake was obtained from images (Figure 2C,D). For both cell lines, it clearly appeared that P-A PBS led to a faster penetration of PI compared to P-A NaCl. Using a non-linear regression fit, one-phase association model:  $Y = Y_0 + (\text{plateau} - Y_0) (1 - e^{-Kt})$ , where  $Y_0$  is the initial value of PI fluorescence intensity,  $K$  is the rate constant and  $t$  is time in hours, we extracted the plateau and the half-times of PI uptake for each condition. For HCT 116-GFP spheroids, the plateau obtained was 1.5 times higher with P-A PBS than with P-A NaCl treatment. This indicates that the amount of PI (i.e., cell death) was more important when spheroids were treated with P-A PBS. Surprisingly, the half-time of PI uptake, corresponding to the time needed to obtain 50% of PI maximal intensity, was 1.6 times higher for P-A NaCl than for P-A PBS (P-A PBS: 1.8 h, P-A NaCl: 3 h). This increase in the P-A PBS induced mortality kinetic was also given by the rate constants ( $K$ ) extracted from the equation. The values were 0.4 and 0.2 for P-A PBS and P-A NaCl, respectively. In accordance with the half-time, PI penetrated twice faster after P-A PBS than P-A NaCl exposure. A plateau was obtained 8 and 10 h after treatment with P-A PBS and P-A NaCl, respectively. These results were confirmed with caspases 3/7 staining on fixed entire HCT-116 GFP spheroids to compare to the apoptosis induced by the two plasma-exposed liquids (Figure 3). Three hours after treatment, few cells at the periphery were caspase 3/7 positives for P-A PBS and P-A NaCl. A concentric increase of the signal was observed in both treated conditions; however, PI-positive cells staining was more pronounced after treatment with P-A PBS. This is in accordance with the results we obtained following PI quantification.

In the case of SKOV-3 GFP Luc spheroids, a difference in the PI fluorescence profile was observed between P-A PBS and P-A NaCl treatment (Figure 2D) only one hour after the treatment. The outer shell was PI-positive for P-A PBS, whilst in spheroids treated with P-A NaCl, a longer time-lapse (8 h) was required to observe PI-positive cells at the outer rim. Non-linear regression demonstrates that the difference between the PI fluorescence profiles over time was less pronounced than in HCT 116-GFP spheroids, and the plateau obtained for P-A PBS was 1.1 times higher than for P-A NaCl. Due to a marked difference in PI fluorescence intensities during the first hours following the treatment (slope), the half-time (P-A PBS: 7.8 h, P-A NaCl: 22 h) and the rate constants  $K$  (P-A PBS: 0.08775, P-A NaCl: 0.03196) were almost 3 times higher for P-A NaCl than for P-A PBS. A plateau was obtained after 36 h and 48 h for P-A PBS and P-A NaCl, respectively.



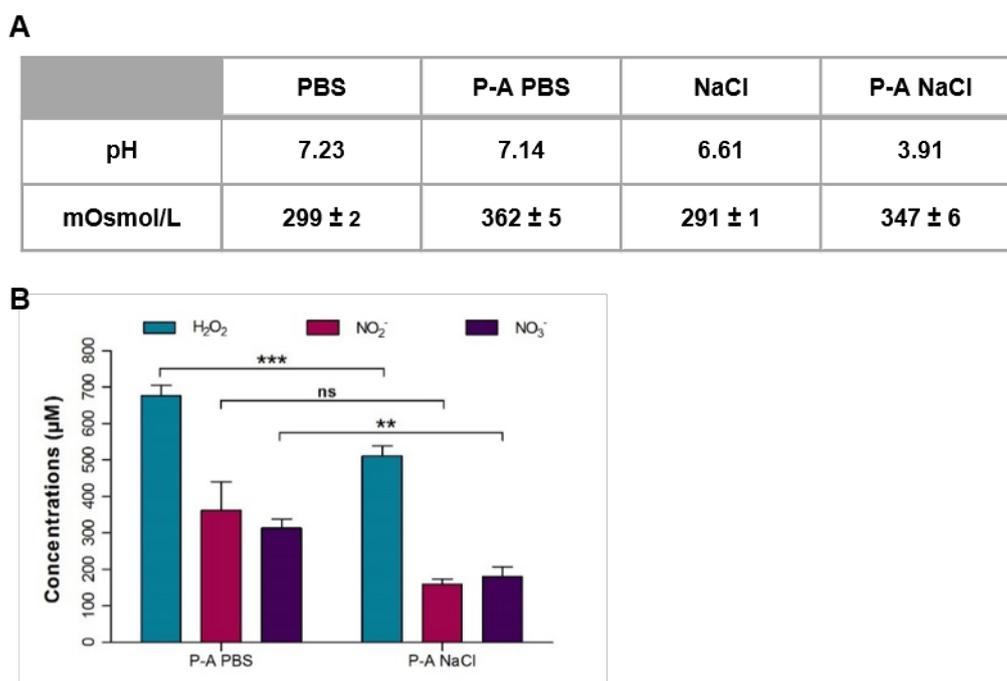
**Figure 2.** PI uptake kinetics of spheroids treated with plasma-activated PBS (P-A PBS) and plasma-activated NaCl (P-A NaCl). (A,B) Overlaid GFP and PI fluorescence micrographs of HCT-116 GFP and SKOV-3 GFP Luc spheroids, 1, 6, 12, 24, and 48 h after treatment with P-A PBS and P-A NaCl. The scale bar is set at 200  $\mu$ m. (C,D) PI fluorescence integrated intensity across the spheroids as a function of time. Two-way ANOVA, \*\*\*\*  $p < 0.0001$ . Fit one-phase association equation:  $Y = Y_0 + (\text{plateau} - Y_0) \times (1 - e^{-kt})$ .  $N = 3$  and 2 independent experiments for HCT-116 GFP and SKOV-3 GFP Luc, respectively, with  $n = 8$  spheroids per experiment.



**Figure 3.** Plasma-activated liquids-induced apoptosis. HCT-116 GFP spheroids were stained with caspase 3/7 red reagent (Molecular Probes Invitrogen, Eugene, Oregon, USA) 3 or 6 h after incubation with either PBS or NaCl exposed to plasma-activated PBS and plasma-activated NaCl (P-A PBS or P-A NaCl, respectively). Fixed entire spheroids were imaged with a confocal microscope. Phase contrast and caspase 3/7 micrographs are presented (equatorial z-slice). The emitted light from caspase 3/7 red reagent was collected through a 610–650 nm bandpass filter. PBS and NaCl represented the controls. The scale bar is set at 100  $\mu\text{m}$ .

### 2.3. Physicochemical Properties of Plasma-Activated PBS (P-A PBS) and Plasma-Activated NaCl (P-A NaCl)

The only apparent difference between PBS and NaCl is the phosphate content and the buffering properties of PBS. To better understand the difference between these two plasma-activated liquids efficiency on cancer cells, we checked their physicochemical properties. We first measured the pH variation after plasma exposure. As expected, P-A PBS did not show any pH variation, and P-A NaCl displayed high acidification after exposure to plasma (from 6.61 to 3.91) (Figure 4A). When liquids were exposed to the plasma jet, 20% of the initial volume evaporated, causing variation in the osmolarity. We measured the osmolarity of the two plasma-exposed solutions. Non-exposed solutions were isotonic (300 mOsmol/L), but when exposed to plasma, a slight increase in osmolarity was observed. Variations in osmolarity were still in the range of tolerated values for cells as already reported [25]. There were no significant differences in osmolarity between P-A PBS and P-A NaCl, thus the differences between P-A PBS and P-A NaCl efficiency cannot be explained solely by the osmolarity variations.



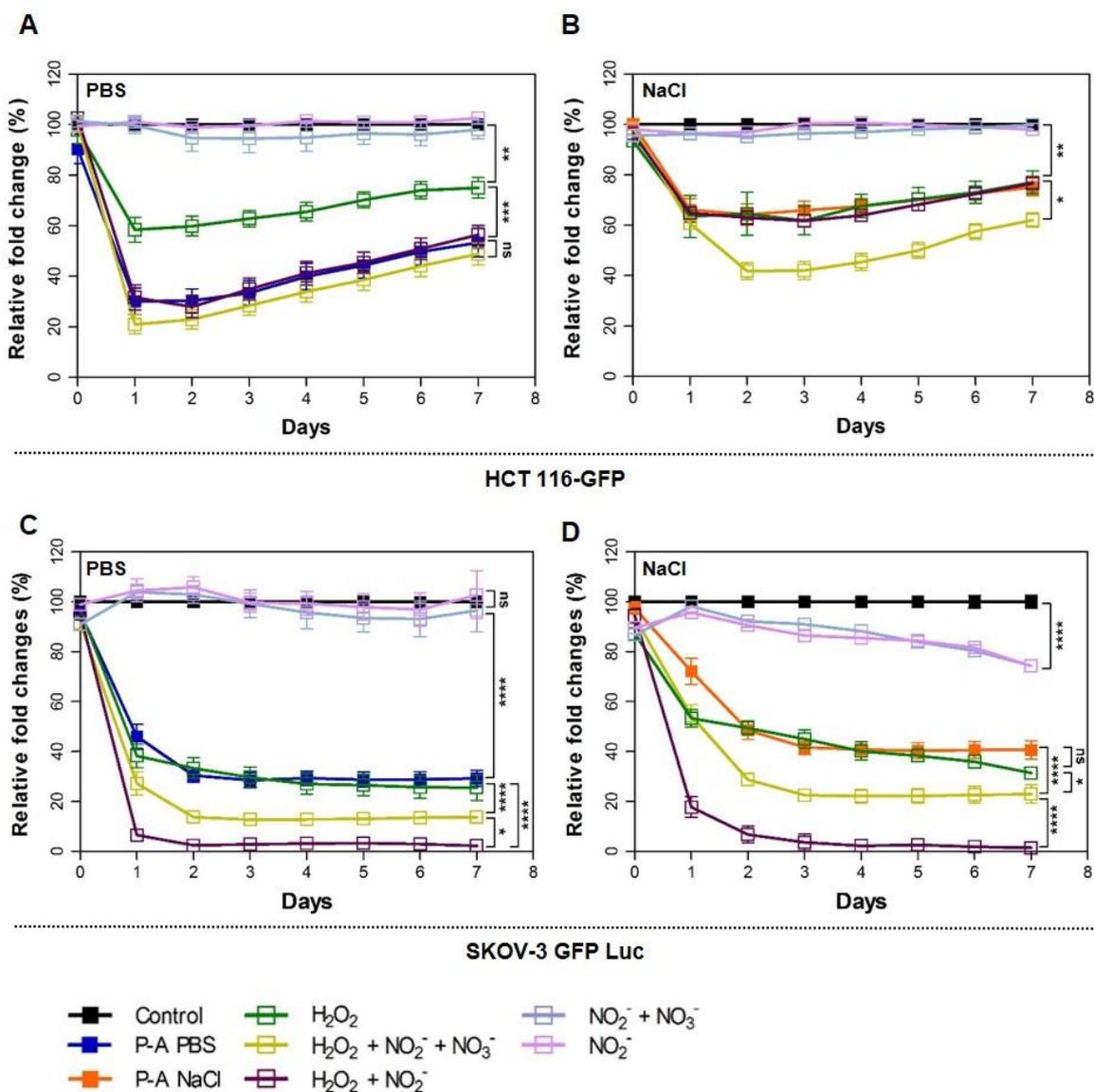
**Figure 4.** Results of the physicochemical properties analysis in plasma-activated PBS (P-A PBS) and plasma-activated NaCl (P-A NaCl). (A) pH and osmolarity were measured directly after exposure to the plasma jet for 120 s, as described in the Materials and Methods section I. PBS vs. P-A PBS and NaCl vs. P-A NaCl: paired *t*-test \*\*\**p* < 0.001. PA-PBS vs. P-A NaCl: unpaired *t*-test, ns: non-significant. *N* = 3 independent experiments. (B) Quantification of the hydrogen peroxide (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), nitrite (NO<sub>2</sub><sup>-</sup>) and nitrate (NO<sub>3</sub><sup>-</sup>) in P-A PBS and P-A NaCl. Unpaired *t*-test \*\*\* *p* < 0,001, \*\* *p* < 0.01; ns: non-significant *p* > 0.05. *N* = 4 independent experiments.

Hydrogen peroxide (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), nitrite (NO<sub>2</sub><sup>-</sup>) and nitrate (NO<sub>3</sub><sup>-</sup>) were referred to as the major reactive oxygen and nitrogen species responsible for plasma-activated liquids cytotoxicity [15,26]. Thus, we quantified these three species in the two plasma-activated liquids, P-A PBS and P-A NaCl (Figure 4B). Overall, a higher concentration of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, NO<sub>2</sub><sup>-</sup> and NO<sub>3</sub><sup>-</sup> was produced in P-A PBS compared to P-A NaCl, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (\*\*\*) *p*-value < 0.001) and NO<sub>3</sub><sup>-</sup> (\*\* *p*-value < 0.01) quantities were significantly different between P-A PBS and P-A NaCl. The greater anti-cancer capacity of P-A PBS could thus be explained by different concentrations observed for the three species.

#### 2.4. Implication of the Hydrogen Peroxide, Nitrite and Nitrate in the Cytotoxicity of Plasma-Activated Liquids

To understand the involvement of the three main long-lived reactive species hydrogen peroxide (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), nitrite (NO<sub>2</sub><sup>-</sup>) and nitrate (NO<sub>3</sub><sup>-</sup>) in the cytotoxicity of the two plasma-exposed solutions, the spheroids were treated with PBS and NaCl solutions containing H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, NO<sub>2</sub><sup>-</sup> and NO<sub>3</sub><sup>-</sup>. Based on the quantification presented above, either 680 µM of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, 360 µM of NO<sub>2</sub><sup>-</sup>, 315 µM of NO<sub>3</sub><sup>-</sup> or 515 µM of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, 160 µM of NO<sub>2</sub><sup>-</sup>, 180 µM of NO<sub>3</sub><sup>-</sup> were added to PBS and NaCl, respectively. Different combinations were used in order to point out the effect of each species. Spheroids were treated over 4 h, as with plasma-exposed solutions. The pH of the solutions was measured, and no variation was observed compared to control (PBS 7.27 and NaCl 6.86). Spheroid growth was followed during 7 days after treatment (Figure 5). For HCT 116-GFP, the treatment with PBS or NaCl containing NO<sub>2</sub><sup>-</sup>/NO<sub>3</sub><sup>-</sup> or NO<sub>2</sub><sup>-</sup> alone did not result in differences in spheroid growth. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> alone in PBS was not enough to obtain the same toxicity as P-A PBS (\*\*\*\* *p*-value) (showing 40% of the decrease compared to 70% obtained with P-A PBS). There were no significant differences (*p*-value > 0.05) when spheroids were treated with H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> + NO<sub>2</sub><sup>-</sup> + NO<sub>3</sub><sup>-</sup> and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> + NO<sub>2</sub><sup>-</sup> without NO<sub>3</sub><sup>-</sup>. This is in accordance with the work of Girard and co-workers [26], who showed that PBS containing H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> alone was not

sufficient to reach the P-A PBS toxicity and acted in synergy with  $\text{NO}_2^-$  to kill HCT 116 cancer cells grown in 2D cultures, and  $\text{NO}_3^-$  was not needed to induce cytotoxicity.



**Figure 5.** Spheroids’ treatment with long-lived reactive oxygen and nitrogen species (RONS): hydrogen peroxide ( $\text{H}_2\text{O}_2$ )  $\pm$  nitrite ( $\text{NO}_2^-$ )  $\pm$  nitrate ( $\text{NO}_3^-$ ). Growth curves of spheroids incubated 4 h in PBS (control), plasma-activated PBS (P-A PBS), PBS containing 680  $\mu\text{M}$  of hydrogen peroxide  $\pm$  nitrite (360  $\mu\text{M}$ )  $\pm$  nitrate (315  $\mu\text{M}$ ) (A and C for HCT 116-GFP and SKOV-3 GFP Luc, respectively) or NaCl solution (control), plasma-activated NaCl (P-A NaCl), NaCl containing 515  $\mu\text{M}$  of hydrogen peroxide  $\pm$  nitrite (160  $\mu\text{M}$ )  $\pm$  nitrate (180  $\mu\text{M}$ ) (B and D for HCT 116-GFP and SKOV-3 GFP Luc, respectively). Graphs represent a relative fold change of spheroids’ equatorial area over the control in percentage as a function of time. Areas were measured from the GFP fluorescence micrographs. Untreated spheroids of HCT 116-GFP (A,B) or SKOV-3 Luc GFP (C,D) are referred to as “control”. Two-way ANOVA, \*\*\*\*  $p < 0.0001$ ; \*\*\*  $p < 0.001$ ; \*\*  $p < 0.01$ ; \*  $p < 0.05$ ;  $N = 3$  independent experiments with  $n = 6$  spheroids per experiment for HCT 116-GFP and  $N = 2$  independent experiments with  $n = 6$  spheroids per experiment for SKOV-3 GFP Luc.

There was no significant difference ( $p$ -value  $> 0.05$ ) when spheroids were treated with P-A NaCl, NaCl +  $\text{H}_2\text{O}_2$  and NaCl +  $\text{H}_2\text{O}_2 + \text{NO}_2^-$  solutions. Surprisingly, NaCl solution containing  $\text{H}_2\text{O}_2$  was

sufficient to induce the same effect as P-A NaCl. Moreover, when both  $\text{NO}_2^-$  and  $\text{NO}_3^-$  were added to the solution, the latter killed cells more efficiently than P-A NaCl (\* *p*-value). Precisely, the decrease in spheroids size 24 h after treatment was similar for the four conditions (P-A NaCl, NaCl +  $\text{H}_2\text{O}_2$ , NaCl +  $\text{H}_2\text{O}_2$  +  $\text{NO}_2^-$  +  $\text{NO}_3^-$  and NaCl +  $\text{H}_2\text{O}_2$  +  $\text{NO}_2^-$ ). Conversely, when both  $\text{NO}_2^-$  and  $\text{NO}_3^-$  were present in solution, spheroid size continued to decline until day 2 after treatment.

SKOV-3 GFP Luc treated with PBS or NaCl containing  $\text{H}_2\text{O}_2$  alone were affected as efficiently as P-A PBS or P-A NaCl. Surprisingly, nitrite and nitrate appeared to be toxic for SKOV-3 GFP Luc spheroids when added to NaCl solution. Moreover, a synergistic effect between the three species was observed for this cell line. Spheroids treated with the three species were more affected than spheroids treated with  $\text{H}_2\text{O}_2$  and  $\text{NO}_2^-$ .

To check if the differences observed are RONS dose-dependent and/or due to chemical interactions between plasma and the two liquids, we treated spheroids with PBS containing the same quantity of the three species as quantified in the case of P-A NaCl and vice versa. Spheroid growth was followed (Supplementary Figure S3). We observed a dose-response phenomenon, whatever the liquid used. Cell detachment within the outer rim of treated spheroids and growth perturbation were the same for a defined quantity of RONS used. The only difference observed was that when NaCl was used, 48 h were necessary to obtain the same growth decrease as the one observed for PBS for the same RONS quantity. This is in agreement with the differences observed for PI uptake, where the kinetic of PI uptake after treatment with P-A PBS was faster than after treatment with P-A NaCl.

### 3. Discussion

Cold atmospheric plasma, and more specifically plasma-activated liquids, represent an alternative to the use of the plasma jet, which might be applied for cancer treatment. These two therapeutic strategies share a common approach: they take advantage of the RONS effect on cancer cells. Plasma-activated liquids are RONS-enriched solutions that can be generated after exposure to a plasma jet, and which remain stable for one month when stored at 4 °C. The purpose of this study was to investigate the anti-cancer properties of two different physiological saline solutions, PBS and NaCl 0.9%, exposed to plasma. These solutions differ in chemical composition and in buffering properties, and are both likely to be used for *in vivo* applications. Two cell lines were used to generate multicellular tumor spheroids, which produce a 3D model that closely mimics the main features of small avascular solid tumors. The HCT 116 human colorectal cancer cells form compact and highly-proliferative spheroids, while SKOV-3 cells are ovarian cancer cells derived from ascites, which are well known for their ability to form metastases and exhibit malignant tumor progenitor cells characteristics [27].

For both cell lines, the spheroids exhibited different responses to treatments with PBS and NaCl previously exposed to plasma. More precisely, the plasma-activated PBS was more efficient than plasma-activated NaCl for killing cancer cells (Figure 1), while both P-A PBS and P-A NaCl led to apoptosis in the peripheral cells of the spheroids. Thus, it would appear that cell death mediated by plasma-activated saline solutions followed the same cell death mechanism induced by the plasma-activated medium [20]. This study shows that the difference in the efficacy of two plasma-activated liquids can be directly correlated to their content in hydrogen peroxide ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ), nitrite ( $\text{NO}_2^-$ ) and nitrate ( $\text{NO}_3^-$ ) (Figure 4B). For the same plasma jet exposure time, a higher enrichment was observed in PBS in comparison to NaCl. To corroborate the implication of RONS, we also investigated the individual and combined effects of each species to better understand their involvement in cell death (Figure 5). The response to these three RONS was cell-line dependent. We showed that PBS containing  $\text{H}_2\text{O}_2$  and  $\text{NO}_2^-$  kill as efficiently as plasma-activated PBS. When  $\text{H}_2\text{O}_2$  alone was added to PBS, limited cytotoxicity was observed. This is in accordance with the work of Girard et al. that showed that in the 2D, HCT 116 monolayer, the two species are required and act in synergy [26]. This was also confirmed by Privat-Maldonado and co-workers, who compared the effect of direct treatment with the plasma jet and indirect treatment with PBS exposed to plasma on glioblastoma spheroid models [28]. In this study, the authors highlighted the importance of short-lived

species in direct treatment, but also showed that plasma-treated liquid cytotoxicity relied mainly on long-lived species. On the other hand, when added to NaCl,  $H_2O_2$  alone seemed to be responsible for cell death. Moreover, there was no synergy effect with  $NO_2^-/NO_3^-$  when they were added to the solution. Similarly, for the SKOV-3 GFP Luc spheroids,  $H_2O_2$  alone, either in PBS or NaCl, was sufficient to be as effective as the plasma-activated liquids. Surprisingly, SKOV-3 GFP spheroids display higher sensitivity to PBS and NaCl containing  $H_2O_2$  plus  $NO_2^-$  or  $H_2O_2$  plus both  $NO_2^-$  and  $NO_3^-$  than for plasma-activated liquids. Indeed, this result was surprising, and further studies should be performed in order to assess the reversibility of the RONS cytotoxic effect in the plasma-activated PBS and NaCl and in the PBS and NaCl added to the RONS by using quenchers such as ascorbic acid or pyruvate.

To better understand the differences observed in spheroid morphology and growth after treatment, PI penetration inside the 3D spheroids was followed over time, and non-linear regressions were extracted from these data in order to obtain the kinetics of cell death during P-A PBS and P-A NaCl treatments (Figure 2). Cells were dying more rapidly and within deeper layers when plasma-exposed PBS treatment was performed. The response to the treatment was also cell line dependent, as we observed different PI/cell death kinetics between HCT-116 GFP and SKOV-3 GFP. The SKOV-3 GFP Luc displayed a slower growth rate constant, compared to HCT 116-GFP. Precisely, the rate constant was more than 4-times higher for HCT 116-GFP compared to SKOV-3 GFP treated with both plasma-exposed saline solutions (P-A PBS and P-A NaCl), meaning that HCT 116-GFP were dying 4-times faster than SKOV-3 GFP. This sensitivity might be due to the morphological characteristics of spheroids made with different cell lines. Indeed, we observed that SKOV-3 GFP Luc cells formed smaller spheroids than HCT 116-GFP and displayed a slower growth rate. HCT 116-GFP spheroids appeared to be highly proliferative when compared to SKOV-3, which were mainly composed of quiescent cells [29].

Moreover, exposure of NaCl to the plasma jet induces acidification (Figure 4A) that of course was not observed for PBS, which is buffered. This acidic pH seems to play an important role. Chemical reactions, which lead to the production of beneficial sub-products, may have occurred in an acidic environment. It has already been described that plasma interaction with NaCl leads to nitrous acid ( $HNO_2$ ), nitric acid ( $HNO_3$ ), and hydrogen peroxide ( $H_2O_2$ ), making the solution more acidic [30]. This acidification could also explain the differences observed in the response to P-A NaCl compared to NaCl containing the three RONS ( $H_2O_2$ ,  $NO_2^-$  and  $NO_3^-$ ). Plasma exposure through chemical reactions with ambient air probably induces the production of other long-lived species, which leads to a lower efficiency or protection from  $NO_2^-/NO_3^-$ -induced cell stress. RONS activity or their penetration may be impaired in an acidic environment. However, the acidification, which has been considered responsible for higher cytotoxicity due to the generation of peroxyxynitrite [31], did not play a major role in treatments involving P-A NaCl. This result indeed requires further investigations.

## 4. Materials and Methods

### 4.1. Cell Culture

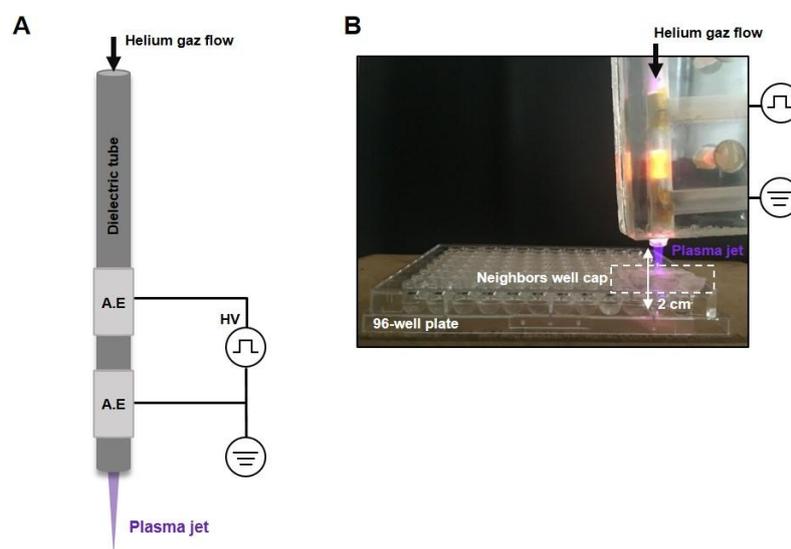
Human colorectal carcinoma cells HCT 116 (ATCC<sup>®</sup> CCL-247<sup>™</sup>) stably expressing green fluorescent protein (GFP) [32] were cultured in Dulbecco's Modified Eagle Medium DMEM + 4.5 g/L of glucose (Gibco-Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), L-Glutamine (CSTGLU00, Eurobio, Les Ulis, France) and pyruvate, supplemented with 10% of fetal bovine serum (F7524, Sigma, Saint Louis, MI, USA) and 1% of penicillin/streptomycin (P0781, Sigma, Saint Louis, MI, USA). SKOV-3 stably expressing green fluorescent protein (GFP) and luciferase (Luc) ovarian carcinoma cells from (ATCC<sup>®</sup> HTB-77<sup>™</sup>) were cultured in RPMI 1640 (Eurobio Scientific), supplemented with L-Glutamine, 10% of fetal bovine serum, 1% of penicillin/streptomycin, human insulin (I9278, Sigma Aldrich, Saint-Louis, MI, USA) at 10  $\mu$ g/mL and recombinant human epidermal growth factor (E9644 from Sigma Aldrich) at 20 ng/mL. Cells were kept in a humidified atmosphere at 37 °C and 5% of  $CO_2$  and were mycoplasma negative (as tested every week with MycoAlert Mycoplasma Detection kit, cat n°#LT07-318, Lonza, Switzerland).

#### 4.2. Spheroid Formation

The non-adherent technique was used to generate spheroids. Briefly, 500 or 5000 cells (for HCT-116 GFP and SKOV-3 GFP Luc, respectively) were suspended in 200  $\mu$ L of culture medium, and seeded in Costar® Corning® Ultra-low attachment 96 well plates (Fisher Scientific, Illkirch, France). Spheroids were kept in a humidified atmosphere at 37 °C and 5% of CO<sub>2</sub>. Cell aggregation occurred in the first 24 h following the seeding and allowed for obtaining single spheroids of similar sizes in each well.

#### 4.3. Plasma Experimental Setup

A non-thermal atmospheric helium plasma jet was generated by a dielectric barrier discharge (DBD) device in ambient air as described previously [25]. The device was powered by a mono-polar square pulse of 1  $\mu$ s duration with 10 kV of magnitude at 10 kHz frequency in a 4-mm inner diameter quartz dielectric tube wrapped with two 2-cm long aluminum electrodes (10 mm distance). Helium gas flow was controlled by a flow meter and fixed at 3 L/min. A schematic representation of the device and a picture of the setting for liquid activation are shown in Figure 6A.



**Figure 6.** The cold-atmospheric plasma jet configuration. (A) Schematic representation of the plasma jet device used in our study. A.E: aluminum electrodes. (B) A photograph illustrating the exposure of the liquids in a 96-well plate using the plasma jet device.

#### 4.4. Liquids Exposition

A 96-well round adherent bottom plate was used to expose the PBS (phosphate-buffered saline modified without calcium and magnesium, Eurobio, Les Ulis, France) and Sodium Chloride 0.9% injectable solution (NaCl) (Lavoisier, France). Briefly, 100  $\mu$ L per well of each solution was exposed for 120 s to the plasma jet as described above, the output of the plasma jet was placed at a distance of 2 cm from the liquid surface, and a plastic cap was used to avoid interaction with neighboring wells (Figure 6B).

#### 4.5. Spheroid Treatment with Plasma-Activated Liquids RONS-Containing Liquids

Spheroids were treated when their size reached 450–500  $\mu$ m or 300–350  $\mu$ m of diameter, for HCT-116 GFP and SKOV-3 GFP Luc, respectively (~5 days of culture). Directly after exposure to the plasma jet, a volume of 80  $\mu$ L (20  $\mu$ L of the solution evaporated during plasma jet exposure) of plasma-activated PBS or NaCl (P-A PBS, P-A NaCl) were transferred onto the spheroids and the plate was placed under cell culture conditions (37 °C, 5% CO<sub>2</sub>) for 4 hours' incubation. When incubation time was over, the spheroids were rinsed twice with PBS, and fresh culture medium (pyruvate-free, DMEM,

Gibco-Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) was added to each well. The same protocol was followed for treatment with PBS and NaCl containing H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (hydrogen peroxide solution from Sigma, France, 30% (w/w) in H<sub>2</sub>O and/or NO<sub>2</sub><sup>-</sup> and/or NO<sub>3</sub><sup>-</sup> (Sodium nitrite and nitrate powders from Fisher Scientific, Illkirch, France).

#### 4.6. Growth Follow-Up

After treatment, the plate was placed in IncuCyte Live Cell Analysis System Microscope at ×10 magnification (Essen BioScience IncuCyte™, Herts, Welwyn Garden City, UK). Spheroid growth was followed during 7 days after treatment using bright-field and GFP channels. Micrographs exported from IncuCyte software (U.S. National Institute of Health, Bethesda, MD, USA) were analyzed with ImageJ; the area of the spheroids was determined from green-fluorescent micrographs and was plotted as relative fold change of the initial area, as a function of time.

#### 4.7. Cell Death Analysis with Propidium Iodide

Propidium iodide was used to follow cell viability in real-time. The probe's penetration within the spheroids was followed over a period of 24 h following the treatment with plasma-activated liquids. Directly after the incubation in P-A PBS and P-A NaCl, spheroids were washed with PBS as described above, and culture medium containing 1 μM of PI was added into the wells. The red fluorescence due to PI penetration was followed with the IncuCyte Live Cell Analysis System Microscope with a ×10 objective. Images were taken every hour.

#### 4.8. Cleaved Caspases 3/7 Detection

Image-iT live red caspase -3 and -7 (FLICA) detection kit for microscopy (Molecular Probes Invitrogen, Eugene, OR, USA) was used according to the manufacturer's instructions to detect caspase activation at 3 and 6 h after treatment. Directly after treatment, the spheroids were incubated in 60 μL of FLICA reagent for 45 min at 37 °C, 5% CO<sub>2</sub>. Subsequently, the spheroids were washed with PBS and fixed in 60 μL of kit fixative solution for 24 h at 4 °C. Fixed entire spheroids were imaged under FV1000 confocal microscope (Olympus, Rungis, France) at a magnification ×20. Emitted light from FLICA reagent was collected through a 610–650 nm bandpass filter (Texas red).

#### 4.9. Image Analysis

Micrographs were analyzed using ImageJ software as described in the supplementary Figure S2. PI signals from out-of-focus planes were collected using wide-field microscopy. The out-of-focus PI fluorescence at the center of the spheroid was the result of a field depth of the microscope objective that is larger than the object diameter. In order to remove this out-of-focus fluorescence, we applied a threshold on both PI (red fluorescent) and GFP micrographs. Areas of viable spheroids were obtained from GFP fluorescence and removed from the PI micrographs. Measurements of the integrated PI fluorescence intensity were done on the final images that represented focal plane PI fluorescence.

#### 4.10. Osmolality and pH Measurements

Osmolality was measured directly after the exposure of the solution to the plasma jet with a single-sample freezing point osmometer, the OSMOMAT 030 (Gonotec, Berlin, Germany) following the manufacturer's instructions. The pH measurements were done with SevenGo Duo™ pH/conductivity meter SG23 (Mettler Toledo, Columbus, OH, USA) with freshly prepared solutions (PBS and NaCl) either exposed to plasma or supplemented with RONS).

#### 4.11. Quantification of Hydrogen Peroxide

A Fluorimetric Hydrogen Peroxide Assay kit (Sigma Aldrich) was used to detect and quantify H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> generated in plasma-activated liquids. Directly after plasma exposure, plasma-exposed PBS/NaCl

were diluted at 1/10 (detection range) and mixed with peroxidase solution and peroxidase substrate for incubation at room temperature during 30 min. Hydrogen peroxide solution (Sigma, 30% (w/w) in H<sub>2</sub>O) was used to obtain a calibration curve. Then, fluorescence at 590 nm was read with the plate reader CLARIOstar (BMG LABTECH, Champigny sur Marne, France)

#### 4.12. Quantification of Nitrite and Nitrate

A Nitrite/Nitrate Colorimetric Assay Kit (Sigma Aldrich) was used to measure NO<sub>2</sub><sup>-</sup> and NO<sub>3</sub><sup>-</sup> in plasma-activated liquids as described by the manufacturers. First, nitrates present in the solutions were reduced to nitrites by using nitrate reductase and enzyme co-factors (2 hours' incubation at room temperature). Then, Griess reagent was used to detect nitrites (15 min at room temperature). Absorbance at 540 nm was read with a plate reader CLARIOstar (BMG LABTECH). NaNO<sub>2</sub> and NaNO<sub>3</sub> kit solutions were used to obtain calibration curves.

#### 4.13. Statistical Analysis

GraphPad Prism 6 software was used for statistical analyses. All quantifications were plotted as mean ± standard error mean (SEM), and overall statistical significance was set at *p*-value < 0.05. Two-way ANOVA or t-tests were performed. Linear regression analysis was used to obtain nitrite/nitrate and hydrogen peroxide calibration curves. Non-linear regression was used to analyze PI penetration kinetics.

## 5. Conclusions

Herein, we investigated the anti-cancer potential of two different plasma-activated liquids on 3-dimensional multicellular spheroids of human colorectal cancer cells and ovarian cancer cells. Our investigations indicate that PBS exposed to plasma was more efficient and penetrates deeper and faster than NaCl exposed to plasma when using a 3D cellular model. Thus, our results indicate that plasma-exposed PBS is more appropriate for the treatment of tumors *in vivo*. Depending on the tumor location, the solution might be injected directly into tumors (in subcutaneous HCT-116 GFP xenografts), or intraperitoneally when treating intraperitoneal malignancies (such as the ones that occur in the SKOV-3 GFP Luc tumor model). Moreover, we also show that the cytotoxicity of plasma-activated saline solutions directly correlates with the concentration of hydrogen peroxide, nitrite and nitrate, as cells responded in a dose-dependent manner when treated with these three long-lived species. The response is cell line dependent.

**Supplementary Materials:** The following are available online at <http://www.mdpi.com/2072-6694/12/3/721/s1>, Figure S1: PI fluorescence plot profile of HCT 116-GFP spheroids, Figure S2: Scheme of the PI and GFP micrographs analysis with ImageJ software, Figure S3: Spheroids treatment with long-lived RONS: hydrogen peroxide (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) ± nitrite (NO<sub>2</sub><sup>-</sup>) ± nitrate (NO<sub>3</sub><sup>-</sup>).

**Author Contributions:** Conceptualization: M.G. and N.F.; methodology: e.g., M.G. and N.F.; validation: e.g., M.G. and N.F.; formal analysis: E.G.; investigation: E.G.; resources: M.G. and N.F.; writing—original draft preparation: E.G., M.G. and N.M.; writing—review and editing E.G., M.G. and N.F.; visualization: E.G., M.G. and N.F.; supervision: M.G. and N.M.; project administration: M.G. and N.M.; funding acquisition: M.G. and N.M. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

**Funding:** This research was funded by grant from the University Paul Sabatier and Occitanie Regional Council. E.G. was supported by a fellowship from University Paul Sabatier and Occitanie Regional Council.

**Acknowledgments:** The authors thank Angelique Pipier from the IPBS for designing the ImageJ macro and Mathilde Coustets for transducing and providing SKOV-3 GFP Luc cell line.

**Conflicts of Interest:** The authors declare no conflict of interest.

## References

1. Ahn, H.J.; Kim, K.I.; Hoan, N.N.; Kim, C.H.; Moon, E.; Choi, K.S.; Yang, S.S.; Lee, J.-S. Targeting Cancer Cells with Reactive Oxygen and Nitrogen Species Generated by Atmospheric-Pressure Air Plasma. *PLoS ONE* **2014**, *9*, e86173. [[CrossRef](#)]
2. Lin, A.; Gorbanev, Y.; Backer, J.D.; Loenhout, J.V.; Boxem, W.V.; Lemièrre, F.; Cos, P.; Dewilde, S.; Smits, E.; Bogaerts, A. Non-Thermal Plasma as a Unique Delivery System of Short-Lived Reactive Oxygen and Nitrogen Species for Immunogenic Cell Death in Melanoma Cells. *Adv. Sci.* **2019**, *6*, 1802062. [[CrossRef](#)]
3. Van Loenhout, J.; Flieswasser, T.; Freire Boullosa, L.; De Waele, J.; Van Audenaerde, J.; Marcq, E.; Jacobs, J.; Lin, A.; Lion, E.; Dewitte, H.; et al. Cold Atmospheric Plasma-Treated PBS Eliminates Immunosuppressive Pancreatic Stellate Cells and Induces Immunogenic Cell Death of Pancreatic Cancer Cells. *Cancers* **2019**, *11*, 1597. [[CrossRef](#)]
4. Azzariti, A.; Iacobazzi, R.M.; Di Fonte, R.; Porcelli, L.; Cristina, R.; Favia, P.; Fracassi, F.; Trizio, I.; Silvestris, N.; Guida, G.; et al. Plasma-activated medium triggers cell death and the presentation of immune activating danger signals in melanoma and pancreatic cancer cells. *Sci. Rep.* **2019**, *9*, 4099. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
5. Yan, D.; Cui, H.; Zhu, W.; Nourmohammadi, N.; Milberg, J.; Zhang, L.G.; Sherman, J.H.; Keidar, M. The Specific Vulnerabilities of Cancer Cells to the Cold Atmospheric Plasma-Stimulated Solutions. *Sci. Rep.* **2017**, *7*, 4479. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
6. Yan, D.; Xu, W.; Yao, X.; Lin, L.; Sherman, J.H.; Keidar, M. The Cell Activation Phenomena in the Cold Atmospheric Plasma Cancer Treatment. *Sci. Rep.* **2018**, *8*, 15418. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
7. Kim, S.J.; Chung, T.H. Cold atmospheric plasma jet-generated RONS and their selective effects on normal and carcinoma cells. *Sci. Rep.* **2016**, *6*, 20332. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
8. Bauer, G.; Graves, D.B. Mechanisms of Selective Antitumor Action of Cold Atmospheric Plasma-Derived Reactive Oxygen and Nitrogen Species: Mechanisms of Selective Antitumor Action. *Plasma Process Polym.* **2016**, *13*, 1157–1178. [[CrossRef](#)]
9. Florian, J.; Merbahi, N.; Yousfi, M. Genotoxic and Cytotoxic Effects of Plasma-Activated Media on Multicellular Tumor Spheroids. *Plasma Med.* **2016**, *6*, 47–57. [[CrossRef](#)]
10. Trachootham, D.; Alexandre, J.; Huang, P. Targeting cancer cells by ROS-mediated mechanisms: A radical therapeutic approach? *Nat. Rev. Drug Discov.* **2009**, *8*, 579–591. [[CrossRef](#)]
11. Sztatowski, T.P.; Nathan, C.F. Production of Large Amounts of Hydrogen Peroxide by Human Tumor Cells. *Cancer Res.* **1991**, *51*, 794–798. [[PubMed](#)]
12. Storz, P. Reactive oxygen species in tumor progression. *Front Biosci.* **2005**, *10*, 1881. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
13. Kaushik, N.K.; Ghimire, B.; Li, Y.; Adhikari, M.; Veerana, M.; Kaushik, N.; Jha, N.; Adhikari, B.; Lee, S.-J.; Masur, K.; et al. Biological and medical applications of plasma-activated media, water and solutions. *Biol. Chem.* **2018**, *400*, 39–62. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
14. Yan, D.; Talbot, A.; Nourmohammadi, N.; Cheng, X.; Canady, J.; Sherman, J.; Keidar, M. Principles of using Cold Atmospheric Plasma Stimulated Media for Cancer Treatment. *Sci. Rep.* **2016**, *5*, 18339. [[CrossRef](#)]
15. Chauvin, J.; Judée, F.; Yousfi, M.; Vicendo, P.; Merbahi, N. Analysis of reactive oxygen and nitrogen species generated in three liquid media by low temperature helium plasma jet. *Sci. Rep.* **2017**, *7*, 4562. [[CrossRef](#)]
16. Gorbanev, Y.; Privat-Maldonado, A.; Bogaerts, A. Analysis of Short-Lived Reactive Species in Plasma–Air–Water Systems: The Dos and the Do Nots. *Anal. Chem.* **2018**, *90*, 13151–13158. [[CrossRef](#)]
17. Bauer, G. Signal amplification by tumor cells: Clue to the understanding of the antitumor effects of cold atmospheric plasma and plasma-activated medium. *IEEE Trans. Radiat. Plasma Med. Sci.* **2018**, *2*, 87–98. [[CrossRef](#)]
18. Biscop, E.; Lin, A.; Boxem, W.V.; Loenhout, J.V.; Backer, J.; Deben, C.; Dewilde, S.; Smits, E.; Bogaerts, A.A. Influence of Cell Type and Culture Medium on Determining Cancer Selectivity of Cold Atmospheric Plasma Treatment. *Cancers* **2019**, *11*, 1287. [[CrossRef](#)]
19. Yan, D.; Nourmohammadi, N.; Bian, K.; Murad, F.; Sherman, J.H.; Keidar, M. Stabilizing the cold plasma-stimulated medium by regulating medium’s composition. *Sci. Rep.* **2016**, *6*, 26016. [[CrossRef](#)]
20. Freund, E.; Liedtke, K.R.; Gebbe, R.; Heidecke, A.K.; Partecke, L.-I.; Bekeschus, S. In Vitro Anticancer Efficacy of Six Different Clinically Approved Types of Liquids Exposed to Physical Plasma. *IEEE Trans. Radiat. Plasma Med. Sci.* **2019**, *3*, 588–596. [[CrossRef](#)]

21. Chauvin, J.; Gibot, L.; Griseti, E.; Golzio, M.; Rols, M.-P.; Merbahi, N.; Vicendo, P. Elucidation of in vitro cellular steps induced by antitumor treatment with plasma-activated medium. *Sci. Rep.* **2019**, *9*, 4866. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
22. Utsumi, F.; Kajiyama, H.; Nakamura, K.; Tanaka, H.; Mizuno, M.; Toyokuni, S.; Hori, M.; Kikkawa, F. Variable susceptibility of ovarian cancer cells to non-thermal plasma-activated medium. *Oncol. Rep.* **2016**, *35*, 3169–3177. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
23. Nakamura, K.; Peng, Y.; Utsumi, F.; Tanaka, H.; Mizuno, M.; Toyokuni, S.; Hori, M.; Kikkawa, F.; Kajiyama, H. Novel Intraperitoneal Treatment With Non-Thermal Plasma-Activated Medium Inhibits Metastatic Potential of Ovarian Cancer Cells. *Sci. Rep.* **2017**, *7*, 6085. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
24. Hirschhaeuser, F.; Menne, H.; Dittfeld, C.; West, J.; Mueller-Klieser, W.; Kunz-Schughart, L.A. Multicellular tumor spheroids: An underestimated tool is catching up again. *J. Biotechnol.* **2010**, *148*, 3–15. [[CrossRef](#)]
25. Griseti, E.; Kolosnjaj-Tabi, J.; Gibot, L.; Fourquaux, I.; Rols, M.-P.; Yousfi, M.; Merbahi, N.; Golzio, M. Pulsed Electric Field Treatment Enhances the Cytotoxicity of Plasma-Activated Liquids in a Three-Dimensional Human Colorectal Cancer Cell Model. *Sci. Rep.* **2019**, *9*, 7583. [[CrossRef](#)]
26. Girard, P.-M.; Arbabian, A.; Fleury, M.; Bauville, G.; Puech, V.; Dutreix, M.; Sousa, J.S. Synergistic Effect of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and NO<sub>2</sub> in Cell Death Induced by Cold Atmospheric He Plasma. *Sci. Rep.* **2016**, *6*, 29098. [[CrossRef](#)]
27. Lee, Y.-J.; Wu, C.-C.; Li, J.-W.; Ou, C.-C.; Hsu, S.-C.; Tseng, H.-H.; Kao, M.-C.; Liu, J.-Y. A rational approach for cancer stem-like cell isolation and characterization using CD44 and prominin-1(CD133) as selection markers. *Oncotarget* **2016**, *7*, 78499–78515. [[CrossRef](#)]
28. Privat-Maldonado, A.; Gorbaney, Y.; Dewilde, S.; Smits, E.; Bogaerts, A. Reduction of Human Glioblastoma Spheroids Using Cold Atmospheric Plasma: The Combined Effect of Short- and Long-Lived Reactive Species. *Cancers* **2018**, *10*, 394. [[CrossRef](#)]
29. Heredia-Soto, V.; Redondo, A.; Berjón, A.; Miguel-Martín, M.; Díaz, E.; Crespo, R.; Hernández, A.; Yébenes, L.; Gallego, A.; Feliu, J.; et al. High-throughput 3-dimensional culture of epithelial ovarian cancer cells as preclinical model of disease. *Oncotarget* **2018**, *9*, 21893–21903. [[CrossRef](#)]
30. Rumbach, P.; Witzke, M.; Sankaran, R.M.; Go, D.B. Decoupling Interfacial Reactions between Plasmas and Liquids: Charge Transfer vs Plasma Neutral Reactions. *J. Am. Chem. Soc.* **2013**, *135*, 16264–16267. [[CrossRef](#)]
31. Julák, J.; Hujacová, A.; Scholtz, V.; Khun, J.; Holada, K. Contribution to the Chemistry of Plasma-Activated Water. *Plasma Phys. Rep.* **2018**, *44*, 125–136. [[CrossRef](#)]
32. Pelofy, S.; Teissié, J.; Golzio, M.; Chabot, S. Chemically Modified Oligonucleotide–Increased Stability Negatively Correlates with Its Efficacy Despite Efficient Electrotransfer. *J. Membr. Biol.* **2012**, *245*, 565–571. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

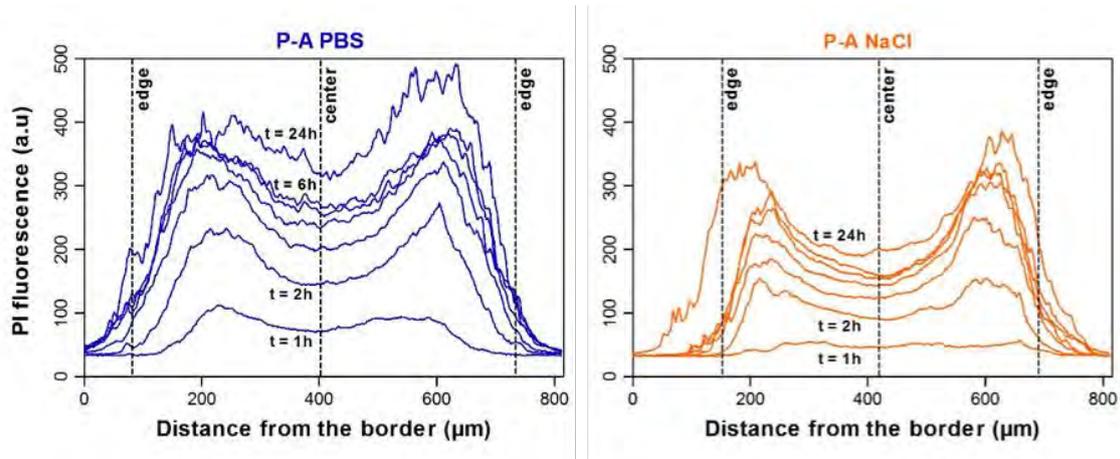


© 2020 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

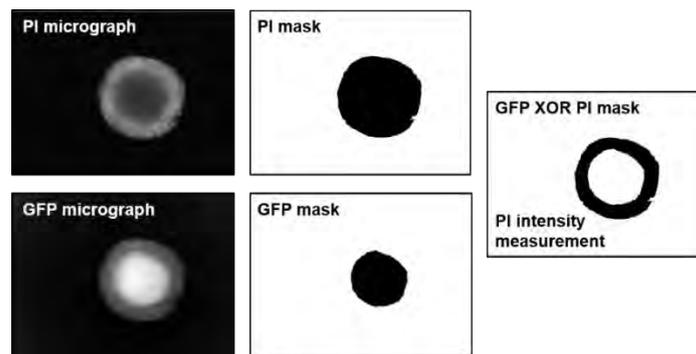
## Supplementary Materials

**Supplementary video 1:** Time-lapse video microscopy film showing propidium iodide real time penetration within HCT 116-GFP spheroids after P-A PBS treatment. GFP fluorescence (green) channel and PI fluorescence channel (red) are overlaid.

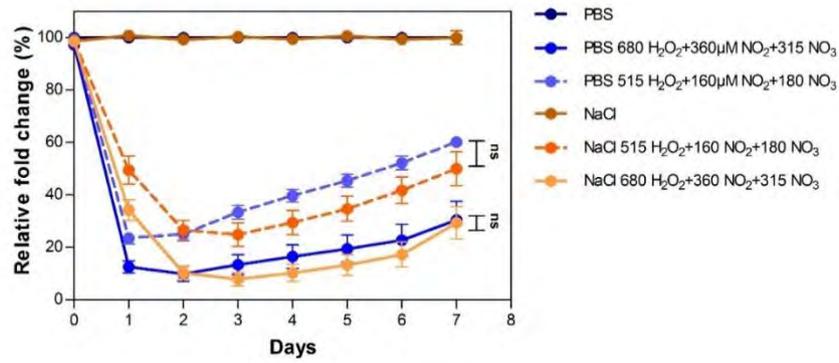
**Supplementary video 2:** Time-lapse video microscopy film showing propidium iodide real time penetration within HCT 116-GFP spheroids after P-A NaCl treatment. GFP fluorescence (green) channel and PI fluorescence channel (red) are overlaid.



**Figure S1.** PI fluorescence plot profile of HCT 116-GFP spheroids. PI fluorescence over equatorial spheroid depth ( $\mu\text{m}$ ) treated with plasma-activated PBS (P-A PBS), or plasma-activated NaCl (P-A NaCl) was plotted on an hourly basis during the first 24 hours. Each solid line corresponds to a time point from 1 to 6, and 24 hours after treatment.



**Figure S2.** Scheme of the PI and GFP micrographs analysis with ImageJ software. PI and GFP micrographs were collected using wide field microscopy. Areas of viable spheroids were obtained from GFP fluorescence and removed from the PI micrographs. Measurements of the integrated PI fluorescence intensity was done on the final images that represented focal plane PI fluorescence.



**Figure S3.** Spheroids treatment with long-lived RONS: hydrogen peroxide (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) ± nitrite (NO<sub>2</sub><sup>-</sup>) ± nitrate (NO<sub>3</sub><sup>-</sup>). Growth curves of HCT 116-GFP spheroids incubated 4 hours in PBS (control); NaCl (control), PBS containing 680 µM of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ± NO<sub>2</sub><sup>-</sup> (360 µM) ± NO<sub>3</sub><sup>-</sup> (315 µM); NaCl containing 515 µM of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ± NO<sub>2</sub><sup>-</sup> (160 µM) ± NO<sub>3</sub><sup>-</sup> (180 µM); NaCl containing 680 µM of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ± NO<sub>2</sub><sup>-</sup> (360 µM) ± NO<sub>3</sub><sup>-</sup> (315 µM) and PBS containing 515 µM of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ± NO<sub>2</sub><sup>-</sup> (160 µM) ± NO<sub>3</sub><sup>-</sup> (180 µM). Graphs represent relative fold change of spheroids equatorial area over control in percentage as a function of time. Areas were measured from the GFP fluorescence micrographs. N=2 independent experiments with n=8 spheroids per experiment.

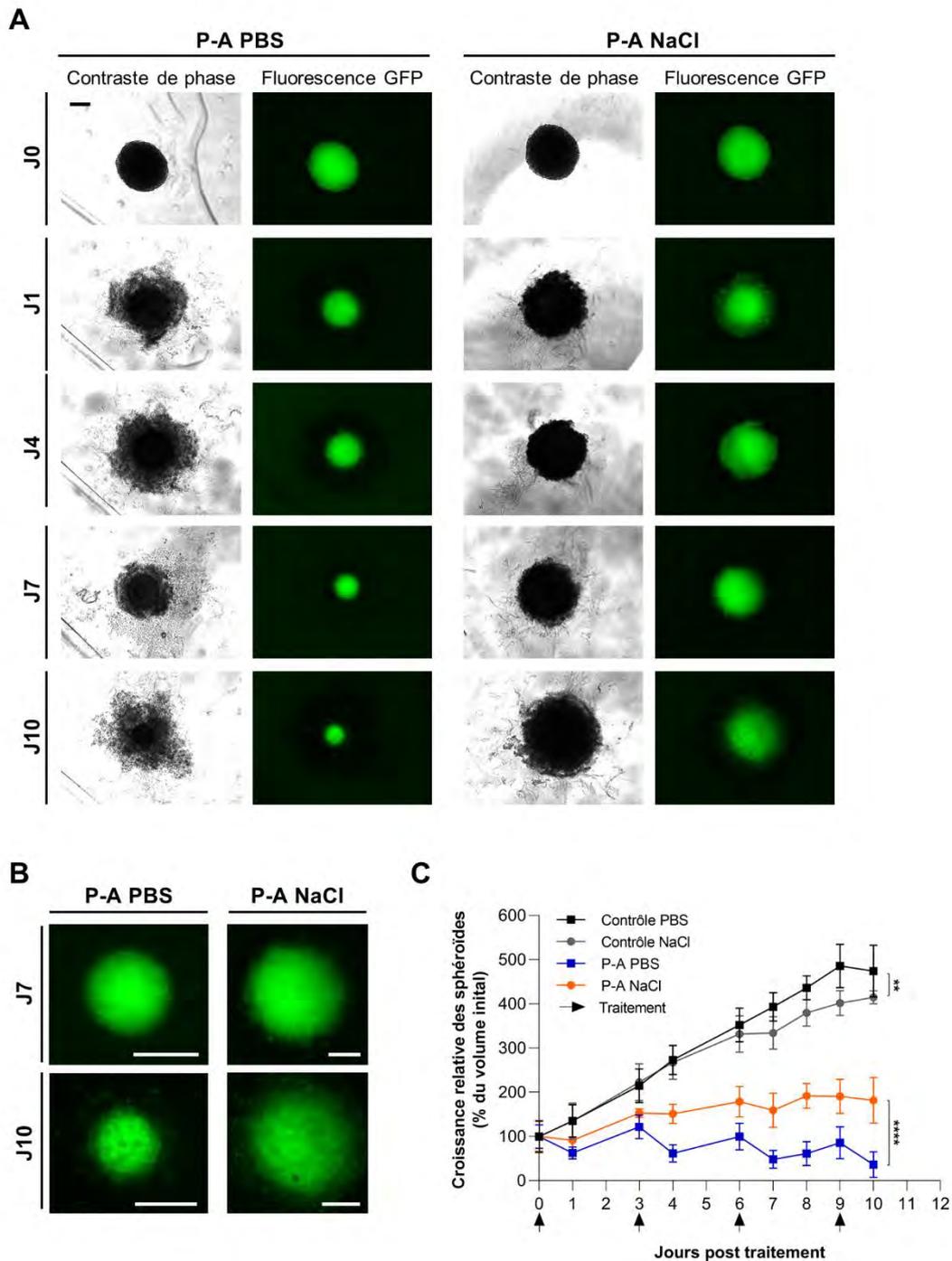
## 6. Effet des traitements successifs par les liquides activés par plasma sur la croissance des sphéroïdes HCT 116-GFP

Le P-A PBS et le P-A NaCl affectent seulement les cellules des couches externes des sphéroïdes. Malgré le détachement de ces cellules, les sphéroïdes reprennent une croissance similaire aux contrôles dans les 48 heures suivant le traitement. Ainsi, dans le but d'affecter plus fortement et de façon non réversible la viabilité des sphéroïdes, nous avons effectué des incubations de 4 heures dans le P-A PBS ou le P-A NaCl à des intervalles successifs de 3 jours (J0, J3, J6, J9). Chaque incubation est suivie d'un changement de milieu. Ces expériences ont uniquement été effectuées sur le modèle de sphéroïde HCT 116-GFP. Des courbes de croissance ont été tracées à partir des images de microscopie de fluorescence GFP (**Figure 41**).

Comme observé sur les expériences avec un seul traitement, 24h après le traitement, il y a une diminution de 40% de l'aire des sphéroïdes exposés au P-A PBS. Ceci est confirmé par les images de microscopie en lumière blanche et en fluorescence (**Figure 41.A**). En effet, 24 heures après le traitement une couronne de cellules mortes est bien visible en contraste et en fluorescence chez le sphéroïde traité par le P-A PBS, en revanche chez le sphéroïde traité par le NaCl activé par plasma, le détachement cellulaire est moins visible et les images en fluorescence montrent une couronne en périphérie moins intense mais qui émet toujours de la fluorescence, qui pourrait correspondre à un mélange de cellules vivantes et de cellules mortes. En accord avec les résultats obtenus précédemment, une reprise de croissance est ensuite observée jusqu'au prochain traitement. Les sphéroïdes traités par P-A NaCl ne sont pas affectés par le second traitement, la pente entre le J3 et le J4 reste nulle. Quant aux sphéroïdes qui ont subi les traitements successifs par P-A PBS, une pente négative, accompagnée d'une diminution de l'aire des sphéroïdes d'environ 50%, est observée après chacun des traitements, suivie d'une légère reprise de croissance, toutefois plus faible que celle des contrôles. Ceci est visible sur les images de microscopie avec le détachement concentrique des cellules mortes après chaque traitement.

Si l'on compare les images de microscopie de fluorescence des sphéroïdes traités par P-A PBS et P-A NaCl, le bord des sphéroïdes à J7 et J10 (24 heures post traitement J6 et J9) présente un aspect poreux pour les sphéroïdes traités NaCl, à l'inverse des sphéroïdes traités par le P-A PBS qui ont un bord franc et net (**Figure 41.B**). Globalement après avoir subi 4 traitements, les sphéroïdes traités par le P-A PBS présentent une diminution de leur aire de 60% par rapport au J0, due à un effet cumulé de chaque traitement (**Figure 41.C**). En revanche, les sphéroïdes

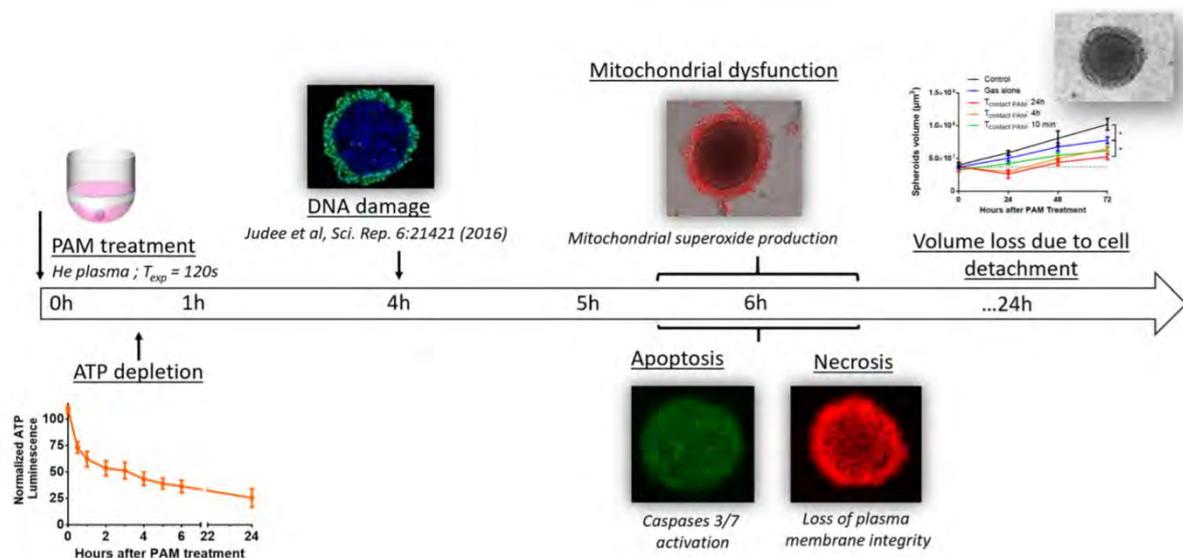
traités par le P-A NaCl ont augmenté de 80 % environ par rapport à leur aire initiale, il y a donc un ralentissement de la croissance mais pas d'effet cumulatif de chaque traitement dans ce cas. De plus, trois incubations de 4 heures successives des sphéroïdes dans du NaCl ont pour effet de ralentir leur croissance en comparaison avec le PBS (visible sur les courbes **figure 41.C**). Puisqu'une seule incubation n'affecte pas la croissance, le NaCl étant une solution non tamponnée, ceci pourrait donc s'expliquer par une exposition répétée à un pH plus acide (environ 6,5).



**Figure 41 : Effet des traitements successifs par P-A PBS et P-A NaCl sur la morphologie et la croissance des sphéroïdes de cellules HCT 116-GFP.** Les sphéroïdes sont incubés 4 heures dans du P-A PBS ou du P-A NaCl (exposés 120 secondes au jet de plasma) successivement à J0, J3, J6 et J9 avant d'être remis dans du milieu de culture. **(A)** Images de microscopie des sphéroïdes en lumière blanche et en fluorescence GFP avant et 24 heures après chacun des traitements. **(B)** Zoom des sphéroïdes après 3 et 4 traitements, Barre d'échelle (A et B) : 200 $\mu$ m. **(C)** Courbes de croissances des sphéroïdes, les flèches noires indiquent les traitements successifs. *t-test* sur N= 2 expériences, n= 6 sphéroïdes/condition/expérience, moyenne  $\pm$  erreur standard à la moyenne.

## 7. Bilan et discussion des résultats (partie I)

Les mécanismes impliqués dans la mort cellulaire des sphéroïdes, induite par traitement avec du DMEM activé par plasma (P-A DMEM), ont été élucidés. Il a été mis en évidence que la mort par apoptose des cellules HCT 116-WT du sphéroïde est induite par une chute de l'ATP intracellulaire des cellules qui conduit à un stress oxydatif mitochondrial (**Figure 42**). En effet, la déplétion en ATP induite par le traitement témoigne d'une dysfonction dans la respiration cellulaire contrôlée par les mitochondries. L'accumulation de ROS dans les cellules entraîne une augmentation du transport des électrons par la chaîne respiratoire des mitochondries (Lablanche, 2009; Tiwari *et al.*, 2002). C'est cette augmentation d'activité mitochondriale (mise en évidence par la production de l'ion superoxyde dans l'article 1) qui est à l'origine de deux phénomènes cellulaires : des altérations des pores de transition de perméabilité mitochondriale (mPTP) et le relargage du cytochrome *c* dans le cytoplasme. L'altération des mPTP entraîne un découplage de l'oxydation phosphorylante à l'origine du déficit énergétique cellulaire (déplétion en ATP).



**Figure 42 : Chronologie des événements induits par le traitement milieu de culture DMEM activé par plasma froid entraînant la mort cellulaire dans les sphéroïdes de cellules HCT 116-WT.**

Nous avons ensuite validé l'utilisation de la lignée cellulaire HCT 116 exprimant la protéine fluorescente GFP. En effet, ces cellules sont également sensibles au traitement par P-A DMEM, et que plus le temps d'exposition du DMEM au plasma est élevé, plus la croissance des sphéroïdes est affectée, de la même façon qu'avec la lignée WT. De plus, nous avons validé l'utilisation du marqueur fluorescent GFP comme outil pour discriminer les cellules mortes des cellules vivantes, facilitant ainsi les mesures pour les suivis de croissance (pas de biais induit par l'expérimentateur, mesures manipulateurs indépendantes).

Nous avons, par la suite, évalué les effets de deux solutions salines, le PBS et le NaCl, exposés au jet de plasma sur des sphéroïdes de cellules HCT 116-GFP et de cellules de carcinome ovarien SKOV-3-GFP-Luc. Nous avons décidé d'utiliser ces deux lignées cellulaires afin de voir si la réponse au traitement est lignée cellulaire dépendante. De plus, ces deux lignées ont été utilisées pour les investigations *in vivo* (**Résultats-Partie III**), sur deux modèles de tumeurs différents (sous-cutanée ou intrapéritonéale) et permettent ainsi d'évaluer l'efficacité de différents protocoles d'injection de liquides activés par plasma (intra-tumorale ou intrapéritonéale).

Le P-A PBS tue plus efficacement les cellules et pénètre plus rapidement dans les couches du sphéroïde que le P-A NaCl, bien que les deux solutions induisent une mort par apoptose des cellules. Cette différence d'efficacité entre le P-A PBS et le P-A NaCl est d'autant plus prononcée pour les sphéroïdes de cellules HCT 116-GFP.

Dans le but d'affecter plus fortement les cellules et jusqu'au cœur du sphéroïde, nous avons par la suite proposé des incubations successives dans le P-A PBS ou le P-A NaCl des sphéroïdes de cellules HCT 116-GFP. Ces traitements successifs par P-A NaCl ont pour effet de ralentir la croissance des sphéroïdes. Au contraire, lorsque les sphéroïdes subissent des traitements successifs avec du P-A PBS, un détachement concentrique des cellules après chaque traitement est observé, il y a donc un effet additif. Ainsi, il est possible d'éradiquer la totalité des sphéroïdes et d'affecter les couches profondes d'un modèle en trois dimensions avec des traitements répétés par P-A PBS.

L'étude des propriétés physico-chimiques de ces deux solutions après exposition au jet de plasma a montré que les variations d'osmolarité étaient similaires pour le PBS et le NaCl. En revanche, du fait de sa nature non-tamponné, le NaCl subit une forte acidification après l'exposition au plasma. Cette acidification du NaCl suite à l'exposition du plasma avait déjà été décrite auparavant et expliquée par la génération d'acide nitreux ( $\text{HNO}_2$ ) et d'acide nitrique ( $\text{HNO}_3$ ) dans la solution (Rumbach *et al.*, 2013). L'activité des RONS ou leur pénétration au sein des sphéroïdes pourraient être altérées dans un environnement acide, ceci pourrait expliquer l'efficacité moindre du P-A NaCl par rapport au P-A PBS. Cependant, l'acidification, qui a déjà été considérée comme responsable d'une cytotoxicité plus élevée due à la génération de peroxy-nitrite (Julák *et al.*, 2018), n'a pas joué un rôle majeur dans les traitements impliquant le P-A NaCl dans notre étude. Ainsi, des investigations supplémentaires devraient être réalisées afin de comprendre les processus de génération des espèces dans cette solution dans le but de comprendre au mieux les différences observées entre le P-A PBS et le P-A NaCl.

En revanche, la différence d'efficacité entre le P-A PBS et le P-A NaCl peut être attribuée à la plus forte production de peroxyde d'hydrogène  $H_2O_2$ , de nitrite  $NO_2^-$  et de nitrate  $NO_3^-$  dans le PBS après exposition au jet de plasma. Ces fortes concentrations accélèrent la cinétique de mort cellulaire permettant ainsi d'affecter plus de cellules, dans les couches plus profondes du sphéroïde. Nous avons également démontré que le  $H_2O_2$  et le  $NO_2^-$  sont responsables des dommages causés aux cellules lors de l'incubation avec le P-A PBS, en accord avec les travaux de Girard et ses collaborateurs, effectués sur cellules en 2D (Girard *et al.* , 2016), et de Privat et ses collaborateurs sur sphéroïdes de cellules de glioblastome (Privat-Maldonado *et al.* , 2018). De façon inattendu, le  $H_2O_2$  seul contribue à l'effet cytotoxique du P-A NaCl. Afin de valider l'implication de ces RONS dans la cytotoxicité du PBS et du NaCl activés par plasma, des expériences supplémentaires devraient être réalisées afin d'évaluer la réversibilité de l'effet cytotoxique des RONS en utilisant des inhibiteurs tels que l'acide ascorbique ou le pyruvate. Ceci nous permettrait de conclure quant à l'implication de ces RONS dans l'efficacité des traitements par PAM ou PAL ainsi que dans les processus de mort cellulaire induits. Dans le cas où l'utilisation de ces inhibiteurs ne reverserait pas totalement l'effet cytotoxique et induirait une mort cellulaire différente, ceci pourrait montrer que d'autres variables rentrent en jeu.

*Cette partie I a permis de mettre en évidence le potentiel anti-cancéreux de deux solutions salines, le tampon phosphate salin et le chlorure de sodium 0,9%, activés par plasma. J'ai mis en évidence que le tampon phosphate salin est plus efficace que le chlorure de sodium 0,9% en termes de mortalité induite et de génération de RONS après exposition au jet de plasma. Nous avons donc fait le choix de travailler avec ce liquide activé par plasma pour la suite des travaux de thèse. Afin d'augmenter l'efficacité de ces solutions activées par plasma sur des modèles en trois dimensions comme le sphéroïde in vitro ou les tumeurs in vivo, des traitements successifs peuvent être réalisés. Néanmoins, l'administration répétée in vivo en clinique pour le traitement des tumeurs peut être considérée comme invasive. C'est pourquoi, il est impératif/nécessaire de combiner les traitements par liquides activés par plasma avec d'autres méthodes afin d'améliorer leur délivrance et in fine potentialiser leurs effets. C'est dans ce contexte que nous avons évalué l'effet combiné des champs électriques pulsés avec le tampon phosphate salin in vitro sur les sphéroïdes de cellules HCT 116-GFP (partie II).*



## Partie II : Étude des effets du traitement combiné par PBS activé par plasma et champs électriques pulsés

### 1. Introduction-Résumé de l'article 3

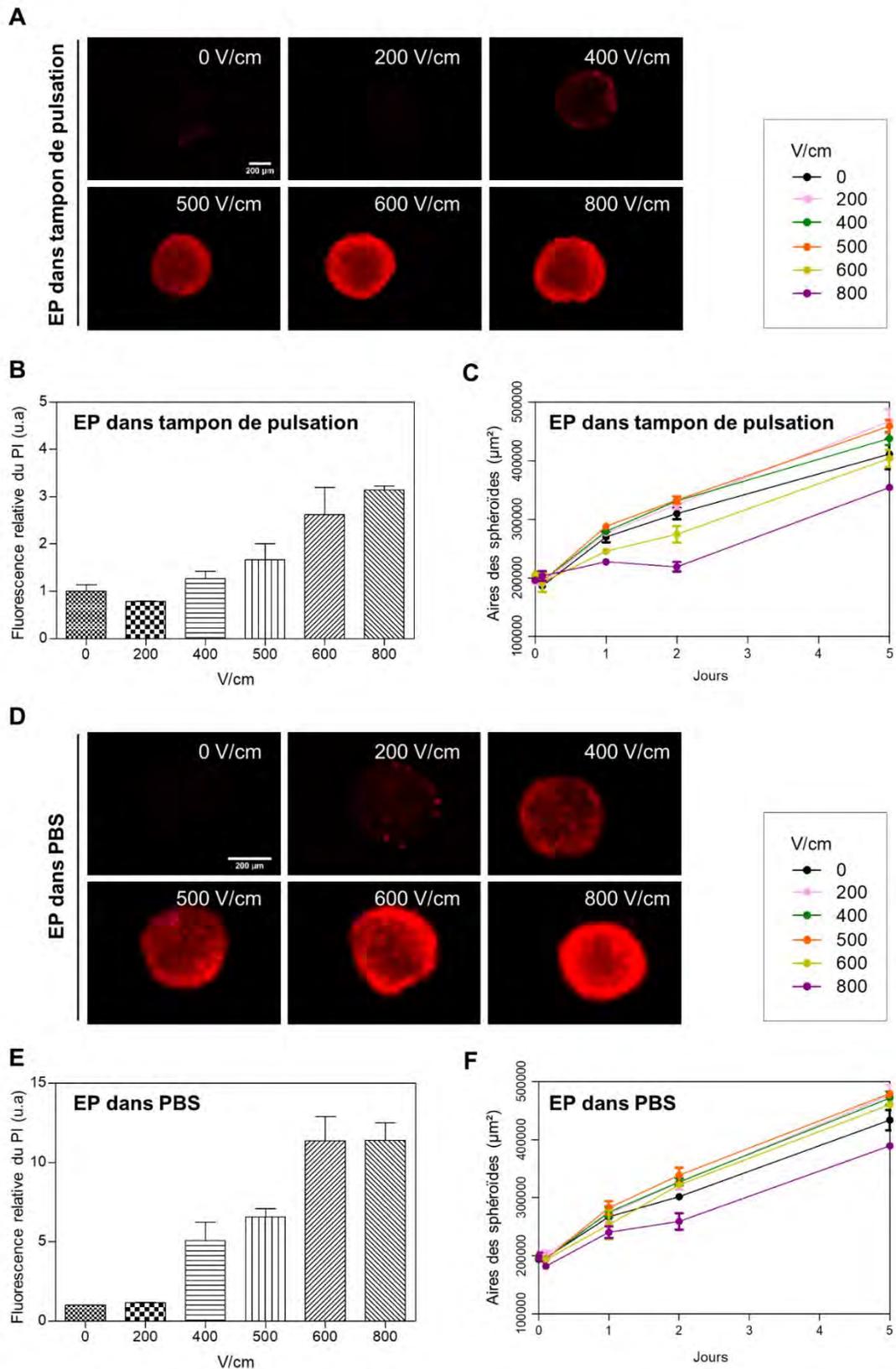
Nous avons montré dans la partie I que l'utilisation de PBS activé par plasma (P-A PBS) pour l'éradication de cellules cancéreuses est une stratégie prometteuse. Toutefois, utilisé sur des modèles multicellulaires en trois dimensions, les effets cytotoxiques et génotoxiques du P-A PBS, et des liquides activés par plasma en général, se limitent aux cellules en périphérie. Ainsi, la pénétration homogène des liquides activés par plasma (PAL) dans un tissu demeure une limite et un challenge pour une future utilisation thérapeutique.

Comme discuté en introduction, l'électroporation (EP) réversible peut être utilisée comme outil de vectorisation pour augmenter la délivrance aux cellules de petites et grosses molécules, en déstabilisant la membrane plasmique mais aussi leur organisation intracellulaire (cytosquelette) sans cependant affecter leur viabilité cellulaire. D'autre part, les champs électriques pulsés ont aussi pour effet de déstabiliser l'architecture tumorale (jonctions cellulaires, matrice extracellulaire et vaisseaux sanguins). Ainsi, nous avons proposé d'utiliser l'EP réversible dans le but de pallier les problèmes de pénétration du P-A PBS au sein des sphéroïdes de cellules HCT 116-GFP.

Article 3 : Pulsed electric field treatment enhances the cytotoxicity of plasma-activated liquids in a three-dimensional human colorectal cancer cell model. Elena Grisetti, Jelena Kolosnjaj-Tabi, Laure Gibot, Isabelle Fourquaux, Marie-Pierre Rols, Mohammed Yousfi, Nofel Merbahi, Muriel Golzio. *Scientific Reports* (2019) 9:7583.

L'objectif des travaux réalisés et présentés dans l'**article 3** ci-après était d'évaluer les effets du traitement combiné en comparaison avec des traitements simples (EP ou P-A PBS) à diverses échelles : tissulaire (morphologie des sphéroïdes), cellulaires et moléculaires. Dans le but de potentialiser les effets cytotoxiques du P-A PBS, il était primordial de se placer dans des conditions de perméabilisation cellulaire réversible qui n'affecte pas la viabilité. Aussi, il était important de vérifier que les paramètres électriques utilisés perméabilisaient efficacement la totalité des cellules du sphéroïde. Étant donné que les molécules à délivrer présentes dans le P-

A PBS sont de petites tailles et diffusent à travers la membrane (RONS), nous avons fait le choix d'utiliser les séquences d'impulsions d'EP standard utilisées pour l'ECT : 8 impulsions de 100  $\mu$ s à une fréquence de 1 Hz (période de 1000 ms). En revanche, nous avons fait varier la tension appliquée aux électrodes : 80, 160, 200, 240 ou 320 V (équivalant à 200, 400, 500, 600, 800 V/cm, espace inter-électrodes de 0,4 cm, planes et parallèles). D'ordinaire, pour les études *in vitro* sur cellules ou sphéroïdes, l'EP est réalisée dans un tampon de pulsation iso-osmotique (330 mOsm/kg) et peu conducteur (1,3 mS/cm) afin d'éviter l'effet joule et donc une élévation trop forte de la température qui pourrait être létale pour les cellules (Kandušer *et al.* , 2008; Teissié *et al.* , 1999). Le PBS est plus conducteur (15-20 mS/cm) que le tampon de pulsation. Ainsi, nous avons dans un premier temps vérifié que le PBS pouvait être utilisé efficacement pour l'EP des cellules du sphéroïde. Pour évaluer la perméabilisation des cellules du sphéroïde, l'iodure de propidium (PI) a été ajouté au tampon utilisé pour l'EP (tampon de pulsation ou PBS à 100 $\mu$ M) et les sphéroïdes sont imagés sous un microscope à fluorescence tout de suite après application des champs électriques pulsés (**Figure 43**). Ces expériences ont permis de mettre en évidence que les cellules des sphéroïdes sont perméabilisées plus efficacement dans le PBS que dans le tampon de pulsation pour des tensions similaires appliquées. Des expériences ont été réalisées en parallèle sans ajout de PI afin d'évaluer l'effet à long terme des champs électriques pulsés sur la croissance et la viabilité des sphéroïdes (**article 3, figure 2**). Des tensions appliquées de 240 ou 320 V (600, 800 V/cm) conduisent à une perméabilisation efficace des cellules du sphéroïde. Toutefois, à 320 V la croissance des sphéroïdes était affectée. Nous avons donc sélectionné une tension de 240 V (600 V/cm) qui conduit à une perméabilisation efficace des cellules du sphéroïde sans en affecter la viabilité.



**Figure 43 : Perméabilisation induite et croissance des sphéroïdes de cellules HCT 116-GFP par champs électriques pulsés.** Les sphéroïdes de cellules HCT 116-GFP de 5 jours de croissance ont été soumis à des champs électriques pulsés de différentes intensités dans du tampon de pulsation (A, B, C) ou du tampon phosphate salin PBS (D, E, F) contenant de l'iodure de propidium à 100 µM (PI). Le marquage PI (rouge) des cellules au sein des sphéroïdes est visible sur les images de microscopie à champs large à fluorescence (A et D). L'intensité de fluorescence a été quantifiée sur les images de microscopie et est présentée sur les histogrammes (B et E). En

parallèle, les mêmes expériences ont été réalisées sans ajout de PI pour suivre la croissance des sphéroïdes post EP (**C et F**). Quantification PI en tampon de pulsation : N=1 seule expérience avec 4 sphéroïdes ; en PBS : N=2 expériences indépendantes avec 4 sphéroïdes, moyenne  $\pm$  erreur standard à la moyenne. Suivi de croissance : tampon de pulsation et PBS : N= 2 expériences indépendantes avec 6 sphéroïdes. Moyenne  $\pm$  erreur standard à la moyenne.

Une fois les paramètres d'EP bien définis, nous avons mis en place un protocole de traitement combiné des sphéroïdes (présenté en **figure 8** de l'**article 3**). Brièvement, les sphéroïdes sont déposés délicatement dans 100 $\mu$ L de PBS (contrôle EP) ou de P-A PBS (traitement combiné) entre les électrodes puis la tension est appliquée. La première étape pour l'évaluation de l'effet du traitement combiné a été de suivre la croissance (au moyen de la fluorescence GFP) ainsi que la morphologie des sphéroïdes pendant 7 jours après le traitement (**article 3, figure 3 et vidéos supplémentaires A, B, C et D**). L'ajout de PI à faible concentration (1 $\mu$ M) (pour éviter la toxicité de la molécule) lors de la mise en culture pour le suivi de croissance a permis de mettre en évidence la mort cellulaire (marquage des cellules ayant perdu leur intégrité membranaire) sur le long terme (**article 3, figure 4**). Une diminution de plus de 95% de l'aire initiale a été observée un jour après le traitement pour les sphéroïdes traités par le P-A PBS et l'EP, avec 50% des sphéroïdes dont la totalité des cellules sont mortes (plus aucun signal GFP). Ceci a été validé par le suivi de la pénétration du PI qui a montré que la totalité des cellules dans toute la profondeur du sphéroïde étaient PI positives seulement 6-7 heures après le traitement. Il est important de noter que les sphéroïdes pour lesquelles toutes les cellules étaient PI-positives n'ont pas repris de croissance même après 7 jours de suivi. Tandis que les sphéroïdes traités seulement avec le P-A PBS ont vu leurs tailles diminuer de 75 % de l'aire en moyenne, et ne présentaient qu'une couronne de cellules PI-positives 24 heures après le traitement (en accord avec les données présentées dans la partie I des résultats). Ainsi, l'EP a potentialisé l'effet cytotoxique du P-A PBS au cœur des sphéroïdes.

Par la suite, nous avons effectué différents tests fonctionnels afin de caractériser au mieux les mécanismes cellulaires et moléculaires impliqués dans la mort des cellules des sphéroïdes traités par P-A PBS et EP. Tout d'abord, des immunofluorescences des histones  $\gamma$ -H2AX, impliquées dans les mécanismes de réparation des cassures de l'ADN, sur des cryocoupes de sphéroïdes ont montré que ces dommages sont engendrés dans les cellules en périphérie de façon très précoce pour les sphéroïdes ayant subi un double traitement (1 heure seulement après EP et mise en incubation dans le P-A PBS) (**article 3, figure 5**). Puis, après seulement 3 heures de traitement, la totalité des cellules des sphéroïdes présentent des dommages à l'ADN. En réponse à cette génotoxicité induite, nous avons mis en évidence, sur sphéroïdes entiers fixés, le clivage des protéines caspases 3 et 7 impliquées dans la mort cellulaire par apoptose (**article**

**3, figure 6).** Enfin, les modifications précoces de l'ultrastructure des organelles ont été étudiées par microscopie électronique à transmission (MET) sur des coupes ultrafines de sphéroïde (**article 3, figure 7**). Cette méthode a permis de mettre en évidence qu'une heure d'incubation dans le P-A PBS précédé par l'EP suffit à induire de fortes modifications dans les cellules en périphérie des sphéroïdes. Ces modifications comprenaient : des noyaux plus larges et gonflés présentant de l'ADN fragmenté (caryorrhexie) ou/et très condensé (pycnose) ; des mitochondries rétrécies/ rétractées présentant une membrane externe très fine et la perte des crêtes internes ; nombreux débris cellulaires, lysosomes et autophagosomes (également retrouvé dans les cellules du centre du sphéroïdes). Ces résultats montrent donc que le traitement combiné induit des modifications de l'ultrastructure des organelles très précoces. De plus, il semblerait que ce type de traitement induise, en plus des dommages à l'ADN et de l'apoptose, une mort par autophagie.

Les résultats présentés dans cet article montrent que l'utilisation de l'EP conduit à une potentialisation de la cytotoxicité et de la génotoxicité du P-A PBS, induisant la mort de toutes les cellules cancéreuses du sphéroïde par des processus qui ne sont pas seulement apoptotiques. Ces travaux démontrent aussi la faisabilité et l'efficacité d'un traitement combiné par liquide activé par plasma et par champs électriques pulsés.

2. Article 3 : Pulsed electric field treatment enhances the cytotoxicity of plasma-activated liquids in a three-dimensional human colorectal cancer cell model. Elena Grisetti, Jelena Kolosnjaj-Tabi, Laure Gibot, Isabelle Fourquaux, Marie-Pierre Rols, Mohammed Yousfi, Nofel Merbahi, Muriel Golzio. *Scientific Reports* (2019) 9:7583.

# SCIENTIFIC REPORTS



OPEN

## Pulsed Electric Field Treatment Enhances the Cytotoxicity of Plasma-Activated Liquids in a Three-Dimensional Human Colorectal Cancer Cell Model

Elena Griseti<sup>1,2</sup>, Jelena Kolosnjaj-Tabi<sup>1</sup>, Laure Gibot<sup>1</sup>, Isabelle Fourquaux<sup>3</sup>, Marie-Pierre Rols<sup>1</sup>, Mohammed Yousfi<sup>2</sup>, Nofel Merbahi<sup>2</sup> & Muriel Golzio<sup>1</sup> 

Cold atmospheric plasma and more recently, plasma-activated liquids (culture media, water or buffered solutions previously exposed to plasma), are gathering momentum in cancer cells treatment. Nevertheless, *in vitro* tests show that this novel approach is sometimes less efficient than expected. We here evaluate the mechanisms of action of the plasma-activated PBS and suggest to use electropermeabilization (EP) in combination with the plasma-activated phosphate-buffered saline (PBS), in order to potentiate the cytotoxic effect of the plasma activated liquid. Human multicellular tumor spheroids (MCTS), a three-dimensional cell model, which resembles small avascular tumors, was used to define the optimal treatment conditions for single and dual-mode treatments. MCTS growth, viability, and global morphological changes were assessed by live cell video-microscopy. In addition, the induction of caspases activation, the appearance of DNA damages, and cell membrane permeabilization, as well as the early modifications in the cellular ultrastructure, were examined by immunofluorescence, propidium iodide staining, confocal fluorescence microscopy and transmission electron microscopy, respectively. Altogether, our results show that a combined treatment resulted in an earlier onset of DNA damage and caspases activation, which completely abolished MCTS growth. This report is a proof of concept study evidencing that electropermeabilization greatly potentiates the cytotoxic effect of plasma-activated PBS *in vitro* in a three-dimensional cancer cell model.

Cold atmospheric plasma (CAP), a weakly ionized gas composed of reactive species, charged particles and photons, has been suggested in the last decade as a new modality for several biological and medical applications such as dentistry, sterilization, wound healing, tissue regeneration, and cancer treatment<sup>1</sup>. In the latter domain, CAP has demonstrated a potential capacity to inhibit tumor cells *in vitro* and *in vivo* in some types of cancer<sup>2</sup>. The cytotoxicity of CAP is mainly related to the reactive oxygen and nitrogen species (RONS), which are formed within the gas phase due to interactions between plasma and ambient air<sup>3</sup> or in contact with treated surface<sup>4</sup>. RONS are present in plasma at relatively high concentrations, and include long-lived reactive species such as hydrogen peroxide and nitrite-nitrate anions<sup>4</sup>. Interestingly, studies suggest that plasma can specifically kill cancer cells without affecting normal cells<sup>5,6</sup>. In the field of cancer treatment, two approaches are proposed. The first approach consists of a direct treatment of cancer cells with the CAP, where the gaseous plasma species directly act on the cancerous cells. The second strategy, which is much more recent, involves an indirect treatment with the plasma-activated liquids (PALs)<sup>7</sup>, where liquids are at first exposed to CAP (or, in other words, are activated by the plasma), and are subsequently placed in contact with cancer cells. Such liquids include either cell culture media (PAM), or

<sup>1</sup>CNRS UMR 5089, Institut de Pharmacologie et de Biologie Structurale, IPBS, 205 Route de Narbonne, 31077, Toulouse, France. <sup>2</sup>Université Toulouse III- Paul Sabatier, CNRS UMR 5213, Laboratoire des Plasmas et Conversion d'Énergie, LAPLACE, 118 Route de Narbonne-Bât 3R3-31062, Toulouse, France. <sup>3</sup>Centre de Microscopie Électronique Appliquée à la Biologie, CMEAB, 133 route de Narbonne Ranguel, 31062, Toulouse, Cedex, France. Correspondence and requests for materials should be addressed to N.M. (email: [nofel.merbahi@laplace.univ-tlse.fr](mailto:nofel.merbahi@laplace.univ-tlse.fr)) or M.G. (email: [muriel.golzio@ipbs.fr](mailto:muriel.golzio@ipbs.fr))

water (PAW) or physiological solutions such as phosphate buffered saline (PBS) or the NaCl saline solution (P-A PBS/NaCl, respectively)<sup>8</sup>. The use of PALs for cancer treatment is currently at an early stage of development, and the effects of PALs on cells are poorly understood. Interestingly, in addition to being cytotoxic to cancer cells, studies show that the cytotoxicity of plasma-activated solutions may be preserved over extended storage periods at  $-80^{\circ}\text{C}$  and even  $4^{\circ}\text{C}$ <sup>9</sup>, meaning that stock supplies could be prepared in advance and used later, which would offer extensive advantages for biomedical applications. Another benefit of PALs in respect to direct treatments with plasma jets, is that liquids could be injected into deep-seated tumors, whereas direct CAP treatments are limited to surface applications. Data gathered from *in vitro* studies suggest PAM induces DNA damages and stops the proliferation of human colorectal cancer cells<sup>10</sup>. To date, our team has investigated the effect of PAM on several tumor types in a 3D cancer cells model, the multicellular tumor spheroid (MCTS). We previously showed that the response to the treatment is cancer cell type-dependent. Intriguingly, in FaDu head and neck cancer cells MCTS, a proliferation boost was observed<sup>11</sup>. On the contrary, cytotoxic effects were observed at the external layer of the MCTS, made of human colorectal cancer cells (HCT 116)<sup>9</sup>. Finally, the cytotoxicity of P-A PBS was reported for different cancer cell types including human glioblastoma<sup>12,13</sup> and human pancreas adenocarcinoma cells<sup>13</sup>. These promising preliminary results suggest that PALs penetration might be limited, particularly when cells have tighter junctions, or when larger volumes of cells have to be treated.

With the aim to enhance RONS penetration, and thus to increase the efficiency of P-A PBS, we here suggest the use of the P-A PBS in combination with electroporomeabilization (EP). The EP, which was first described in 1972 by Neumann *et al.* on vesicular membranes<sup>14</sup>, relies on the capacity of pulsed electric fields to modulate the electric transmembrane potential of cells, resulting in the generation of transient and localized permeant structures in cell membranes, while not altering the cellular homeostasis<sup>15</sup>. At well-defined electric pulses parameters (field strength, pulse duration, number of pulses), the increased permeability is transient and the viability of the cells is well preserved<sup>16</sup>. This capacity of pulsed electric field to reversibly permeabilize cell membranes is nowadays used to increase intracellular delivery of therapeutic molecules to cells and tissues. This approach thus enables the administration of lower local or systemic drug doses<sup>17,18,19</sup>. In the case of electrochemotherapy (ECT), which is a combined approach using chemotherapeutics and electroporomeabilization, a fast and efficient transfer of anti-cancer drugs is enabled across transient membrane alterations, generated by EP. Protocols in the framework of the European Standard Operating Procedure on Electrochemotherapy (ESOPE protocol) standardized the clinical application of ECT<sup>20</sup>. In 2006, a prospective non-randomized study reported a complete 73.7% response rate for local tumor nodules treatment with ECT<sup>21</sup>. Ten years later, a prospective, observational study enrolling 376 patients with superficial metastases, who were subjected to ECT in 10 different research centers confirmed these results<sup>22</sup>. Electrogenotherapy (EGT) is also used in clinics and allows efficient electro-delivery of small RNA (siRNA and anti RNA), as the electric field reportedly acts on both the membrane permeabilization and the electrophoretic drag of the negatively charged small RNA molecules, and both processes are required to promote the translocation and traffic to the nucleus and finally contribute to gene expression<sup>23,24,25</sup>. Currently, new electrochemotherapy strategies are under development to extend ECT applicability to tumors with different histological hallmarks. Calcium electroporation was recently proposed as a simple and inexpensive tool for anti-cancer therapy<sup>26,27</sup>, and relies on the combination of EP with supraphysiological doses of calcium. This therapeutic approach supports the theory that other compounds, which are not necessarily complex chemical drugs, could be combined with electroporation to cure cancer.

In a similar context, a recent study investigated the effect of a sequential treatment of cells with EP and PAM, where the effect was compared in tumorigenic versus normal rat liver adherent monolayers of epithelial cells<sup>28</sup>, and demonstrated that combined treatment led to a better killing of tumor cells, while non-tumorigenic cells were less affected.

In order to test the efficacy of a treatment, three-dimensional (3D) cell culture model, the MCTS, can be used. The MCTS has particular interest in biomedical studies, especially in screening tests for cancer treatments, due to cellular 3D organization that mimics tumor tissues<sup>29,30</sup>. In this regard MCTS might include a proliferative, a quiescent and a necrotic layer, cell-to-cell communications channels, including gap junctions, desmosomes and electrical coupling, and its own extracellular matrix<sup>31,32,33</sup>. Thus, MCTS allows a better preclinical evaluation of anticancer therapeutic strategies and enables the prediction of the *in vivo* response. The 3D organization makes cellular spheroids particularly attractive for the evaluation of drug delivery efficiency upon EP<sup>34</sup>.

In this context, the aim of the present study was to evaluate the effect of P-A PBS in a 3D cancer cells model, and to potentiate the cytotoxic effect, by combining P-A PBS treatment with EP. The response to single and dual treatments was investigated within MCTS made of human colorectal cancer cells HCT 116, expressing the green fluorescent protein (GFP). The P-A PBS's efficiency was monitored: (i) by live cells fluorescence microscopy, which allowed assessing macroscopic morphological changes and cell membrane permeability occurring in HCT 116-GFP MCTS over time; (ii) by transmission electron microscopy (TEM), which enabled us to evaluate modifications in MCTS ultrastructure; (iii) by immunofluorescence, after the immunostaining of phosphorylated histone H2A variant H2AX, which allows assessing DNA damages, and (iv) by a luminescent assay, determining the pro-apoptotic potential of the treatment, measuring caspase-3/7 activities in MCTS.

## Results

**Plasma exposure time-dependent cytotoxicity of P-A PBS in HCT 116-GFP MCTS.** Prior the investigation of the effect of a dual treatment with P-A PBS and EP, we first selected the optimal conditions for PBS activation with the CAP jet. MCTS were treated with PBS activated with the plasma jet for 60, 120 or 240 seconds. Control MCTS were incubated for 4 hours either in PBS or in PBS exposed to the helium gas flow (no plasma) to obtain a control hypoosmotic solution. The exposure to hypertonic solution did not affect MCTS growth, as their growth rate was similar to the MCTS incubated in cell culture medium (Supplementary Data, Fig. 1).

The macroscopic appearance and the viability (which was correlated with the GFP fluorescence) of MCTS were daily monitored with a wide field microscope (Fig. 1). One day after the treatment, bright field micrographs evidenced detached cells (indicated by black arrows in Fig. 1A) in the periphery of the treated MCTS. Detached cells did not exhibit any green fluorescence. The width of the concentric rim of dead cells was the greatest in MCTS, which were treated with PBS activated with the plasma jet during the longest period. The growth curve (Fig. 1B) shows that MCTS lost 15, 55 and 85% of their area, respectively, at day 1 after the treatment with PBS, which was activated with a plasma jet for 60, 120 and 240 seconds, respectively. When PBS was activated for 60 or 120 seconds, MCTS were able to grow with a similar rate to controls. On the contrary, MCTS treated with P-A PBS, which underwent a 240 seconds activation, exhibited a slower growth rate. In a seven days follow up, MCTS were 84, 70 and 38% smaller than control, respectively, for PBS activated with a plasma jet for 60, 120 and 240 seconds.

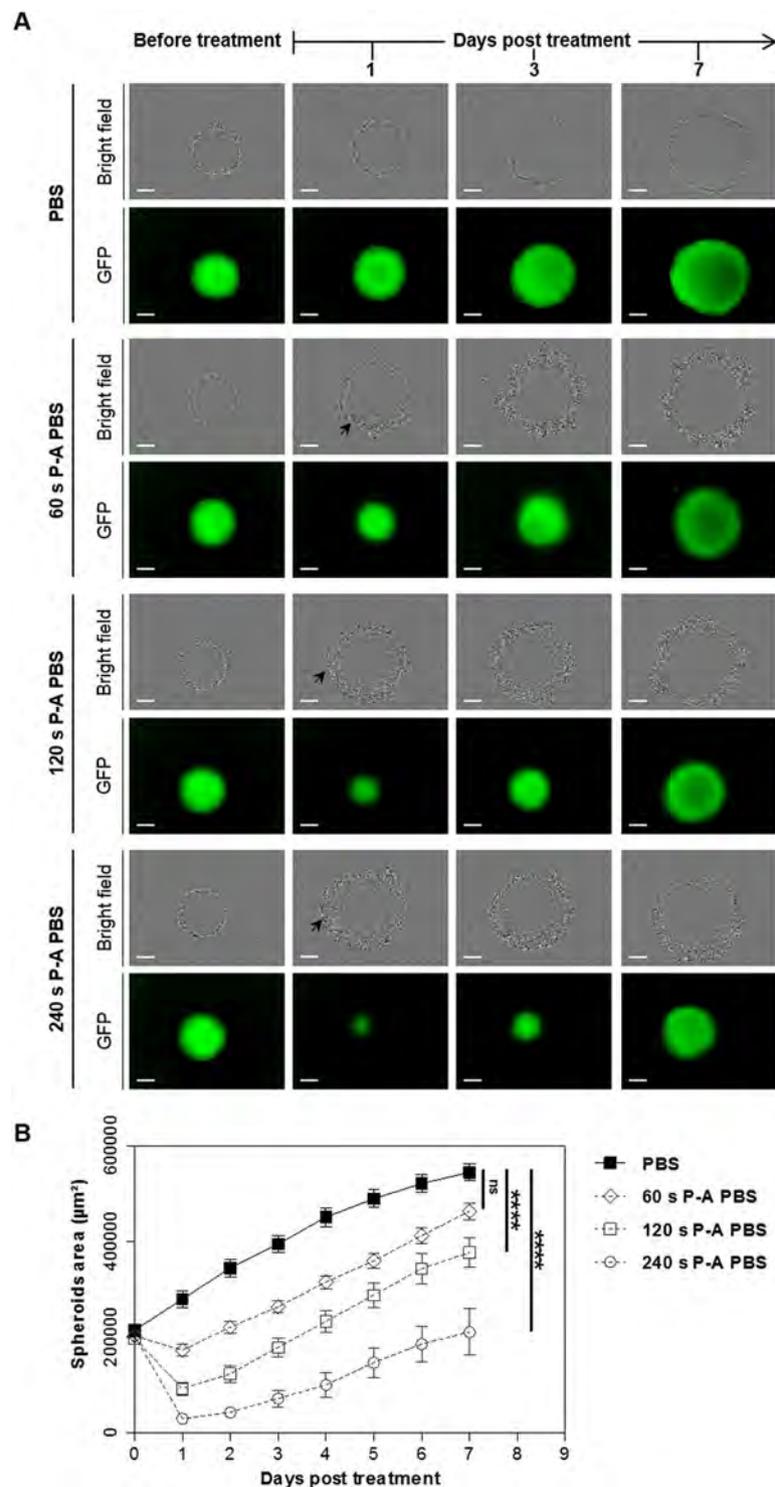
Hydrogen peroxide  $H_2O_2$  and nitrite  $NO_2^-$  content were also quantified, and the osmolarity of P-A PBS was measured for different plasma exposure times (Supplementary Data, Table 1). The concentrations of the two species directly correlated with plasma exposure times and correlated with the trend observed in growth curves. PBS plasma jet exposure caused an increase in the osmolarity of the solution, which was proportional to the plasma exposure time, and was due to water evaporation.

Altogether, these results demonstrate that the cytotoxicity of P-A PBS depends on the time of exposure of the PBS to the plasma jet. Sixty seconds of exposure were not enough to obtain significant difference in MCTS growth seven days after treatment, compared to 120- and 240-seconds activation, where irreversible damages and a slower growth rate of MCTS were observed. While P-A PBS activated for 120 or 240 seconds both had a cytotoxic effect, the exposure of PBS to a plasma jet for 240 seconds highly impacted the osmolarity of the solution. As the osmolarity of the PBS activated for 120 seconds was in a tolerable range for the cells, we considered it as the most appropriate for the combination with EP. Moreover, the concentration of hydrogen peroxide within this solution was high enough to induce cytotoxicity to cancer cells, while being tolerated by normal cells<sup>7,35</sup>.

**Optimization of EP parameters for non-lethal and efficient MCTS reversible permeabilization.** In order to potentiate the cytotoxic effect of P-A PBS without harming the cells with a pulsed electric field, we defined the optimal conditions for a transient electroporation. MCTS were submitted to EP according to parameters used in electrochemotherapy ESOPE protocols (eight pulses lasting 100  $\mu$ s at a frequency of 1 Hz)<sup>21</sup>. Different electric field intensities were tested, from 200 to 800 V/cm, in order to select the intensity allowing efficient and reversible cell permeabilization, without affecting cell growth and viability. Permeabilization was evaluated on live MCTS shortly after EP with wide field fluorescent microscopy (Fig. 2A) using the propidium iodide (PI), a non-permeant red fluorescent DNA intercalating agent that penetrates only in cells exhibiting defects in plasma membrane integrity. PI fluorescence was quantified (Fig. 2B). In parallel, MCTS were electropulsed and directly placed in culture medium, in order to evaluate the impact of EP on MCTS growth over a period of 5 days post treatment (Fig. 2C,D). For the control condition (0 V/cm), only few PI-positive cells were observed, corresponding to rare and scattered dead cells presenting damaged membrane. As expected, permeabilization increased with electric field intensity. At 400 V/cm, there were still some non-permeabilized cells in the core of the MCTS. When using the highest electric intensities, 600 and 800 V/cm, a concentric permeabilization was observed with an intense staining at the external layer of the MCTS. PI quantification showed no significant differences between 600 and 800 V/cm intensity. Nevertheless, at 800 V/cm pulsed electric field strength, a slight but not significant decrease of MCTS growth rate was observed during two days following the treatment. Based on these results, 600 V/cm was selected as an optimal condition to promote cells in-depth reversible permeabilization, without affecting cell viability.

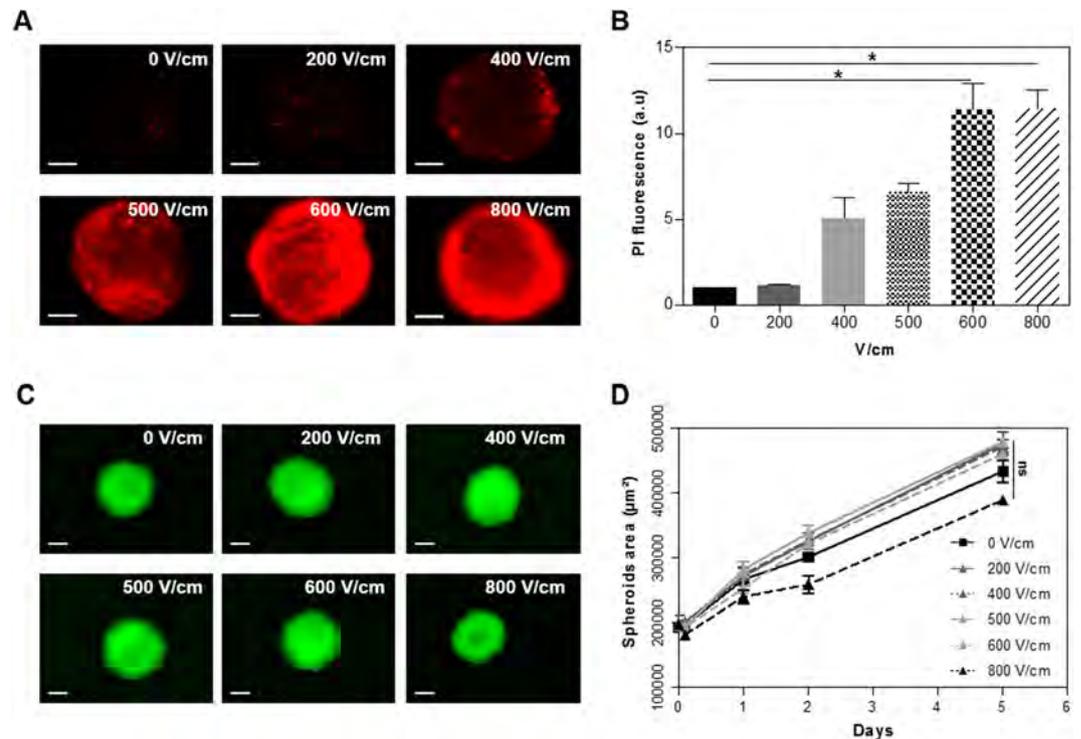
**Irreversible cytotoxic effect of dual treatment with P-A PBS and EP on HCT 116-GFP MCTS.** The macroscopic morphological changes and cell viability after dual treatment with EP (600 V/cm) and 120 seconds P-A PBS were investigated by live fluorescence microscopy. Both bright field and GFP fluorescent micrographs are shown in Fig. 3A. MCTS treated with P-A PBS displayed the same morphology and growth as the one described previously in Fig. 2. When MCTS were submitted to EP in addition to P-A PBS, a morphology similar to the P-A PBS MCTS group was observed on bright field images until day 3. Seven days after treatment the 3D structure of MCTS was completely ruined. GFP fluorescence micrographs showed that entire MCTS were affected one day after the treatment. The cells lost their fluorescence within 1 day and there was no recovery even 7 days after treatment. These results were confirmed when propidium iodide was added to MCTS after treatment, showing that PI-positive cells (dead cells) within the MCTS were GFP negative (Fig. 4). Interestingly, micrographs showed that a PI-positive necrotic core began to appear within the MCTS after 8 days of culture, which means that at the time of treatment, the core included viable cells, which is in line with literature findings concerning early developmental stages of MCTS<sup>36</sup>. MCTS area was measured daily and GFP fluorescence micrographs were used to obtain growth curves (Fig. 3B). A decrease of more than 95% of the mean area was observed one day after treatment for MCTS dually treated with P-A PBS and EP, whereas MCTS treated with P-A PBS alone displayed a decrease of 75%. Up to 2 days after the treatment, the differences between the two treated conditions became significant, with a  $p < 0.0001$  after 4 days. Our results demonstrate that the cytotoxicity of P-A PBS could be greatly enhanced by means of EP. Videos available on Supplementary Data showed that complete cell death occurred between 6- and 7-hours post-treatment.

In order to assess the involvement of  $H_2O_2$  in the cytotoxicity of the P-A PBS, additional experiments were performed with 680  $\mu$ M of hydrogen peroxide (equal to the concentration that was quantified in Supplementary Table 1) added to the PBS medium in combination with EP. The results showed that PBS containing 680  $\mu$ M  $H_2O_2$  was less toxic on MCTS than P-A PBS (Fig. 3B). According to the obtained growth curves, a decrease of 49% of



**Figure 1.** MCTS growth inhibition depends on the time of PBS activation with the plasma jet. HCT 116-GFP MCTS were incubated 4 hours in P-A PBS activated with the plasma jet for 60, 120 or 240 seconds. After treatment, MCTS were placed in culture medium for a growth follow-up during 7 days. **(A)** Bright field and GFP fluorescence micrographs of MCTS before treatment and at day 1, 3 and 7 post treatment. Black arrows indicate detached dead cells. Scale bar: 100  $\mu\text{m}$ . **(B)** Growth curves plotted from GFP fluorescence area, mean  $\pm$  standard error mean.  $N = 2$  experiments,  $n = 6$  MCTS per experiment per condition. Two-way ANOVA \*\*\*\* $p < 0.0001$ .

the mean area was observed one day after treatment for MCTS treated with PBS containing  $\text{H}_2\text{O}_2$ , whereas MCTS treated with P-A PBS displayed a decrease of 75%. There was no significant difference when PEF was performed in presence of  $\text{H}_2\text{O}_2$ , showing that PEF potentiation of P-A PBS cytotoxicity could not be attributed to  $\text{H}_2\text{O}_2$ .



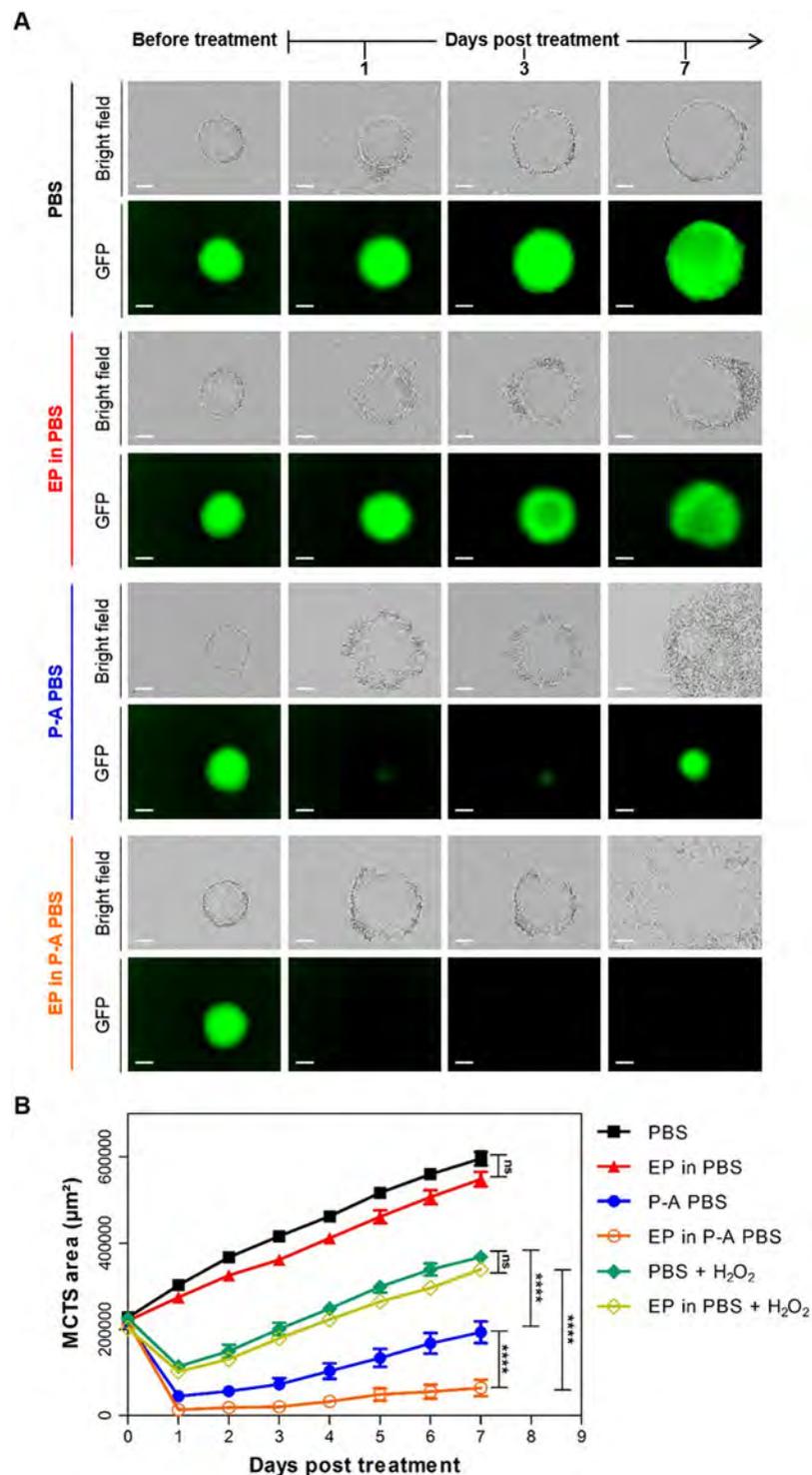
**Figure 2.** EP conditions optimization for MCTS reversible electroporation. HCT 116-GFP MCTS were submitted to different electric field strengths (0, 200, 400, 500, 600, 800 V/cm) in PBS before being incubated (i) with 100  $\mu$ M propidium iodide (PI) to assess the permeabilization or (ii) in culture medium for the growth follow up. (A) Wide field fluorescence micrographs (PI staining in red) obtained immediately after electroporation. Scale bar: 100  $\mu$ m. (B) Quantification of PI fluorescence according to EP condition. One-way ANOVA \* $p = 0.01$  (C) GFP fluorescence micrographs 2 days after treatment. Scale bar: 200  $\mu$ m. (D) MCTS growth curves over 5 days post treatment (determined from the area of GFP fluorescence). Two-way ANOVA showed no significant (ns) differences in MCTS growth over time. B and D displayed mean  $\pm$  standard error mean;  $N = 2$  experiments,  $n = 6$  MCTS per experiment per condition.

**Early DNA damages and caspases activation induced by dual treatment with EP and P-A PBS.** DNA damages were evaluated by immuno-detection of phosphorylated form of histone H2A, the  $\gamma$ H2AX, on 5  $\mu$ m-thick MCTS cryo-sections at 1 and 3 hours post treatment (Fig. 5). MCTS treated with P-A PBS displayed a similar  $\gamma$ H2AX signal pattern 1 or 3 hours post treatment, with localized peripheral fluorescence within the MCTS. MCTS undergoing P-A PBS combined with EP showed a large number of positive  $\gamma$ H2AX cells and a stronger signal intensity, compared to MCTS treated only with P-A PBS. One hour after treatment, the EP in P-A PBS MCTS exhibited an intense signal-emitting concentric layer of H2AX-positive zones. Within the MCTS core, there were still some cells with unaltered histones H2A. After 3 hours of treatment, the  $\gamma$ H2AX signal became more homogenous and extended throughout the whole MCTS. The  $\gamma$ H2AX staining patterns were clearly visible in micrographs acquired at higher magnification, a majority of whole-nuclear  $\gamma$ H2AX signal was observed when dual-treatment was performed (Supplementary Fig. 2). Control and EP MCTS displayed few if any cells exhibiting a positive  $\gamma$ H2AX signal 3 hours after treatment. These results show that when EP is performed in addition to P-A PBS, the DNA damages are more intense and propagate all the way through the MCTS.

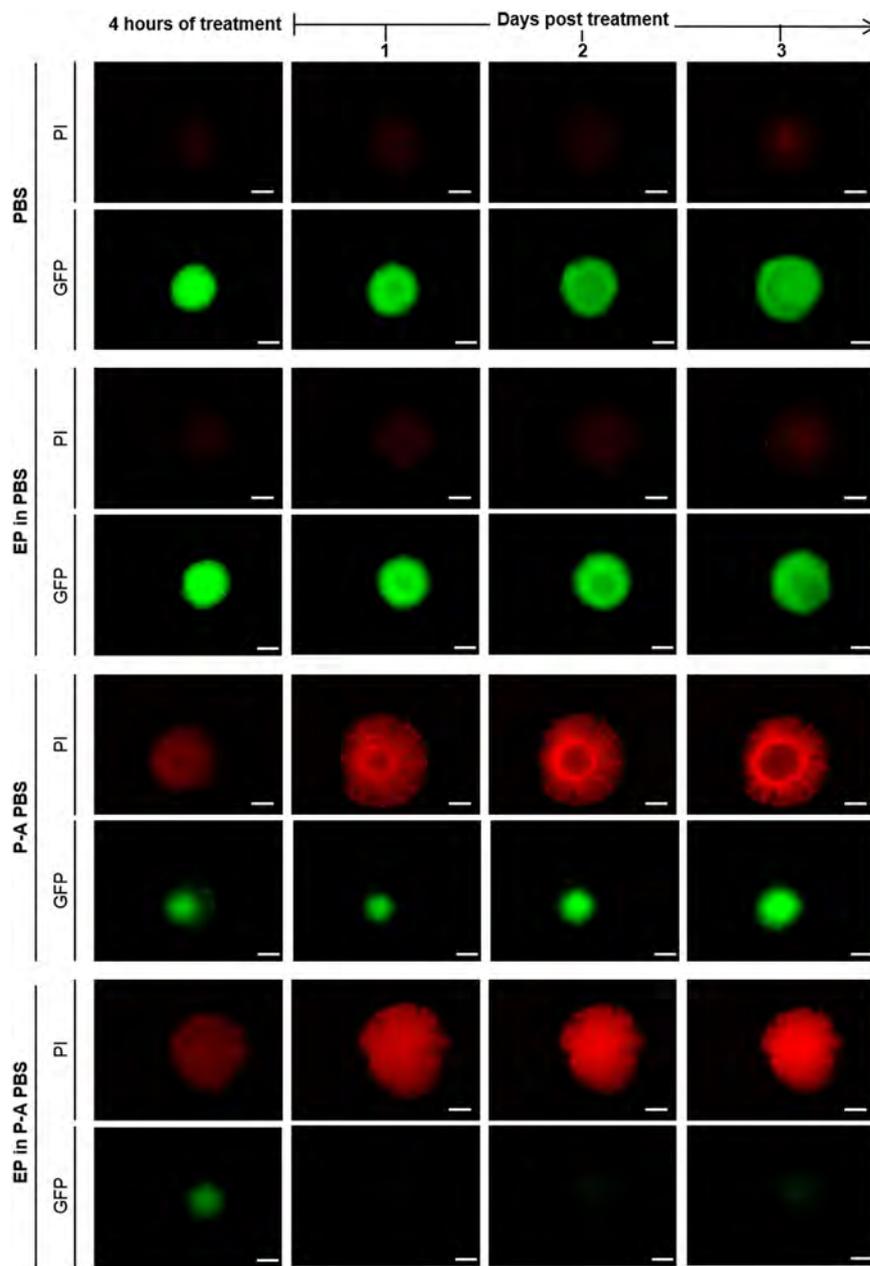
In further analyses, we evaluated the kinetics of apoptosis induction after treatment. The FLICA<sup>TM</sup> fluorescent reagent was used to detect activated caspases 3/7 (red-fluorescent signal) at 1, 2, or 3 hours post treatment. Whole MCTS were fixed in formalin and were imaged under a confocal microscope. Micrographs shown in Fig. 6 display z-stacks taken in the middle of the MCTS. Control (PBS), EP in PBS and P-A PBS treated-MCTS did not show major caspase activation over 3 hours. In the dual treatment group, we observed a peripheral signal that was more intense than the one observed in the other groups as soon as 1 hour after treatment. Two hours after treatment, a concentric pattern of caspase activation was evident, and occupied a thicker outer layer than the one observed 1-hour post treatment. Finally, 3 hours after treatment, the MCTS displayed a distorted shape as well as a smaller volume than the MCTS in other groups, and exhibited an intense fluorescence signal across the entire MCTS.

Altogether, these results show that  $\gamma$ H2AX induction and activation of Caspase 3/7 after EP treatment in the presence of PA-PBS were occurring faster than when P-A PBS treatment was applied alone. Secondly, such damages were occurring in deeper layers of the MCTS when the combined treatment was applied.

**Assessment of early ultrastructural modifications 1-hour after treatment.** The ultrastructure of MCTS cells was assessed with transmission electron microscopy (TEM) (Fig. 7). The periphery of MCTS treated with the dual treatment was characterized by an outer layer of large and moribund cells, which exhibited large

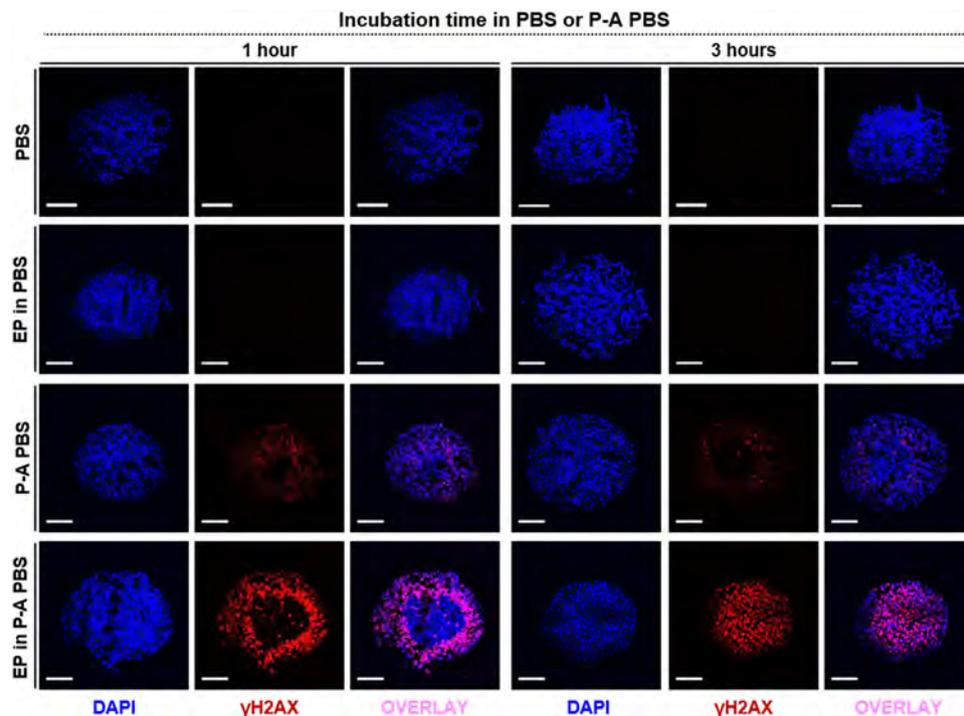


**Figure 3.** Potentiation of the P-A PBS cytotoxic effect on MCTS submitted to EP. HCT 116-GFP MCTS were put in either PBS, P-A PBS or PBS containing  $680\ \mu\text{M}$  of  $\text{H}_2\text{O}_2$  (negative control) before being electropulsed and let for 4 hours. MCTS were then placed in culture medium for growth follow-up over 7 days post treatment. (A) Wide field micrographs (bright field and GFP fluorescence) before treatment (day 0) and 1, 3 and 7 days after treatment. Scale bar:  $200\ \mu\text{m}$ . (B) Growth curves representing viable MCTS (GFP fluorescence) area over time after treatment. Representative images of  $N = 4$  experiments ( $n = 6$  MCTS per experiment) for PBS, EP in PBS, P-A PBS and EP in P-A PBS (8/24 MCTSs regrew after dual treatment, represented by the explicit error bar occurring in the P-A PBS group) and  $N = 3$  experiments for PBS +  $\text{H}_2\text{O}_2$  and EP in PBS +  $\text{H}_2\text{O}_2$  ( $n = 8$  MCTS per experiment). Two-way ANOVA \*\*\*\* $p < 0.0001$ .



**Figure 4.** PI penetration in dead cells after MCTS dual treatment. HCT 116-GFP MCTS were incubated with P-A PBS containing  $1\ \mu\text{M}$  of PI during 4 hours and then placed in culture medium containing  $1\ \mu\text{M}$  PI for wide field fluorescence microscopy.  $T_0$  represents time shortly after treatment. Representative images of MCTS with Propidium iodide (PI) in red and GFP in green. Scale:  $200\ \mu\text{m}$ .

and swollen nuclei with either a condensed nucleolus (pyknosis) or nuclear fragmentation (karyorrhexis) (indicated by black solid line circles in Fig. 7). These alterations, showing the destructive fragmentation of the nucleus of a dying cell, could occur as a result of either programmed cell death or necrosis. The cytosol of peripheral cells was filled with organelles debris, lysosomes, autophagosomes (indicated by black dashed line circles) and lamellar bodies (pointed with red arrows). Large autophagic vacuoles were observed in high number in dually treated specimen, even at the core of the MCTS, compared with P-A PBS-treated MCTS (black dashed line circle in Supplementary Fig. 3). The mitochondria were shrunk and their membrane was thick (indicated by black arrows). More precisely, the occurrence of inner membrane mitoptosis (IMM) was observed, where cristae and internal matrix of the mitochondria were lost while the external mitochondrial envelope remained unaltered. These structures were also observed in some cells of P-A PBS-treated MCTS, but to a smaller extent. When MCTSs were treated with P-A PBS only, cells often exhibited condensed nucleoli (pyknosis), while mitochondria exhibited thinner mitochondrial membranes and mitochondrial matrix loss, indicated by black arrows in the panels (Fig. 7). Most of the cells in the MCTS, which were exposed to the PBS alone, exhibited normal morphologies of the cytosol, nuclei, and cell organelles. When MCTSs were submitted to EP in PBS, a slightly larger amount

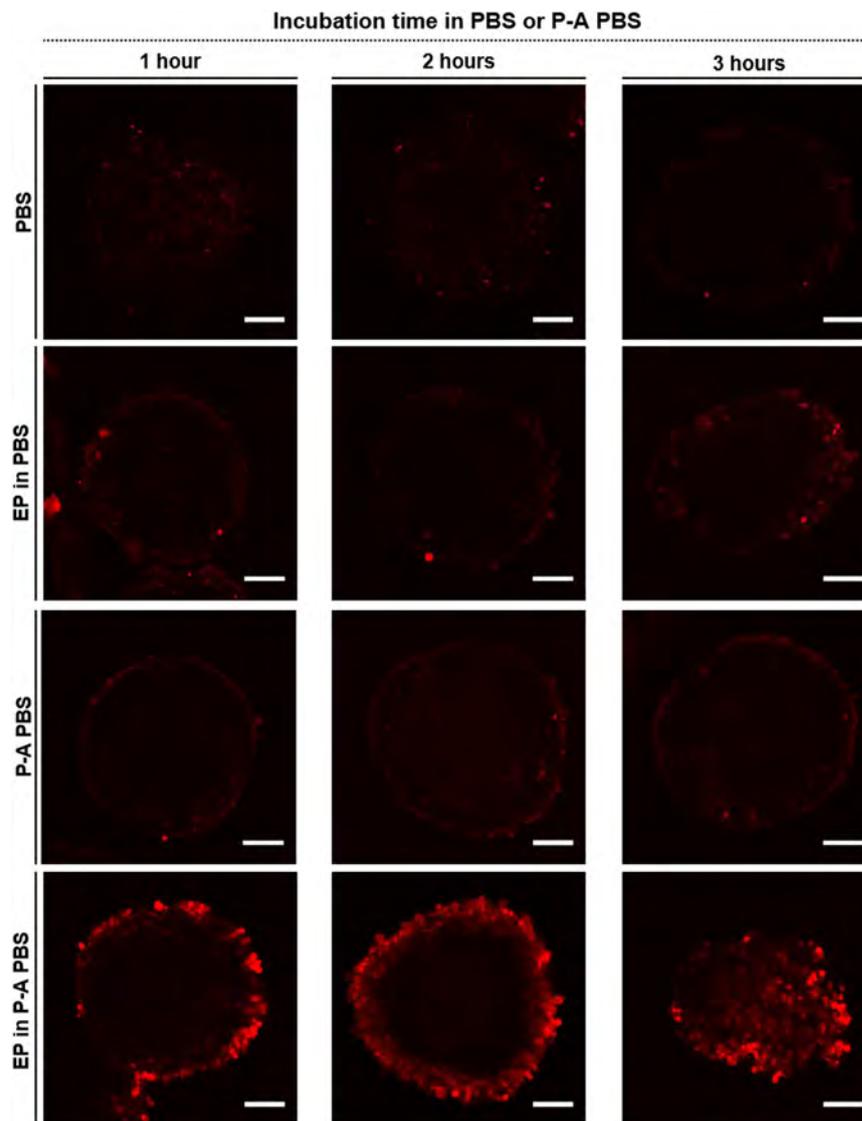


**Figure 5.** Combination of P-A PBS and EP enhanced DNA damages within MCTS. MCTS were fixed in formalin at either 1 or 3 hours post treatment (control and EP in PBS) or P-A PBS (P-A PBS and EP in P-A PBS) before cryo-freezing in OCT. Five  $\mu\text{m}$ -thick sections stained with DAPI (blue) and antibodies against  $\gamma\text{H2AX}$  (Alexa 594, red) were analyzed with a confocal microscope. Scale bar = 100  $\mu\text{m}$ . Representative images of  $N=2$  experiments,  $n=10$  MCTS per experiment per condition.

of vacuoles and lysosomes was observed (denoted with letter V and L, respectively in Fig. 7). The membranes of mitochondria were more electron dense than the ones observed in the PBS control, and the Golgi apparatus was slightly dilated (denoted with letter G in Fig. 7). These results suggest that in addition to early apoptosis, dual treatment can also induce autophagy, which allows a methodically arranged degradation of dysfunctional cellular organelles.

## Discussion

In this study, we investigated the effect of a dual treatment with P-A PBS and EP in order to increase the cytotoxicity of the plasma-activated liquid. To test the efficiency of the dual treatment, we used a three-dimensional cancer cell model made of human colorectal cancer cells. In the first approach, we had to determine the optimal conditions for PBS exposure to a CAP jet, and to assess the most appropriate parameters for the electropermeabilization of HCT 116-GFP MCTSs. The efficacy of P-A PBS depends on its content of reactive species, which indeed depends on the operating conditions used for PBS activation (such as the gap between the plate containing PBS and the plasma jet, the gas flow rate, the plasma exposure time), and also the used plasma jet setups (configuration, working gas, power supplies, plasma temperature), which directly affect the produced RONS ratio<sup>12</sup>. Using MCTS as a model to predict the treatment's response was a reliable approach making sure to take into account the growing rate of MCTS<sup>36</sup>. Indeed, small size MCTS display higher growing rate than larger ones, and the different organization of the layers between the center and the periphery<sup>19,35</sup>. Our previous studies demonstrated that plasma exposure of cell culture medium during 120 seconds allows efficient inhibition of HCT 116 human colorectal cancer cells MCTS growth<sup>9</sup>. Yet, cell culture medium comprises several components that might interact with plasma and might potentially generate harmful byproducts, therefore we chose to assess the effectiveness of plasma-activated PBS, which only contains salts. In order to correlate plasma activation time with the activated liquid's efficacy, we screened several exposure times of PBS to the CAP jet and we measured the concentration of two specific RONS species ( $\text{H}_2\text{O}_2$  and  $\text{NO}_2^-$ ). Even if the levels of these RONS species are considered a good indicator for the cytotoxicity of PAL to cancer cells, the effect of P-A PBS should not be linked exclusively to the presence of RONS. Indeed, it was already shown<sup>9</sup> and confirmed in our study, that the presence of  $\text{H}_2\text{O}_2$  alone is not sufficient to obtain the same cytotoxic effect on cancer cells. Plasma activated liquids generally involve other species that might be toxic to cells. The latter include hydrogen peroxide and nitrite/nitrate, but also acids and other complex aqueous byproducts, which certainly simultaneously contribute to the observed cytotoxicity to cancer cells. Nevertheless, the 120 seconds exposure time led to the production of 677  $\mu\text{M}$  of hydrogen peroxide and 107  $\mu\text{M}$  of nitrite, respectively, and induced cell death in the outer layer of the MCTS. The level of hydrogen peroxide produced in the PBS after the 240 seconds activation protocol was indeed higher (>1000  $\mu\text{M}$ ), but the osmolarity of the solution increased beyond the physiological range of 300 mOsm/L, and induced moderate osmotic stress, that has severe consequences to the cell<sup>37</sup>. We thus chose to perform a 120 seconds CAP jet

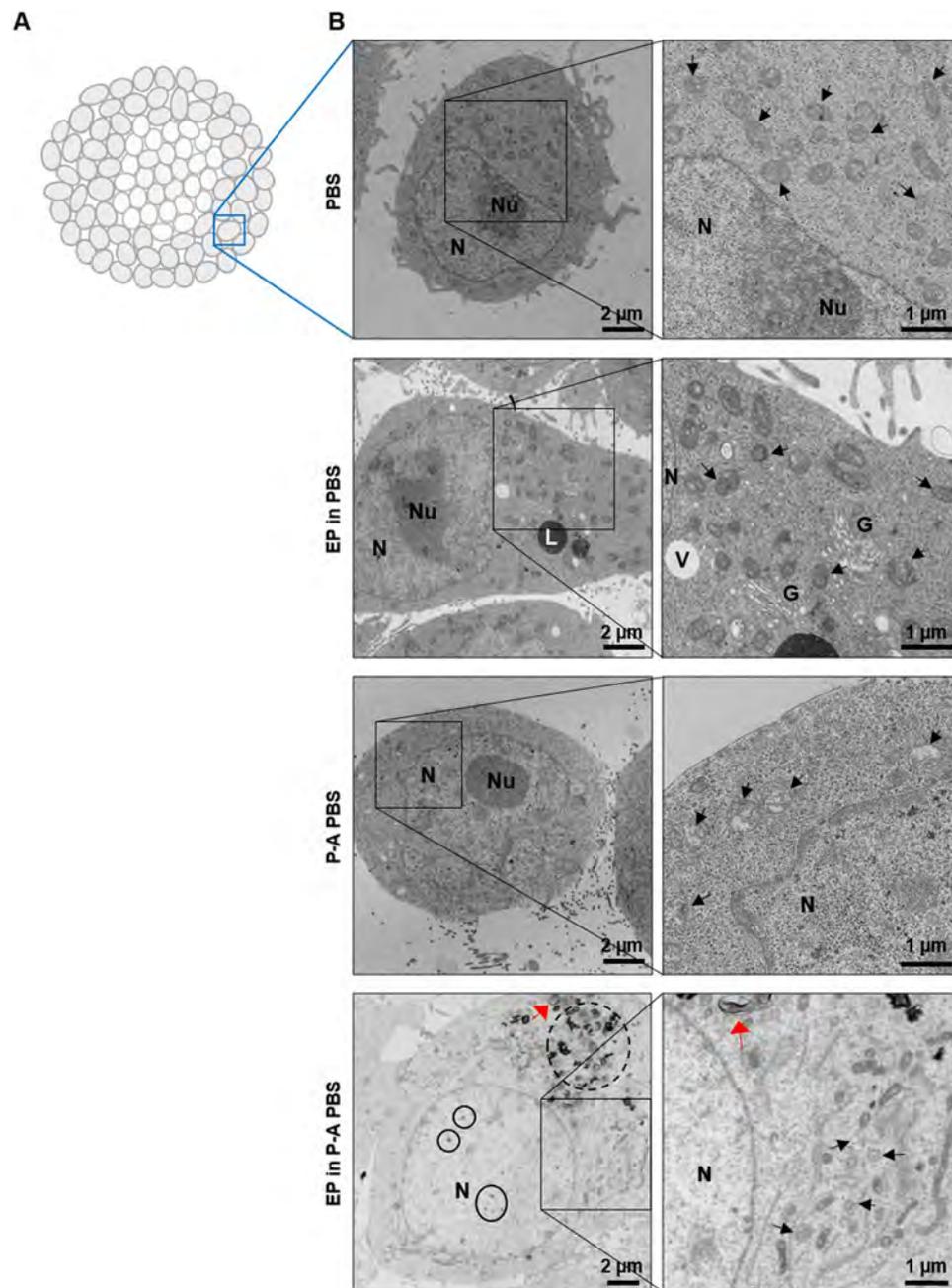


**Figure 6.** High and early activation of caspase 3/7 induced by P-A PBS and EP combination. HCT 116-GFP MCTS were incubated with FLICA reagent (caspase 3/7 dye) at different time points after treatment (1, 2 or 3 hours). Fixed whole MCTS were imaged under a confocal microscope to detect FLICA ( $\lambda = 559$  nm). Scale bar: 100  $\mu$ m. Representative images of N = 4 experiments, n = 4 MCTS per experiment per condition.

activation, and combine the use of P-A PBS with EP to test the efficiency of the dual treatment, and enhance P-A PBS cytotoxicity within the MCTS. In order to achieve high, efficient and reversible cell permeabilization within the MCTS, the ESOPE protocol (eight pulses lasting 100  $\mu$ s at a frequency of 1 Hz)<sup>21</sup> was applied. As the permeabilization of the cell membrane depends on the exposure conditions and the cell type<sup>16</sup>, we had to establish the electric field intensity, at which the permeabilization and the viability are the highest, and for HCT 116-GFP cells in MCTS, the fixed field intensity was 600 V/cm.

As emphasized in the results section, the P-A PBS treatment induces a transient cytotoxic effect, which is not strong enough to affect the deeper layers of MCTS. Conversely, the dual treatment induces an irreversible and global effect, which sets on in the periphery, and over time propagates throughout the MCTS, and finally yields to a complete growth arrest. The immunostaining of histone H2AX allowed us to evidence DNA damages occurring within the MCTS at different post-exposure time points. Besides, additional tests evidenced that the areas displaying DNA damages also presented an earlier and more intensive activation of caspases 3/7, indicating that the dual treatment leads to an apoptotic cell death in a higher number of cells. Both, the  $\gamma$ H2AX induction and the activation of Caspase 3/7 occurring after EP treatment in the presence of PA-PBS set on more efficiently in comparison to what we observed after P-A PBS treatment alone. Taken together, our results thus substantiate that electroporation enhances the cytotoxic effects of plasma activated PBS, which, over time, propagate from MCTS periphery into the core. These global damages result in the ablation of most if not all cells that constitute MCTS.

Previous studies showed that MCTS were able to reorganize and decrease their quiescent cells proportion to switch to a more proliferative behavior under pulsed electric field<sup>36</sup>. We thus assume, it might be possible MCTS respond in the same manner to the P-A PBS treatment. This would explain the growth pattern of P-A PBS-treated



**Figure 7.** MCTS ultrastructure modifications 1-hour after treatment. (A) Schematic representation of the zone within the MCTS, which was imaged by transmission electron microscopy (TEM). (B) TEM micrographs showing representative zones in different treatment groups and at different scales. Left column showing representative micrographs of individual cells, and right column the corresponding magnified views of organelles. (N = nucleus, Nu = nucleolus, L = lysosome, V = vacuole, G = Golgi apparatus, black arrows indicate some of the mitochondria, red arrow points to lamellar bodies, autophagic vacuoles and pyknosis/karyorrhexis are surrounded with, respectively, black dashed- and solid- line circles).

MCTS. After an initial decrease of MCTS growth, from day 2 onward, this group exhibited the same growth speed (same growth curve slope) as the controls, indicating that the core of the MCTS continued to grow.

As propidium iodide was taken up by the cells in all layers of MCTS, we first assumed that we enhanced the cytotoxicity of P-A PBS by means of EP-induced cell permeabilization, which allowed a better RONS penetration within the MCTS. Moreover, the efficiency of P-A PBS probably strongly depends on the quantity of produced hydrogen peroxide and nitrite species<sup>38</sup>. As, to our knowledge, there were no published studies evaluating the toxicity of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> after application of pulsed electric field to MCTS, we also considered potential cellular effects of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. In order to assess a potential toxicity of hydrogen peroxide, we added synthetic H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> to MCTS and we showed that EP did not potentiate the cytotoxic effect of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, as there was no significant difference in MCTS growth when EP was performed in presence of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in PBS. Therefore, the enhancement of PA-PBS toxicity by

EP treatment can be attributed either to the presence of other species ( $\text{NO}_2^-$ ,  $\text{NO}_3^-$ , ...) in plasma-exposed liquids or, to  $\text{H}_2\text{O}_2$  and  $\text{NO}_2^-$ , which act in synergy to kill cancer cells, as described by Girard et co-workers in the 2D cell model<sup>38</sup>. Thus, potentiation of P-A PBS cytotoxicity by EP might be effective only when the two species are present.

In order to assess the morphological changes occurring rapidly in MCTS on cellular ultrastructural level, we performed the transmission electron microscopy (TEM). The structural anomalies were observed in the nuclei and mitochondria in the P-A PBS group, while the dual treatment affected all cellular components. The condensation of chromatin in cellular nuclei (also known as pyknosis) and the fragmentation of the nucleus (karyorrhexis), which were observed in P-A PBS group and EP in P-A PBS group, respectively, correlate with the DNA damages and the onset of apoptosis<sup>39</sup>. The latter were confirmed by functional biochemical tests. Indeed, these nuclear structures were observed in a larger proportion when combined treatment was applied, in comparison to the unimodal P-A PBS treatment. Moreover, when compared with P-A PBS-treated MCTS, pyknosis and karyorrhexis were disseminated throughout a thicker rim in MCTS in the EP in P-A PBS-treated MCTS. Interestingly, the mitochondria shrank and exhibited matrix loss. In addition, the mitochondria were characterized by ruptures of cristae, a phenomenon that is characteristic of the inner membrane mitoptosis<sup>40</sup>. This kind of ultrastructure modification occurs during both apoptosis and autophagy pathway<sup>40</sup>. More recently, mitochondrial structural changes, such as the one observed in our investigations, were correlated to the loss of mitochondrial potential<sup>41</sup>. In both P-A PBS and EP in P-A PBS treated-conditions autophagic vacuoles were observed, yet, the EP in P-A PBS group exhibited the highest proportion of autophagosomes. The appearance of autophagy has been related to different kinds of cellular stress, such as nutrient starvation or oxidative stress, that lead to RONS generation<sup>42</sup>. Under our conditions, MCTS were kept in PBS for four hours after treatment, which might have induced nutrient starvation, but observed control MCTS's cells rarely exhibited autophagic vacuoles and intracellular vesicles. While autophagic vacuoles were not present in the EP in PBS group, the cells did contain a large fraction of intracellular vesicles. Nevertheless, the vesicles in the EP-treatment group did not contain any organelles debris, and probably corresponded to vesicles that are generated due to the increased micropinocytosis and endocytosis, which occur after cellular exposure to pulsed electric fields<sup>43,44</sup>. As autophagosomes were mainly present in P-A PBS and EP in P-A PBS treated-conditions, we can conclude that in our case such intracellular structures are specific to the plasma-activated liquids treatment.

Steuer *et al.* hypothesized that pulsed electric fields could enhance treatment efficacy by altering cell-cell junctions of adjacent cells<sup>45,46</sup>. These cell-cell junctions' alterations have also been reported for endothelial cells *in vitro* and *in vivo*<sup>47</sup>. Indeed, EP leads to an osmotic swelling of the cells and a reorganization of the cytoskeleton, leading to a transient increase of the intercellular space<sup>48</sup>. These alterations are reversible in absence of cytotoxic drugs<sup>49</sup>. In parallel, Funk and Krise showed that hydrogen peroxide induced reductions in lateral membrane diffusion, which might be responsible for substrates' accumulation within cells<sup>50</sup>. This supports the finding that the application of both techniques has an increased and irreversible cytotoxic effect, which can be attributed to the cumulative effects of EP and RONS. Based on this insight, we suggest that the combination of P-A PBS with EP may lead to both, higher plasma-activated liquid penetration, due to induced membrane permeabilization, and an alteration of the cell-cell junctions within the MCTS. The loss of cellular cohesion hence additionally promotes the penetration of RONS in the deeper layers of MCTS, allowing cell death within the core of the MCTS, resulting in an irreversible cytotoxic effect.

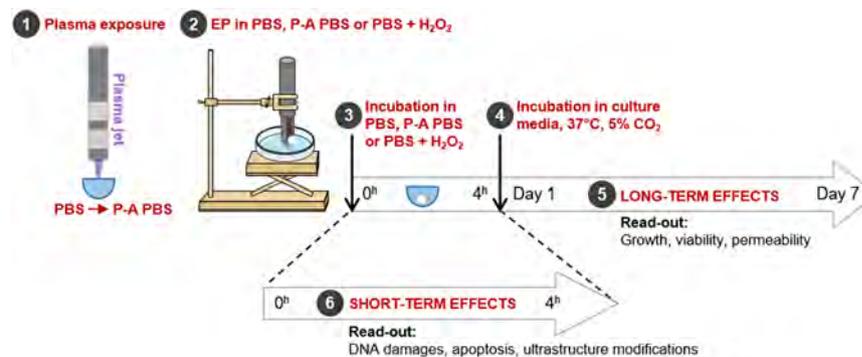
## Conclusion

In the present study, we demonstrated that electroporation greatly enhances plasma-activated PBS cytotoxic effect in a three-dimensional human colorectal cancer cell model. The *in vitro* approaches developed here may open up new possibilities for further investigations of the anti-cancer potential of pulsed electric fields in combination with plasma-activated PBS, including the ones that could be applied *in vivo*.

## Methods

**Cell Culture and MCTS generation.** Green fluorescent protein (GFP) transduced<sup>51</sup> human colorectal carcinoma cells HCT 116, supplied by ATCC® CCL-247™ were cultured in Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM, Gibco-Invitrogen, Carlsbad, USA) containing 4.5 g/L glucose, L-Glutamine and pyruvate, supplemented with 1% of penicillin/streptomycin and 10% of fetal bovine serum. The cells were cultured in a controlled humidified atmosphere (5%  $\text{CO}_2$ , 37 °C). HCT 116-GFP MCTS were made using the non-adherent technique in Costar® Corning® Ultra-low attachment 96-well plates (Fisher Scientific, Illkirch, France). Five hundred cells were seeded per well in 200  $\mu\text{L}$  of cell culture medium, and plates were cultivated in 5%  $\text{CO}_2$  humidified atmosphere at 37 °C. Single MCTS were obtained in each well 24 hours after seeding. At day 5 after seeding the MCTS reached 450–500  $\mu\text{m}$  of diameter and were considered ready for treatment.

**MCTS treatments.** *Plasma-activated PBS (P-A PBS).* The low temperature plasma jet was generated in ambient air by using dielectric barrier discharge as described elsewhere<sup>10</sup>. In summary, the plasma jet was produced with a gap distance of 10 mm between two aluminum tape electrodes wrapped around a quartz tube. The flow rate of helium gas was 3 L/min. A mono-polar square pulse with 10 kV of voltage magnitude, 10 kHz of frequency and 1  $\mu\text{s}$  duration ignited the electric discharge. For PBS activation, 100  $\mu\text{L}$  of PBS (Eurobio's phosphate buffered saline modified without  $\text{Ca}^{2+}$  and  $\text{Mg}^{2+}$ , Sigma) was exposed to the cold atmospheric plasma jet in the wells of 96-well round adherent bottom plates for 60, 120 or 240 seconds. The distance between the liquid surface and the plasma jet tube output was fixed at 2 cm, based on our previous work<sup>9</sup>. Hydrogen peroxide, nitrite and nitrate content generated in P-A PBS were characterized using Fluorimetric Hydrogen Peroxidase and Nitrite/Nitrate colorimetric assay kits (Sigma Aldrich) according to manufacturer's instructions. The osmolarity of P-A PBS was measured with a cryoscopic osmometer, OSMOMAT 030 (Gonotec) within a maximum of 30 minutes



**Figure 8.** Schematic view of the protocol for HCT 116-GFP MCTS treatment and data analysis. (1) PBS was exposed to the plasma jet. (2) MCTS were placed in a 100  $\mu$ L liquid drop of either PBS (**EP in PBS**), P-A PBS (**EP in P-A PBS**) or PBS + H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (**EP in PBS + H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>**) up to 1 minute prior application of EP. (3) MCTS were then kept in the treatment media for 4 hours of incubation at 37  $^{\circ}$ C, 5% CO<sub>2</sub>. Three other groups were not submitted to EP and were just incubated in the **PBS, P-A PBS or PBS + H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>**. (4, 5) MCTS were rinsed and placed in the fresh culture medium and placed at 37  $^{\circ}$ C, 5% CO<sub>2</sub> for MCTS growth follow-up during 7 days. DNA damages, apoptosis and ultrastructure modifications were assessed after the incubation period of 1, 2, 3 and 4 hours, and were assessed either on living cells or on fixed MCTS, according to the described protocol (6).

after plasma exposure. For the treatment, MCTS were incubated in 80  $\mu$ L of P-A PBS (within 30 minutes after plasma jet exposure) for 4 hours, and MCTS were incubated in either PBS or PBS containing 680  $\mu$ M of hydrogen peroxide (FOURNISSEUR) served as the controls. After the 4 hours treatment incubation, treated media were removed and fresh culture medium was added.

**Electropermeabilization.** MCTS electropermeabilization was performed with a unipolar square-wave electric pulses generator ELECTROCELL S20 ( $\beta$ tech, Toulouse, France) with a high-voltage maximum of 1.5 kV connected to flat parallel stainless steel electrodes with the inter-electrode distance of 4 mm. Electric parameters corresponded to electrochemotherapy ESOPE protocols<sup>21</sup>. Eight pulses lasting 100  $\mu$ s at a frequency of 1 Hz were applied at optimized (600 V/cm) electric field intensity and at room temperature. Electropermeabilization was also performed in PBS containing 680  $\mu$ M hydrogen peroxide as a control experiment. MCTS were placed either in a 100  $\mu$ L liquid drop of PBS, P-A PBS or PBS + H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (dual treatment) and they remained in the liquid up to 1 minute prior electropermeabilization.

Figure 8 illustrates the treatment protocol applied in this work and schematizes the materials and methods section.

**MCTS analysis.** *Growth of MCTS and analysis of micrographs with ImageJ.* After 4 hours of immersion in PBS or P-A PBS, MCTS were rinsed twice with PBS and placed in cell culture medium, where MCTS growth and viability was continuously followed during 7 days (4 days after treatment, fresh culture medium was added to the MCTS) using IncuCyte Live Cell Analysis System Microscope with magnification x10 objective. Micrographs were exported from the IncuCyte software and the GFP green fluorescence was used to set a threshold mask on MCTS and to measure the area with the ImageJ software.

*Cell membrane permeabilization upon EP treatment.* Propidium iodide (PI) was used to detect cell membrane permeabilization after MCTS electropermeabilization at different electric field intensities. 100  $\mu$ M of PI in PBS was used in the electropermeabilization experiment, where MCTS were placed in a 100  $\mu$ L drop of the PBS containing PI, which was placed between the electrodes and the electric field pulses were applied. Five minutes after the MCTS were rinsed and the PI fluorescence ( $\lambda_{exc} = 535$  nm,  $\lambda_{em} = 617$  nm) was monitored on live MCTS under a wide field Zeiss Primovert microscope (Carl Zeiss, Marly Le Roy, France), equipped with a DMIRB CoolSnapFx HQ2 camera. Images were then analyzed with the ImageJ software.

*Cell viability.* Propidium iodide was also used to evaluate cells viability after treatment (when membrane permeabilization occurred due to cell death). MCTS were electropulsed in either PBS or P-A PBS, and kept for 4 hours in newly prepared PBS or P-A PBS solution containing 1  $\mu$ M concentration of PI. After the 4 hours incubation, MCTS were rinsed twice with PBS and placed in fresh cell culture media, also containing 1  $\mu$ M of PI. PI penetration to dead cells within MCTS was continuously followed during 3 days with IncuCyte Live Cell Analysis System Microscope.

*Transmission electronic microscopy.* TEM was used to observe the cellular ultrastructure modifications in MCTS before and after the physical treatments. Treated (P-A PBS, EP in P-A PBS) and control (PBS, EP in PBS) MCTS were retrieved 1 hour after treatment, fixed with 2% glutaraldehyde in 0.1 M sodium cacodylate buffer, post-fixed with 1% osmium tetroxide, gradually dehydrated in ethanol, and embedded in the Embed 812 resin (Electron Microscopy Sciences) using a Leica EM AMW automated microwave tissue processor for electron microscopy. Stained 70-nm sections (3% uranyl acetate in 50% ethanol and Reynold's lead citrate) were observed with a HT 7700 Hitachi transmission electron microscope, operating at an accelerating voltage of 80 kV and equipped with a CCD AMT XR41 camera.

**Caspases 3/7 activity detection in MCTS.** Image-iT live red caspase –3 and –7 detection kit for microscopy (Invitrogen) was used according to the manufacturer's instructions to detect caspase activation at different time-points. Briefly, HCT 116-GFP MCTS were treated as described in section 2, where MCTS were treated and sequentially incubated (following 1, 2 or 3 hours after treatment) with 60  $\mu$ L of FLICA reagent for 45 minutes at 37 °C, 5% CO<sub>2</sub>. MCTS were then rinsed twice with PBS before being fixed in 60  $\mu$ L of kit fixative solution for 24 hours at 4 °C. Fixed whole MCTS were imaged under FV1000 confocal microscope (Olympus, France) at a magnification x20. The emitted light from FLICA reagent was collected through a 610–650 nm band pass filter (Texas red).

**Immunofluorescence on MCTS cryo-sections.** Treated (P-A PBS, EP in P-A PBS) and control (PBS, EP in PBS) were retrieved after 1, 2 or 3 hours of treatment and fixed using neutral-buffered formalin (Sigma) for 2 hours at room temperature. MCTS were then placed in PBS-sucrose 15% and 30% sequentially for 12 hours at 4 °C. Shandon Cryomatrix™ resin (ThermoFisher Scientific) was used to embed MCTS and cryo-freezing was performed using isopentane and liquid nitrogen. Blocks were sliced in 5  $\mu$ m-thick sections and mounted on microscopy slides. Slides were blocked with PBS-1% BSA-0.5% Triton X-100 and stained with primary antibodies against phosphorylated Histone H2AX<sup>52</sup> (rabbit monoclonal, Cell Signaling Technology) at 1/500 dilution for 1 hour at room temperature. Goat anti-rabbit IgG coupled with Alexa Fluor 594 (Life Technologies) at 1/800 dilution were used as secondary antibodies for 30 minutes staining at room temperature. Slides were mounted in Vectashield mounting medium with DAPI (Vector Laboratories) and imaged with a FV1000 confocal microscope (Olympus, France) at different magnifications (x20 and x40).

**Statistical analysis.** Data are given as mean  $\pm$  (Standard Error of the Mean) SEM with *N* replicates and *n* denoting the number of MCTS in each replicate. Overall statistical significance was set at *p* < 0.05. Differences between values were assessed by one or two-way ANOVA and curve slopes were obtained by linear regression analysis.

## References

- Fridman, G. *et al.* Applied Plasma Medicine. *Plasma Processes and Polymers*. **5**, 503–533, <https://doi.org/10.1002/ppap.200700154> (2008).
- Yan, D., Sherman, J. H. & Keidar, M. Cold atmospheric plasma, a novel promising anti-cancer treatment modality, *Oncotarget*. **8**, <https://doi.org/10.18632/oncotarget.13304> (2017).
- Graves, D. B. The emerging role of reactive oxygen and nitrogen species in redox biology and some implications for plasma applications to medicine and biology. *Journal of Physics D: Applied Physics*. **45**, 263001, <https://doi.org/10.1088/0022-3727/45/26/263001> (2012).
- Chauvin, J., Judée, F., Yousfi, M., Vicendo, P. & Merbahi, N. Analysis of reactive oxygen and nitrogen species generated in three liquid media by low temperature helium plasma jet, *Scientific Reports*. **7**, <https://doi.org/10.1038/s41598-017-04650-4> (2017).
- Keidar, M. *et al.* Cold plasma selectivity and the possibility of a paradigm shift in cancer therapy. *British Journal of Cancer*. **105**, 1295–1301, <https://doi.org/10.1038/bjc.2011.386> (2011).
- Florian, J., Merbahi, N. & Yousfi, M. Genotoxic and Cytotoxic Effects of Plasma-Activated Media on Multicellular Tumor Spheroids. *Plasma Medicine*. **6**, 47–57, <https://doi.org/10.1615/PlasmaMed.2016015823> (2016).
- Tanaka, H. *et al.* Plasma-Activated Medium Selectively Kills Glioblastoma Brain Tumor Cells by Down-Regulating a Survival Signaling Molecule, AKT Kinase. *Plasma Medicine*. **1**, 265–277, <https://doi.org/10.1615/PlasmaMed.2012006275> (2011).
- Kaushik, N. K. *et al.* Biological and medical applications of plasma-activated media, water and solutions, *Biological Chemistry*. **0**, <https://doi.org/10.1515/hsz-2018-0226> (2018).
- Judée, F. *et al.* Short and long-time effects of low temperature Plasma Activated Media on 3D multicellular tumor spheroids, *Scientific Reports*. **6**, <https://doi.org/10.1038/srep21421> (2016).
- Plewa, J.-M. *et al.* Low-temperature plasma-induced antiproliferative effects on multi-cellular tumor spheroids. *New Journal of Physics*. **16**, 043027, <https://doi.org/10.1088/1367-2630/16/4/043027> (2014).
- Nofel, M., Chauvin, J., Vicendo, P. & Judée, F. Effects of Plasma Activated Medium on Head and Neck FaDu Cancerous Cells: comparison of 3D and 2D response, *Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry*. **17**, <https://doi.org/10.2174/1871520617666170801111055> (2017).
- Van Boxem, W. *et al.* Anti-cancer capacity of plasma-treated PBS: effect of chemical composition on cancer cell cytotoxicity, *Scientific Reports*. **7**, <https://doi.org/10.1038/s41598-017-16758-8> (2017).
- Yan, D. *et al.* The Specific Vulnerabilities of Cancer Cells to the Cold Atmospheric Plasma-Stimulated Solutions, *Scientific Reports*. **7**, <https://doi.org/10.1038/s41598-017-04770-x> (2017).
- Neumann, E. & Rosenheck, K. Permeability changes induced by electric impulses in vesicular membranes. *The Journal of Membrane Biology*. **10**, 279–290, <https://doi.org/10.1007/BF01867861> (1972).
- Teissie, J., Golzio, M. & Rols, M. P. Mechanisms of cell membrane electroporation: A minireview of our present (lack of?) knowledge. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*. **1724**, 270–280, <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2005.05.006> (2005).
- Rols, M. P., Golzio, M., Gabriel, B. & Teissie, J. Factors Controlling Electroporation of Cell Membranes. *Technology in Cancer Research & Treatment*. **1**, 319–327, <https://doi.org/10.1177/153303460200100502> (2002).
- Mir, L. *et al.* Effective treatment of cutaneous and subcutaneous malignant tumours by electrochemotherapy. *British Journal of Cancer*. **77**, 2336–2342, <https://doi.org/10.1038/bjc.1998.388> (1998).
- Rols, M.-P. Electroporation, a physical method for the delivery of therapeutic molecules into cells. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*. **1758**, 423–428, <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2006.01.005> (2006).
- Sauer, H., Pütz, V., Fischer, K., Hescheler, J. & Wartenberg, M. Increased doxorubicin uptake and toxicity in multicellular tumour spheroids treated with DC electrical fields. *British Journal of Cancer*. **80**, 1204–1213, <https://doi.org/10.1038/sj.bjc.6690487> (1999).
- Mir, L. M. *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™ by means of invasive or non-invasive electrodes. *European Journal of Cancer Supplements*. **4**, 14–25, <https://doi.org/10.1016/j.ejcsup.2006.08.003> (2006).
- Marty, M. *et al.* Electrochemotherapy – An easy, highly effective and safe treatment of cutaneous and subcutaneous metastases: Results of ESOP (European Standard Operating Procedures of Electrochemotherapy) study. *European Journal of Cancer Supplements*. **4**, 3–13, <https://doi.org/10.1016/j.ejcsup.2006.08.002> (2006).

22. Campana, L. G. *et al.* Treatment efficacy with electrochemotherapy: A multi-institutional prospective observational study on 376 patients with superficial tumors. *European Journal of Surgical Oncology (EJSO)*. **42**, 1914–1923, <https://doi.org/10.1016/j.ejso.2016.06.399> (2016).
23. Paganin-Gioanni, A. *et al.* Direct visualization at the single-cell level of siRNA electrotransfer into cancer cells. *Proc Natl Acad Sci USA* **108**, 10443–10447, <https://doi.org/10.1073/pnas.1103519108> (2011).
24. Chabot, S., Teissié, J. & Golzio, M. Targeted electro-delivery of oligonucleotides for RNA interference: siRNA and anti-miR. *Advanced Drug Delivery Reviews*. **81**, 161–168, <https://doi.org/10.1016/j.addr.2014.05.002> (2015).
25. Escoffre, J.-M. *et al.* Electromediated formation of DNA complexes with cell membranes and its consequences for gene delivery. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*. **1808**, 1538–1543, <https://doi.org/10.1016/j.bbame.2010.10.009> (2011).
26. Falk, H., Matthiessen, L. W., Wooler, G. & Gehl, J. Calcium electroporation for treatment of cutaneous metastases; a randomized double-blinded phase II study, comparing the effect of calcium electroporation with electrochemotherapy. *Acta Oncologica*. **57**, 311–319, <https://doi.org/10.1080/0284186X.2017.1355109> (2018).
27. Romeo, S. *et al.* ESOPE-Equivalent Pulsing Protocols for Calcium Electroporation: An *In Vitro* Optimization Study on 2 Cancer Cell Models. *Technol Cancer Res Treat*. **17**, <https://doi.org/10.1177/1533033818788072> (2018).
28. Steuer, A., Wolff, C. M., von Woedtke, T., Weltmann, K.-D. & Kolb, J. F. Cell stimulation versus cell death induced by sequential treatments with pulsed electric fields and cold atmospheric pressure plasma. *Plos One*. **13**, e0204916, <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0204916> (2018).
29. Zanoni, M. *et al.* 3D tumor spheroid models for *in vitro* therapeutic screening: a systematic approach to enhance the biological relevance of data obtained. *Scientific Reports*. **6**, <https://doi.org/10.1038/srep19103> (2016).
30. Dufau, I. *et al.* 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**, 15, <https://doi.org/10.1186/1471-2407-12-15> (2012).
31. Thoma, C. R., Zimmermann, M., Agarkova, I., Kelm, J. M. & Krek, W. 3D cell culture systems modeling tumor growth determinants in cancer target discovery. *Advanced Drug Delivery Reviews*. **69–70**, 29–41, <https://doi.org/10.1016/j.addr.2014.03.001> (2014).
32. Tevis, K. M., Colson, Y. L. & Grinstaff, M. W. Embedded Spheroids as Models of the Cancer Microenvironment. *Adv Biosyst.* **1**, <https://doi.org/10.1002/adbi.201700083> (2017).
33. Ferreira L. P., Gaspar V. M. & Mano J. F. Design of spherically structured 3D *in vitro* tumor models - Advances and prospects. *Acta Biomater.* **75**, 11–34, <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2018.05.034> (2018).
34. Gibot, L., Wasungu, L., Teissié, J. & Rols, M.-P. Antitumor drug delivery in multicellular spheroids by electropermeabilization. *Journal of Controlled Release*. **167**, 138–147, <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2013.01.021> (2013).
35. Duan, J., Lu, X. & He, G. The selective effect of plasma activated medium in an *in vitro* co-culture of liver cancer and normal cells. *Journal of Applied Physics*. **121**, 013302, <https://doi.org/10.1063/1.4973484> (2017).
36. Sauer, H. *et al.* DC electrical field-induced c-fos expression and growth stimulation in multicellular prostate cancer spheroids. *British Journal of Cancer*. **75**, 1481–1488, <https://doi.org/10.1038/bjc.1997.253> (1997).
37. Takagi, M., Hayashi, H. & Yoshida, T. The effect of osmolarity on metabolism and morphology in adhesion and suspension chinese hamster ovary cells producing tissue plasminogen activator. *Cytotechnology*. **9**, <https://doi.org/10.1023/A:1008171921282> (2000).
38. Girard, P.-M. *et al.* Synergistic Effect of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and NO<sub>2</sub> in Cell Death Induced by Cold Atmospheric He Plasma. *Scientific Reports*. **6**, <https://doi.org/10.1038/srep29098> (2016).
39. Ziegler, U. & Groscurth, P. Morphological Features of Cell Death. *Physiology*. **19**, 124–128, <https://doi.org/10.1152/nips.01519.2004> (2004).
40. Tinari, A., Garofalo, T., Sorice, M., Esposti, M. D. & Malorni, W. Mitoptosis: Different Pathways for Mitochondrial Execution. *Autophagy*. **3**, 282–284, <https://doi.org/10.4161/auto.3924> (2007).
41. Miyazono, Y. *et al.* Uncoupled mitochondria quickly shorten along their long axis to form indented spheroids, instead of rings, in a fission-independent manner. *Scientific Reports*. **8**, <https://doi.org/10.1038/s41598-017-18582-6> (2018).
42. Gump, J. M. & Thorburn, A. Autophagy and apoptosis- what's the connection? *Trends Cell Biol.* **21**, 387–392, <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2011.03.007> (2011).
43. Rols, M. P., Femenia, P. & Teissie, J. Long-Lived Macropinocytosis Takes Place in Electropermeabilized Mammalian Cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. **208**, 26–35, <https://doi.org/10.1006/bbrc.1995.1300> (1995).
44. Antov, Y., Barbul, A. & Korenstein, R. Electroendocytosis: stimulation of adsorptive and fluid-phase uptake by pulsed low electric fields. *Experimental Cell Research*. **297**, 348–362, <https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2004.03.027> (2004).
45. Steuer, A., Zhuang, J., Kolb, J. F., Daeschlein, G. Effect of pulsed electric fields on cell-cell-communication via gap junctions in cell-monolayers. In: 2013 Abstracts IEEE International Conference on Plasma Science (ICOPS), pp. 1–1., <https://doi.org/10.1109/PLASMA.2013.6634800> (2013).
46. Steuer, A., Schmidt, A., Labohá, P., Babica, P. & Kolb, J. F. Transient suppression of gap junctional intercellular communication after exposure to 100-nanosecond pulsed electric fields. *Bioelectrochemistry*. **112**, 33–46, <https://doi.org/10.1016/j.bioelechem.2016.07.003> (2016).
47. Markelc, B. *et al.* Increased permeability of blood vessels after reversible electroporation is facilitated by alterations in endothelial cell-to-cell junctions. *Journal of Controlled Release*. **276**, 30–41, <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2018.02.032> (2018).
48. Kanthou, C. *et al.* The endothelial cytoskeleton as a target of electroporation-based therapies. *Molecular Cancer Therapeutics*. **5**, 3145–3152, <https://doi.org/10.1158/1535-7163.MCT-06-0410> (2006).
49. Jarm, T., Cemazar, M., Miklavcic, D. & Sersa, G. Antivascular effects of electrochemotherapy: implications in treatment of bleeding metastases. *Expert Review of Anticancer Therapy*. **10**, 729–746, <https://doi.org/10.1586/era.10.43> (2010).
50. Funk, R. S. & Krise, J. P. Exposure of Cells to Hydrogen Peroxide Can Increase the Intracellular Accumulation of Drugs. *Molecular Pharmaceutics*. **4**, 154–159, <https://doi.org/10.1021/mp060071q> (2007).
51. Pelofy, S., Teissié, J., Golzio, M. & Chabot, S. Chemically Modified Oligonucleotide—Increased Stability Negatively Correlates with Its Efficacy Despite Efficient Electrotransfer. *The Journal of Membrane Biology*. **245**, 565–571, <https://doi.org/10.1007/s00232-012-9468-9> (2012).
52. Mah, L.-J., El-Osta, A. & Karagiannis, T. C.  $\gamma$ H2AX: a sensitive molecular marker of DNA damage and repair. *Leukemia*. **24**, 679–686, <https://doi.org/10.1038/leu.2010.6> (2010).

## Acknowledgements

The authors acknowledge the financial support from the Université Paul Sabatier and Région Occitanie and the Grand Sud Ouest Cancerpole, the “Toulouse Réseau Imagerie” core IPBS facility support (Genotoul, Toulouse, France) which was supported by the Association Recherche Cancer (n°5585), Region Midi Pyrenees (CPER) and Grand Toulouse cluster. Research was conducted in the scope of the EBAM European Associated Laboratory (LEA) and resulted from the networking efforts of the COST Action TD1104 (<http://www.electroporation.net>).

## Author Contributions

*Conceptualization:* M.G., N.M.; *Methodology:* E.G., J.K.-T., M.G., N.M.; *Validation:* E.G., J.K.-T., M.G., N.M.; *Formal Analysis:* E.G.; *Investigation:* E.G., J.K.-T.; *Resources:* I.F., L.G., M.-P.R., M.G., M.Y., N.M.; *Writing-Original Draft:* E.G., J.K.-T.; *Writing-Review and Editing:* E.G., J.K.-T., L.G., M.-P.R., M.G., M.Y., N.M.; *Visualization:* E.G., M.G., N.M.; *Supervision:* M.G., N.M.; *Project Administration:* M.G., N.M.; *Funding Acquisition:* L.G., M.-P.R., M.G., M.Y., N.M.

## Additional Information

**Supplementary information** accompanies this paper at <https://doi.org/10.1038/s41598-019-44087-5>.

**Competing Interests:** The authors declare no competing interests.

**Publisher's note:** Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



**Open Access** This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons license, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons license, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons license and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this license, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>.

© The Author(s) 2019

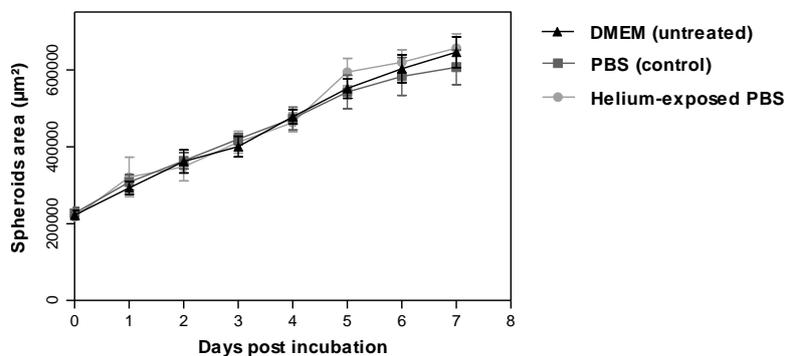
## SUPPLEMENTARY INFORMATION

### Videos:

See attached files.

**HCT 116-GFP MCTS morphological changes after dual treatment with P-A PBS and EP.** Bright field and GFP micrographs were acquired with the IncuCyte Live Cell Analysis System Microscope hourly during 7 days. The first 4 hours displayed on the videos correspond to hours of incubation either in PBS (untreated groups) or in P-A PBS (treated groups). Videos are displayed as overlays of bright field and GFP channels. (A) Untreated MCTS, bath in PBS for 4 hours; (B) EP in PBS; (C) P-A PBS; (D) EP in P-A PBS. After the 4 hours of incubation in either PBS (A, B) or P-A PBS (C, D), MCTS were placed in culture medium and put in the microscope.

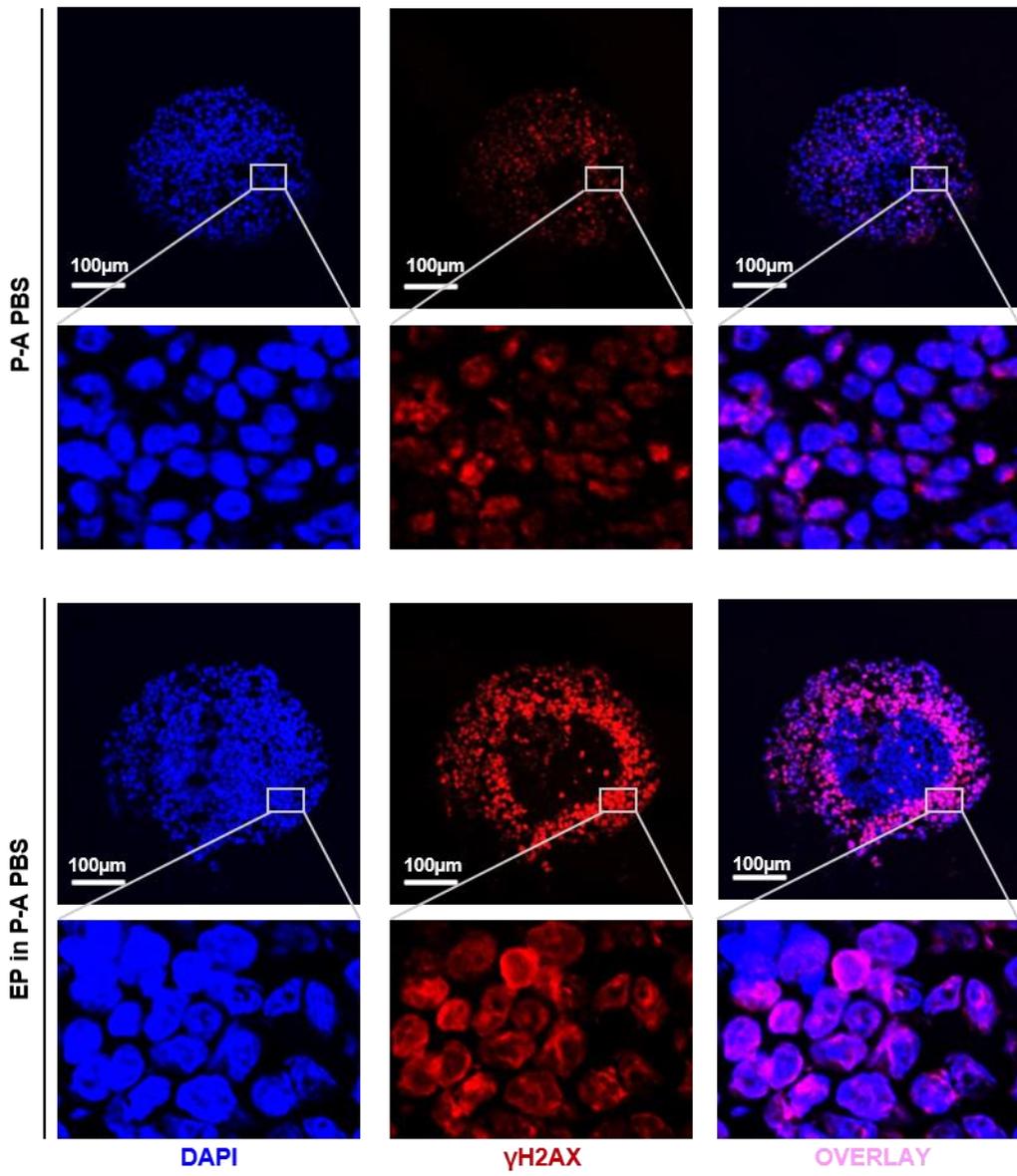
### Figures:

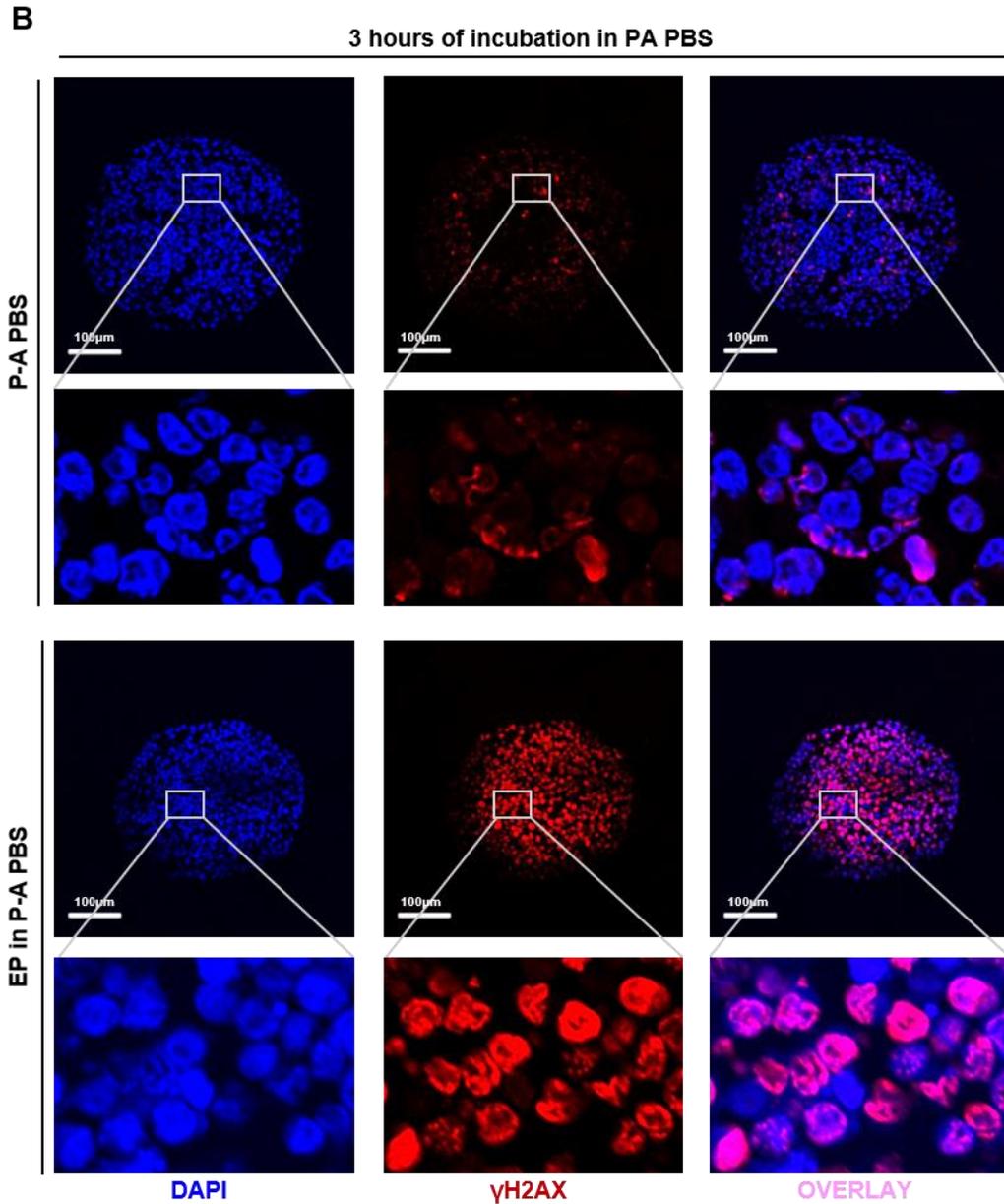


**Supplementary figure 1: MCTS growth follow-up after incubation in PBS or helium-exposed PBS, compared to untreated MCTS.** In order to assess the effect of PBS bath and helium gas exposition on MCTS growth, HCT 116-GFP MCTS were incubated 4 hours with these two-buffered solutions. MCTS were observed after treatment under IncuCyte Live Cell Analysis System Microscope. GFP fluorescence area was measured over time during 7 days. Area was compared with MCTS cultured in DMEM (untreated). N= 2 experiments, n=8 MCTS per conditions, mean  $\pm$  standard deviation.

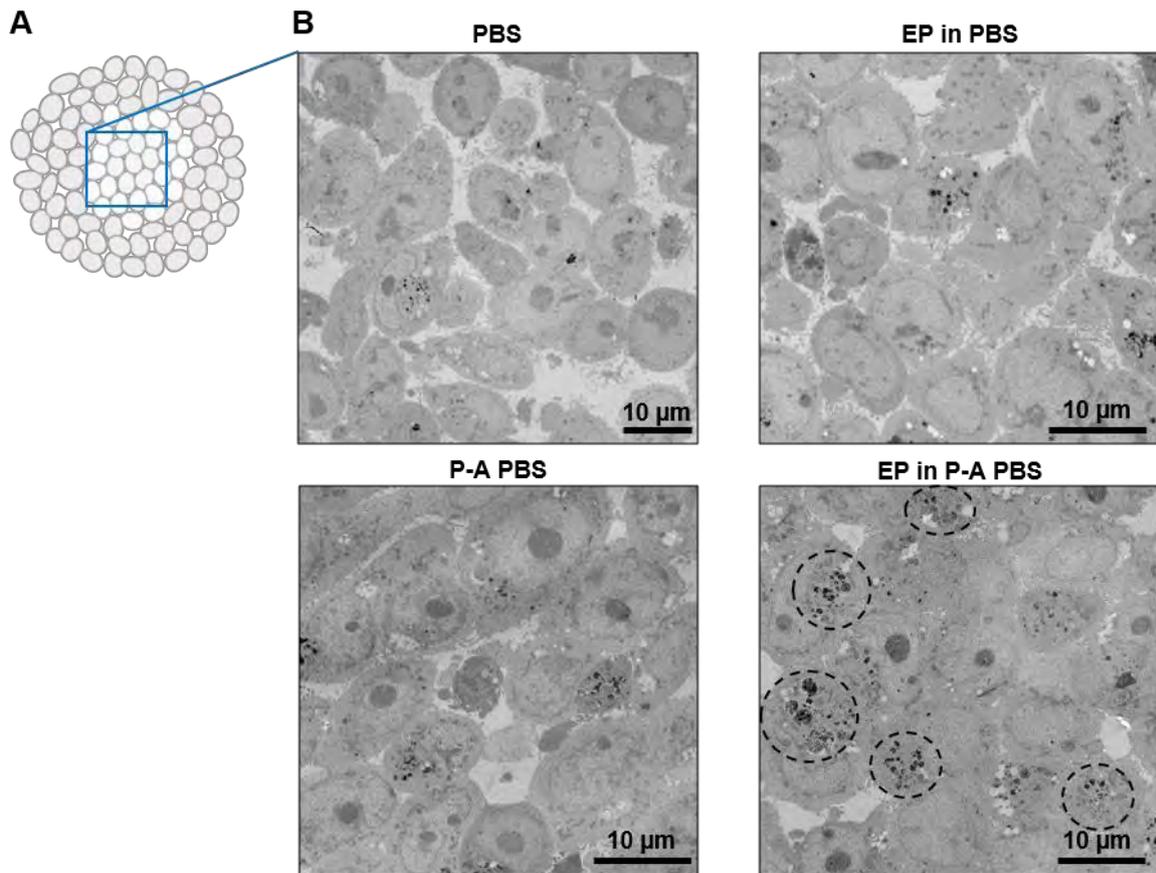
**A**

1 hour of incubation in PA PBS





**Supplementary figure 2:  $\gamma$ H<sub>2</sub>AX staining patterns observed within MCTS submitted to P-A PBS treatment or dual treatment with EP.** MCTS were fixed in formalin at either 1 (A) or 3 hours (B) post electroporation in P-A PBS before cryo-freezing in OCT. Five  $\mu$ m-thick sections stained with DAPI (blue) and antibodies against  $\gamma$ H<sub>2</sub>AX (Alexa 594, red) were analyzed with a confocal microscope at x20 and x40 magnification. Representative images of N= 2 experiments, n= 10 MCTS per experiment per condition.



**Supplementary figure 3: Core MCTS ultrastructure modifications 1-hour after treatment.** (A) Schematic representation of the zone within the MCTS, which was imaged by transmission electron microscopy (TEM). (B) TEM micrographs showing representative zones imaged within the MCTS core in different treatment groups. Autophagic vacuoles are surrounded with black dotted circle.

**Table:**

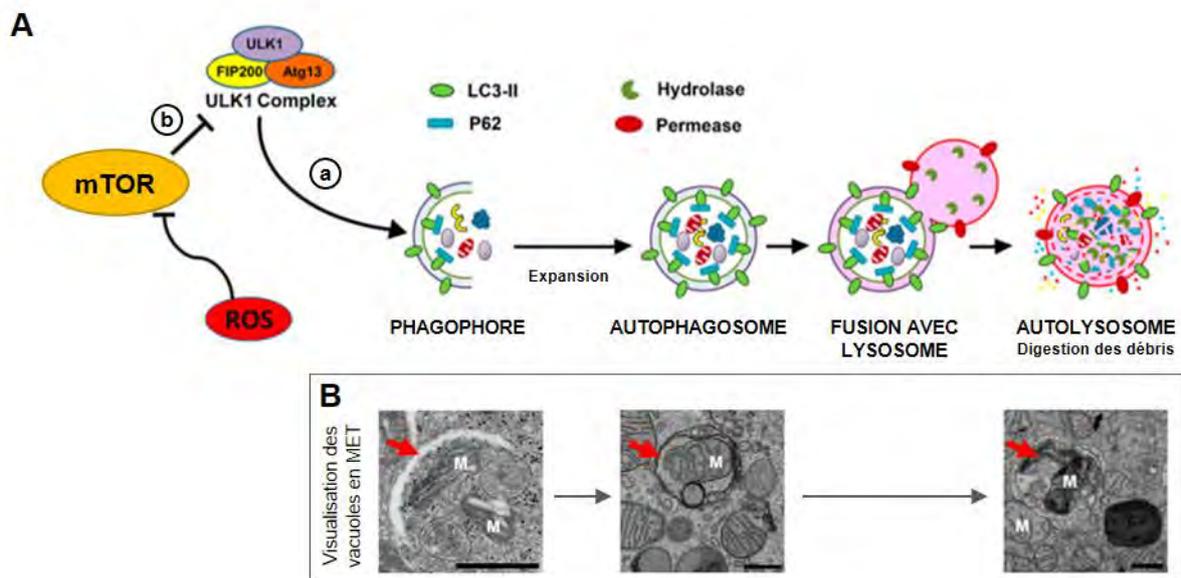
Plasma exposure time (s)	0	60	120	240
Osmolarity (mOsmol/L)	299.3 ± 2.1	330 ± 5.1	362 ± 5.1	533 ± 33.15
[H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ] (μM)	0	367.5 ± 34.1	677.3 ± 28.5	1390 ± 38.6
[NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> ] (μM)	0	54.1 ± 6.1	106.7 ± 19.3	181.3 ± 37.3

**Supplementary Table 1: Osmolarity and RONS analysis of PBS activated during different plasma exposure times.** Hydrogen peroxide and nitrite content were characterized using Fluorimetric Hydrogen Peroxidase and Nitrite colorimetric assay kits. Osmolarity changes were measured with a cryoscopic osmometer, OSMOMAT. Measurements were performed on PBS within 30 minutes after its exposure to plasma jet. N= 4 experiments and n=3. Mean ± standard error mean.

### 3. Induction de l'autophagie

#### a. Introduction

L'autophagie est un mécanisme de dégradation de déchets cellulaires (protéines mal repliées, agrégats protéiques, organites endommagés non fonctionnels) ou d'élimination de pathogènes (Glick *et al.*, 2010). L'autophagie s'apparente donc à un processus de nettoyage cellulaire permettant à la cellule de se débarrasser de déchets et de maintenir l'homéostasie cellulaire. Ainsi, l'autophagie a longtemps été considéré comme un mécanisme de survie de la cellule (fonction pro-survie). Néanmoins dans certains contextes, elle peut constituer une voie de mort cellulaire en réponse à un stress (fonction anti-survie). En effet, une altération de la voie de l'autophagie ou une activation prolongée de cette dernière peut causer la mort des cellules en raison de la perturbation de l'homéostasie cellulaire (Fitzwalter and Thorburn, 2015). L'autophagie peut également être induite en cas de stress oxydatif trop important, l'accumulation des macromolécules et organelles oxydé par les ROS active l'autophagie pour assurer la cytoprotection et maintenir l'homéostasie cellulaire (Filomeni *et al.*, 2015).



**Figure 44 : Les différentes étapes de l'autophagie : formation des vésicules et protéines impliquées dans la régulation.** (A) Les majeures protéines impliquées dans le processus d'autophagie et sa régulation sont montrées ici (mTOR, le complexe ULK1, P62, LC3-II, hydrolase et perméase). Schéma adapté de (Kaushal *et al.*, 2019). (B) Images de microscopie électronique à transmission (MET) issues de (Jung *et al.*, 2019) montrant les différentes vacuoles d'autophagie (flèches rouges). M : mitochondries. Barre d'échelle : 500 nm.

La **figure 44** montre le processus multi-étape de l'autophagie. La première étape est la formation du phagophore, une double bicouche lipidique, à partir de la membrane du réticulum endoplasmique ou de l'appareil de Golgi. S'en suit l'expansion de ce phagophore autour

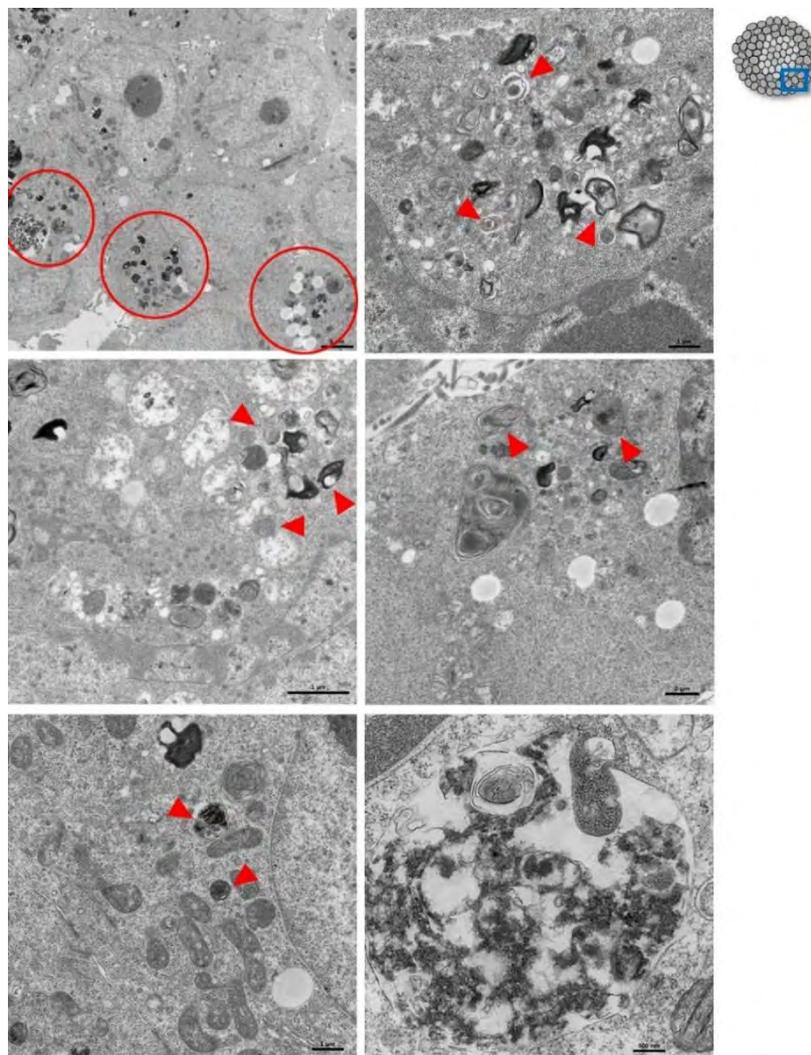
contenu à dégrader, une fois que la vésicule est formée, on parle d'autophagosome. La maturation de l'autophagosome passe alors par la fusion avec un lysosome, cette fusion entraîne la formation de l'autolysosome, riche en hydrolases et protéases acides, qui permet la dégradation du contenu. Dans certains cas, on parle de recyclage cellulaire puisque les acides aminés et autres sous-produits issus de la dégradation peuvent être exportés vers le cytoplasme via les perméases lysosomales et utilisés comme précurseurs pour la synthèse de macromolécules et pour le métabolisme énergétique (production d'ATP). Le terme « autophagie » est utilisé à la fois pour désigner la formation des autophagosomes mais aussi la totalité de la voie décrite comprenant la fusion avec le lysosome et la dégradation du contenu. Il est donc très important de noter ici que la formation des autophagosomes n'implique pas nécessairement la dégradation de matériel. C'est pourquoi on parle de « flux autophagique » pour définir le processus entier jusqu'à la dégradation. Certains mécanismes de régulation de la mort cellulaire impliquent la formation d'autophagosomes mais pas nécessairement un flux autophagique, tandis que d'autres impliquent à la fois la formation des autophagosomes et le flux autophagique.

L'autophagie est un processus cellulaire finement régulé par de multiples protéines (nous allons discuter uniquement des protéines étudiées pour les travaux de thèse). La formation d'un complexe ULK1 (*UNC51-like kinase*) protéine sérine/thréonine kinase, avec les protéines FIP200 (*AK-family interacting protein of 200 kDa*) et ATG13 (*autophagy related gene 13*) initie le recrutement des lipides pour la formation du phagophore (**Figure 44.a**). La conjugaison de la protéine LC3-I (*light chain 3*) cytosolique avec des phosphatidyléthanolamine (PE) permet son incorporation dans la membrane du pré-autophagosome, on parle alors de la forme LC3-II associée à l'autophagosome. LC3-II a une fonction structurale dans l'étape d'expansion et de maturation des autophagosomes et est utilisée comme marqueur d'identification de ces structures. P62 est une protéine adaptatrice qui interagit à la fois avec la protéine LC3-II et les agrégats protéiques polyubiquitinés favorisant ainsi leur ciblage et leur recyclage ou dégradation par le flux autophagique. La protéine mTOR (*mammalian/mechanistic target of rapamycin*, sérine/thréonine kinase) joue un rôle clef dans la régulation de l'autophagie à différents niveaux. En effet, la phosphorylation de la sérine 757 de ULK1 et d'ATG13 par mTOR empêche la formation d'un complexe « actif » (de conformation fermée) ULK1/ATG13/FIP200 et inhibe l'initiation de l'autophagie (Ganley *et al.* , 2009; Jung *et al.* , 2010) (**Figure 44.b**). Dans certains contextes cellulaires, tel qu'une carence en nutriments ou

en facteurs de croissance, l'hypoxie, ou un stress oxydatif, mTOR est inhibée et l'autophagie peut être initiée.

## b. Résultats

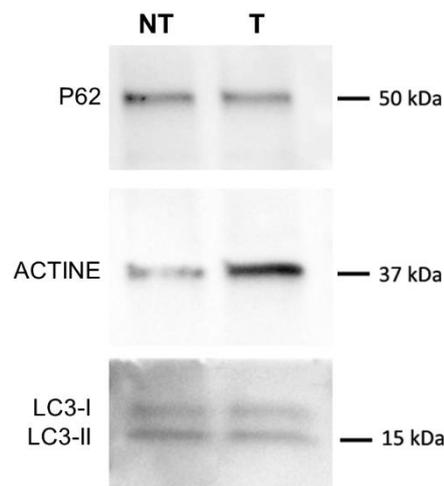
Les images de MET de l'article 3 ont été ré-étudiées en collaboration avec le Dr. Isabelle Vergne (biologiste cellulaire de l'IPBS). Ces secondes observations ont permis de mettre en évidence des structures similaires à des vacuoles d'autophagie dans les cellules des sphéroïdes doublement traités avec le P-A PBS et l'EP. La **figure 45** montre ces structures qui s'apparentent à des vacuoles à double membrane pleine, pour certaines le contenu est très contrasté et noir, comme sur les images de MET montrées en **figure 44.B** de la phase de digestion des débris cellulaires.



**Figure 45 : Observation en microscopie électronique à transmission des vacuoles d'autophagie sur les cellules HCT 116-GFP des couronnes externes des sphéroïdes traités par EP et P-A PBS (1 heure d'incubation avant fixation). Les flèches rouges montrent ce qui semblent être des vacuoles d'autophagie. Barres d'échelle : haut gauche : 5  $\mu$ m ; milieu droit : 2  $\mu$ m ; haut droit, milieu gauche et bas gauche : 1  $\mu$ m ; bas droit : 500 nm.**

Ces observations restent toutefois préliminaires et d'autres approches sont nécessaires afin de valider qu'il s'agit bien d'autophagosomes. De plus, des analyses supplémentaires sont requises afin de savoir si un flux autophagique est engagé (jusqu'à la dégradation du contenu). L'identification de marqueurs de l'autophagie (protéines impliquées dans la voie et introduites précédemment) peut être réalisés au moyen de l'étude de l'expression de ces protéines par western blot (WB) et/ou d'immunofluorescence.

Par manque de temps, nous n'avons pu réaliser des expériences de WB que sur les extraits de protéines totales (cytoplasmiques, membranaires et nucléaires) issue de sphéroïdes contrôle (non traité, NT) et de sphéroïdes soumis au double traitement par P-A PBS et EP (Traité, T). Basé sur les observations faites en MET, nous avons commencé par effectuer un WB sur des extraits protéiques issues de sphéroïdes traités une heure seulement. Un broyage mécanique a été effectué dans le tampon de lyse cellulaire pour s'assurer d'une dissociation des sphéroïdes efficace. Nous avons évalué l'expression de deux protéines impliquées dans l'autophagie : P62 et LC3-II. La membrane du WB après révélation est présentée en **figure 46**. L'actine, utilisée ici comme contrôle de charge des protéines, est en plus faible quantité chez les contrôles. Ceci implique qu'une plus faible quantité de protéine a été déposée. Aucune variation dans l'expression de p62 et LC3-II n'est visible entre la condition contrôle et la condition traitée, toutes deux présentent en très faible quantité. Toutefois, puisque moins de protéines ont été déposées chez le contrôle, nous pouvons penser que les sphéroïdes traités expriment donc moins les protéines p62 et LC3-II. Néanmoins, cette faible variation ne nous permet pas de conclure.

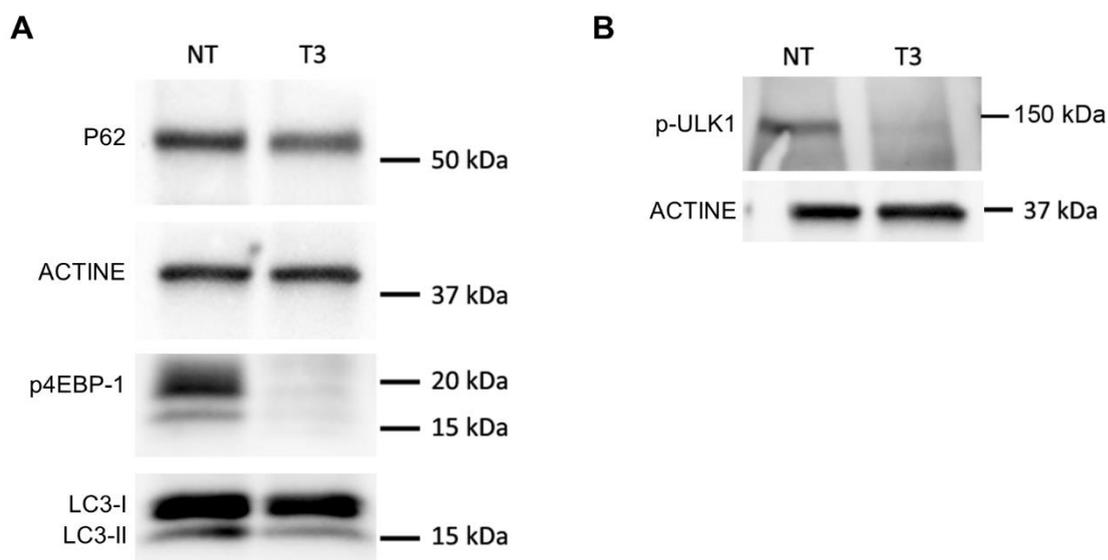


**Figure 46 : Analyse par Western Blot de l'expression de p62 et LC3-II.** Extraits protéiques issues de sphéroïdes de cellules HCT 116-GFP non traités (NT) et traités par EP suivi d'une incubation d'une heure dans du P-A PBS (T). L'actine est utilisée comme contrôle de charge.

Cette première expérience nous a donc permis de mettre au point le protocole pour l'analyse en WB :

- La lyse chimique dans un tampon d'extraction est suffisante pour extraire les protéines cytoplasmiques des cellules du sphéroïde (pas de broyage mécanique nécessaire, réduit la quantité de protéine extraite et affecte les cellules),
- Un temps d'une heure après traitement n'est pas suffisant pour observer des changements dans l'expression des protéines impliquées (**Figure 46**). Ceci étant sûrement dû à la proportion de cellules affectées par l'autophagie après une heure de traitement (seulement la couronne externe des sphéroïdes comme vu en MET) qui est négligeable par rapport aux autres cellules. Ainsi, nous avons décidé d'analyser l'expression des protéines sur des extraits protéiques provenant de sphéroïdes prélevés après 3 heures de traitement.

Nous avons réalisé une analyse par WB sur des extraits protéiques issues de sphéroïdes contrôle (NT) et traité P-A PBS + EP (3 heures d'incubation post EP) (T3). Pour cette expérience, nous avons également regardé l'expression de la forme phosphorylée de la protéine 4EBP-1 (*4E-binding protein-1*), en parallèle de LC3-I/II et de P62 (**Figure 47.A**). En effet, la protéine 4EBP-1 est un substrat de mTOR. Sa phosphorylation est utilisée comme témoin de l'activité de mTOR (Gingras *et al.*, 1999). Ainsi, l'étude de l'expression de la forme phosphorylée de 4EBP-1 (p4EBP-1) nous permet de renforcer l'interprétation des résultats.



**Figure 47 : Analyse par Western Blot de l'expression de protéines impliquées dans la voie de l'autophagie.** Extraits protéiques issues de sphéroïdes de cellules HCT 116-GFP non traité (NT) et traités par EP suivi d'une incubation de 3 heures dans du P-A PBS (T3). **(A)** Analyse de l'expression de P62, p4EBP-1 et LC3I/II. **(B)** Analyse de l'expression de p-ULK-1. L'actine est utilisée comme contrôle de charge.

Le double traitement induit une réduction de l'expression de P62 (légère), de la protéine LC3 sous ces deux formes (LC3-I et II) et de la forme phosphorylée de la protéine 4EPB-1 (substrat de mTOR). La réduction de l'expression de ces protéines peut être interprétée de différentes façons : la diminution de LC3-II peut être une conséquence de sa dégradation en fin de flux autophagique ou d'une diminution de sa production en amont de la voie (Yoshii and Mizushima, 2017). En effet, dans certaines cellules la dégradation de LC3-II est plus rapide que la formation et donc on observe une diminution de LC3-II, tandis que dans d'autres cas, la formation est plus importante que la dégradation conduisant alors à une augmentation. Dans ces deux cas il y a activation de l'autophagie. De même, la réduction de p62, substrat de l'autophagie peut être une conséquence de sa consommation par le flux actif de l'autophagie ou à l'inverse une diminution de sa production (Yoshii and Mizushima, 2017).

C'est pour ces raisons qu'il est nécessaire d'évaluer l'expression d'autres protéines afin de comprendre si l'on se trouve dans le cas d'un flux d'autophagie actif ou alors dans un arrêt de celui-ci. La réduction de l'expression de la forme phosphorylée de 4EPB-1 conforte l'hypothèse d'un flux actif de l'autophagie. En effet, comme vu précédemment une diminution de la phosphorylation de cette protéine indique que l'activité de la protéine mTOR est réduite et que l'autophagie peut être initiée.

Les mêmes extraits protéiques ont été utilisés pour évaluer l'expression de la forme phosphorylée (Ser757) de la protéine ULK-1 (**figure 47.B**). Tout comme pour la protéine 4EBP-1, les cellules des sphéroïdes traités n'expriment pas la forme phosphorylée de la protéine ULK-1. Ce résultat renforce l'hypothèse de l'activation du flux autophagique induit par le double traitement et est en accord avec les résultats trouvés précédemment.

Ces données préliminaires suggèrent une activation de l'autophagie car on observe à la fois une diminution de LC3-II et de p62, de la phosphorylation d'ULK1 et une inhibition de mTOR (forme phosphorylée de la protéine 4EPB-1). Toutefois, ces analyses restent à compléter et à reproduire. Des inhibiteurs chimiques du flux d'autophagie pourraient être utilisés (chloroquine ou bafilomycine) qui empêche l'acidification des lysosomes en inhibant pompes à protons ainsi que des contrôles positifs pour l'autophagie. Les mêmes analyses devraient être réalisées sur toutes les conditions (contrôle EP seul et sphéroïdes traités par le P-A PBS seul) afin de voir si l'autophagie n'est induite que dans le cas du double traitement. Enfin, des immunofluorescences de P62 et LC3-II permettraient également de valider les résultats par une autre approche.

#### 4. Modulation des jonctions cellulaires et du cytosquelette

Dans la continuité des travaux présentés dans l'**article 3**, nous avons émis l'hypothèse qu'en plus de la diffusion transcellulaire des RONS contenues dans le P-A PBS potentialisée par la perméabilisation des cellules, l'application des champs électriques pulsés pourrait également affecter les jonctions cellulaires des cellules ainsi que leur cytosquelette. Ceci induirait, d'une part, un relâchement de la structure du sphéroïde par une altération de la cohésion cellulaire, et permettrait, d'autre part, une diffusion paracellulaire des RONS plus rapide et jusqu'au cœur du sphéroïde.

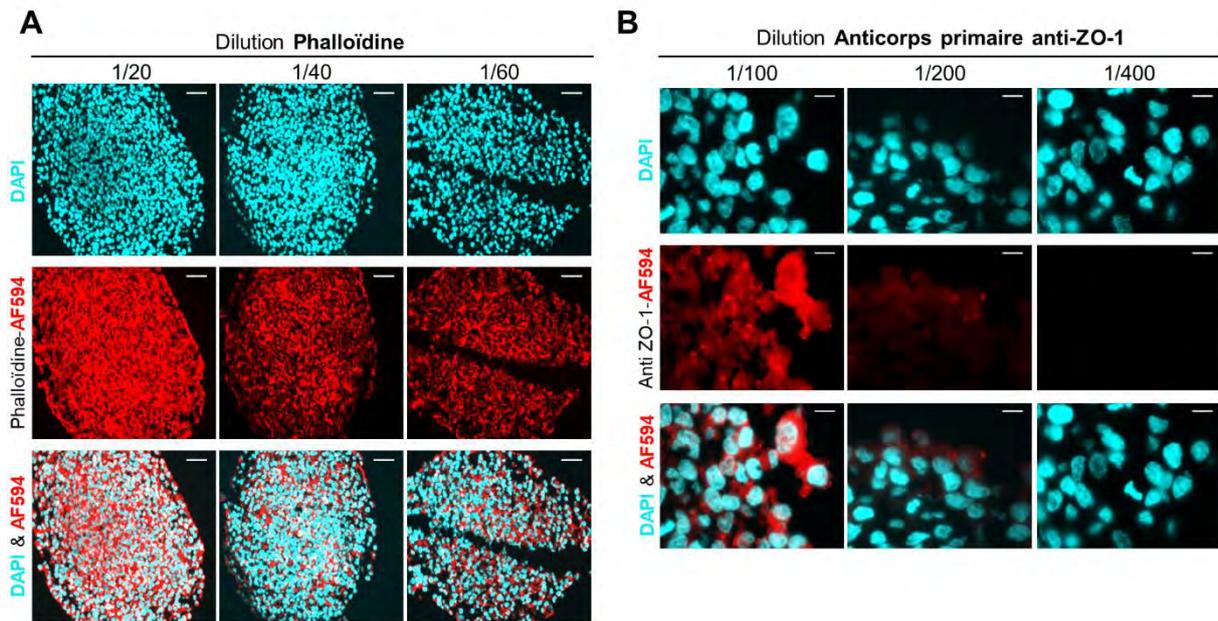
Pour répondre à cette question, nous avons effectué, sur des cryocoupes de sphéroïdes de cellule HCT 116-GFP, des marquages par immunofluorescence de l'actine filamenteuse (actine-F, microfilaments) et de la protéine Zonula Occludens-1 (ZO-1). ZO-1 participe à l'ancrage des microfilaments d'actine à la membrane puisqu'elle interagit à la fois avec l'actine-F et des protéines transmembranaires impliquées dans les jonctions serrées et adhérentes (occludine, claudine, junction adhesion molecules JAM), assurant ainsi la fonction de cohésion entre les cellules (Fanning and Anderson, 2009). Comme discuté en introduction (**Introduction-Partie III-Section 1.d**), les altérations des jonctions et des cytosquelettes des cellules induites par l'EP sont observées très rapidement après l'application des champs électriques pulsés et sont transitoires. Ainsi, nous avons fait le choix de cryo-fixer les sphéroïdes 30 minutes ou 3 heures après traitement dans le but d'évaluer des possibles altérations précoces (30 minutes) ainsi que la réversibilité de ces événements cellulaires (3 heures).

L'actine-F est marquée directement avec la phalloïdine couplée à l'Alexa Fluor 594 (phalloïdine-AF594). Il s'agit d'une toxine peptidique qui se lie spécifiquement à l'interface entre les sous-unités d'actine globulaire (actine G) des filaments (Lengsfeld *et al.*, 1974). La protéine ZO-1 est marquée par un anticorps primaire (AC anti-ZO-1) puis détectée par l'utilisation d'un anticorps secondaire couplé à l'Alexa Fluor 594. Les marquages réalisés ne sont donc pas des co-marquages puisque les fluorochromes utilisés sont les mêmes pour les deux protéines.

*L'optimisation des marquages ainsi que les immunofluorescences ont été réalisées par Jinane Sahli, étudiante en Master 1, au cours d'un stage d'initiation à la recherche. Les données présentées ci-après constituent des expériences préliminaires, les premières observations des immunofluorescences ont été effectuées sous un microscope à fluorescence à champs large.*

Néanmoins, il serait nécessaire de continuer ses expériences et d'observer les profils de marquage en microscopie confocale afin de conclure quant à l'effet du traitement combiné.

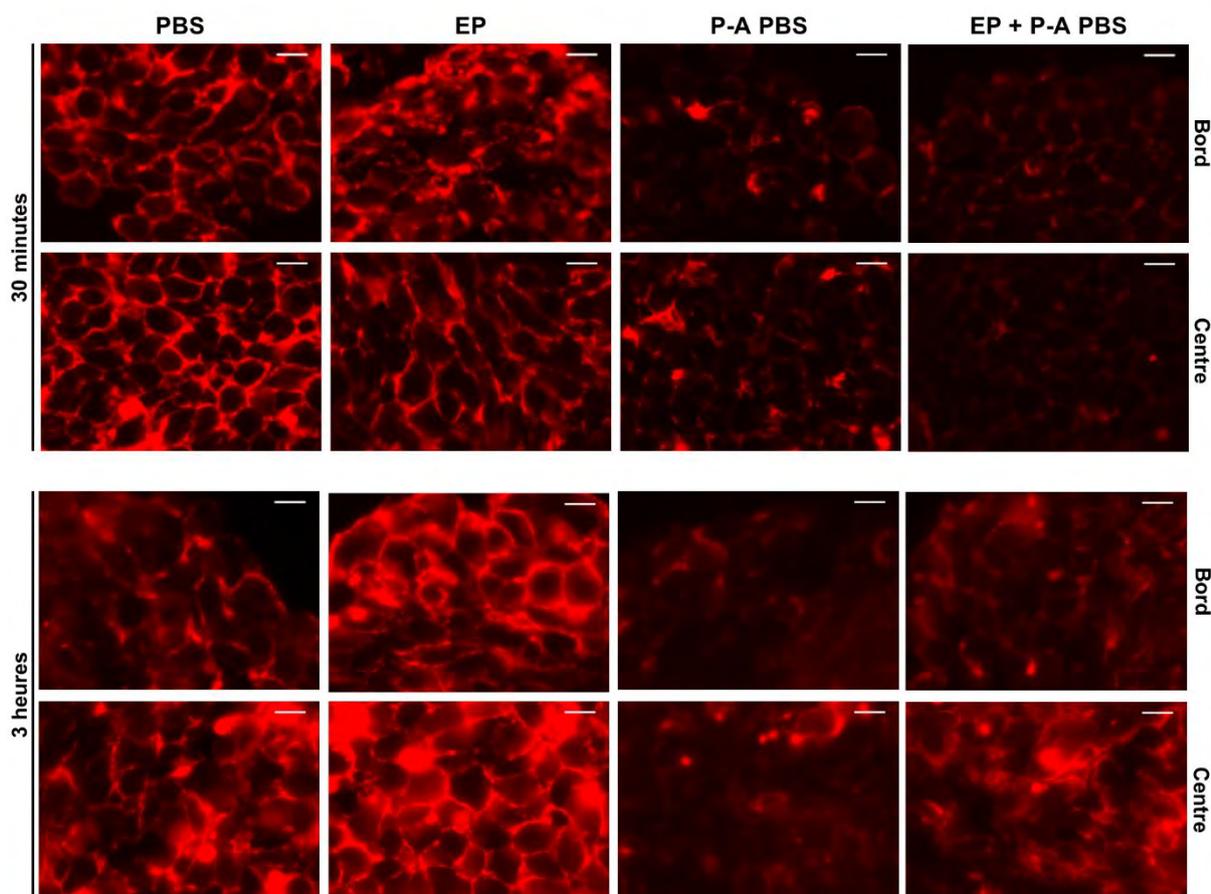
Des titrations de la phalloïdine-AF594 et de l'AC anti-ZO-1 ont été effectuées sur des coupes de sphéroïdes contrôles (cultivés pendant 5 jours dans du DMEM). Les résultats sont présentés en **figure 48**. Ces titrations nous ont permis de choisir les concentrations optimales pour le marquage et la détection des deux protéines sur les coupes de sphéroïdes (1/60 pour la phalloïdine et 1/100 pour l'AC anti-ZO-1). Aussi, nous avons pu déterminer le profil de marquage des deux protéines sur les coupes de sphéroïdes. Il est important de noter ici que le marquage de l'actine-F sur coupes de sphéroïdes diffère d'un marquage sur cellules adhérentes en 2D. D'une part, l'organisation/l'entassement des cellules en trois dimensions implique que les cellules ne forment pas de protrusions et de fibres de stress (**Figure 48.A**). D'autre part, les cellules présentes sur les cryocoupes de sphéroïdes ne sont pas toutes dans la même orientation et au même niveau (en Z), ceci est clairement visible sur les marquages des noyaux au DAPI (**Figure 48.B**). Ceci entraîne une inhomogénéité des marquages d'une cellule à une autre, plus prononcé pour le marquage de ZO-1 ponctiforme (**Figure 48.B**).



**Figure 48 : Titration des anticorps pour le marquage par immunofluorescence de l'actine-F et de ZO-1.** Micrographies des cryocoupes (5  $\mu\text{m}$  d'épaisseur) de sphéroïdes de cellules HCT 116-GFP non traités (cultivés dans le DMEM pendant 5 jours). Les noyaux sont marqués avec du DAPI (bleu cyan). **(A)** Micrographies de fluorescence obtenues avec différentes dilutions de la phalloïdine couplé à l'Alexa Fluor 594 (AF594, rouge). Grossissement  $\times 20$ , barre d'échelle : 100  $\mu\text{m}$ . **(B)** Micrographies de fluorescence obtenues avec différentes dilutions de l'anticorps primaire dirigé contre ZO-1, l'anticorps secondaire couplé à l'Alexa Fluor 594 (AF594, rouge) est utilisé à une concentration fixée. Grossissement  $\times 100$  à huile, barre d'échelle : 10  $\mu\text{m}$ . L'acquisition des images se fait au microscope à fluorescence champ large. Les images sont représentatives de  $n=5$  coupes de 5 sphéroïdes différents.

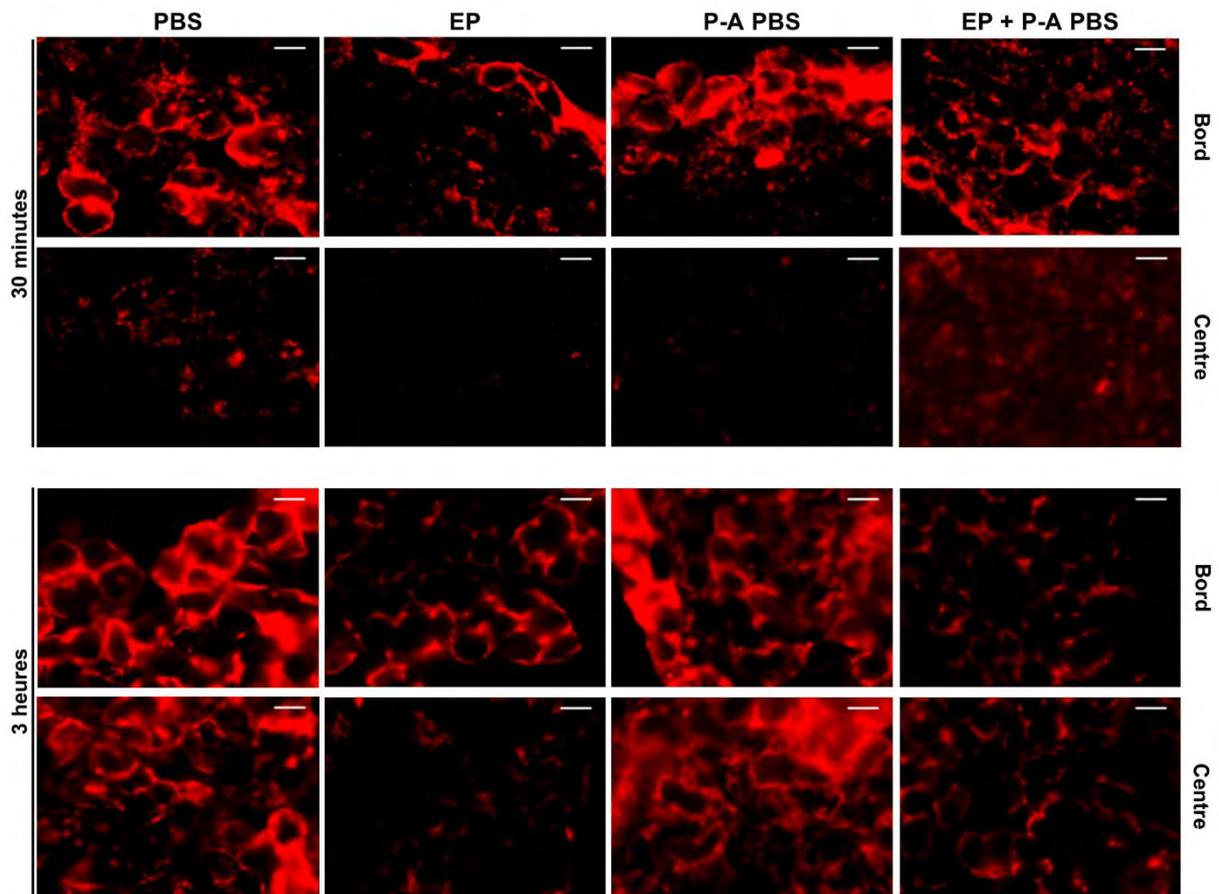
À la suite des titrations des anticorps, nous avons effectués les marquages en immunofluorescence des deux protéines sur les cryocoupes des sphéroïdes des conditions suivantes : PBS (témoin), EP seul (dans le PBS), P-A PBS seul et P-A PBS précédé de l'EP, à 30 minutes ou 3 heures de traitement. Il est important de noter ici que les cryocoupes utilisées pour le marquage de l'actine-F et de ZO-1 pour ces conditions ne présentent pas les mêmes épaisseurs selon le temps de traitement. Des coupes de 5  $\mu\text{m}$  d'épaisseur ont été réalisées avec les sphéroïdes fixés 30 minutes après le traitement ; tandis que les sphéroïdes traités 3 heures ont été fixés et coupés avec une épaisseur de 10  $\mu\text{m}$ . Cette épaisseur de coupe a été réalisé pour une analyse en microscopie confocale des marquages, qui n'a pas pu être effectuée durant le stage suite à une panne. Ainsi, l'imagerie de ces coupes en microscopie à champ large induit la détection de fluorescence hors focus et donc un signal moins net visible sur les **figures 49** et **50** présentées ci-après.

Les micrographes de fluorescence de l'actine-F, des régions du centre et du bord des sphéroïdes, pour chacune des conditions de traitement sont présentés en **figure 49**. Il ne semble pas y avoir de différence entre le marquage de l'actine-F 30 minutes ou 3 heures après le traitement. De même, les cellules du centre et du bord des sphéroïdes ne présentent pas de différence dans le profil de marquage. Deux groupes se distinguent : les conditions PBS et EP et les conditions P-A PBS et P-A PBS + EP. En effet, les cellules des sphéroïdes incubés dans le PBS seul (témoin) ou en combinaison avec l'EP, présente un marquage intense péri membranaire et homogène entre les cellules. Tandis que les cellules des sphéroïdes incubés dans le P-A PBS, seul ou en combinaison avec l'EP ont un marquage peu intense et plus inhomogène. Ainsi, le P-A PBS semble responsable des altérations non réversibles (puisque maintenues après 3 heures de traitement) de l'actine-F. Il est possible que le traitement au P-A PBS, par l'action des RONS, favorise la dépolymérisation de l'actine en monomère, ce qui entrainerait une diminution du marquage et une perte d'intensité de la fluorescence (DalleDonne *et al.* , 1995; Milzani *et al.* , 1997). Étonnamment, l'EP ne perturbe pas le cytosquelette d'actine des cellules. Néanmoins, il est possible que 30 minutes soit un temps trop long et que les effets transitoires soient plus précoces. Si ces résultats sont confirmés, il n'y aurait donc pas de synergie d'action du P-A PBS et de l'EP sur l'architecture des microfilaments d'actine.



**Figure 49 : Immunofluorescence de l'actine-F sur des coupes de sphéroïdes de cellules HCT 116-GFP.** Les sphéroïdes sont soumis à l'EP seul dans le PBS (EP), ou incubés 30 minutes ou 3 heures dans le PBS (PBS) ou dans le P-A PBS (P-A PBS) seulement ou précédé de l'EP (P-A PBS + EP). Epaisseur de coupes : 5  $\mu\text{m}$  à 30 minutes, 10  $\mu\text{m}$  à 3 heures. Microscope de fluorescence à champs large, objectif x100 à huile, barre d'échelle : 100  $\mu\text{m}$ . Les images sont représentatives de n = 5 coupes.

Les micrographes de fluorescence de ZO-1 sont présentés en **figure 50**. Le marquage en immunofluorescence de ZO-1 est un marquage ponctiforme/discontinu et membranaire (**Figure 48**). Le marquage est plus intense sur les cellules du bord du sphéroïde que pour les cellules du centre. Cette sous-expression pourrait être due au fait que les cellules du centre sont soutenues par une couronne de cellules périphériques fortement adhérentes et prolifératives. Les cellules au centre ne seraient plus en nécessité d'exprimer la protéine. Pour vérifier cette hypothèse, des analyses par western blot sur des extraits protéiques issus de dissociations différentielles des cellules en périphéries et des cellules du centre des sphéroïdes pourraient être réalisées. Pour les cellules présentes sur la couronne externe du sphéroïde, le marquage est un peu plus intense dans les conditions PBS (témoin) et P-A PBS comparé aux conditions pour lesquelles l'EP a été effectuée (EP seul et P-A PBS + EP), ces observations sont valables pour les deux temps de traitement. Ainsi, contrairement au cytosquelette d'actine, l'EP déstabiliserait la protéine ZO-1 tandis que le P-A PBS seul ne semble pas affecter son organisation.



**Figure 50 : Immunofluorescence de ZO-1 sur des coupes de sphéroïdes de cellules HCT 116-GFP.** Les sphéroïdes sont soumis à l'EP seul dans le PBS (EP), ou incubés 30 minutes ou 3 heures dans le PBS (PBS) ou dans le P-A PBS (P-A PBS) seulement ou précédé de l'EP (P-A PBS + EP). Epaisseur de coupes : 5  $\mu\text{m}$  à 30 minutes, 10  $\mu\text{m}$  à 3 heures. Microscope de fluorescence à champs large, objectif x100 à huile, barre d'échelle : 100  $\mu\text{m}$ . Les images sont représentatives de n = 5 coupes.

Ces résultats restent toutefois préliminaires et d'autres expériences notamment par immunofluorescence devraient être réalisés et imagés par microscopie confocale dans le but de mieux caractériser les profils de marquages de l'actine F et de ZO-1. De plus, des coupes de 5  $\mu\text{m}$  d'épaisseur semblent plus approprié que les coupes de 10  $\mu\text{m}$  pour l'observation de ces structures cellulaires en microscopie à champ large.

## 5. Universalité du traitement combiné par P-A PBS et EP : étude préliminaire d'autres lignées cancéreuses

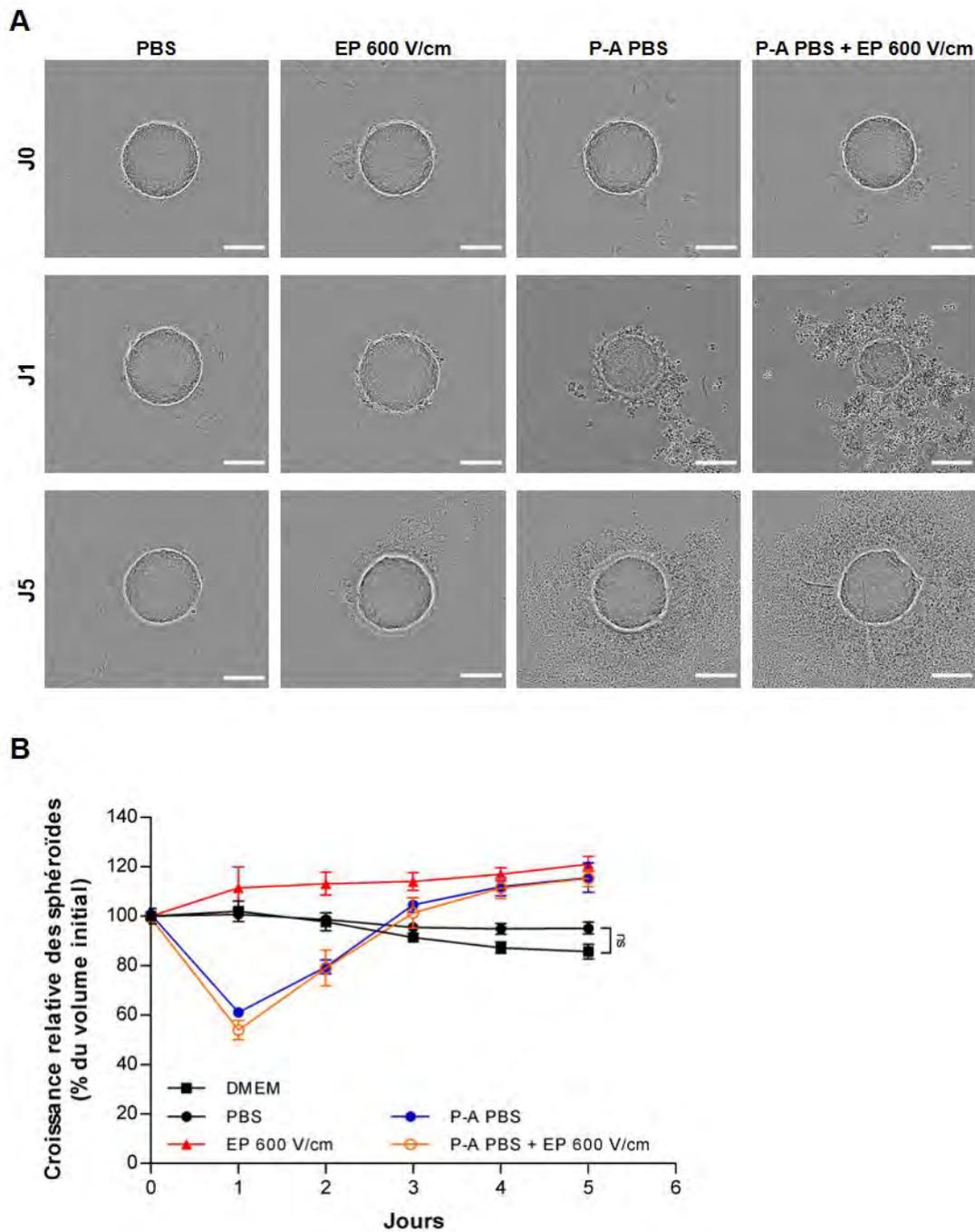
Les mécanismes de mort cellulaire impliqués dans la réponse au double traitement par P-A PBS et EP ont été étudiés sur la lignée HCT 116-GFP. Nous avons par la suite évalué l'efficacité du traitement en termes de viabilité et de croissance sur deux autres lignées cellulaires cancéreuses, dans le but de tester le caractère universel du double traitement. Deux lignées cellulaires cancéreuses ont été utilisées : les cellules de mélanome murin B16-F10 exprimant un marqueur fluorescent rouge (tdTomato) en perspective d'une transposition sur le petit animal (modèle syngénique) (**Résultats-Partie III**) ; et les cellules d'adénocarcinome du pharynx humain FaDu. Le potentiel anti-cancéreux du milieu de culture activé par plasma (P-A DMEM) a précédemment été évalué sur les cellules FaDu et il a été montré que la prolifération cellulaire au sein des sphéroïdes est stimulée après le traitement (Chauvin *et al.*, 2018). Il est donc intéressant d'évaluer l'efficacité du traitement par P-A PBS, seul ou combiné à l'EP, sur ces cellules.

### a. Réponse des sphéroïdes de la lignée cellulaire FaDu

Pour évaluer l'effet du P-A PBS seul ou combiné aux champs électriques pulsés sur les sphéroïdes de cellules FaDu, le protocole optimisé sur les cellules HCT 116-GFP a été utilisé (EP 600 V/cm, 4 heures d'incubation dans le P-A PBS).

Les images de microscopie et les courbes de croissance des sphéroïdes sont présentées en **figure 51**. Les sphéroïdes de cellules FaDu ont une forme sphérique et sont très compacts (**Figure 51.A, J0**). Il est important de noter ici qu'au-delà de 5 jours de culture (au moment du traitement), les sphéroïdes de cellules FaDu ne croissent plus, comme l'indique la courbe de croissance des sphéroïdes du groupe contrôle (DMEM) dont la pente est nulle (**Figure 51.B**). Une légère diminution, d'environ 10 %, de la taille des sphéroïdes (contrôle DMEM) est observée au J5. Aucune perte de cellules n'a été observée chez ces sphéroïdes, ceci peut donc être due à la compaction des sphéroïdes. L'incubation dans le PBS n'a pas d'influence sur la croissance des sphéroïdes FaDu (test ANOVA à deux facteurs non significatif). Un jour après le traitement des cellules se détachent en périphérie des sphéroïdes traités avec le P-A PBS seul ou combiné à l'EP, ce phénomène est associé à une perte de volume d'environ 40 et 50 %, respectivement. Les jours qui suivent, les sphéroïdes reprennent une forte croissance, jusqu'à atteindre un volume supérieur aux contrôles à J3 et atteindre une taille 15 % plus élevée que la taille initiale. Les sphéroïdes ayant été soumis à l'EP seule présentent une légère augmentation

d'environ 11 % de leur volume initial un jour après le traitement, puis leur croissance se stabilise.



**Figure 51 : Effets du traitement P-A PBS, seul ou combiné à l'EP, sur les sphéroïdes de cellules FaDu. (A)** Micrographes des sphéroïdes de cellules FaDu avant traitement (J0), 1 et 5 jours après les différents traitement (grossissement x10), barre d'échelle : 200  $\mu$ m. **(B)** Croissance des sphéroïdes obtenues à partir des micrographes. n= 8 sphéroïdes/groupe.

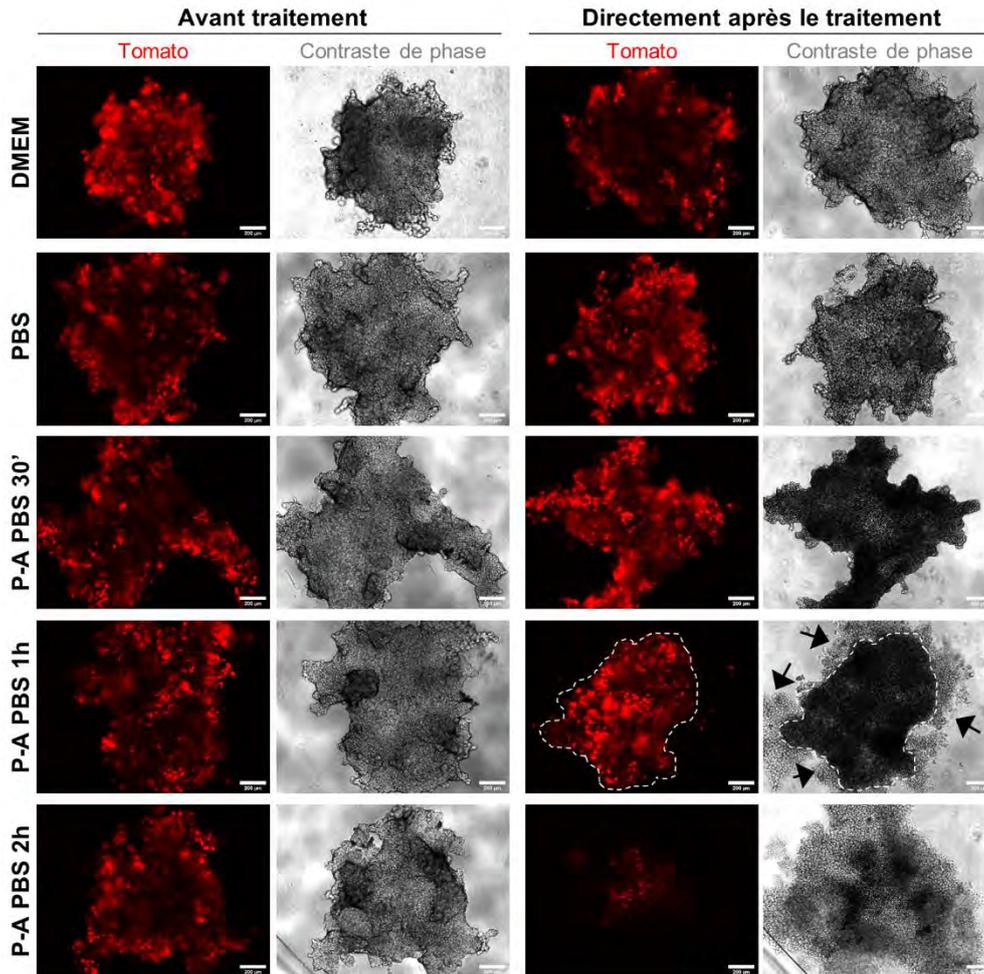
Cette expérience qui reste toutefois préliminaire, a montré, d'une part que le traitement par P-A PBS, induisait un détachement des cellules en périphérie le jour suivant le traitement, suivi

par une stimulation de la croissance des sphéroïdes, comme observé avec le P-A DMEM (Chauvin *et al.*, 2018). D'autre part, l'EP effectuée seule, semble induire une légère stimulation de la croissance. Enfin, aucune différence n'a été observé entre la condition P-A PBS seul et EP.

Les cellules FaDu ayant un diamètre plus petit que les cellules HCT 116-GFP, il est probable qu'une intensité de champs électriques pulsés de 600 V/cm ne soit pas suffisante pour atteindre le seuil de perméabilisation de ces cellules (**Introduction-Partie III-Section 1**). Aussi, il aurait été intéressant d'effectuer la même expérience avec des intensités de champs électriques plus élevées et d'évaluer l'efficacité de perméabilisation des cellules.

### **b. Réponse des sphéroïdes de la lignée cellulaire B16-F10-tdTomato**

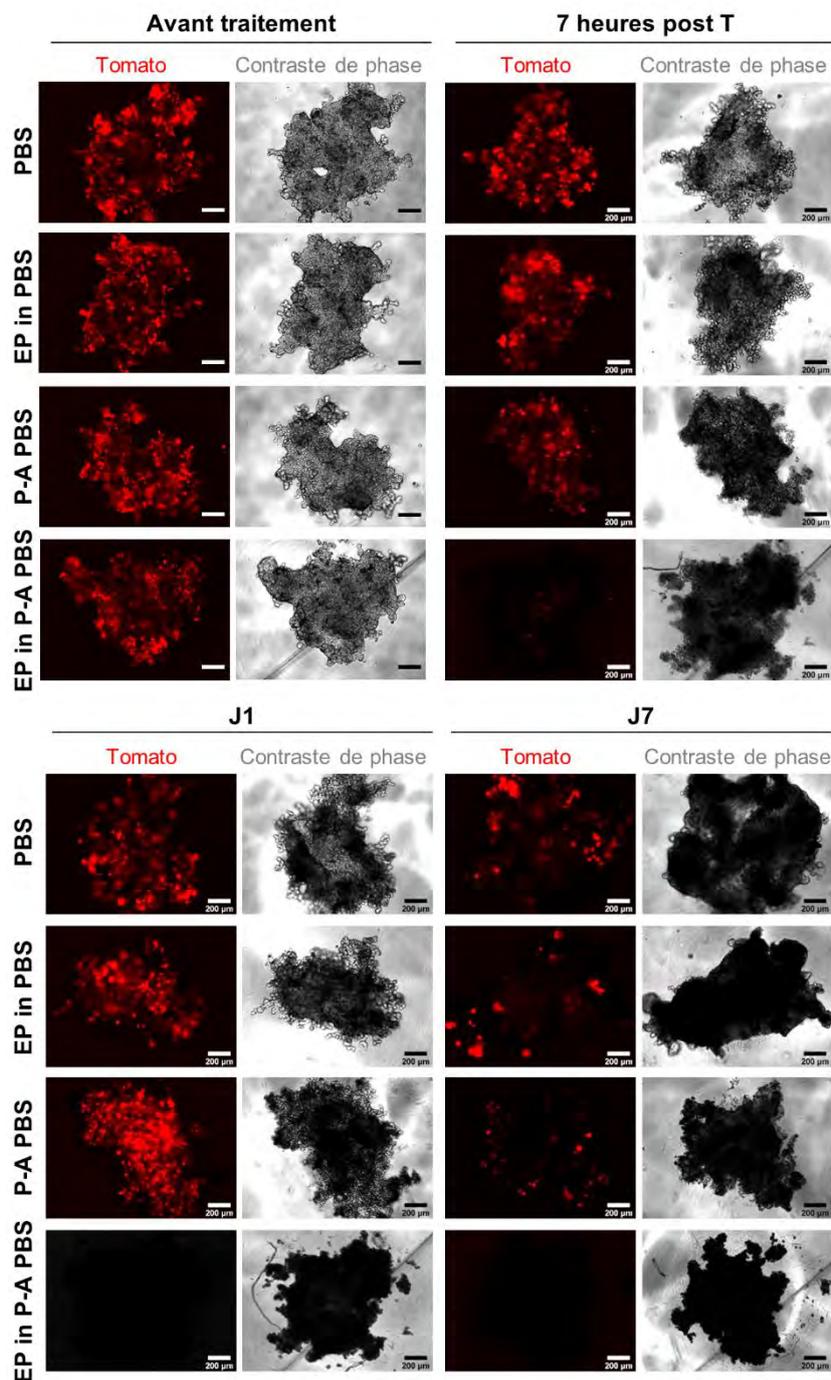
Les sphéroïdes formés par les cellules B16-F10-tdTomato sont moins compacts, réguliers et sphériques que ceux formés par les autres lignées cellulaires utilisées pour les travaux de thèse (**Figure 52, contrôle DMEM**). De ce fait, nous avons dans un premier temps, évalué la sensibilité de ces sphéroïdes vis-à-vis du P-A PBS pour différents temps d'incubation. Les sphéroïdes sont mis à incuber à 37°C, 5% de CO<sub>2</sub> en atmosphère humidifiée avec du P-A PBS pendant 30 minutes, 1 heure ou 2 heures. Directement après le traitement, la plaque est imagée sous un microscope à fluorescence à champ large. La **figure 52** montre les micrographes de phase de contraste et de fluorescence tdTomato des sphéroïdes avant le traitement et directement après le traitement. Les sphéroïdes du groupe témoin PBS présentent une morphologie similaire à celle des sphéroïdes du groupe contrôle (DMEM), des bords nets et bien contrastés, et un contraste similaire à celui observé avant le traitement, témoin d'une même organisation tridimensionnelle des cellules. En revanche, les sphéroïdes traités 30 minutes avec le P-A PBS présentent des changements dans leurs morphologies, ils apparaissent beaucoup plus contrastés (plus foncés) dans leur intégralité, ce qui peut être dû à une compaction des cellules, visible également en fluorescence puisque le signal semble plus intense et concentré, du fait de la proximité des cellules. À partir d'une heure d'incubation dans le P-A PBS, les cellules en périphérie des sphéroïdes commencent à se détacher, ceci est notable sur les images de contraste de phase (**Figure 52**, flèches noires) mais également sur l'image de fluorescence tdTomato puisque ces cellules perdent leur fluorescence (**Figure 52**, contour sphéroïde viable en pointillé blanc). Après deux heures d'incubation dans le P-A PBS, les sphéroïdes se désagrègent entièrement, et la majorité des cellules n'expriment plus la tdTomato.



**Figure 52 : Changements de morphologie des sphéroïdes de cellules B16-F10-tdTomato en réponse au traitement par P-A PBS.** Les sphéroïdes de cellules B16-F10-tdTomato sont mis en contact avec du PBS (2 heures) ou du P-A PBS pendant 30 minutes, 1 heure ou 2 heures. Les sphéroïdes sont imagés avant le traitement et directement après le traitement au microscope à fluorescence à champ large. La morphologie des sphéroïdes est visible sur les micrographes de contraste de phase et la fluorescence tdTomato (utilisée ici comme témoin de la viabilité cellulaire). Images représentatives de n= 8 sphéroïdes d'une seule expérience. Barre d'échelle : 200  $\mu$ m.

Par la suite, nous avons évalué la réponse au traitement combiné par P-A PBS et champs électriques pulsés des sphéroïdes B16-F10-tdTomato. Deux heures d'incubation des sphéroïdes B16-F10-tdTomato engendrent la dissociation de toutes les cellules du sphéroïde. Ainsi, nous avons décidé de choisir un temps d'incubation de 1 heure des sphéroïdes B16-F10-tdTomato, en gardant la même stratégie que celle employée pour les sphéroïdes de cellules HCT 116-GFP (potentialisation de l'effet de P-A PBS par l'EP). Une intensité des champs électriques pulsés de 600 V/cm est appliquée comme décrit précédemment pour les HCT 116-GFP. Les sphéroïdes sont imagés 7 heures après le traitement (temps nécessaire pour observer la mort des cellules chez les sphéroïdes HCT 116-GFP) puis la morphologie des sphéroïdes et leur fluorescence

tdTomato sont suivies jusqu'à 7 jours après le traitement. Les micrographes sont présentés en **Figure 53**.



**Figure 53 : Réponse des sphéroïdes de cellules B16-F10-tdTomato au traitement combiné P-A PBS et EP.** Les sphéroïdes sont incubés dans du PBS ou du P-A PBS pendant 1 heure ± EP (600 V/cm). Les changements de morphologie et la fluorescence tdTomato sont suivis au microscope à fluorescence à champ large. Barre d'échelle : 200 μm. Images représentatives de n= 6 sphéroïdes d'une seule expérience.

Une désagrégation des sphéroïdes ayant été soumis au double traitement est observée seulement 7 heures après l'incubation. Cette perte de cohésion du sphéroïde s'accompagne d'une perte de

la fluorescence des cellules. Ces effets sont irréversibles puisque jusqu'à 7 jours après traitement aucune fluorescence n'est observée pour ces sphéroïdes doublement traités. De plus, les images de contraste de phase à J1 et J7 montrent que les cellules qui se sont désagrégées juste après le traitement se regroupent au fond du puits et sont extrêmement contrastées, caractéristique des cellules mortes observées en microscopie à contraste de phase. Ces dernières ne reforment pas de sphéroïde viable. L'EP seule ne semble pas avoir d'effet sur la morphologie des sphéroïdes et sur la viabilité des cellules. Cependant, il aurait été intéressant d'effectuer un marquage avec une molécule similaire à l'iodure de propidium (YO-PRO, sonde verte adaptée avec ces cellules exprimant un marqueur fluorescent rouge), afin d'évaluer le taux de perméabilisation des cellules des sphéroïdes à 600 V/cm.

Cette expérience reste préliminaire puisqu'elle repose uniquement sur de l'observation microscopique. Nous avons cependant montré que le traitement combiné conduit à une désagrégation des cellules qui s'accompagne d'une perte de l'expression du marqueur fluorescent tdTomato, témoin de la viabilité cellulaire. En revanche, le traitement par P-A PBS seul induit le détachement de quelques cellules en périphérie et une compaction du sphéroïde jusqu'à 24 heures après le traitement. Ces effets restent toutefois réversibles. Le traitement par champs électriques pulsés n'induit aucun changement dans la morphologie des sphéroïdes et l'expression du marqueur fluorescent tdTomato. Ainsi, il semblerait que l'EP potentialise les effets du P-A PBS sur la lignée de mélanome murin B16-F10-tdTomato *in vitro*.

## 6. Bilan et discussions des résultats (Partie II)

Les effets du traitement combiné par P-A PBS et par EP *in vitro* sur les sphéroïdes de cellules HCT 116-GFP ont été évalués et présentés dans cette partie. Nous avons tout d'abord optimisé le protocole d'EP permettant une perméabilisation réversible et efficace sur sphéroïde entier en microscopie de fluorescence à champ large au moyen de l'iodure de propidium. Toutefois, il aurait été intéressant de déterminer le taux de cellules perméabilisées sur sphéroïdes dissociés en cytométrie en flux afin de s'assurer d'une EP efficace et ainsi d'affiner les paramètres si besoin. Nous avons montré dans la partie I des résultats (**article 2**) qu'un seul traitement par P-A PBS, avec les conditions de traitement que nous avons fixé, n'était pas suffisant pour induire des dommages sur les cellules au cœur des sphéroïdes. Un seul traitement par EP, en combinaison avec le P-A PBS, a suffi pour induire des dommages irréversibles à l'intégralité du sphéroïde. Ceci a été corrélé avec des dommages à l'ADN et une mort par apoptose (clivage des caspases 3/7).

L'observation de l'ultrastructure des organelles cellulaires par microscopie électronique à transmission a permis de mettre en évidence des modifications structurales de l'ADN (pycnose et caryorrhexie) à la fois pour les cellules des sphéroïdes traités avec le P-A PBS seul et doublement traités avec le P-A PBS et l'EP. Ce type d'évènements cellulaires est associé aux dommages à l'ADN et à l'induction de l'apoptose (Ziegler and Groscurth, 2004). Ceci a été observé sur une plus large couronne de cellule pour les sphéroïdes ayant été traité avec le P-A PBS et l'EP combiné. De plus, la rupture des crêtes internes des mitochondries des cellules doublement traité est un phénomène caractéristique de la mitoptose, observée au cours de l'autophagie et/ ou de l'apoptose (Tinari *et al.* , 2007). Des vacuoles similaires à des autophagosomes ont également été observées en très grande quantité dans les cellules des sphéroïdes doublement traités. L'analyse de l'expression de marqueurs de l'autophagie par Western Blot a montré qu'une activation du flux autophagique est engendrée à la suite du double traitement. Ces résultats préliminaires suggèrent l'hypothèse que l'EP pourrait favoriser l'accumulation des ROS dans la cellule et que le stress oxydatif engendré pourrait alors inhiber mTOR. Nous avons vu que les substrats de mTOR, la protéine 4EBP-1 et ULK-1, ne sont plus phosphorylés lorsque les sphéroïdes ont été soumis au double traitement. Ainsi, l'inhibition de la voie mTOR permettrait d'initier l'autophagie. Une étude publiée récemment a montré que le traitement par milieu de culture (RPMI) activé par jet de plasma induit l'autophagie dans des cellules de cancer de l'endomètre *in vitro*, corrélée à une inactivation de la voie signalétique de mTOR (Yoshikawa *et al.* , 2020).

La chronologie des événements cellulaires engendrés par le double traitement (P-A PBS + EP) décrite dans cette partie II est la suivante : des dommages à l'ADN sont induit à partir de 1 heure de traitement sur les cellules des couches externes, jusqu'à atteindre la totalité du sphéroïde après 3 heures de traitement. En parallèle, la formation de vacuoles d'autophagies après uniquement 1 heure de traitement a été observée en MET sur les cellules de la couronne externe, détectable et confirmé en WB après 3 heures de traitement, ce qui implique que la grande majorité des cellules du sphéroïde exprime ces marqueurs de l'autophagie après 3 heures de traitement. Le clivage des caspases 3/7 intervient 4 heures après le traitement. Ainsi, il semblerait que la mort cellulaire engendrée par le double traitement implique à la fois les voie autophagique et apoptotique. Il a été montré que l'activation du flux autophagique peut être un promoteur de la mort cellulaire par apoptose (Fitzwalter and Thorburn, 2015). De plus, une accumulation de ROS et de RNS par la cellule, entraînant l'oxydation de nombreuses macromolécules dont l'ADN, représente une source primaire de dommages. A la suite de ces dommages cellulaires, une relation entre les mécanismes de réparation de l'ADN (que nous avons mis en évidence) et l'autophagie peut se mettre en place dans la cellule (Bae and Guan, 2011; Filomeni *et al.*, 2015). Ainsi, dans notre contexte de stress oxydatif très élevé induit par le double traitement, il est difficile de savoir si l'autophagie observée aide la cellule à maintenir son homéostasie (mécanisme pro-survie), et avant que celle-ci entre finalement en apoptose à cause de dommages trop importants, ou si au contraire l'autophagie a induit elle-même l'apoptose (mécanisme anti-survie). L'utilisation d'inhibiteurs de l'autophagie nous permettrait de répondre à cette question.

Steuer *et al.* ont proposé une approche similaire sur des cellules en monocouche à celle que nous avons développée ici reposant sur l'utilisation des champs électriques pulsés en combinaison avec le traitement par milieu de culture (DMEM) activé par plasma (Steuer *et al.*, 2018). Contrairement à la stratégie expérimentale que nous avons utilisée, des champs électriques pulsés affectant la viabilité ont été utilisés (même nombre et durée des impulsions que ceux que nous avons utilisés,  $\mu\text{sec-PEF}$ ) jusqu'à 1500 V/cm dans le but de voir un effet de synergie des deux méthodes. Ils ont montré que les lignées cancéreuses sont plus sensibles au traitement que leur équivalent non cancéreux (viabilité cellulaire). Ils ont proposé que les ROS générés dans le milieu de culture activé par plasma participent à la stabilisation des pores membranaires engendrés par l'EP via la peroxydation lipidique. Ainsi l'ordre séquentiel des deux traitements, impliquant d'abord la mise en contact avec les liquides activés par plasma puis l'application des champs électriques pulsés serait primordial pour obtenir une synergie des

deux méthodes. Cette théorie est controversée puisqu'une autre étude a montré que des traitements en simultanée par champs électriques pulsés avec du plasma en jet direct induisent une plus forte cytotoxicité que des traitements séquentiels (Wolff *et al.* , 2020). De plus, lorsque les traitements ont été testés de façon séquentielle, l'ordre n'a pas impacté la toxicité induite. Les auteurs ont alors émis l'hypothèse que la combinaison du plasma direct avec les champs électriques pulsés accélère et augmente les cascades de signalisation impliquées dans la mort cellulaire via l'accumulation de ROS dans la cellule. En revanche, ils ont écarté l'hypothèse reposant sur l'augmentation d'efficacité de perméabilisation membranaire qui pourrait conduire à une IRE. Parallèlement, le PBS activé par plasma a également été utilisé en combinaison avec les champs électriques pulsés ( $\mu$ sPEF) dans le but d'améliorer l'efficacité de l'EP pour l'application combiné avec des drogues anti-cancéreuses *in fine* (ECT) (Chung *et al.* , 2020). Le but de cette étude publiée récemment était donc de développer de nouveaux protocoles permettant de minimiser les effets secondaires des champs électriques pulsés. Il a été montré sur des cellules de mélanome murin B16-F10 que la combinaison des deux approches permet d'atteindre un taux de perméabilisation des membranes similaire à celui atteint avec l'EP seul en ECT (1100 V/cm) à des amplitudes de champs pourtant bien plus faibles (de l'ordre de 600 V/cm). Basé sur les simulations moléculaires, Yusupov *et al* ont proposé que la peroxydation lipidique de la membrane induite par les ROS, présentes dans le PBS activé par plasma, abaisse le seuil de perméabilisation de cette dernière et facilite ainsi l'électroperméabilisation (Yusupov *et al.* , 2017).

Nous avons par la suite évalué l'implication du cytosquelette et des jonctions dans la potentialisation de l'effet du P-A PBS par l'EP. En effet, l'utilisation d'un modèle en trois dimensions nous a permis d'émettre d'autres hypothèses quant aux mécanismes de potentialisation des effets cytotoxique des PALs par l'EP. Nous avons proposé que l'application des champs électriques pulsés fragiliserait la structure 3D des sphéroïdes. Ce phénomène pourrait ainsi favoriser la diffusion/le transport paracellulaire des RONS jusqu'au cœur du sphéroïde. Nous avons montré que l'EP des cellules du sphéroïde ne déstabilise pas le cytosquelette d'actine à 30 minutes. En revanche, l'incubation dans le P-A PBS, enrichi en RONS, induit une baisse de la détection de la protéine en fluorescence. La polymérisation de l'actine globulaire G en actine filamenteuse F est un mécanisme ATP-dépendant, ainsi le stress oxydatif engendré par le P-A PBS pourrait induire la dépolymérisation de l'actine F. Les résultats obtenus pour les deux temps de traitements (1 et 3 heures) semblent indiquer que l'EP des cellules des sphéroïdes affecte l'organisation de ZO-1. Il est possible que la déstabilisation

de protéines transmembranaires (via la déstabilisation de la membrane par EP) auxquelles ZO-1 se lie, agissent indirectement sur son organisation ou sa conformation. Nous pouvons supposer que le recrutement de l'ATP à la membrane pour rétablir son intégrité induit indirectement la déstabilisation et la dégradation de ZO-1.

L'efficacité du double traitement a ensuite été évalué sur des sphéroïdes d'autres lignées cellulaires cancéreuses : les cellules de mélanome murin B16-F10-tdTomato et les cellules d'adénocarcinome du pharynx humain FaDu. Nous avons mis en évidence que les sphéroïdes de cellules FaDu ont une réponse au traitement par P-A PBS similaire à ce qui a été observé auparavant avec le P-A DMEM (Chauvin *et al.* , 2018). Les cellules en périphérie des sphéroïdes sont affectées par le traitement, ce qui provoque une baisse du volume des sphéroïdes dans les 24 heures suivant le traitement. S'en suit une forte reprise de croissance des sphéroïdes. Ceci peut être due à une régulation du cycle cellulaire des cellules à l'intérieur du sphéroïde suite au stress oxydatif engendré par le traitement par P-A PBS (Shackelford *et al.* , 2000). Une autre hypothèse repose sur la sécrétion d'exosomes par ces cellules, qui a déjà été décrit comme phénomène cellulaire pro-survie dans le cas du traitement par radiothérapie (Mutschelknaus *et al.* , 2016). Il serait intéressant de confirmer ces hypothèses par immunomarquage d'un marqueur de la prolifération Ki67 et par isolement des exosomes. Enfin, les cellules B16-F10 ne forment pas des sphéroïdes cohésifs et sphériques mais des agrégats. Aucun suivi de croissance n'a donc été effectué. Néanmoins les observations de la fluorescence tdTomato ont indiqué que la totalité des cellules n'expriment plus la protéine dans les heures suivant le double traitement indiquant ainsi une possible potentialisation de l'effet cytotoxique du P-A PBS par l'EP.

*Un schéma regroupant les principaux résultats in vitro de cette partie est présenté en figure 54. Nous avons mis en évidence qu'un traitement unique par champs électriques pulsés potentialise la toxicité du PBS activé par plasma sur un modèle en trois dimensions. Cette potentialisation est permise grâce à la perméabilisation membranaire des cellules qui induit une diffusion transcellulaire des RONS plus rapide et jusqu'au cœur du sphéroïde. Cette cinétique de pénétration accélérée induit un stress oxydatif très élevé à l'intérieur des cellules. Le flux autophagique est alors initié via les dommages à l'ADN ou directement par l'inhibition de mTOR. S'en suit la mort par apoptose des cellules.*

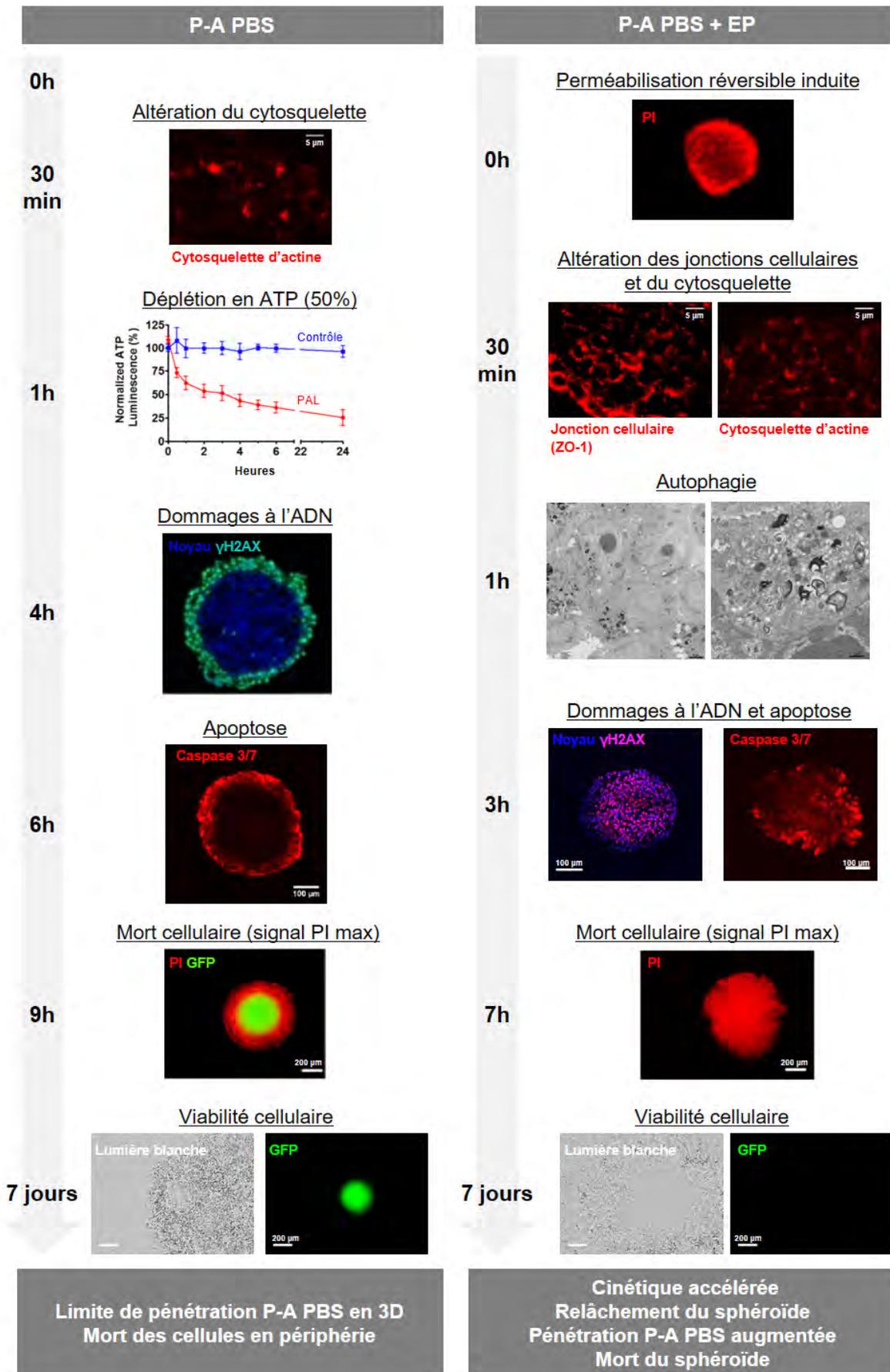


Figure 54 : Bilan des résultats (partie I et II).

*Les résultats présentés dans cette partie II, reposant sur l'utilisation de diverses approches in vitro, sont très prometteurs et ouvrent la voie pour des études plus approfondies sur le potentiel anticancéreux des champs électriques pulsés en combinaison avec le PBS activé par plasma ainsi que le développement de protocoles in vivo.*



## **Partie III : Mise en place de protocoles *in vivo* pour le traitement par liquides activés par plasma et champs électriques pulsés de différents modèles de tumeurs**

### 1. Introduction et modèles tumoraux utilisés

Dans la continuité des travaux *in vitro* présentés précédemment, des expérimentations chez la souris ont été effectuées. Différents modèles de tumeurs ont été mis en place pour évaluer la réponse au traitement PBS activé par plasma (P-A PBS), seul ou combiné aux champs électriques pulsés. Trois modèles ont été utilisés :

- Modèle de mélanome murin B16-F10 exprimant la protéine fluorescente rouge (tdTomato) en greffe intradermique dans des souris immunocompétentes (modèle syngénique) ;
- Modèle d'adénocarcinome colique humain HCT 116 exprimant la protéine fluorescente verte (eGFP) en greffe sous-cutanée dans des souris nude immunodéficientes (modèle non syngénique) ;
- Modèle de carcinose péritonéale ovarienne humaine SKOV-3 exprimant le marqueur fluorescent vert GFP et la Luciférase (Luc) en greffe intrapéritonéale dans des souris immunodéficientes (modèle non syngénique).

La réponse au traitement par P-A PBS, seul ou combiné aux champs électriques pulsés, a été évaluée *in vitro* pour ces trois lignées cellulaires dans les parties précédentes (**Résultats-Partie I et II**). L'utilisation de ces trois modèles de tumeurs nous permet de tester différentes modalités d'injection du P-A PBS : injection intra tumorale pour les tumeurs intradermiques et sous-cutanées, injection intra péritonéale pour la carcinose ovarienne péritonéale. Comme pour les investigations *in vitro*, l'électroperméabilisation (EP) est utilisée ici dans le but de potentialiser les effets du traitement par P-A PBS. Ainsi, les paramètres électriques standardisés pour les protocoles d'électrochimiothérapie ; 8 impulsions de 100  $\mu$ s à une fréquence de 1 Hz à une intensité de 1300 V/cm, ont été utilisés pour l'EP des tumeurs sous-cutanées et intradermiques.

Différentes modalités de traitement ont été appliquées en fonction du modèle d'étude *in vivo* :

- Une injection unique de P-A PBS dans les tumeurs intradermique B16-F10-tdTomato, seule ou combinée à l'EP,

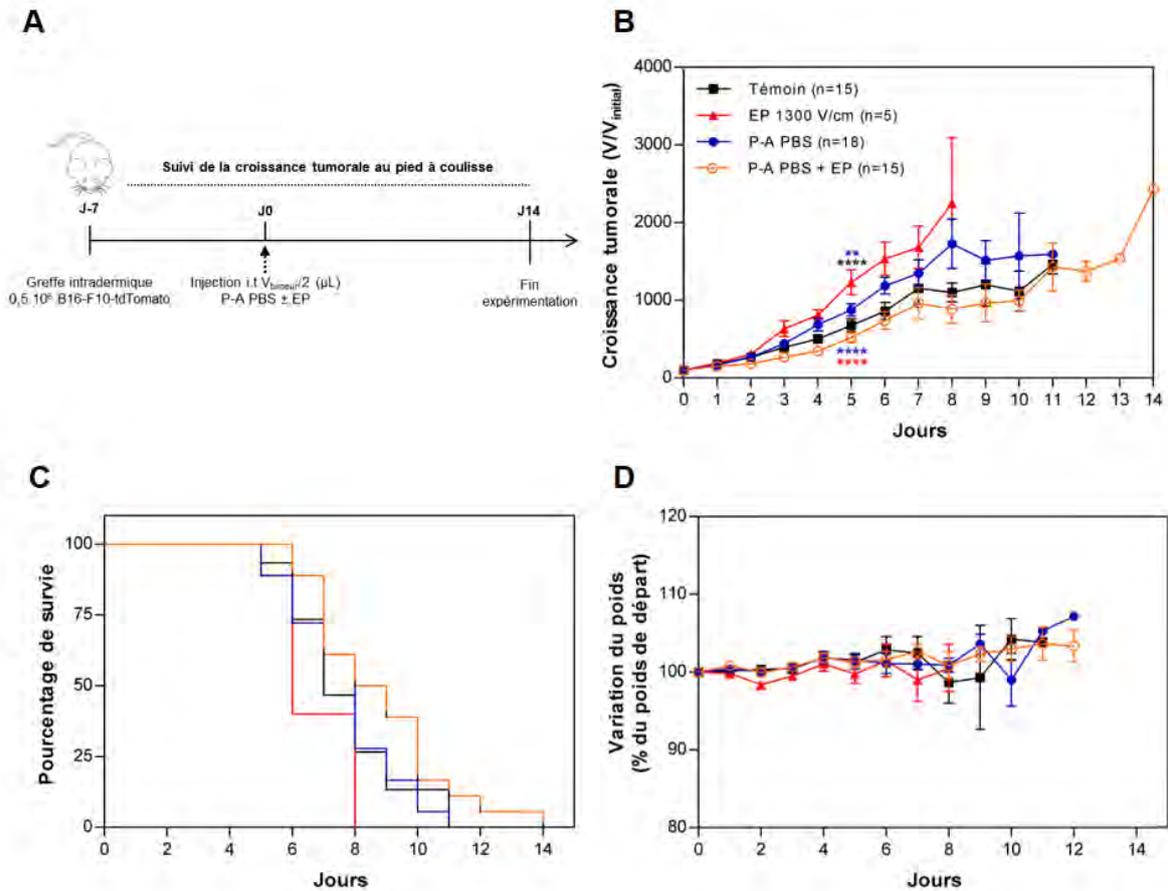
- Des injections répétées de P-A PBS dans les tumeurs sous-cutanées HCT 116-GFP, seules ou combinées à l'EP,
- Des injections répétées de P-A PBS dans le péritoine des souris greffées avec les cellules SKOV-3 GFP Luc, sans EP, puisque l'emplacement des tumeurs ne le permet pas.

La réponse au traitement est évaluée par la croissance tumorale et le taux de survie des animaux. Une masse tumorale équivalent à 5% du poids de la souris ainsi que la perte de poids de 20 % du poids initial sont définis comme des points limites et entraînent donc la mise à mort de l'animal.

## 2. Réponse des tumeurs intradermiques B16-F10-tdTomato

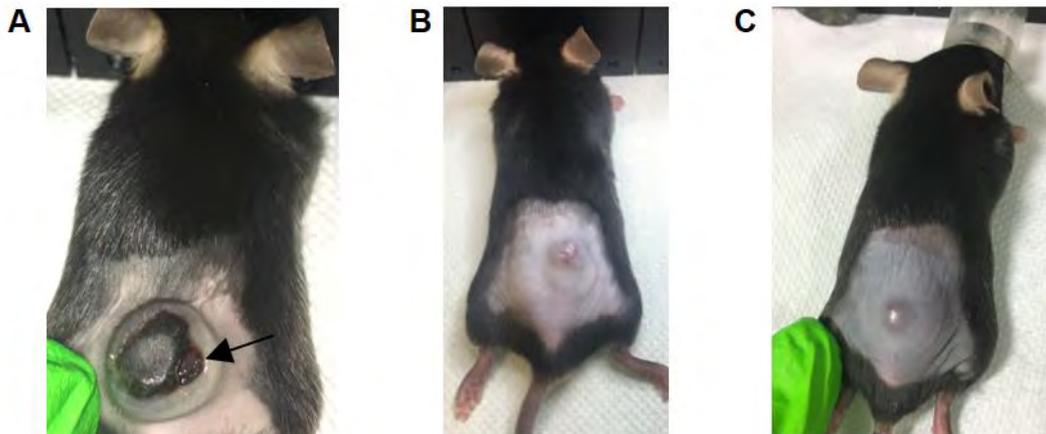
Sept jours après la greffe de 500 000 cellules en intradermique, les souris présentent des tumeurs d'un volume compris entre 45 et 80 mm<sup>3</sup>. Les souris sont aléatoirement réparties en 4 groupes : un groupe témoin, un groupe dont les tumeurs sont soumises à l'EP seulement (1300 V/cm, précédé ou non d'une injection placebo de PBS non activé), un groupe dont les tumeurs sont injectées avec du P-A PBS et enfin un groupe de souris dont la tumeur est injectée avec du P-A PBS suivie de l'application de l'EP. Un unique traitement est réalisé à J0 (**Figure 55.A**).

Les courbes de croissance tumorale, de survie et de suivi du poids des animaux sont présentées en **figure 55**. Les données des groupes témoins, P-A PBS et P-A PBS + EP sont issues de 4 expériences indépendantes, les données du groupe EP sont issues de 2 expériences indépendantes. Les tumeurs doublement traitées ont une croissance plus lente que les tumeurs des groupes P-A PBS seul et EP seul (**Figure 55.B**). A partir du cinquième jour après le traitement des différences significatives sont observées entre la taille des tumeurs du groupe P-A PBS + EP et des groupes P-A PBS seul et EP seul (\*\*\*\* $p < 0.0001$ ). En revanche, aucune différence significative n'a été observée avec le groupe témoin. Les tumeurs traitées seulement avec l'EP croissent plus rapidement que les tumeurs témoin (\*\*\*\* $p < 0.0001$ ). Bien qu'aucune différence dans la croissance tumorale n'ait été observée entre les groupes témoins et les groupes P-A PBS et P-A PBS + EP, les souris traitées avec le P-A PBS en combinaison avec l'EP présentent toutefois un meilleur taux de survie que les groupes témoins (**Figure 55.C**). Enfin, aucune perte de poids de 20 % du poids initial n'a été observée chez les souris (**Figure 55.D**).



**Figure 55 : Évaluation de la réponse à l'injection de PBS activé par plasma, seul ou combiné à l'EP, des tumeurs intradermiques B16-F10-tdTomato chez des souris immunocompétentes (C57Bl/6).** J0 représente le jour du traitement. **(A)** Protocole mis en place pour le traitement des tumeurs. **(B)** La croissance des tumeurs est suivie par mesure journalière au pied à coulisse digital, le volume tumoral est obtenu tel que décrit dans le matériel et méthode section 16.a. Les valeurs sont comparées avec un test ANOVA à deux facteurs entre le J0 et le J5 avec \*\*\* $p < 0.0001$  ; \*\* $p < 0.01$ . **(C)** La survie des animaux de chaque groupe est présentée en pourcentage. **(D)** Graphe représentant la variation du poids des animaux au cours de l'expérimentation. Données des groupes témoin, P-A PBS et P-A PBS + EP issues de 4 expériences indépendantes. Données du groupe EP seul issues de 2 expériences indépendantes dont  $n=3$  EP avec injection placebo de PBS et  $n=2$  EP sans injection de placebo. Les données des graphes représentent les moyennes  $\pm$  SEM.

Une nécrose centrale est observée pour la majorité des tumeurs atteignant un volume supérieur ou égal à 300 mm<sup>3</sup> (**Figure 56.A**). Cette nécrose tumorale évolue en même temps que la tumeur grossit, et aucune cicatrisation n'a été observée au cours du temps pour les souris des groupes témoin, EP et P-A PBS. Les tumeurs ayant reçu une injection de P-A PBS ont montré un léger gonflement jusqu'à 48 heures après le traitement, qui s'apparente à une inflammation locale qui n'est visible que sur le site de la tumeur (**Figure 56.B**). Enfin, une inflammation, caractérisée par un gonflement des tissus avoisinants la tumeur, a été observée chez les souris dont les tumeurs ont été doublement traitées par P-A PBS et EP (**Figure 56.C**). Cette inflammation perdure jusqu'à 48 heures après le traitement et induit d'une part, un ralentissement de la croissance tumorale et d'autre part, une nécrose tumorale plus tardive.



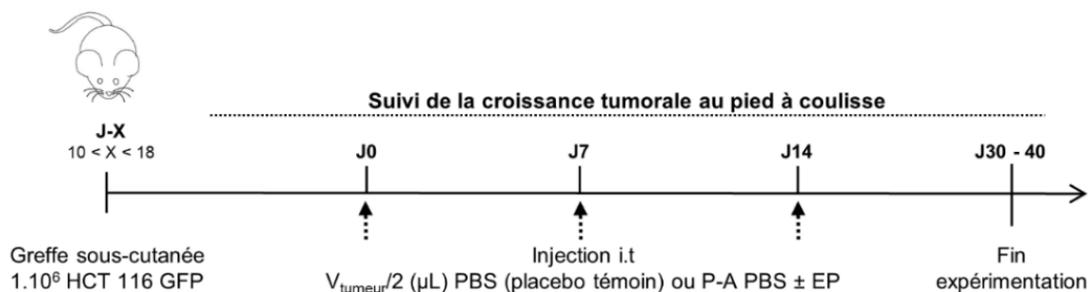
**Figure 56 : Évolution morphologique des tumeurs intradermiques B16-F10-tdTomato au cours de l'expérimentation. (A)** Photographie d'une tumeur témoin, prise avant la mise à mort de la souris et présentant une nécrose centrale non cicatrisée et ouverte (flèche noire). **(B)** Photographie d'une tumeur traitée avec du P-A PBS prise 48 heures après l'injection. **(C)** Photographie d'une tumeur doublement traitée (injection de P-A PBS suivie de l'EP), 48 heures après le traitement montrant un gonflement autour de la tumeur, témoin d'une inflammation.

Les résultats obtenus pour ce modèle tumoral ne nous permettent pas de conclure quant à l'efficacité du traitement par P-A PBS seul ou combiné avec l'EP. Une injection unique de P-A PBS n'induit aucun effet sur la croissance tumorale. Les paramètres d'EP utilisés semblent induire une augmentation de la vitesse de croissance des tumeurs, ces résultats issus de 5 animaux de deux expériences indépendantes restent préliminaires. Il est donc difficile de comparer le groupe EP des autres groupes qui présentent un nombre d'animaux plus élevé. Il est important de noter ici que des variabilités dans la croissance tumorale, intra- et inter-expériences, ont été observées pour ce modèle de tumeur. En effet, au sein d'une même expérience de fortes différences ont été observées entre les souris mâles et femelles. Ces différences n'ont pas été observés de façon répétée mais plutôt aléatoire, sans corrélation entre réponse au traitement et genre des animaux. Ainsi, il est très difficile de conclure quant à l'efficacité des traitements sur ce modèle. De plus, la greffe des cellules de mélanome murin B16-F10-tdTomato chez la souris *in vivo* entraîne une croissance très rapide (une dizaine de jours seulement) des tumeurs, ceci complique fortement l'évaluation de l'effet des différentes modalités de traitement.

### 3. Réponse des tumeurs sous-cutanées HCT 116-GFP

Nous avons précédemment démontré que le traitement combiné par P-A PBS et EP tue efficacement les cellules HCT 116-GFP dans un modèle en trois dimensions de microtumeur (**Résultats-Partie II-Article 3**). Dans la continuité de ces travaux, l'efficacité du double traitement a été évaluée sur des tumeurs sous-cutanées HCT 116-GFP greffées chez des souris nude (dépourvues de réponse immunitaire adaptative). Entre 10 et 18 jours après la greffe de 1 million de cellules HCT 116-GFP, les tumeurs atteignent un volume compris entre 50 et 100 mm<sup>3</sup>. Les souris sont aléatoirement divisées en 4 groupes : un groupe témoin (injection placebo de PBS dans la tumeur), un groupe EP seul (1300 V/cm), un groupe P-A PBS et un groupe P-A PBS + EP (1300 V/cm).

Les tumeurs établies présentent une croissance bien plus lente que la croissance des tumeurs B16-F10-tdTomato, nous avons décidé de voir s'il était possible d'amplifier la réponse en répétant le traitement 3 fois avec une fréquence hebdomadaire (J0, J7 et J14 comme décrit sur la **figure 57**).

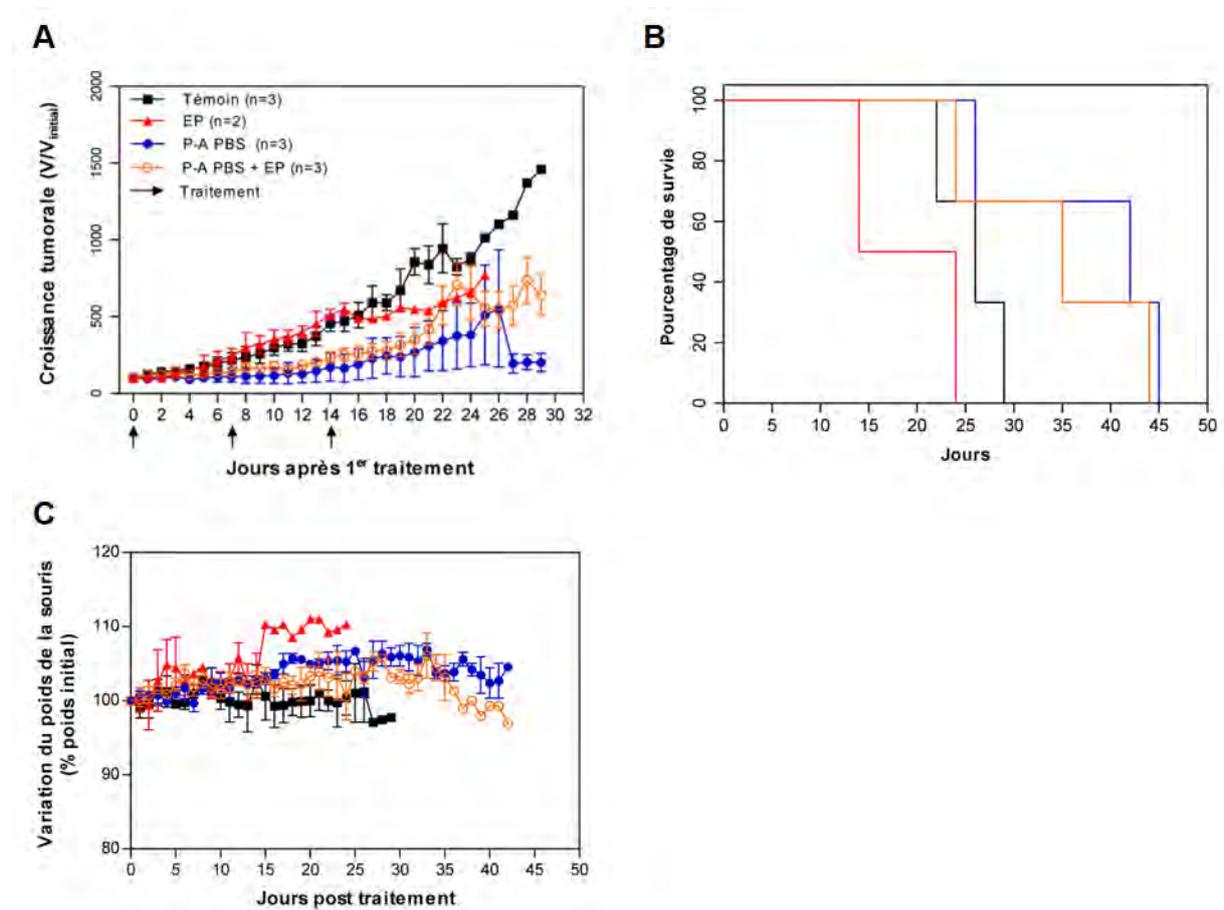


**Figure 57 : Stratégie expérimentale mise en place pour le traitement par P-A PBS, seul ou combiné à l'EP, des tumeurs sous-cutanées HCT 116-GFP chez des souris immunodéficientes (nudes).** Le J0 représente le jour du 1<sup>er</sup> traitement (10 à 18 jours post greffe des cellules). Un volume de PBS ou P-A PBS équivalent à un V/2 de la tumeur est injecté dans les tumeurs des souris. Une mesure journalière au pied à coulisse de la tumeur est effectuée tout au long de l'expérimentation.

Deux expériences indépendantes ont pu être effectuées sur ce modèle. Néanmoins, le nombre de groupe d'animaux de la seconde expérience a dû être réduit (suite au plan de continuité d'activité de la période de crise sanitaire COVID-19). Uniquement le groupe témoin et P-A PBS ont été gardés pour cette seconde expérience.

Pour la première expérience, un fort ralentissement de la croissance tumorale a été observé pour les tumeurs ayant été traitées avec du P-A PBS seul ou combiné à l'EP (**Figure 58.A**). Cette différence est observable à partir du J8, après le second traitement, jusqu'à la fin de l'expérimentation. Lorsque les traitements sont arrêtés, les barres d'erreurs des groupes P-A

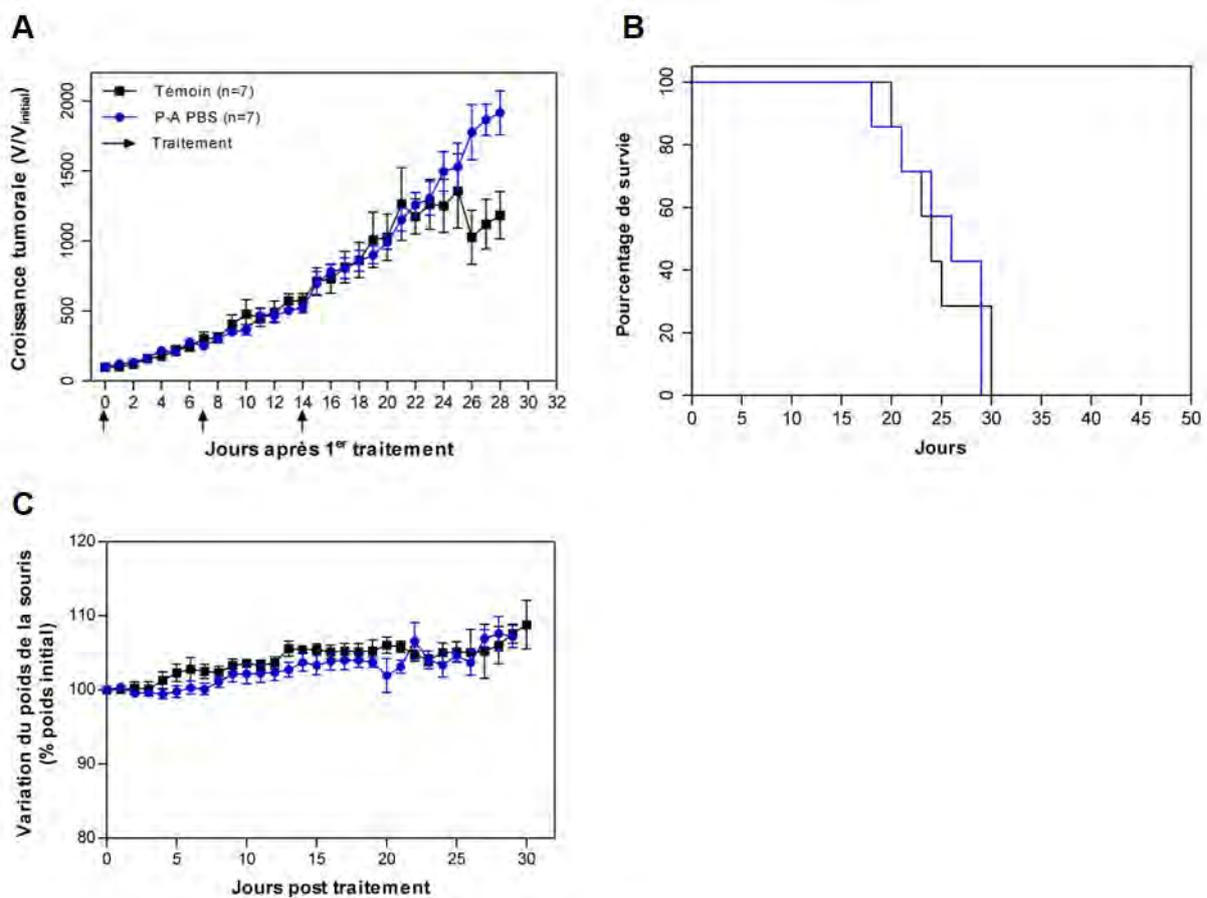
PBS et P-A PBS + EP augmentent du fait de la reprise de croissance de certaines tumeurs. Les tumeurs ayant été soumises à l'EP présentent une croissance similaire aux tumeurs témoins, jusqu'à J15. Une chute de la courbe est ensuite observée dû au fait qu'il ne reste plus qu'une seule souris. Les 3 souris issues des groupes P-A PBS et P-A PBS + EP ont été maintenues en vie jusqu'à plus de 40 jours après le traitement (**Figure 58.B**). Aucune variation de poids de plus de 20 % du poids initial n'a été observée, bien que les souris témoins présentent une perte de poids plus élevée que les traités au cours de l'expérimentation (**Figure 58.C**). Cette première expérience a montré que trois injections successives de P-A PBS dans les tumeurs entraîne une forte inhibition de leurs croissances. De plus, il semblerait que l'EP ne potentialise pas cet effet.



**Figure 58 :** Évaluation de la réponse à l'injection de PBS activé par plasma, seul ou combiné à l'EP, des tumeurs sous-cutanées HCT 116-GFP chez des souris immunodéficientes (expérience 1). J0 représente le jour du premier traitement. (A) La croissance des tumeurs est suivie par mesure journalière au pied à coulisse digital, le volume tumoral est obtenu tel que décrit dans le matériel et méthode section 16.b. (B) La survie des animaux de chaque groupe est représentée en pourcentage. (C) Graphe représentant la variation du poids des animaux dans chaque groupe au cours de l'expérimentation.

Pour la seconde expérience, les souris ont été réparties en deux groupes de souris uniquement : témoin (injection placebo de PBS non activé) et traité P-A PBS. En effet, au vu des résultats de la première expérience, nous avons fait le choix de supprimer les groupes EP et P-A PBS + EP

dans le but d'avoir un bon effectif pour les groupes restants. Le protocole expérimental a été légèrement modifié pour cette seconde expérience, le P-A PBS injecté dans les tumeurs pour le second et le troisième traitement n'a pas été produit le jour de l'injection. Comme il a été montré que les espèces réactives de l'oxygène et de l'azote responsable de l'effet cytotoxique *in vitro* du P-A PBS sont stables à 4°C en solution pendant une durée d'un mois (Judée *et al.*, 2016a; Saito *et al.*, 2016), le P-A PBS a été conservé pendant 24 à 96 heures à 4°C pour des soucis d'organisation de présence au laboratoire. Les injections du P-A PBS successives n'ont eu aucun effet sur la croissance tumorale (**Figure 59.A**). Une diminution de la courbe de croissance du groupe témoin est observée à partir du J25 suite à la mise à mort de certains animaux (plus que 2 animaux sur 7). Les souris traitées ne présentent pas un meilleur taux de survie (**Figure 59.B**). Aucune variation de poids significative des animaux n'a été observée (**Figure 59.C**). Pour cette expérience, nous avons prévu de continuer les traitements au-delà des 30 jours mais étant donné qu'aucun effet n'a été observé après 3 traitements successifs nous avons donc décidé d'arrêter l'expérimentation.



**Figure 59 : Évaluation de la réponse à l'injection de PBS activé par plasma des tumeurs sous-cutanées HCT 116-GFP chez des souris immunodéficientes (expérience 2).** J0 représente le jour du premier traitement. (A) La croissance des tumeurs est suivie par mesure journalière au pied à coulisse digital, le volume tumoral est obtenu tel que décrit dans le matériel et méthode section 16.b. (B) La survie des animaux de chaque groupe est représentée

en pourcentage. (C) Graphe représentant la variation du poids des animaux dans chaque groupe au cours de l'expérimentation.

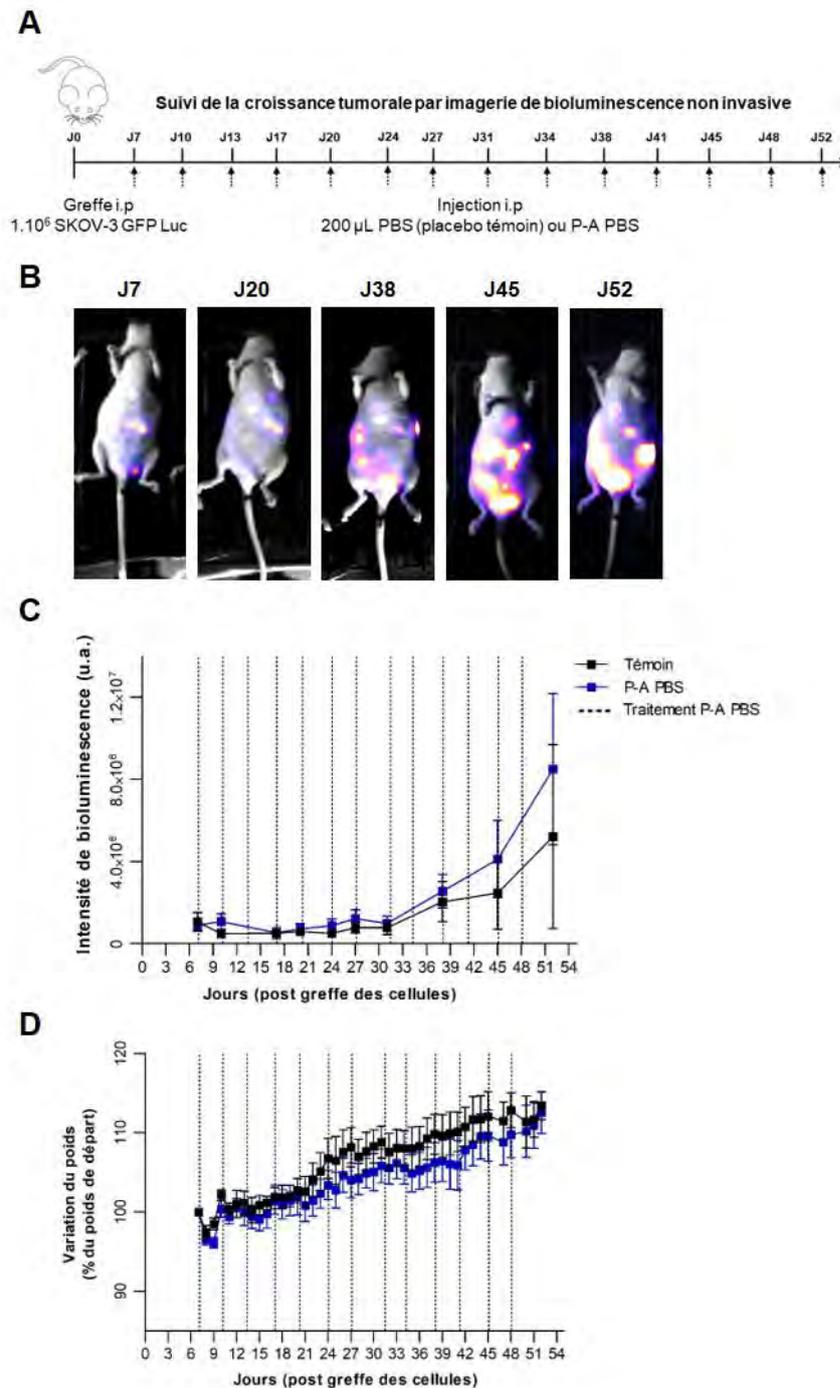
Ainsi, les deux expériences réalisées sur le modèle de tumeurs sous-cutanée HCT 116-GFP chez la souris nude ont montré de fortes variabilités inter-expériences. L'hétérogénéité des résultats obtenus avec ce modèle de tumeurs ne nous permet pas de conclure, d'autres expériences devront être réalisées avec un grand nombre d'animaux par groupe (n=10) afin de conclure quant à l'effet du traitement simple par P-A PBS et l'effet potentialisateur de l'EP.

#### 4. Réponse des tumeurs intrapéritonéales SKOV-3 GFP Luc

Nous avons précédemment montré (**Résultats-Partie I-Article 2**) que le P-A PBS peut être utilisé pour éradiquer les cellules de carcinose ovarienne péritonéale humaine SKOV-3 GFP Luc. Dans la continuité des travaux entrepris *in vitro*, nous avons donc utilisé un modèle de tumeur *in vivo* chez la souris nude immunodéficiente afin d'évaluer la réponse à des injections successives de P-A PBS dans le péritoine. Ce troisième modèle d'étude nous permet de tester une autre modalité de traitement/d'injection du P-A PBS, directement dans le péritoine de l'animal. De plus, la greffe intrapéritonéale des cellules SKOV-3 GFP Luc chez la souris est caractérisée par la formation de petits nodules dans la cavité péritonéale (Lengyel *et al.* , 2014). Ainsi, l'éradication de ces nodules est un véritable challenge clinique.

La stratégie expérimentale mise en place pour la greffe des cellules et le traitement par P-A PBS est présentée en **figure 60.A**. La luciférine est utilisée pour le suivi de la croissance tumorale par imagerie de bioluminescence non invasive (**Figure 60.B**) comme décrit dans la section 16.d du matériel et méthode. Sept jours après la greffe intrapéritonéale de 1 million de cellules SKOV-3 GFP Luc, une première imagerie par bioluminescence est effectuée afin de vérifier la prise tumorale. Une légère bioluminescence est observée à ce stade de l'expérimentation (**Figure 60.B et C**), montrant que les cellules tumorales sont toujours vivantes dans le péritoine. Nous avons fait le choix de synchroniser le traitement de toutes les souris à ce moment-là. Ainsi, 7 jours post greffe, les souris sont aléatoirement divisées en deux groupes : un groupe témoin qui recevra une injection de PBS non activé deux fois par semaine (fréquence de 3-4 jours), et un groupe P-A PBS qui recevra une injection deux fois par semaine (fréquence de 3-4 jours). L'expérience a été réalisée une seule fois et les courbes de suivi de croissance tumorale par imagerie de bioluminescence et de suivi de poids des animaux sont présentées en **figure 60.C et D**. En début d'expérimentation (J7 à J31, 4 semaines post greffe), aucune progression dans le signal de la bioluminescence des tumeurs intrapéritonéales n'est observée. Trente-six jours sont nécessaires pour observer une augmentation du signal de la bioluminescence, similaire pour les groupes témoins et traités P-A PBS (**Figure 60.C**). Comme indiqué par les barres d'erreurs, des variabilités dans la progression de la carcinose péritonéale ont été observées entre les souris d'un même groupe. Le suivi par bioluminescence s'est fait jusqu'à 52 jours après la greffe des cellules, aucune différence n'a été observé entre le groupe témoin et le groupe traité P-A PBS. A partir de 21 jours post greffe, les souris ayant reçu des injections répétées de P-A PBS (au nombre de 5) ont montré une prise de poids légèrement plus faible que les souris témoins mais de façon non significative (**Figure 60.D**). Les souris ont

toutes été mises à mort après 52 jours d'expérimentation puisqu'aucun effet du P-A PBS a été observé.



**Figure 60 : Stratégie expérimentale mise en place pour le traitement de la carcinose péritonéale SKOV-3 GFP Luc par l'injection intrapéritonéale de PBS activé par plasma chez des souris immunodéficientes (nudes).** J0 représente le jour de la greffe des cellules (A) Stratégie expérimentale. (B) Photographies d'une souris traitée avec le P-A PBS imagée dans le dispositif de bioluminescence, l'intensité de bioluminescence est représentée en échelle de Fourier Image REsolution (FIRE). (C) Suivi de l'intensité de bioluminescence des cellules SKOV-3 GFP Luc au cours de l'expérimentation. (D) Graphe représentant la variation du poids des animaux au cours de l'expérimentation. Données issues d'une seule expérience, groupe témoin n=4, groupe P-A PBS n=5. Les données des graphes C et D représentent les moyennes  $\pm$  SEM.

## 5. Bilan et discussions des résultats (Partie III)

Les résultats obtenus *in vitro* sur sphéroïdes de lignées cellulaires cancéreuses dans les parties I et II des résultats nous ont servi de point de départ pour la mise en place de protocoles *in vivo*. L'effet du traitement par P-A PBS, seul ou combiné à l'électroperméabilisation (EP), sur la croissance tumorale a été étudié sur trois différents modèles de tumeur. Différents modèles de tumeurs humaines et murines ont été utilisées chez des souris immuno-compétentes ou déficientes (nude) : greffe intradermique de cellules de mélanome murin B16-F10-tdTomato dans des souris immuno-compétentes (C57Bl/6) ; greffe sous-cutanée de cellules d'adénocarcinome colique humain HCT 116-GFP et greffe intrapéritonéale de cellules de carcinome ovarienne péritonéale humaine SKOV-3-GFP-Luc chez des souris immunodéficientes (nude). Les paramètres d'EP utilisés en électrochimiothérapie ont été appliqués, le but étant d'augmenter la délivrance du P-A PBS et de déstabiliser l'architecture et la vascularisation tumorale. L'effet du P-A PBS injecté dans la tumeur ou dans le péritoine, en injection répétées, a été évalué par le suivi de la croissance tumorale (au pied à coulisse ou par bioluminescence).

Pour le traitement du mélanome chez la souris immunocompétente, de grandes variabilités intra- et inter-expériences ont été obtenues. Les tumeurs traitées avec l'EP seule ont montré une croissance plus rapide que les témoins. Ce résultat n'est pas en accord avec les données de la littérature. En effet pour les paramètres électriques utilisés, l'EP ne devrait pas affecter la croissance tumorale (Cemazar *et al.* , 2006). Néanmoins, les données EP sont issues de deux expériences seulement (n=5 souris), ainsi l'expérience doit être reproduite avec un plus grand N, afin d'homogénéiser le nombre d'animaux avec les autres groupes. Le pool de toutes les expériences a montré qu'une injection unique en début d'expérimentation de P-A PBS, seul ou combiné à l'EP, n'a aucun effet sur la croissance tumorale par rapport aux tumeurs témoins. La croissance très rapide du mélanome B16-F10-tdTomato en fait un modèle d'étude complexe. De plus, ces tumeurs sont décrites comme pas ou peu immunogéniques, capacité à induire une réponse immunitaire, du fait de la très faible expression du complexe majeur d'histocompatibilité (MHC) de classe I (Overwijk and Restifo, 2000). Ainsi, il se pourrait que l'efficacité du traitement *in vivo* dépende de cette réponse immunitaire chez les souris immuno-compétentes et qu'elle ne soit donc pas suffisante pour induire une réponse au traitement.

Une étude comparative de l'effet du plasma en traitement direct et du milieu de culture activé par plasma (PAM), seul ou combiné avec l'administration d'un agent anti-cancéreux, la

cyclophosphamide, sur le mélanome B16-F10 sous-cutané a été publiée récemment (Saadati *et al.*, 2018). Les auteurs ont montré qu'une injection répétée tous les jours, pendant 25 jours, de très grand volume de PAM (400  $\mu$ L) entraîne une forte diminution dans la croissance des tumeurs. Néanmoins, le protocole expérimental suivi dans cette étude est difficilement transposable en clinique du fait du grand volume de PAM injecté quotidiennement (6 fois le volume de la tumeur). De plus, les modèles de tumeurs établies dans cette étude sont des tumeurs sous-cutané et non intradermique, qui ont une pousse plus lente et permettent donc d'effectuer des expérimentations plus prolongées. Une limite de ce modèle est qu'il ne constitue pas une greffe orthotopique comparé au modèle intradermique que nous avons utilisé. Il serait tout de même intéressant d'évaluer l'effets d'injections répétées de P-A PBS, seul ou combiné à l'EP, sur des tumeurs B16-F10 sous-cutanées.

Nous avons ensuite évalué l'effet du traitement par P-A PBS seul ou combiné à l'EP sur les tumeurs sous-cutanées HCT 116-GFP. Une première expérience nous a permis de montrer que l'injection de P-A PBS répétée toutes les semaines induit un retard de croissance des tumeurs et un meilleur taux de survie des animaux. Malheureusement une deuxième expérience avec plus d'animaux n'a pas permis de confirmer cet effet. En revanche, l'EP (1300 V/cm) ne semble pas avoir d'effet potentialisateur. D'autres paramètres d'EP pourraient être testés dans le but d'induire une potentialisation comme obtenu *in vitro*.

Enfin, l'effet d'injection répétées de P-A PBS dans le péritoine sur l'établissement et la progression de la carcinose péritonéale ovarienne humaine SKOV-3 GFP Luc chez des souris immunodéficientes a été étudié. Les résultats préliminaires ont montré que l'injection de P-A PBS répétées tous les 3-4 jours sur une période de 52 jours n'a pas eu d'effet sur la croissance tumorale. Les résultats présentés ici sont issus d'une seule expérience sur un nombre d'animaux restreint, ainsi d'autres expériences sont à réaliser afin de confirmer nos observations. L'injection intrapéritonéale de milieu de culture activé par plasma a été récemment proposé par Takeda et son équipe pour l'éradication de métastases péritonéales issues de carcinomes gastriques (Takeda *et al.*, 2017). Leur stratégie expérimentale repose sur l'injection de PAM 24, 48, 72 et 96 heures après l'injection des cellules, puis à nouveau entre le jour 8 et le jour 11 suivants. Ils ont montré une réduction de 60 % dans le nombre de nodules péritonéaux formés chez les souris traitées. Dans ces travaux, le traitement étant effectué avant même que les tumeurs s'établissent dans le péritoine, il est fort probable que l'adhésion des cellules au péritoine et donc la prise tumorale soient empêchées par le traitement du milieu de culture activé par plasma. La stratégie expérimentale mise en place par les auteurs reposerait donc plutôt sur

l'inhibition de l'implantation tumorale plutôt que sur l'inhibition de la croissance. Cette injection préventive pourrait avoir un intérêt lors de la chirurgie de cytoréduction péritonéale. En effet, de fortes récurrences des carcinomes ovariens péritonéaux ont été attribuées à la dissémination qui se produit au cours des opérations de chirurgie.

Leur stratégie diffère donc de celle que nous avons proposée puisque nous utilisons le P-A PBS sur des tumeurs qui ont déjà commencé à s'implanter, nous évaluons donc l'effet du traitement sur son développement. Toutefois, si nos résultats sont confirmés, il serait envisageable de combiner l'administration intrapéritonéale du P-A PBS avec de la chimiothérapie, dans le but de réduire les quantités de molécules à administrer. Cette stratégie pourrait être testée *in vitro* sur des sphéroïdes avant d'être transposée chez la souris.

Il est intéressant de relever que dans notre étude les cellules SKOV-3 GFP Luc sont apparues moins sensibles au traitement par P-A PBS *in vitro* sur sphéroïdes que les cellules HCT 116-GFP (**Résultats-Partie I- Article 2**). De la même façon, la différence de sensibilité vis-à-vis du PA PBS et du PA NaCl était moindre pour ces cellules SKOV-3 GFP Luc. Une hypothèse pour expliquer cette faible sensibilité vis-à-vis des liquides activés par plasma enrichis en RONS serait que ces cellules ont une sensibilité au stress oxydatif moins accrue. Le taux de RONS apporté par le P-A PBS et le P-A NaCl pourrait être situé en dessous du seuil de sensibilité et participer au maintien de l'homéostasie des cellules (cf. Introduction-Partie I-Figure 3 et Partie II-Figure 9).

*Dans cette partie III, nous avons évalué le potentiel anti tumoral du P-A PBS, seul ou combiné à l'EP, in vivo sur trois différents modèles de tumeurs. Aux vues des résultats non-reproductibles et hétérogènes obtenus, aucune conclusion quant à l'efficacité du traitement in vivo n'a pu être faite. En revanche, cette partie nous a permis de tester différentes modalités d'injection du P-A PBS : l'injection intra tumorale pour les tumeurs intradermiques et sous-cutanées, et l'injection intra péritonéale pour la carcinome ovarienne péritonéale, à travers l'utilisation des trois différents modèles de tumeurs et divers protocoles. De plus, ces expérimentations in vivo ont mis en évidence les limites de prédiction du modèle en trois dimensions utilisées dans la partie II. Bien que le traitement combiné ait montré une très bonne efficacité d'éradication des cellules au sein des sphéroïdes, la transposition du protocole in vivo n'a pas donné les mêmes résultats. Aussi, les expérimentations in vivo nécessitent des protocoles d'utilisation des liquides activés par plasma les plus normalisés possibles afin de palier à la variabilité interindividuelle.*



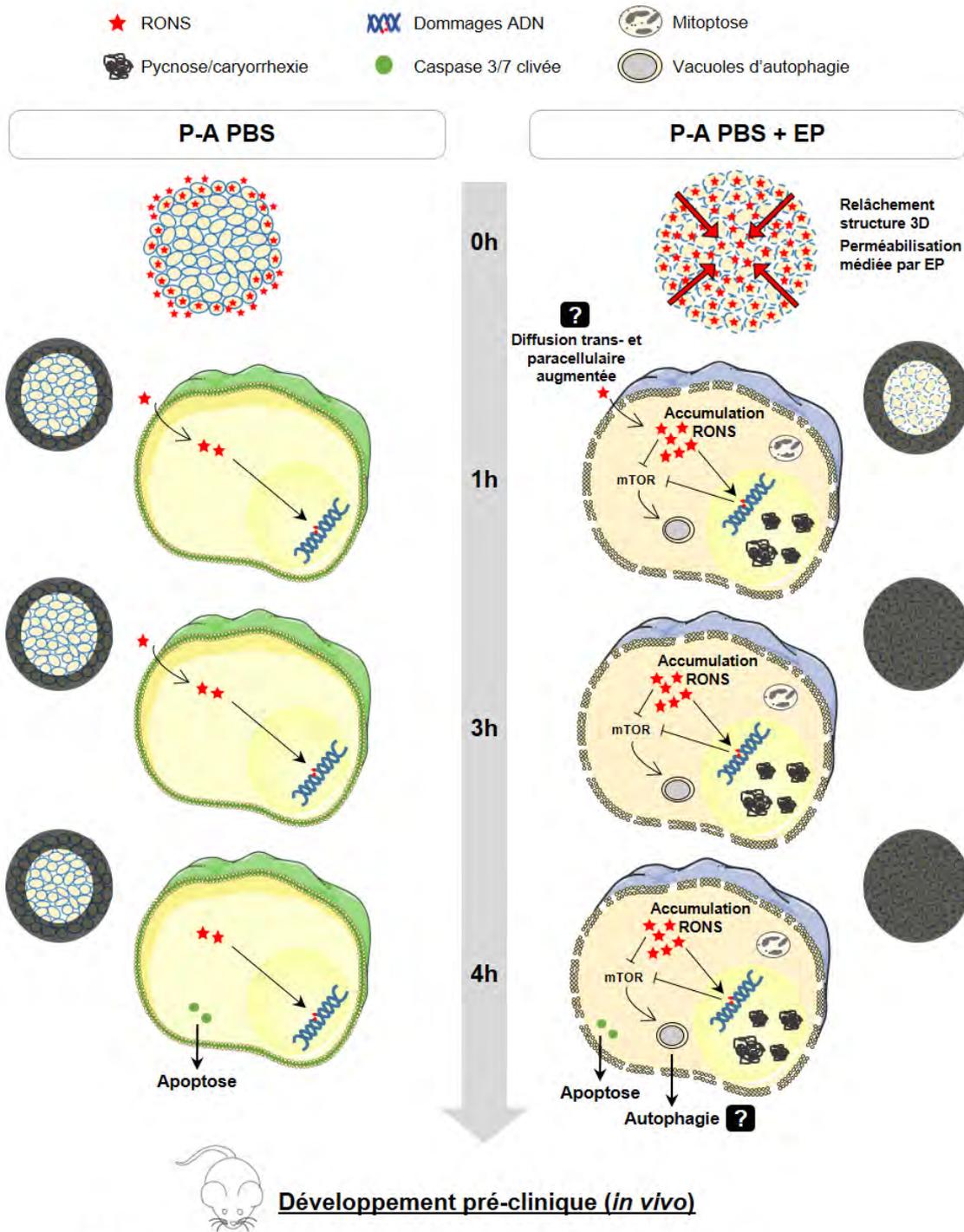
## CONCLUSION GÉNÉRALE ET PERSPECTIVES

Au cours de ces dernières décennies, l'arsenal des thérapies anticancéreuses basées sur des principes physiques a considérablement augmenté. Parmi ces nouvelles approches thérapeutiques, le plasma froid à pression atmosphérique a suscité l'intérêt de nombreuses recherches. Une nouvelle modalité d'utilisation du plasma a également été proposée pour l'éradication des cellules cancéreuses : l'utilisation de liquides activés par plasma (PAL), enrichis en espèces réactives de l'oxygène et de l'azote (RONS). Bien que l'efficacité des liquides activés par plasma envers les cellules cancéreuses ait été démontrée, de nombreuses questions demeurent quant aux mécanismes d'actions. C'est dans ce contexte que l'objectif de cette thèse était d'approfondir les connaissances sur ces mécanismes à l'échelle cellulaire et moléculaire. Afin de répondre à ces questions, des travaux *in vitro* ont été effectués sur un modèle en trois dimensions : le sphéroïde de lignées cellulaires cancéreuses, plus proche de l'architecture et de l'organisation tumorale et donc plus prédictif.

Parallèlement, l'électroporation ou électropériméabilisation (EP) est une technique physique maîtrisée pouvant induire des modifications transitoires des propriétés biologiques des cellules au niveau des lipides membranaires, des protéines membranaires et du cytosquelette. Ces altérations transitoires et locales peuvent être mises à profit pour potentialiser l'entrée et donc l'efficacité de substances actives contre les cellules cancéreuses. C'est dans ce contexte que nous avons proposé d'utiliser l'EP comme une modalité de traitement physique pour potentialiser les effets anti-cancéreux des PAL. L'hypothèse de travail que nous avons posé repose sur deux phénomènes cellulaires : l'augmentation de la délivrance des PAL aux tumeurs et la déstabilisation du tissu tumoral. Les effets du traitement combiné par PBS activé par plasma (P-A PBS) et EP ont été évalués dans deux parties de la thèse : une partie *in vitro* sur sphéroïde, et une autre partie *in vivo* sur différents modèles de tumeurs.

Les différents travaux effectués au cours de cette thèse ont permis d'approfondir nos connaissances sur les mécanismes d'action des liquides activés par plasma froid et de montrer qu'en combinaison avec l'électroporation d'autres morts cellulaires pouvaient être ciblées comme l'autophagie. Un schéma bilan des principaux résultats des travaux de thèse, des hypothèses sur les mécanismes d'action du double traitement ainsi que les perspectives est présenté ci-après (**Figure 61**).

## Sphéroïde de cellules cancéreuses (*in vitro*)



- ?** **Protocole**
- Multiplicité des injections
- Administration P-A PBS
- Paramètres d'EP

- ?** **Mécanismes d'action**
- Spécificité cellulaire
- Réponse immunitaire
- Déstructuration du tissu tumoral

**Figure 61 : Schéma bilan représentant les hypothèses des mécanismes moléculaires et cellulaires induits par le traitement combiné par champs électriques pulsés (EP) et PBS activé par plasma (P-A PBS).** Les cellules au sein du modèle 3D concernées par les mécanismes cellulaires décrit sont représentées sur les sphéroïdes miniatures avec un cercle gris. RONS : espèces réactives de l'oxygène et de l'azote, ? perspectives et hypothèses à valider.

La première partie de la thèse a permis d'élucider les mécanismes cellulaires engendrés par le traitement par liquides activés par plasma et de comparer l'efficacité de deux différentes solutions salines activées par plasma, le PBS et le NaCl (plus adaptées que les milieux de culture pour la transposition en clinique).

Il a été mis en évidence que le traitement par DMEM activé par plasma de sphéroïdes de cellules HCT 116-WT induit une mort par apoptose des cellules des couches externes. Cette mort par apoptose est précédée d'une forte déplétion en ATP intracellulaire des cellules conduisant à un stress oxydatif mitochondrial. Le potentiel anti-cancéreux du PBS et du NaCl, exposés au jet de plasma froid, a ensuite été évalué en termes d'inhibition de croissance tumorale et de cinétique de mort cellulaire sur les sphéroïdes de deux lignées cellulaires : HCT 116-GFP et SKOV-3-GFP-Luc. Nous avons montré que le PBS et le NaCl activés par plasma tuent efficacement les cellules présentes sur les couches externes du sphéroïde. De plus, le PBS activé par plasma présente une efficacité plus accrue que le NaCl activé par plasma. Ceci a été expliqué par une plus grande quantité de RONS (peroxyde d'hydrogène, nitrite et nitrate) générées dans le PBS suite à l'exposition au plasma. Aussi, nous avons montré que les RONS présents dans ces liquides sont responsables de leurs cytotoxicités et génotoxicités envers les cellules cancéreuses *in vitro*.

Pour une meilleure compréhension des différences observées entre le PBS et le NaCl, il serait intéressant de regarder si d'autres RONS à longue durée de vie sont impliquées dans la toxicité de ces liquides. De même, l'éventuelle génération de sous-produits chimiques qui pourrait intervenir après avoir mis en contact les liquides avec les cellules pourrait être évalué. L'impact de l'acidification du NaCl après son exposition au jet de plasma froid sur la génération de ces sous-produits ainsi que sur la réponse cellulaire reste également à étudier à ce jour.

Dans la seconde partie de la thèse, nous avons proposé d'utiliser l'électroperméabilisation pour potentialiser les effets des liquides activés par plasma froid au sein des sphéroïdes. Bien que le caractère universel du traitement ait été étudié par l'utilisation de différentes lignées cancéreuses, les mécanismes cellulaires ont été élucidés sur le modèle de sphéroïde de cellules HCT 116-GFP. Les effets du traitement combiné en comparaison avec des traitements simples (EP seul ou P-A PBS seul) ont été évalués à diverses échelles : tissulaire (morphologie des sphéroïdes), cellulaires et moléculaires. Un seul traitement par EP, en combinaison avec le P-A PBS, a suffi pour induire des dommages irréversibles à l'intégralité du sphéroïde. En effet, des dommages à l'ADN ainsi que de l'apoptose cellulaire ont été mis en évidence sur toutes les cellules du sphéroïde après 3 heures de traitement. Aussi, l'application des champs électriques pulsés induit une accélération de la cinétique des événements cellulaires qui régissent la mort des cellules. L'observation de l'ultrastructure des organelles cellulaires par microscopie électronique à transmission a permis de renforcer l'hypothèse de cette cinétique accélérée puisque seulement 1 heure après traitement, les cellules des sphéroïdes doublement traités présentent des structures cellulaires types de l'apoptose : pycnose et caryorrhexie de l'ADN, rupture des crêtes internes des mitochondries caractéristiques de la mitoptose. L'analyse de l'ultrastructure par microscopie électronique à transmission a également permis d'émettre des hypothèses quant à la mort cellulaire associée au double traitement. En effet, des autophagosomes ont été observés en très grande quantité dans les cellules des sphéroïdes doublement traités. L'analyse de l'expression de marqueurs de l'autophagie par Western Blot a montré qu'une activation du flux autophagique est engendrée à la suite du double traitement. Ces résultats préliminaires suggèrent l'hypothèse que l'EP pourrait favoriser l'accumulation dans la cellule des RONS contenus dans le P-A PBS engendrant ainsi un fort stress oxydatif impliqué dans l'initiation de l'autophagie.

Nous avons donc montré *in vitro* que l'EP peut être utilisée pour potentialiser l'effet de liquides activés par plasma sur un modèle en trois dimensions de microtumeur. Néanmoins, certaines questions demeurent concernant les mécanismes d'action de la potentialisation du P-A PBS par l'EP. En effet, nous avons proposé que la potentialisation par l'EP des effets cytotoxiques et génotoxiques du PBS activé par plasma repose sur une diffusion augmentée et une meilleure pénétration des RONS, para- et transcellulaire. Il serait intéressant d'évaluer cette pénétration en temps réel à l'aide de sonde fluorescente au sein des sphéroïdes dans le but de valider cette hypothèse. De plus, il est probable que la présence de RONS en solution pendant l'EP favorise

et stabilise la formation de pores membranaires. Cette hypothèse pourrait être confirmée au moyen de simulations numériques.

Parallèlement, une meilleure compréhension des mécanismes cellulaires mis en jeu au cours de la réponse au traitement combiné reste encore à élucider. En effet, d'autres expériences devront être réalisées dans le but de valider l'induction de l'autophagie en réponse au double traitement. Les comparaisons en WB n'ont été faites qu'entre les sphéroïdes non traités et les sphéroïdes doublement traités. Il serait donc intéressant de voir si l'autophagie est également induite par traitement P-A PBS seul, ou si cette voie de mort cellulaire est spécifique du double traitement. Si c'est le cas, il ne s'agit donc pas juste d'une augmentation de la toxicité permise par l'EP mais d'une réponse cellulaire induite différente.

De même, l'hypothèse proposée reposant sur une déstructuration de l'architecture 3D du sphéroïde par l'EP facilitant à la fois la diffusion des RONS mais également la fragilisation du sphéroïde reste également à valider par d'autres immunofluorescences (avec de l'imagerie confocale plus résolutive, ou microscopie à feuille de lumière sur sphéroïde entier).

Pour une future transposition en clinique, la sensibilité des cellules saines vis-à-vis du double traitement par P-A PBS et EP reste également à élucider à ce jour. En effet, la sensibilité accrue des cellules cancéreuses est possiblement due à leur taux de RONS basal plus élevé que les cellules saines. Ainsi, il est pertinent de se poser la question de l'influence et de l'implication d'un environnement cellulaire plus ou moins enrichi en RONS sur la réponse au traitement et l'induction des mécanismes cellulaires discutés précédemment.

Dans la continuité des travaux réalisés *in vitro* sur sphéroïdes, nous avons évalué l'efficacité du traitement par P-A PBS seul ou combiné à l'EP sur différents modèles de tumeurs chez des souris immuno-compétentes ou déficientes : greffe intradermique de cellules de mélanome murin B16-F10-tdTomato dans des souris C57Bl/6 ; greffe sous-cutanée de cellules HCT 116-GFP et greffe intrapéritonéale de cellules SKOV-3-GFP-Luc dans des souris nues.

Pour le traitement du mélanome B16-F10-tdTomato, des variabilités intra- et inter-expériences ont été obtenues, avec aucun effet du traitement sur le pool des expériences. L'utilisation d'un modèle de tumeur murine tel que le mélanome B16-F10-tdTomato permet d'accéder à un niveau de complexité supérieur par rapport aux autres modèles qui ne sont pas syngéniques. En effet, l'implication du système immunitaire dans la réponse au traitement peut être étudiée sur ce modèle. Il serait donc intéressant d'effectuer d'autres expériences sur ce modèle de tumeur, éventuellement en greffe sous-cutanée afin de voir s'il existe des différences avec le modèle intradermique et dans le cas où le traitement fonctionnerait, d'évaluer l'implication du système immunitaire.

Pour les tumeurs HCT 116-GFP sous-cutanées, une première expérience nous a permis de montrer que l'injection de P-A PBS répétée toutes les semaines induit un retard de croissance des tumeurs et un meilleur taux de survie des animaux. L'application de l'EP après l'injection de P-A PBS n'a pas potentialisé l'effet du P-A PBS. Malheureusement une deuxième expérience avec plus d'animaux n'a pas permis de confirmer cet effet. Enfin, l'injection répétée de P-A PBS dans le péritoine de souris ayant subi une greffe de cellules SKOV-3-GFP-Luc n'a eu aucun effet sur l'établissement et la progression de la carcinose péritonéale ovarienne humaine. Nous avons mis en évidence *in vitro* sur sphéroïdes que les RONS présentes dans le P-A PBS sont responsables des dommages causés aux cellules SKOV-3-GFP-Luc et HCT 116-GFP. Le traitement des tumeurs par une solution contenant les RONS présentes dans le P-A PBS pourraient être réalisé *in vivo* dans le but d'évaluer l'implication de ces RONS dans la réponse tumorale *in vivo*.

Pour les tumeurs intradermique et sous-cutanée, B16-F10-tdTomato et HCT 116-GFP, nous avons fait le choix d'utiliser les paramètres d'EP utilisés en ECT afin d'induire une meilleure délivrance du P-A PBS dans la tumeur. Néanmoins, dans le but de transposer la stratégie expérimentale développée *in vitro* sur les sphéroïdes, il serait intéressant d'optimiser ces paramètres afin de déstabiliser l'édifice tumoral.

Bien que les résultats obtenus ne nous aient pas permis de conclure quant à l'efficacité du traitement par P-A PBS seul (SKOV-3-GFP-Luc) ou combiné à l'EP (HCT 116-GFP et B16-F10-tdTomato), les expérimentations animales entreprises au cours de la thèse ont permis de tester différents protocoles d'injection du P-A PBS : seul ou combiné à l'EP, en unique injection ou en multiples injections ; injecté directement dans la tumeur ou dans le péritoine des souris. De plus, ces expérimentations *in vivo* ont mis en évidence les limites de prédiction du modèle en trois dimensions. Bien que le traitement combiné ait montré une très bonne efficacité d'éradication des cellules au sein des sphéroïdes, la transposition du protocole *in vivo* n'a pas donné les mêmes résultats. Aussi, les expérimentations *in vivo* nécessitent des protocoles d'utilisation des liquides activés par plasma adaptés et les plus normalisés possibles afin de palier à la variabilité inter-individuelle.



# MATÉRIELS ET MÉTHODES

---

## 1. Lignées et cultures cellulaires

Les lignées de cellules d'adénocarcinome colorectal humain HCT 116 sauvage (WT) (ATCC<sup>®</sup> CCL-247<sup>TM</sup>) et HCT 116 GFP transduite exprimant la protéine fluorescente verte (GFP) (Pelofy *et al.*, 2012), de mélanome murin B16-F10 (ATCC<sup>®</sup> CRL-6475<sup>TM</sup>) transduite exprimant la protéine fluorescente rouge (tdTomato) et de carcinome squameux du pharynx humain FaDu (ATCC<sup>®</sup> HTB-43<sup>TM</sup>) sont cultivées dans du Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) à 4,5g/L de D-Glucose, L-Glutamine, contenant du pyruvate (Gibco-Invitrogen, France), supplémenté de 10% de sérum de veau fœtal (SVF) (Sigma Aldrich, États-Unis) et 1% de pénicilline/streptomycine (P/S) (Sigma Aldrich, États-Unis). La lignée de cellules d'adénocarcinome ovarien humain SKOV-3 (ATCC<sup>®</sup> HTB-77<sup>TM</sup>) doublement transduite pour exprimer la GFP et la luciférase (Luc) (Coustets *et al.*, 2020) est cultivée dans du Roswell Park Memorial Institute medium (RPMI) 1640 (Eurobio, France) supplémenté de 10% de SVF, 1% de P/S, 2mM de L-Glutamine (Eurobio, France), 10 µg/mL d'insuline humaine (Sigma Aldrich, États-Unis) et 20 ng/mL de facteur de croissance épidermique humain (Sigma Aldrich, États-Unis). Toutes les cellules sont cultivées dans des flasques en monocouche à 37°C dans une atmosphère humidifiée à 5% de CO<sub>2</sub>.

## 2. Obtention et culture des sphéroïdes

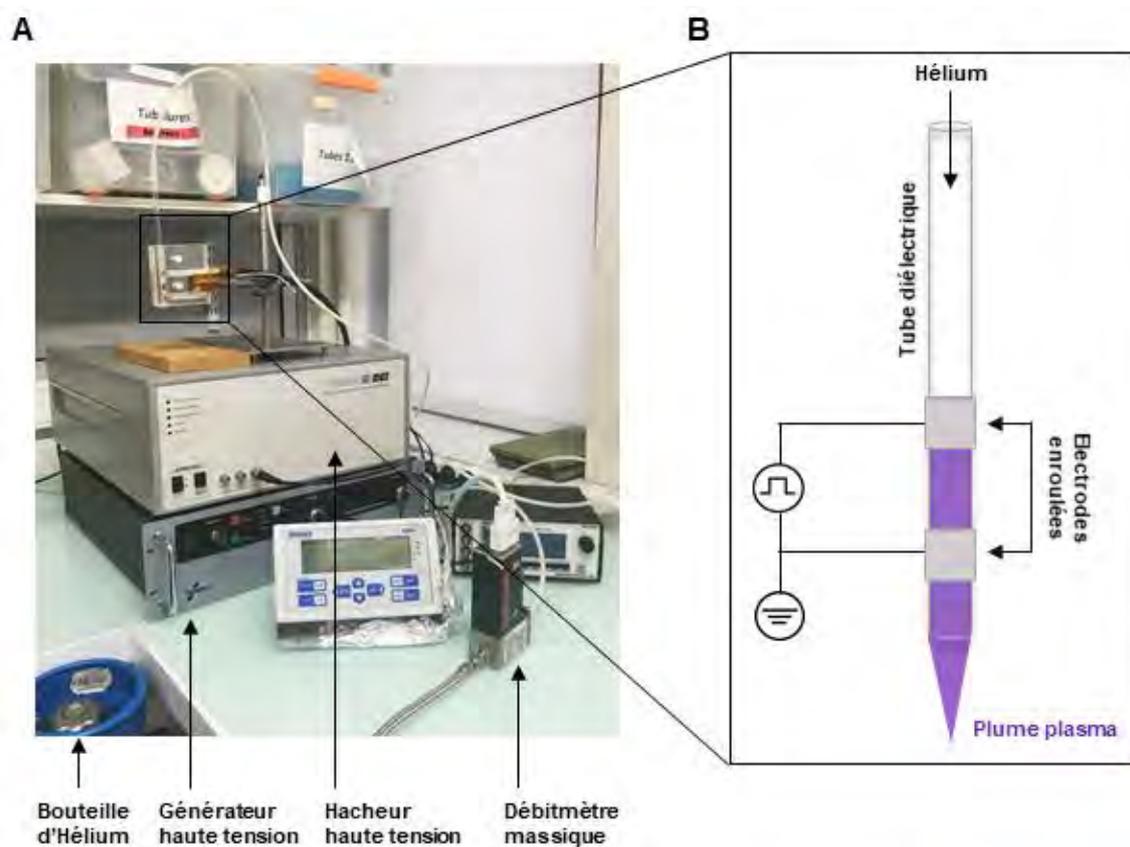
Les sphéroïdes sont produits dans des plaques 96 puits Costar<sup>®</sup> Corning<sup>®</sup> *Ultra low attachment* à fonds ronds non-adhérentes (Sigma Aldrich, États-Unis) (Gibot and Rols, 2013). Les cellules sontensemencées dans 200 µL de leur milieu de culture respectif à différentes densités : 500 pour les cellules HCT 116-WT et GFP, 3000 pour les cellules B16-F10-tdTomato et 5000 cellules par puits pour les cellules FaDu et SKOV-3 GFP Luc. Les sphéroïdes sont maintenus en culture en atmosphère humidifiée à 37°C et 5% CO<sub>2</sub>. L'agrégation des cellules survient dans les premières 24 heures suivant l'ensemencement.

## 3. Plasma froid à pression atmosphérique

### **a. Dispositif plasma à basse température et à pression atmosphérique**

Le jet de plasma froid à pression atmosphérique est généré au moyen de l'ionisation partielle d'un gaz par apport d'énergie électrique. Deux électrodes d'aluminium de 20 mm de largeur

sont enroulées à une distance de 10 mm l'une de l'autre autour d'un tube diélectrique en quartz de 4 et 6 mm de diamètre, intérieur et extérieur, respectivement. Les deux électrodes sont séparées par du kapton (film de poly imide), celle du haut est reliée à la haute tension, celle du bas est mise à la masse. Un flux d'hélium (4.5) passe à travers le tube de quartz à un débit de 3 L/min contrôlé par un débitmètre massique (Brooks model SLA5850S1AAB1C2A1). Le jet de plasma est obtenu par application de tension impulsionnelle délivrée par un générateur haute tension (Technix HV SR10-R-300) associé à un hacheur haute tension (série DEI PVX-4150). Les paramètres électriques utilisés pour le jet de plasma dans les expérimentations sont : durée de l'impulsion carrée  $1\mu\text{s}$  à une tension maximale de 10 kV et une fréquence de 10 kHz. Une photographie ainsi qu'un schéma du dispositif sont montrés en **Figure 62**.

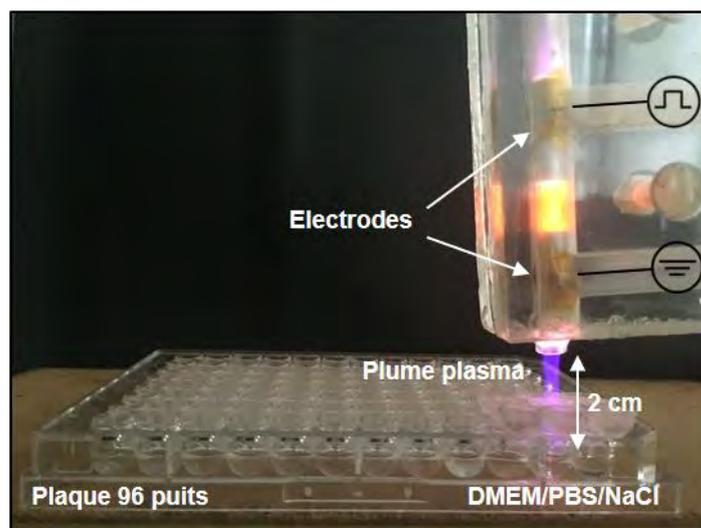


**Figure 62 : Photographie (A) et schéma (B) du dispositif jet de plasma mis en place au laboratoire.**

### **b. Activation des liquides par exposition au jet de plasma**

Le dispositif décrit ci-dessus a été utilisé pour l'exposition de DMEM sans pyruvate (Thermofisher Scientific, France), de tampon phosphate salin (PBS, sans calcium, sans magnésium, Eurobio, France) et de chlorure de sodium à 0,9 % (NaCl 0,9 %, Lavoisier, France). Dans une plaque de 96 puits à fonds ronds, 100  $\mu\text{L}$  de solution à activer sont placés dans chaque

puits avant d'être exposés au jet de plasma (60 ou 120 secondes) à une distance fixe de 2 cm de la sortie du tube diélectrique (**Figure 63**). Après une exposition de 120 secondes, une évaporation d'environ 20% de la solution est observée. Ceci est dû au flux d'hélium et à l'incrément de chaleur généré par le jet de plasma (la plume plasma peut atteindre une température de 50°C). Le volume restant de 80  $\mu\text{L}$  est donc utilisé pour le traitement des sphéroïdes (**section 7 du matériel et méthode**).



**Figure 63 : Photographie du dispositif d'activation des liquides par le jet de plasma froid.**

#### 4. Mesure de l'osmolarité et du pH

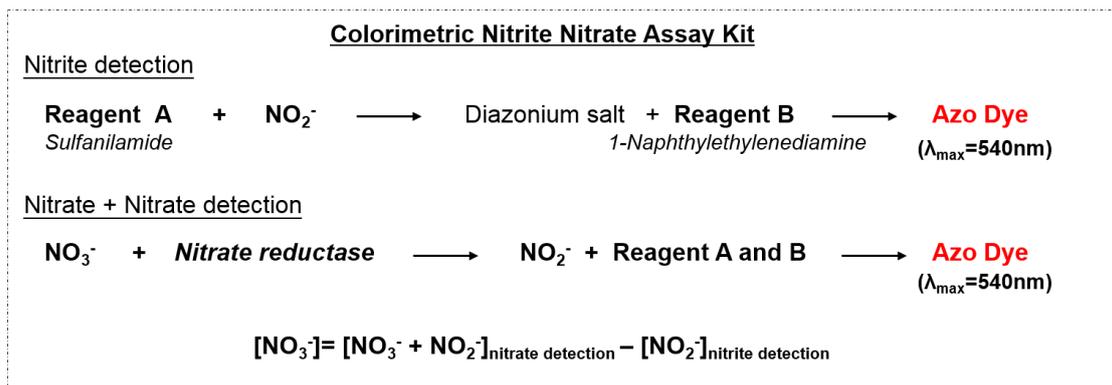
L'osmolarité des solutions est mesurée directement après l'exposition au jet de plasma au moyen d'un osmomètre cryoscopique dans 50  $\mu\text{L}$  de solution (OSMOMAT 030, Gonotec, Allemagne).

Le pH des solutions est mesuré 24 heures après l'exposition au plasma, les solutions sont conservées à 4°C. Les mesures de pH sont effectuées avec la sonde pH inLab micro Pro-ISM™ (Mettler Toledo, États-Unis) dans 2 mL de solution.

#### 5. Dosage des espèces réactives de l'oxygène et de l'azote

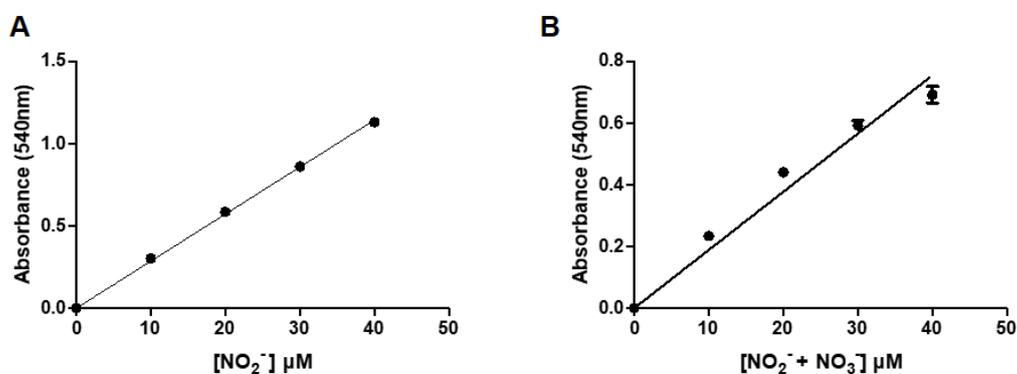
##### a. Nitrite/nitrate

La détection des ions nitrite et nitrate repose sur l'utilisation du réactif de Griess (mécanisme détaillé en **figure 64**) à l'aide d'un kit de détection par colorimétrie (colorimetric nitrite nitrate assay kit, Sigma Aldrich, États-Unis).



**Figure 64 : Principe de la détection des ions nitrite et nitrate par colorimétrie.**

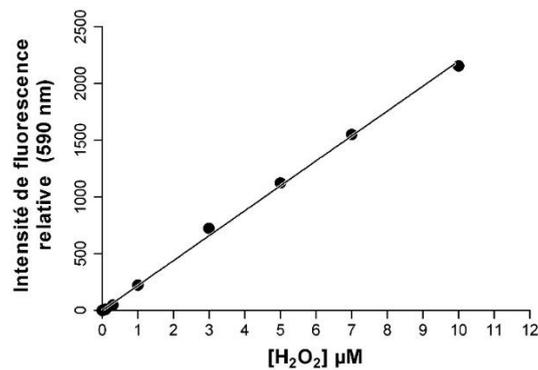
Les mesures sont effectuées dans les solutions directement après leur exposition au plasma. Les solutions sont diluées au 1:20<sup>ème</sup> afin de rester dans la zone linéaire de la courbe d'étalonnage (entre 0 et 40  $\mu\text{M}$ ). Des solutions-mères de  $\text{NaNO}_2$  et  $\text{NaNO}_3$  à 100  $\mu\text{M}$  (fournies dans le kit) sont utilisées pour réaliser les courbes d'étalonnage (**Figure 65**). Le dosage des nitrites et des nitrates se fait en deux étapes. La détection des nitrites se fait par ajout successif de 50  $\mu\text{L}$  de réactif de Griess A et de réactif de Griess B aux solutions à doser (blanc, standard, échantillons). La plaque est mise à incuber 5 minutes à température ambiante. La détection des nitrites et nitrates confondus se fait par ajout de 10  $\mu\text{L}$  de nitrate réductase et 10  $\mu\text{L}$  de cofacteurs d'enzyme. La plaque est ensuite incubée à température ambiante pendant 2 heures. Une fois les incubations terminées, l'absorbance à 540 nm est mesurée au spectrofluorimètre CLARIOstar (BMG LABTECH, France). La concentration en nitrite sera directement calculé à partir de la courbe d'étalonnage de la détection de  $\text{NO}_2^-$  (**Figure 65.A**). La concentration en nitrite + nitrate sera donnée par la courbe standard de la détection de  $\text{NO}_2^- + \text{NO}_3^-$  (**Figure 65.B**). La concentration en nitrate est obtenue avec le calcul suivant :  $[\text{Nitrate}] = [\text{Nitrite} + \text{Nitrate}] - [\text{Nitrite}]$ .



**Figure 65 : Courbes d'étalonnage pour le dosage des ions nitrite et des ions nitrate dans les solutions.** Les courbes sont obtenues en utilisant des solutions de  $\text{NaNO}_2$  et  $\text{NaNO}_3$  à différentes concentrations par la lecture de l'absorbance à 540 nm en triplicata. (A) Courbe d'étalonnage de la détection de  $\text{NO}_2^-$ . (B) Courbe d'étalonnage de la détection de  $\text{NO}_2^- + \text{NO}_3^-$ .

## b. Peroxyde d'hydrogène

Un kit de détection par fluorimétrie est utilisé pour le dosage du peroxyde d'hydrogène (Fluorimetric Hydrogen Peroxide Assay Kit, Sigma Aldrich, États-Unis). La réduction du peroxyde d'hydrogène par la peroxydase en eau s'accompagne de la production d'un composé fluorescent ( $\lambda_{\text{excitation}} = 540 \text{ nm}$ ,  $\lambda_{\text{émission}} = 590 \text{ nm}$ ). Les dosages sont effectués dans les solutions directement après l'exposition au plasma. Les solutions sont diluées au 1:4 afin de rester dans la zone linéaire de la courbe d'étalonnage (entre 0 et 10  $\mu\text{M}$ ). Une courbe d'étalonnage est réalisée en utilisant une solution de peroxyde d'hydrogène à 3% fournie dans le kit (**Figure 66**). 50  $\mu\text{L}$  de mélange réactionnel (contenant le substrat de la peroxydase et la peroxydase) sont ajoutés à chaque puits contenant 50  $\mu\text{L}$  des solutions à doser (blanc, standard, échantillons). Après homogénéisation, la plaque est incubée 30 minutes à température ambiante, sans lumière. Après incubation, l'intensité de fluorescence à 590 nm est mesurée au spectrofluorimètre CLARIOstar (BMG LABTECH, France).



**Figure 66 : Courbes d'étalonnage pour le dosage du peroxyde d'hydrogène dans les solutions.** Les points de la courbe sont obtenus en utilisant une solution standard de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> par la lecture de la fluorescence à 590 nm à différentes concentrations en triplicata.

## 6. Dispositif d'électroperméabilisation (EP)

Le générateur haute tension (jusqu'à 2 kV) ELECTROCELL S20 (βtech, France) (**Figure 67.A**) est utilisé *in vitro* et *in vivo* pour l'EP réversible des sphéroïdes et des tumeurs. Les électrodes utilisées pour les expérimentations *in vitro* et l'expérimentation animale sont en acier inoxydable planes et parallèles de 4 mm et 5 mm de distance inter-électrodes, respectivement. Le générateur génère des impulsions unipolaires en vague carrée (ce profil peut être contrôlé via l'oscilloscope du générateur, **figure 67.B**). La tension U appliquée aux bornes des électrodes génère un champ électrique d'intensité E (V/cm) où  $E = U / d$  (distance inter-électrodes). Le courant maximal délivré par le générateur est de 8 A. Les paramètres électriques (nombre, durée

et fréquence des impulsions) des protocoles d'électrochimiothérapie sont utilisés : 8 impulsions de 100  $\mu$ s avec une fréquence de répétition de 1 Hz (période de 1000 ms).

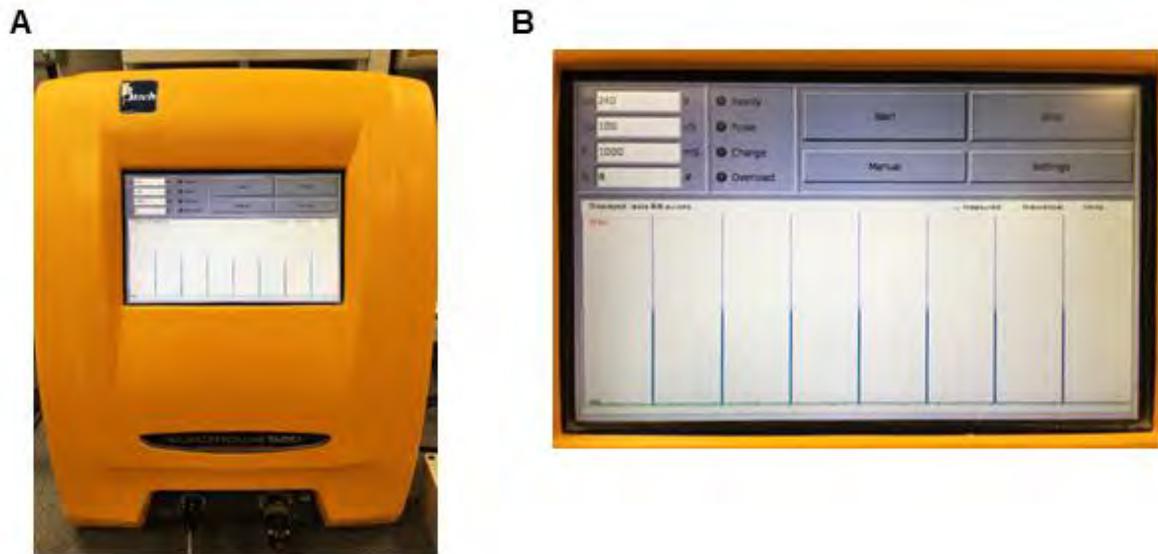


Figure 67 : Photographie du générateur ELECTROCELL S20  $\beta$ tech (A) avec le profil des impulsions unipolaires en vague carrée (B).

## 7. Traitement des sphéroïdes

Les sphéroïdes sont traités 5 jours après leur ensemencement. Les tailles de sphéroïdes obtenues après 5 jours de culture sont dépendantes des lignées cellulaires utilisées : les sphéroïdes de cellules HCT 116-WT et GFP ainsi que les FaDu présentent un diamètre compris entre 400 et 500  $\mu$ m, les sphéroïdes de cellules SKOV-3 GFP Luc sont plus petits (~350  $\mu$ m) tandis que les cellules B16-F10-tdTomato tendent à former des agrégats cellulaires peu réguliers et peu compacts.

### **a. Par liquides activés par plasma**

Le milieu de culture est retiré et les sphéroïdes sont rincés directement dans les puits à deux reprises par l'ajout de 200  $\mu$ L de PBS (sans calcium, sans magnésium). Le PBS est ensuite retiré puis les sphéroïdes sont mis en contact avec les liquides activés par plasma (80  $\mu$ L / puits). Les sphéroïdes contrôles PBS sont mis en incubation avec le même volume de liquide non exposé au jet de plasma. La plaque est ensuite placée à l'incubateur pendant 4 heures (dans le cas d'un traitement complet, pour certains protocoles les sphéroïdes sont prélevés après 1, 2 ou 3 heures d'incubation seulement). Dans le cas des traitements successifs, le même protocole est répété tous les 3 jours.

### b. Par solutions enrichies en RONS

Une solution de peroxyde d'hydrogène à 30 % dans l'eau (Sigma Aldrich, États-Unis), et des poudres de nitrate et nitrite de sodium (Fisher Scientific, France) sont utilisées pour obtenir des solutions de PBS et de NaCl enrichies en RONS. Le même protocole que décrit en **section 7.a** est suivi pour le traitement des sphéroïdes avec ces solutions.

### c. Par électroperméabilisation

Les électrodes sont maintenues à l'aide d'une potence et sont mises en contact avec une boîte de pétri (**Figure 68**). Une goutte de 100  $\mu$ L de solution d'EP iso-osmotique : soit du tampon phosphate de conductivité 1,3 mS/cm (8,1mM de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 1mM de  $\text{MgCl}_2$  et de 250mM de saccharose), soit du PBS sans calcium/magnésium ou soit du PBS activé par plasma, est déposée entre les électrodes. Les sphéroïdes d'une même condition sont rassemblés dans un seul et même puits de la plaque de culture avant d'être soumis à l'EP en même temps (6 à 10 sphéroïdes). Les sphéroïdes sont récupérés à l'aide de cônes à bouts larges, dans le but d'éviter tout stress physique, et déposés par gravité dans le liquide inter-électrodes (**Figure 68**). Dans le cas du double traitement (P-A PBS + EP), les sphéroïdes sont d'abord soumis à l'EP entre les électrodes dans une goutte de PBS activé par plasma puis sont mis à incuber individuellement dans le PBS activé par plasma tel que décrit précédemment (**section 7.a**).

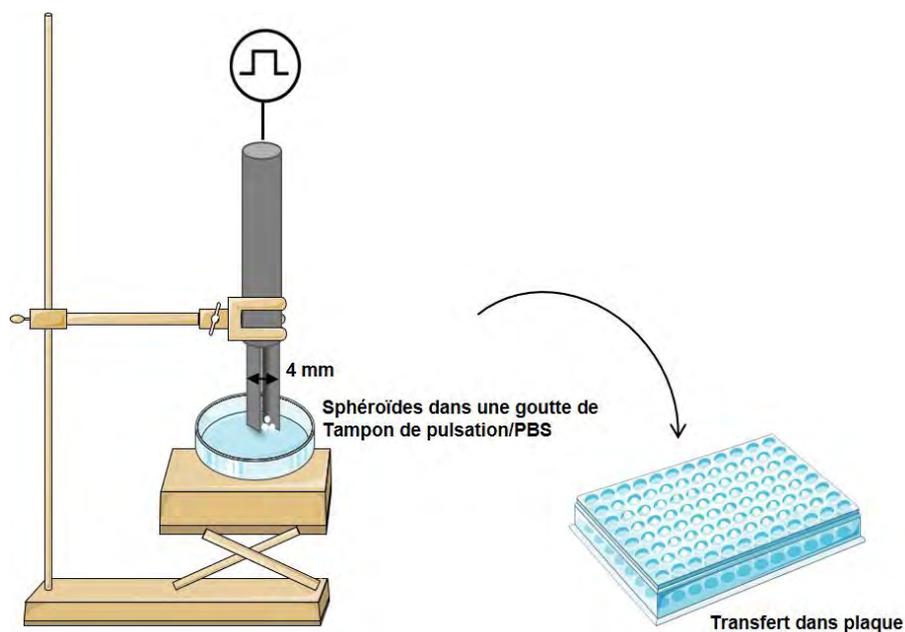


Figure 68 : Schéma du dispositif pour l'électroperméabilisation des sphéroïdes.

## 8. Suivi de croissance des sphéroïdes

Après la durée du traitement des sphéroïdes (4 heures), ces derniers sont rincés à deux reprises avec 100  $\mu$ L de PBS (sans calcium, sans magnésium) puis remis en culture dans du milieu DMEM complet sans pyruvate (ThermoFisher Scientific, France) ou du RPMI complet (dépendant des lignées cellulaires, cf **section 1. Lignées et cultures cellulaires**). La plaque est ensuite placée dans un microscope optique à fluorescence champs large automatisé, IncuCyte Live Cell Analysis System Microscope (Essen BioScience IncuCyte™, Royaume-Uni). Ce microscope acquiert une image de chaque puits toutes les heures, sur différents canaux (lumière blanche et fluorescence verte) au grossissement x10.

## 9. Efficacité de l'électroporéabilisation des sphéroïdes

Le protocole d'électroporéabilisation est suivi comme décrit précédemment (**section 7.c**). L'iodure de propidium (PI), intercalant de l'ADN non perméant qui marque les cellules dont l'intégrité membranaire est affectée, est ajouté à une concentration de 100  $\mu$ M à la solution d'électroporéabilisation. Ici, le PI est donc utilisé pour mettre en évidence la perméabilisation transitoire qui se met en place directement après l'EP. Les sphéroïdes sont ensuite rincés dans un grand volume de PBS (1 mL) puis transférés individuellement dans des puits contenant 100  $\mu$ L de PBS pour l'observation au microscope optique inversé à champs large (DMIRB, Leica Microsystems SA, France) équipé d'une caméra CoolSnapFx HQ2 (Roper Scientific, Photometrics, États-Unis). La fluorescence émise par le PI est visible avec le filtre mCherry (bande passante filtre d'excitation, BP : 560/40nm, filtre d'émission, BP : 630/75 nm). Les images acquises sont traitées via le logiciel Image J afin d'obtenir des valeurs d'intensités de fluorescence intégrées.

## 10. Suivi de la mort cellulaire en temps réel

Le PI est également utilisé afin d'évaluer la mortalité des cellules à long terme, il ne s'agit plus de perméabilisation réversible mais de perte d'intégrité membranaire due à la mort des cellules. Ici, 1  $\mu$ M de PI est ajouté au PBS (témoin), ou au P-A PBS (groupe traité  $\pm$  EP), 10 minutes après l'EP pour que les cellules vivantes aient le temps de redevenir imperméables et ne soient donc pas marquées. Le PI est maintenu pendant 4 heures d'incubation avec les sphéroïdes. Les sphéroïdes sont ensuite rincés au PBS et placés dans du milieu de culture frais contenant également 1  $\mu$ M de PI. La pénétration du PI en temps réel dans les cellules mortes est suivie

durant 3 jours après traitement avec le microscope optique à fluorescence à champs large automatisé, IncuCyte Live Cell Analysis System Microscope (Essen BioScience IncuCyte™, Royaume-Uni). Ce microscope acquiert une image de chaque puits toutes les heures, sur différents canaux (lumière blanche, fluorescences verte et rouge) au grossissement x10.

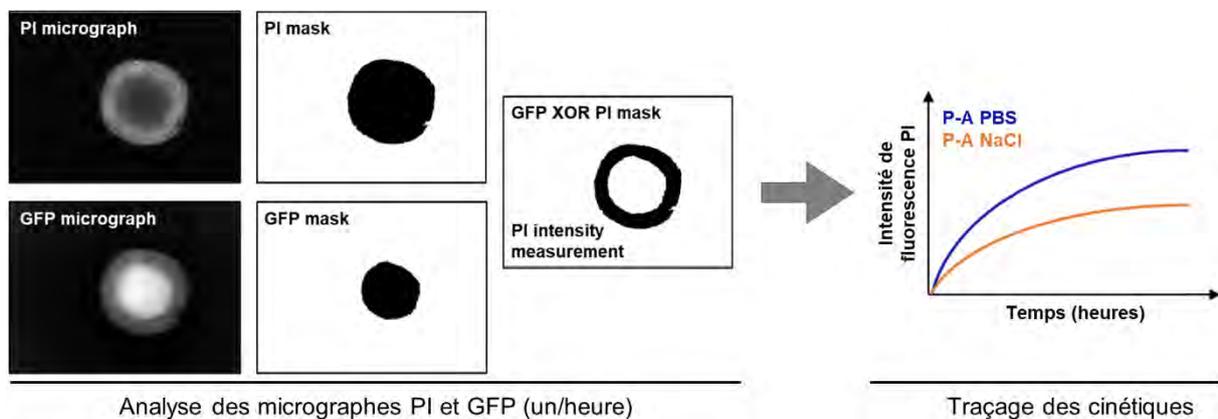
## 11. Analyse des images de microscopie

### a. Croissance des sphéroïdes

La croissance des sphéroïdes est suivie durant 7 jours après traitement au microscope en lumière blanche ou en fluorescence (expériences et lignées dépendance). Les micrographes sont exportés du logiciel de l'IncuCyte (un par jour) et analysés sous Image J. L'aire des sphéroïdes est mesurée en définissant une aire sur les images en lumière blanche pour les cellules n'exprimant pas de protéines fluorescentes (HCT 116-WT et FaDu) ou en appliquant un seuil de fluorescence (HCT 116-GFP, SKOV-3 GFP Luc). L'aire est tracée en fonction du temps.

### b. Cinétique de pénétration du PI

La procédure d'analyse des images pour l'obtention des cinétiques de pénétration du PI est détaillée sur la **figure 69**.



**Figure 69 : Procédure d'analyse des micrographes pour l'obtention des cinétiques de pénétration du PI.**

Les micrographes de fluorescence GFP (vert) et PI (rouge) sont exportés du logiciel de l'IncuCyte (un par heure) et analysés sous Image J. Le système de microscopie utilisé étant un microscope à champ large, le signal de fluorescence PI des plans hors focus sont collectés. Ce signal récupéré sur les micrographes, induit un effet de flou au centre du sphéroïde (conséquence d'une profondeur de champ de l'objectif x10 plus grande que le diamètre de

l'objet). Dans le but de s'affranchir de cette fluorescence hors focus, un seuil est appliqué sur les micrographes GFP permettant d'obtenir un masque délimitant l'aire du sphéroïde encore viable (cellules GFP positives). L'aire de ce sphéroïde GFP positif (**Figure 69, GFP mask**) est ensuite supprimée des micrographes PI (**Figure 69, PI mask**) afin de ne garder que la couronne PI positive sans la fluorescence hors focus (**Figure 69, GFP XOR PI mask**). L'outil de mesure du logiciel permet ensuite d'extraire les intensités de fluorescence intégrées du PI sur cette image finale représentant le plan focal de la fluorescence PI des sphéroïdes.

## 12. Marquage de l'apoptose

### a. **Cytométrie en flux**

Après incubation avec le milieu de culture DMEM activé par plasma (temps d'incubation de 1, 4 et 6 heures), les sphéroïdes sont dissociés au moyen de trois bains successifs de 3 minutes dans 1 mL de trypsine (1X) à 37°C. Pour s'assurer d'une bonne dissociation, les tubes sont agités sous vortex entre chaque bain. La digestion trypsique est stoppée par ajout de milieu de culture DMEM complet, les cellules sont centrifugées (300 g, 3 minutes) et marquées pour l'AnnexinV-PI (kit Annexin V-FITC Apoptosis, BioVision, États-Unis) et incubées 15 minutes sur glace et dans le noir. Les pourcentages de cellules en apoptose (Annexin V-FITC positive, PI négative) et en nécrose (Annexin V-FITC positive, PI positive) sont obtenus par analyse des échantillons au cytomètre en flux BD-FACSCalibur™ (BD Biosciences, États-Unis) et les résultats sont analysés avec le logiciel FlowJo (TreeStar Inc.).

### b. **Microscopie confocale à fluorescence**

Le kit de microscopie Image-iT live red caspase -3 and -7 (FLICA) (Molecular Probes Invitrogen, États-Unis) est utilisé pour détecter le clivage des caspases 3 et 7. Directement après l'incubation dans le PBS ou NaCl (témoins) ou dans les liquides activés par plasma (P-A PBS et P-A NaCl), les sphéroïdes sont incubés dans 60 µL de réactif FLICA pendant 45 minutes à l'incubateur de culture (37°C, atmosphère humidifiée, 5% CO<sub>2</sub>). Les sphéroïdes sont ensuite lavés au PBS puis fixés dans 60 µL de solution de fixation (fournie dans le kit) pendant 24 heures à 4°C. Les sphéroïdes entiers, fixés et marqués sont ensuite imagés sous le microscope confocal FV1000 (Olympus, France) au grossissement x20. La fluorescence émise par le réactif FLICA est récupérée sur la bande passante de la mCherry (filtre d'excitation, BP : 560/40nm, filtre d'émission, BP : 630/75 nm).

### 13. Immunofluorescences

#### **a. Préparation des échantillons**

Les sphéroïdes sont fixés avec du formalin à 10 % (Sigma Aldrich, États-Unis) 2 heures à température ambiante puis rincés au PBS (sans calcium, sans magnésium). Les sphéroïdes sont ensuite déshydratés par des bains de sucrose successifs de 15, puis 30% à 4°C durant une nuit. Après rinçage au PBS, les sphéroïdes sont inclus dans de la résine d'enrobage (Shandon Cryomatrix™ resin, Thermofisher Scientific, France), puis cryocongelés sur de l'isopentane refroidi à l'azote liquide à -190°C. L'utilisation de l'isopentane comme intermédiaire entre l'échantillon et l'azote liquide permet un refroidissement lent et plus homogène de l'échantillon, ce qui permet de mieux conserver sa structure. Les blocs sont conservés au congélateur à -80°C. Des cryo-coupes d'épaisseurs variables (**cf. tableau 4**) sont obtenues à partir de ces blocs au moyen d'un cryostat (CM1950, Allemagne) et les coupes sont déposées sur des lames adhésives SuperFrost UltraPlus® (Menzel-Gläser, ThermoScientific, France) pour les immunomarquages.

#### **b. Immunomarquages**

Des immunomarquages des histones phosphorylées  $\gamma$ -H2AX, de l'actine filamenteuse (actine F) et de la protéine ZO-1 sont effectués sur coupes de sphéroïde. Ici un protocole général est détaillé avec les étapes majeures des immunomarquages. Les spécificités concernant les solutions de blocage/saturation, les anticorps et les dilutions pour chacun des immunomarquages sont détaillées dans le **Tableau 4**. Les coupes de sphéroïdes sont bloquées dans une solution contenant du PBS, de l'albumine de veau fœtal (BSA, Euromedex, France) et du Triton X-100 (Sigma Aldrich, États-Unis) pendant 1 heure à température ambiante. Les lames sont ensuite rincées trois fois au PBS (sans calcium, sans magnésium) puis incubées avec l'anticorps primaire à 4°C durant une nuit. Les lames sont rincées au PBS (sans calcium, sans magnésium) et incubées avec l'anticorps secondaire (uniquement pour les marquages de  $\gamma$ -H2AX et de ZO-1, l'actine est détectée par marquage direct) pendant 30 minutes à température ambiante. Une fois le marquage terminé, les lames sont rincées avant d'être montées avec des lamelles et du milieu Vectashield contenant du DAPI (Vector Laboratories, Royaume-Uni), scellées avec du vernis, puis conservées à -20°C pour l'imagerie.

	Épaisseur cryocoupes	Solution de saturation	Immunomarquage		Imagerie de fluorescence
			Anticorps primaire	Anticorps secondaire	
<b>γ-H2AX</b>	5 µm	PBS-BSA 1% - Triton X-100 0.5%	Phospho γ-H2AX (rabbit monoclonal, CST, Etats-Unis) dilué au 1/500	Goat anti-rabbit IgG couplé à AF594 (Life Technologies, France) à 3.3 µg/mL	Confocal, FV1000 Olympus
<b>Actine F</b>	5 µm 10 µm	PBS-BSA 3% - Triton X-100 0.5%	Phalloïdine couplée à AF 594 (Invitrogen, France) à 85 µg/mL		Champ large, DMIRB Leica
<b>ZO-1</b>	5 µm 10 µm	PBS-BSA 3% - Triton X-100 0.5%	ZO-1 Rabbit IgG, (ThermoFisher Scientific, France) à 2.5 µg/mL	Goat anti-rabbit IgG couplé à AF594 (Life Technologies, Pays) à 3.3 µg/mL	Champ large, DMIRB Leica

**Tableau 4 : Stratégie expérimentale pour les immunomarquages des protéines sur coupes de sphéroïdes.**  
BSA : albumine de veau fœtal ; AF 594 : Alexa Fluor 594 ; CST : Cell Signaling Technology.

### c. Imagerie

Les lames marquées γ-H2AX sont imagées avec un microscope à fluorescence confocal, le FV1000 (Olympus, France) à différents grossissements (x20, x40 et x60 à huile). La fluorescence de l'Alexa Fluor 594 est détectée sur la bande passante filtre d'excitation, BP : 560/40nm, filtre d'émission, BP : 630/75 nm et le DAPI est détecté dans l'UV (filtre d'excitation, BP : 390/40 nm, filtre d'émission, BP : 450/40 nm). Les lames marquées pour l'actine F et la protéine de jonction cellulaire ZO-1 sont observées au microscope optique inversé à fluorescence à champ large (DMIRB, Leica Microsystems SA, France) équipé d'une caméra Cool Snap HQ2 (Roper Scientific, Photometrics, États-Unis) aux objectifs x20 et x100. L'Alexa Fluor 594 est détectée avec le filtre de la mCherry (filtre d'excitation, BP : 560/40nm, filtre d'émission, BP : 630/75 nm) et le DAPI est détecté dans l'UV (filtre d'excitation, BP : 390/40 nm, filtre d'émission, BP : 450/40 nm).

### 14. Étude de l'expression de protéines impliquées dans l'autophagie par Western Blotting

Directement après la durée indiquée du traitement, les sphéroïdes sont placés sur la glace et transférés dans du tampon de lyse RIPA 1X (RIPA buffer for protein extraction, Sigma Aldrich, États-Unis) contenant un inhibiteur de protéases (protease inhibitor cocktail, Bio Basic Inc, Canada), des inhibiteurs de phosphatases (sodium orthovanadate Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub> et fluorure de sodium NaF) et du β-mercaptoethanol (Sigma Aldrich, États-Unis). Les échantillons sont ensuite incubés à 95°C pendant 5 minutes. Les extraits protéiques sont dosés à l'aide d'un kit de dosage (DC Protein Assay, BioRad, États-Unis) avant d'être déposés en quantités égales sur un gel d'électrophorèse SDS (sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis 4–15%,

BioRad, États-Unis) dans un tampon Tris/glycine (BioRad, États-Unis). Après électrophorèse, les protéines sont transférées sur une membrane de nitrocellulose (TransBlot® Turbo™ mini-size nitrocellulose, Bio-Rad, États-Unis). Les membranes sont bloquées dans du PBS contenant 5% de lait ou de sérum de veau fœtal puis incubées durant une nuit avec les anticorps primaires suivant : LC3 (#L7543 Sigma Aldrich, États-Unis), beta-actin (#sc-81178, Santa Cruz Biotechnology, États-Unis); p-ULK1 (Ser757) (#14202, CST, États-Unis); p62 (#610832, BD Transduction Laboratories, États-Unis); 4E-BP1 (#9644, CST, États-Unis); p-4E-BP1 (Thr37/46) (#2855P, CST, États-Unis). Les membranes sont ensuite incubées avec les anticorps secondaires correspondant (horseradish peroxidase-conjugated secondary antibody, ThermoScientific, France). Les immunomarquages sont détectés avec le réactif chimiluminescent SuperSignal West Pico Chemiluminescent Substrate (ThermoFisher Scientific, France) et les membranes sont révélées avec le système d'imagerie ChemiDoc™ Touch (BioRad, États-Unis). L'actine est utilisée comme protéine de contrôle de charge.

#### 15. Étude de l'ultrastructure par microscopie électronique à transmission

Les sphéroïdes sont récupérés directement après traitement (1 heure d'incubation dans le PBS ± EP, P-A PBS ± EP) et fixés successivement dans du tampon sodium cacodylate 0,1 M contenant 2 % de glutaraldéhyde, puis du tetroxide osmium à 1%. Les sphéroïdes sont ensuite déshydratés dans de l'éthanol avant d'être enrobés dans une résine Embed 812 (Electron Microscopy Sciences, États-Unis) en utilisant un préparateur de tissus par micro-ondes pour la microscopie électronique (Leica EM AMW, France). Des coupes ultrafines sont réalisées à l'ultramicrotome (Leica EM UC7) puis doublement contrastées avec une solution à 50% d'éthanol contenant du citrate de plomb (Reynold's lead citrate) et de l'acétate d'uranyl. Les coupes contrastées sont ensuite imagées avec un microscope électronique à transmission HT 7700 (Hitachi, États-Unis) équipé d'une caméra CCD AMT XR41 à une tension d'accélération des électrons de 80 kV.

#### 16. Expérimentation animale

Des souris nude (NMRI-nu de chez Janvier Labs, France) et des souris C57/Bl6 (Charles River Laboratories, France) mâles et femelles âgées de 6 à 8 semaines et pesant entre 25 et 30 g ont été utilisées. Toutes les expérimentations animales ont été conduites en accord avec la directive européenne 2010/63/EU et les procédures françaises pour l'utilisation des animaux à des fins scientifiques, avec l'accord du comité d'éthique (C2EA01) du Ministère de l'Enseignement

Supérieur, de la Recherche et de l'Innovation (MESRI) auprès duquel le projet est référencé sous le numéro APAFIS #20285-2019041714087359.

Il est important de noter ici que les souris sont maintenues sous anesthésie par inhalation d'isoflurane (5 en induction, 2,5-3 en maintien) (Vetflurane, France) pour toutes les procédures détaillées ci-après (injection des cellules, traitements, suivi de croissance au pied à coulisse et par bioluminescence). Les souris sont sacrifiées lorsque le volume tumoral atteint environ 5% du poids de l'animal (entre 1000 et 1500 mm<sup>3</sup>) ou lorsque de la nécrose tumorale sans cicatrisation est observée.

#### **a. Modèle syngénique de mélanome B16-F10-tdTomato en intradermique**

##### *i. Greffe des cellules*

Le jour précédant l'injection des cellules, les poils du flanc droit des souris C57/Bl6 sont retirés avec une tondeuse et de la crème dépilatoire. Les cellules de mélanome murin B16-F10-tdTomato maintenues en culture (deux-trois passages post-décongélation) et entre 80 et 90 % de confluence (phase exponentielle de croissance) sont décollées à la trypsine puis remises en suspension dans du milieu de culture complet. Les cellules sont comptées à la cellule de Malassez et la quantité de suspension cellulaire nécessaire pour l'injection (500 000 cellules/souris) est prélevée puis centrifugée à 500 g pendant 5 minutes. Le culot de cellules est repris dans du PBS (sans calcium, sans magnésium) à une concentration de 25 000 000/mL (500 000 cellules dans 20 µL de suspension/souris). Les cellules en suspension sont gardées sur glace jusqu'à l'injection en intradermique de 20 µL dans le flanc droit des souris C57/Bl6.

##### *ii. Suivi de croissance*

Les tumeurs sont visibles et palpables 3 à 5 jours après la greffe. Elles sont alors mesurées à partir de ce moment au moyen d'un pied à coulisse digital. Pour ce faire la tumeur est pincée, puis 3 grandeurs sont mesurées :  $a$ ,  $b$  et  $c$  avec  $a$  la longueur (grand côté),  $b$  la largeur (petit côté) et  $c$  l'épaisseur de la tumeur. Le volume (en mm<sup>3</sup>) est obtenu par cette formule :  $\left(\frac{\pi}{6}\right) * (a * b * c)$ ; avec  $\left(\frac{\pi}{6}\right)$  le facteur de correction.

#### **b. Modèle non syngénique d'adénocarcinome colorectal humain HCT 116-GFP en sous-cutané**

##### *i. Greffe des cellules*

Les cellules d'adénocarcinome colorectal humain HCT 116-GFP maintenues en culture (deux-trois passages post-décongélation) et entre 80 et 90 % de confluence (phase exponentielle de croissance) sont décollées à la trypsine puis remis en suspension dans du milieu de culture complet. Les cellules sont comptées à la cellule de Malassez et la quantité de suspension cellulaire nécessaire pour l'injection (1 000 000 de cellules/souris) est prélevée puis centrifugée à 500 g pendant 5 minutes. Le culot de cellules est repris dans du PBS (sans calcium, sans magnésium) à une concentration de 20 millions/mL (1 000 000 de cellules dans 50 µL de suspension/souris). Les cellules en suspension sont gardées sur glace jusqu'à l'injection sous-cutanée de 50 µL dans le flanc droit des souris nude.

### *ii. Suivi de croissance*

Les tumeurs sont visibles et palpables entre 10 à 18 jours après la greffe. Elles sont mesurées à partir de ce moment au moyen d'un pied à coulisse digital. Les tumeurs sous-cutanées peuvent être adhérentes au tissu conjonctif sous la peau, ainsi il est impossible de les pincer pour effectuer la mesure de la grandeur  $c$ . Le volume (en mm<sup>3</sup>) est donc obtenu par la formule :  $\frac{[a*(b^2)]}{2}$ , avec  $a$  la longueur (grand côté) et  $b$  la largeur de la tumeur (petit côté).

### **c. Traitement des tumeurs sous-cutanée HCT 116-GFP et intradermique B16-F10-tdTomato par P-A PBS et EP**

Le premier traitement des tumeurs intradermiques et sous-cutanées est effectué lorsque ces dernières atteignent un volume compris entre 50 et 100 mm<sup>3</sup> (variable selon les expériences). Les souris sont aléatoirement réparties en trois groupes : un groupe témoin (B16-F10-tdTomato) non traité ou groupe placebo (HCT 116-GFP) qui recevra une injection de PBS (sans calcium sans magnésium), un groupe P-A PBS et un groupe P-A PBS combiné à l'EP. Le PBS et le P-A PBS sont injectés directement dans la tumeur à l'aide d'une seringue à un volume correspondant à la moitié du volume tumoral, préalablement calculé (**Figure 70.A**). Dans le cas du double traitement, le P-A PBS est injecté dans la tumeur et l'EP est réalisée juste après l'injection. Le dispositif utilisé et les paramètres électriques sont décrits dans la **section 6** du matériel et méthode. Un gel conducteur (Eko Gel, Italie) est appliqué sur la tumeur afin de faire le contact électrique entre la peau et les électrodes et ainsi permettre le passage du courant à la tumeur. La tumeur est ensuite positionnée entre les électrodes et une tension de 650 V est appliquée (l'espace inter-électrodes est de 5 mm, et l'intensité du champ  $E$  est de 1300 V/cm) (**Figure 70.B**).

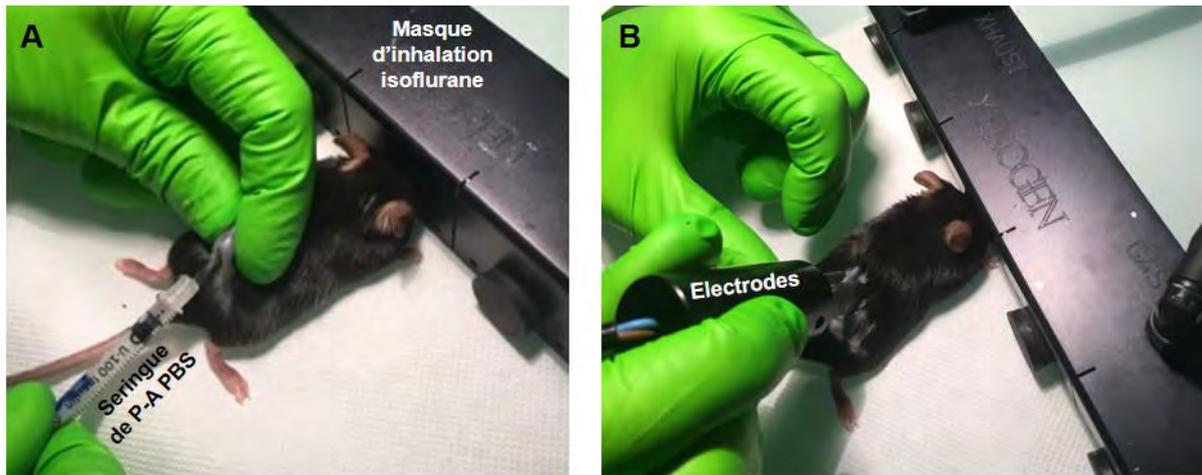


Figure 70 : Procédures d'injection du P-A PBS (A) et d'électroperméabilisation (B) des tumeurs intradermiques B16-F10-tdTomato.

Les tumeurs intradermiques B16-F10-tdTomato ne sont traitées qu'une seule fois au J0, du fait de leur croissance rapide. Les tumeurs HCT 116-GFP sont soumises à 3 traitements au total, un traitement tous les 7 jours durant 14 jours (Figure 71).

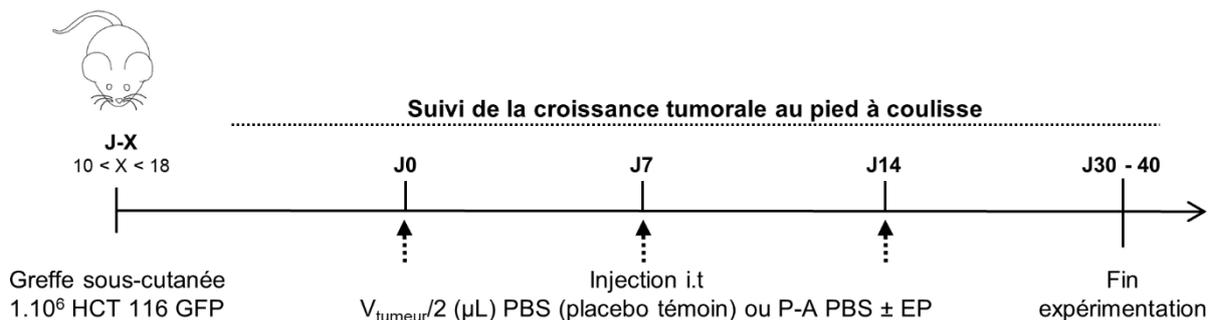


Figure 71 : Procédure expérimentale pour le traitement et le suivi de croissance des tumeurs sous-cutanée HCT 116-GFP chez la souris nMRI.

#### d. Modèle non syngénique de carcinose péritonéale ovarienne SKOV-3 GFP Luc

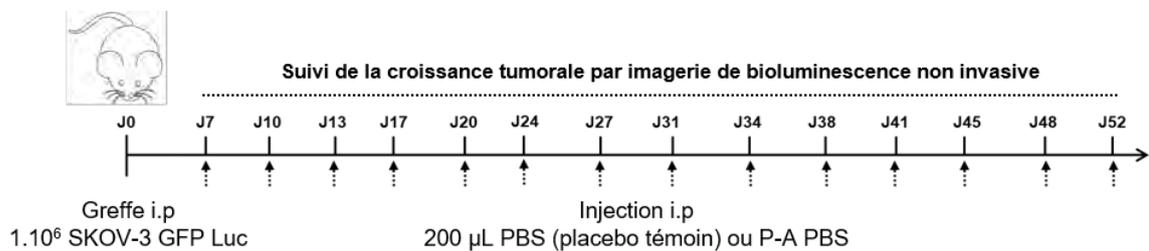
##### i. Greffe des cellules

Les cellules d'adénocarcinome ovarien humain SKOV-3 GFP Luc maintenues en culture (deux-trois passages post-décongélation) et entre 80 et 90 % de confluence (phase exponentielle de croissance) sont décollées à la trypsine puis remis en suspension dans du milieu de culture complet. Les cellules sont comptées à la cellule de Malassez et la quantité de suspension cellulaire nécessaire pour l'injection (1 000 000 de cellules/souris) est prélevée puis centrifugée à 500 g pendant 5 minutes. Le culot de cellules est repris dans du PBS (sans calcium, sans magnésium) à une concentration de 5 millions/mL (1 000 000 de cellules dans 200  $\mu$ L de

suspension/souris). Les cellules en suspension sont gardées sur glace jusqu'à l'injection de 200  $\mu$ L dans le péritoine des souris nude.

### ii. Traitement

Une semaine après la greffe des cellules, la première injection de PBS (sans calcium sans magnésium) (groupe témoin placebo) ou de PBS (sans calcium sans magnésium) activé par plasma est r alis e. Un volume de 200  $\mu$ L est injecté dans le péritoine des souris et un bref massage de l'abdomen est effectué pour s'assurer d'une répartition homogène de la solution dans le péritoine. Ce traitement est répété tous les 3-4 jours (deux fois par semaine) sur une période de 52 jours. La **figure 72** montre la procédure expérimentale suivie pour le traitement et l'imagerie des animaux.



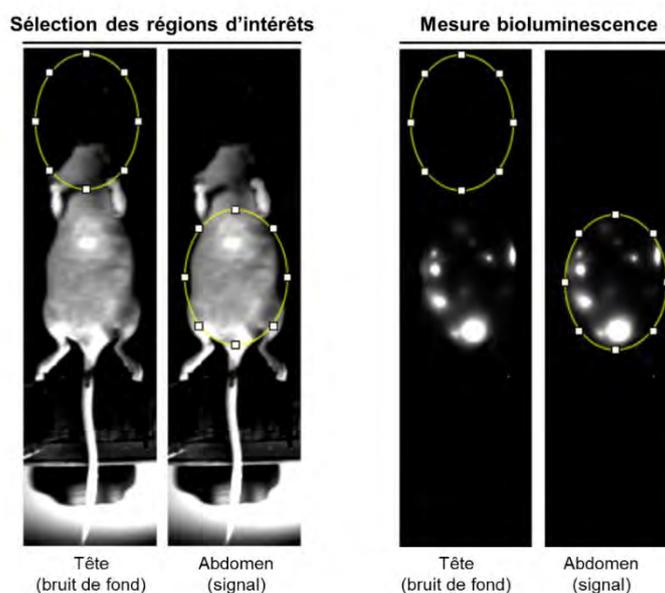
**Figure 72 : Procédure expérimentale pour le traitement et le suivi de croissance par bioluminescence des tumeurs SKOV-3 GFP Luc chez la souris nMRI.**

### iii. Suivi de croissance tumorale par imagerie de bioluminescence non invasive

La D-lucif rin sodium salt (OZ Biosciences, France) est inject e dans le péritoine des souris préalablement pes e à une concentration finale de 150 mg/kg. La première imagerie de bioluminescence est prise 5 minutes après l'injection. Pour ce faire, les souris sont positionn es dans une boîte noire (Photek, Royaume-Uni) sur un tapis chauffant réglé à 37 C (Harvard Apparatus,  tats-Unis) et imag es (3 par 3) avec une caméra Ikon M. La bioluminescence est imag e avec un objectif VIS-NIR Cinegon 1.4/12-0515 (Schneider, Allemagne). Les données sont obtenues avec le logiciel d'acquisition Solis (ANDOR Technology). La bioluminescence est utilis e ici comme un outil qualitatif et quantitatif et est r alis e tous les 3-4 jours (deux fois par semaine, avant chaque traitement). Une acquisition toutes les 5 minutes pendant 25 minutes à un binning de 2 est r alis e. Six acquisitions successives sont r alis es pour chaque souris et l'image correspondant au pic de d'émission de photons de bioluminescence sera gard e pour la quantification de la bioluminescence et le suivi de la croissance tumorale.

### iv. Analyse des images de bioluminescence

Les images de bioluminescence sont analysées avec le logiciel Image J. Les étapes du traitement des images sont montrées en **figure 73**. Pour chaque séquence d'imagerie, deux images sont exportées : photographie des souris en lumière blanche dénommée « live » et image de bioluminescence correspondante dénommée « lum ». Chacune de ces images contient 6 acquisitions. Tout d'abord, deux régions d'intérêts (Region Of Interest, ROI) sont sélectionnées sur les images « live », à l'aide de l'outil « ROI manager », correspondant à la tête de la souris (bruit de fond, aucune émission de lumière dans cette région) et l'abdomen correspondant au signal de bioluminescence spécifique des cellules SKOV-3 GFP Luc. Ensuite, la bioluminescence est mesurée (outil « integrated density ») sur la ROI « abdomen » sur les 6 acquisitions « lum » et l'image dont l'intensité de bioluminescence est la plus élevée est sélectionnée. La bioluminescence est mesurée dans les deux régions, tête et abdomen, pour chacune des souris sur l'image préalablement sélectionnée. Les données présentées dans les graphes correspondent à la valeur d'intensité de bioluminescence intégrée soustraite du bruit de fond (« integrated density » abdomen - « integrated density » tête).



**Figure 73 : Images de bioluminescence de la luciférine sur le logiciel ImageJ et position des ROI (Region Of Interest).**

## 17. Statistiques

Le logiciel GraphPad Prism 6.0 est utilisé pour l'analyse statistique des données numériques. Différents tests sont réalisés en fonction des jeux de données. Pour les jeux de données présentant plus de deux variables : suivis de croissance des sphéroïdes et des tumeurs, cinétiques de pénétration de PI et suivis de poids des animaux, des tests statistiques d'analyse

de variances (ANOVA) à deux facteurs avec un post-test de *Bonferroni* sont utilisés. La comparaison de deux jeux de données non appariées est réalisée avec un unpaired t-test. Tous les tests sont réalisés avec un intervalle de confiance de 95%, avec la p-valeur indiquant : \*p < 0.05, \*\*p < 0.01, \*\*\*p < 0.001 et \*\*\*\*p < 0.0001. Le nombre de sphéroïdes et d'animaux utilisés pour chaque expérience ainsi que le nombre d'expérience sont indiqués dans chacune des légendes des figures.

## BIBLIOGRAPHIE

---

- Aaronson, S.A. (1991). Growth Factors and Cancer. *254*, 9.
- Adachi, T., Tanaka, H., Nonomura, S., Hara, H., Kondo, S., and Hori, M. (2015). Plasma-activated medium induces A549 cell injury via a spiral apoptotic cascade involving the mitochondrial–nuclear network. *Free Radical Biology and Medicine* *79*, 28–44.
- Adamovich, I., Baalrud, S.D., Bogaerts, A., Bruggeman, P.J., Cappelli, M., Colombo, V., Czarnetzki, U., Ebert, U., Eden, J.G., Favia, P., *et al.* (2017). The 2017 Plasma Roadmap: Low temperature plasma science and technology. *J. Phys. D: Appl. Phys.* *50*, 323001.
- Alkawareek, M.Y., Algwari, Q.Th., Lavery, G., Gorman, S.P., Graham, W.G., O’Connell, D., and Gilmore, B.F. (2012). Eradication of *Pseudomonas aeruginosa* Biofilms by Atmospheric Pressure Non-Thermal Plasma. *PLoS One* *7*.
- Al-Lazikani, B., Banerji, U., and Workman, P. (2012). Combinatorial drug therapy for cancer in the post-genomic era. *Nat Biotechnol* *30*, 679–692.
- Al-Sakere, B., André, F., Bernat, C., Connault, E., Opolon, P., Davalos, R.V., Rubinsky, B., and Mir, L.M. (2007). Tumor Ablation with Irreversible Electroporation. *PLoS ONE* *2*, e1135.
- Andtbacka, R.H.I., Kaufman, H.L., Collichio, F., Amatruda, T., Senzer, N., Chesney, J., Delman, K.A., Spitler, L.E., Puzanov, I., Agarwala, S.S., *et al.* (2015). Talimogene Laherparepvec Improves Durable Response Rate in Patients With Advanced Melanoma. *JCO* *33*, 2780–2788.
- Antov, Y., Barbul, A., Mantsur, H., and Korenstein, R. (2005). Electroendocytosis: Exposure of Cells to Pulsed Low Electric Fields Enhances Adsorption and Uptake of Macromolecules. *Biophys J* *88*, 2206–2223.
- Arndt, S., Landthaler, M., Zimmermann, J.L., Unger, P., Wacker, E., Shimizu, T., Li, Y.-F., Morfill, G.E., Bosserhoff, A.-K., and Karrer, S. (2015). Effects of Cold Atmospheric Plasma (CAP) on  $\beta$ -Defensins, Inflammatory Cytokines, and Apoptosis-Related Molecules in Keratinocytes In Vitro and In Vivo. *PLoS One* *10*.
- Arndt, S., Unger, P., Berneburg, M., Bosserhoff, A.-K., and Karrer, S. (2018). Cold atmospheric plasma (CAP) activates angiogenesis-related molecules in skin keratinocytes, fibroblasts and endothelial cells and improves wound angiogenesis in an autocrine and paracrine mode. *Journal of Dermatological Science* *89*, 181–190.
- Bacellar, I.O.L., Oliveira, M.C., Dantas, L.S., Costa, E.B., Junqueira, H.C., Martins, W.K., Durantini, A.M., Cosa, G., Di Mascio, P., Wainwright, M., *et al.* (2018). Photosensitized Membrane Permeabilization Requires Contact-Dependent Reactions between Photosensitizer and Lipids. *J. Am. Chem. Soc.* *140*, 9606–9615.
- Bae, H., and Guan, J.-L. (2011). Suppression of autophagy by FIP200 deletion impairs DNA damage repair and increases cell death upon treatments with anti-cancer agents. *Mol Cancer Res* *9*, 1232–1241.

Baron, V.T., Welsh, J., Abedinpour, P., and Borgström, P. Intravital microscopy in the mouse dorsal chamber model for the study of solid tumors. 13.

Bauer, G., Sersenová, D., Graves, D.B., and Machala, Z. (2019). Dynamics of Singlet Oxygen-Triggered, RONS-Based Apoptosis Induction after Treatment of Tumor Cells with Cold Atmospheric Plasma or Plasma-Activated Medium. *Sci Rep* 9.

Beatty, G.L., and Gladney, W.L. (2015). Immune Escape Mechanisms as a Guide for Cancer Immunotherapy. *Clinical Cancer Research* 21, 687–692.

Begley, C.G., and Ellis, L.M. (2012). Raise standards for preclinical cancer research. *Nature* 483, 531–533.

Bekeschus, S., Schmidt, A., Weltmann, K.-D., and von Woedtke, T. (2016). The plasma jet kINPen – A powerful tool for wound healing. *Clinical Plasma Medicine* 4, 19–28.

Bellard, E., Markelc, B., Pelofy, S., Le Guerroué, F., Sersa, G., Teissié, J., Cemazar, M., and Golzio, M. (2012). Intravital microscopy at the single vessel level brings new insights of vascular modification mechanisms induced by electroporation. *Journal of Controlled Release* 163, 396–403.

Belpomme, D. (1991). Diversité des mécanismes de résistance aux chimiothérapies anticancéreuses. *Med Sci (Paris)* 7, 465.

Bergemann, C., Rebl, H., Otto, A., Matschke, S., and Nebe, B. (2019). Pyruvate as a cell-protective agent during cold atmospheric plasma treatment in vitro: Impact on basic research for selective killing of tumor cells. *Plasma Processes and Polymers* 16, 1900088.

Bergonié, J., and Tribondeau, L. (2003). Interpretation of some results from radiotherapy and an attempt to determine a rational treatment technique. 1906. *Yale J Biol Med* 76, 181–182.

Bernhardt, J., and Pauly, H. (1973). On the generation of potential differences across the membranes of ellipsoidal cells in an alternating electrical field. *Biophysik* 10, 89–98.

Blangero, C., Rols, M.P., and Teissié, J. (1989). Cytoskeletal reorganization during electric-field-induced fusion of Chinese hamster ovary cells grown in monolayers. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* 981, 295–302.

Boehm, D., Heslin, C., Cullen, P.J., and Bourke, P. (2016). Cytotoxic and mutagenic potential of solutions exposed to cold atmospheric plasma. *Sci Rep* 6, 21464.

Boudam, M.K., Moisan, M., Saoudi, B., Popovici, C., Gherardi, N., and Massines, F. (2006). Bacterial spore inactivation by atmospheric-pressure plasmas in the presence or absence of UV photons as obtained with the same gas mixture. *J. Phys. D: Appl. Phys.* 39, 3494–3507.

Bremner, J. (2008). Ethylene Oxide Sterilization: Safety and Effectiveness. *Biomedical Instrumentation & Technology* 42, 399–400.

Breton, M., and Mir, L.M. (2018). Investigation of the chemical mechanisms involved in the electroporation of membranes at the molecular level. *Bioelectrochemistry* 119, 76–83.

- Bruggeman, P., and Leys, C. (2009). Non-thermal plasmas in and in contact with liquids. *J. Phys. D: Appl. Phys.* *42*, 053001.
- Bruggeman, P.J., Kushner, M.J., Locke, B.R., Gardeniers, J.G.E., Graham, W.G., Graves, D.B., Hofman-Caris, R.C.H.M., Maric, D., Reid, J.P., Ceriani, E., *et al.* (2016). Plasma–liquid interactions: a review and roadmap. *Plasma Sources Sci. Technol.* *25*, 053002.
- Bureau, M.F., Gehl, J., Deleuze, V., Mir, L.M., and Scherman, D. (2000). Importance of association between permeabilization and electrophoretic forces for intramuscular DNA electrotransfer. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects* *1474*, 353–359.
- Buzzá, H.H., Fialho de Freitas, L.C., Moriyama, L.T., Teixeira Rosa, R.G., Bagnato, V.S., and Kurachi, C. (2019). Vascular Effects of Photodynamic Therapy with Curcumin in a Chorioallantoic Membrane Model. *Int J Mol Sci* *20*.
- Byers, S.W., Sommers, C.L., Hoxter, B., Mercurio, A.M., and Tozeren, A. (1995). Role of E-cadherin in the response of tumor cell aggregates to lymphatic, venous and arterial flow: measurement of cell-cell adhesion strength. *108*, 2053–2064.
- Byrne, C.M., and Thompson, J.F. (2006). Role of electrochemotherapy in the treatment of metastatic melanoma and other metastatic and primary skin tumors. *Expert Review of Anticancer Therapy* *6*, 671–678.
- Cairns, R.A., Harris, I.S., and Mak, T.W. (2011). Regulation of cancer cell metabolism. *Nat Rev Cancer* *11*, 85–95.
- Calcinotto, A., Filipazzi, P., Grioni, M., Iero, M., De Milito, A., Ricupito, A., Cova, A., Canese, R., Jachetti, E., Rossetti, M., *et al.* (2012). Modulation of Microenvironment Acidity Reverses Anergy in Human and Murine Tumor-Infiltrating T Lymphocytes. *Cancer Research* *72*, 2746–2756.
- Calvet, C.Y., Famin, D., André, F.M., and Mir, L.M. (2014). Electrochemotherapy with bleomycin induces hallmarks of immunogenic cell death in murine colon cancer cells. *OncoImmunology* *3*, e28131.
- Campana, L.G., Testori, A., Curatolo, P., Quaglino, P., Mocellin, S., Framarini, M., Borgognoni, L., Ascierio, P.A., Mozzillo, N., Guida, M., *et al.* (2016). Treatment efficacy with electrochemotherapy: A multi-institutional prospective observational study on 376 patients with superficial tumors. *European Journal of Surgical Oncology (EJSO)* *42*, 1914–1923.
- Campana, L.G., Edhemovic, I., Soden, D., Perrone, A.M., Scarpa, M., Campanacci, L., Cemazar, M., Valpione, S., Miklavčič, D., Mocellin, S., *et al.* (2019). Electrochemotherapy – Emerging applications technical advances, new indications, combined approaches, and multi-institutional collaboration. *European Journal of Surgical Oncology* *45*, 92–102.
- Canatella, P.J., Black, M.M., Bonnicksen, D.M., McKenna, C., and Prausnitz, M.R. (2004). Tissue Electroporation: Quantification and Analysis of Heterogeneous Transport in Multicellular Environments. *Biophys J* *86*, 3260–3268.

Cannon, R., Ellis, S., Hayes, D., Narayanan, G., and Martin, R.C.G. (2013). Safety and early efficacy of irreversible electroporation for hepatic tumors in proximity to vital structures: IRE for Hepatic Tumors. *J. Surg. Oncol.* *107*, 544–549.

Cemazar, M., Sersa, G., Wilson, J., Tozer, G.M., Hart, S.L., Grosel, A., and Dachs, G.U. (2002). Effective gene transfer to solid tumors using different nonviral gene delivery techniques: Electroporation, liposomes, and integrin-targeted vector. *Cancer Gene Ther* *9*, 399–406.

Cemazar, M., Golzio, M., Escoffre, J.-M., Couderc, B., Sersa, G., and Teissié, J. (2006). In vivo imaging of tumor growth after electrochemotherapy with cisplatin. *Biochemical and Biophysical Research Communications* *348*, 997–1002.

Chapman, W.C., Debelak, J.P., Wright Pinson, C., Washington, M.K., Atkinson, J.B., Venkatakrishnan, A., Blackwell, T.S., and Christman, J.W. (2000). Hepatic Cryoablation, But Not Radiofrequency Ablation, Results in Lung Inflammation. *Ann Surg* *231*, 752–761.

Chauvin, J. (2018). Etude des mécanismes anti-cancéreux induits par milieux activés par jet de plasma froid : vers une nouvelle approche thérapeutique. 177.

Chauvin, J., Judée, F., Yousfi, M., Vicendo, P., and Merbahi, N. (2017). Analysis of reactive oxygen and nitrogen species generated in three liquid media by low temperature helium plasma jet. *Sci Rep* *7*, 4562.

Chauvin, J., Judee, F., Merbahi, N., and Vicendo, P. (2018). Effects of Plasma Activated Medium on Head and Neck FaDu Cancerous Cells: Comparison of 3D and 2D Response. *ACAMC* *18*, 776–783.

Chen, D.S., and Mellman, I. (2017). Elements of cancer immunity and the cancer–immune set point. *Nature* *541*, 321–330.

Chen, C.-Y., Cheng, Y.-C., and Cheng, Y.-J. (2018). Synergistic effects of plasma-activated medium and chemotherapeutic drugs in cancer treatment. *J. Phys. D: Appl. Phys.* *51*, 13LT01.

Chung, T.-H., Stancampiano, A., Sklias, K., Gazeli, K., André, F., Dozias, S., Douat, C., Pouvesle, J.-M., Santos Sousa, J., Robert, É., *et al.* (2020). Cell Electroporation Enhancement by Non-Thermal-Plasma-Treated PBS. *Cancers* *12*, 219.

Classen, J., Dengler, B., Klinger, C., Bettenay, S., Rickerts, V., and Mueller, R. (2017). Cutaneous alternariosis in an immunocompromised dog successfully treated with cold plasma and cessation of immunosuppressive medication. *Tierarztl Prax Ausg K* *45*, 337–343.

Compton, K.T., and Langmuir, I. (1930). Electrical Discharges in Gases. Part I. Survey of Fundamental Processes. *Rev. Mod. Phys.* *2*, 123–242.

Čorović, S., Pavlin, M., and Miklavčič, D. (2007). Analytical and numerical quantification and comparison of the local electric field in the tissue for different electrode configurations. *Biomed Eng Online* *6*, 37.

Čorović, S., Al Sakere, B., Haddad, V., Miklavčič, D., and Mir, L.M. (2008). Importance of Contact Surface between Electrodes and Treated Tissue in Electrochemotherapy. *Technol Cancer Res Treat* *7*, 393–399.

- Corovic, S., Lackovic, I., Sustaric, P., Sustar, T., Rodic, T., and Miklavcic, D. (2013). Modeling of electric field distribution in tissues during electroporation. *Biomed Eng Online* 12, 16.
- Corovic, S., Markelc, B., Dolinar, M., Cemazar, M., and Jarm, T. (2015). Modeling of Microvascular Permeability Changes after Electroporation. *PLoS One* 10.
- Courau, T., Bonnereau, J., Chicoteau, J., Bottois, H., Remark, R., Assante Miranda, L., Toubert, A., Blery, M., Aparicio, T., Allez, M., *et al.* (2019). Cocultures of human colorectal tumor spheroids with immune cells reveal the therapeutic potential of MICA/B and NKG2A targeting for cancer treatment. *J Immunother Cancer* 7.
- Coustets, M., Ladurantie, C., Bellard, E., Prat, M., Rols, M.-P., Ecochard, V., Ferron, G., Chabot, S., Golzio, M., and Paquereau, L. (2020). Development of a near infrared protein nanoprobe targeting Thomsen-Friedenreich antigen for intraoperative detection of submillimeter nodules in an ovarian peritoneal carcinomatosis mouse model. *Biomaterials* 241, 119908.
- Daeschlein, G., Scholz, S., Ahmed, R., von Woedtke, T., Haase, H., Niggemeier, M., Kindel, E., Brandenburg, R., Weltmann, K.-D., and Juenger, M. (2012). Skin decontamination by low-temperature atmospheric pressure plasma jet and dielectric barrier discharge plasma. *Journal of Hospital Infection* 81, 177–183.
- DalleDonne, I., Milzani, A., and Colombo, R. (1995). H2O2-Treated Actin: Assembly and Polymer Interactions with Cross-Linking Proteins. *Biophysical Journal* 69, 10.
- Daniell, M.D., and Hill, J.S. (1991). A HISTORY OF PHOTODYNAMIC THERAPY. *ANZ J Surg* 61, 340–348.
- Daud, A.I., DeConti, R.C., Andrews, S., Urbas, P., Riker, A.I., Sondak, V.K., Munster, P.N., Sullivan, D.M., Ugen, K.E., Messina, J.L., *et al.* (2008). Phase I Trial of Interleukin-12 Plasmid Electroporation in Patients With Metastatic Melanoma. *J Clin Oncol* 26, 5896–5903.
- Davalos, R.V., Rubinsky, B., and Mir, L.M. (2003). Theoretical analysis of the thermal effects during in vivo tissue electroporation. *Bioelectrochemistry* 61, 99–107.
- Davalos, R.V., Mir, L.M., and Rubinsky, B. (2005). Tissue Ablation with Irreversible Electroporation. *Annals of Biomedical Engineering* 33, 223–231.
- Deng, S., Ruan, R., Mok, C.K., Huang, G., Lin, X., and Chen, P. (2007). Inactivation of *Escherichia coli* on Almonds Using Nonthermal Plasma. *J Food Science* 72, M62–M66.
- Desoize, B., Gimonet, D., and Jardiller, J.C. (1998). Cell culture as spheroids: an approach to multicellular resistance. *Anticancer Res.* 18, 4147–4158.
- DiGiovanni, J. (1992). Multistage carcinogenesis in mouse skin. *Pharmacology & Therapeutics* 54, 63–128.
- Dolega, M.E., Delarue, M., Ingremeau, F., Prost, J., Delon, A., and Cappello, G. (2017). Cell-like pressure sensors reveal increase of mechanical stress towards the core of multicellular spheroids under compression. *Nat Commun* 8, 14056.

- Dos Santos, A.F., De Almeida, D.R.Q., Terra, L.F., Baptista, M.S., and Labriola, L. (2019). Photodynamic therapy in cancer treatment - an update review. *JCMT* 2019.
- Doskey, C.M., Buranasudja, V., Wagner, B.A., Wilkes, J.G., Du, J., Cullen, J.J., and Buettner, G.R. (2016). Tumor cells have decreased ability to metabolize H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>: Implications for pharmacological ascorbate in cancer therapy. *Redox Biology* 10, 274–284.
- Dower, W.J., Miller, J.F., and Ragsdale, C.W. (1988). High efficiency transformation of *E.coli* by high voltage electroporation. *Nucleic Acids Research* 16, 6127–6145.
- Dutta, D., Asmar, A., and Stacey, M. (2015). Effects of nanosecond pulse electric fields on cellular elasticity. *Micron* 72, 15–20.
- Eliezer, Y., and Eliezer, S. (2001). The fourth state of matter: an introduction to plasma science (Bristol, UK ; Philadelphia: IOP).
- Elmore, S. (2007). Apoptosis: A Review of Programmed Cell Death. *Toxicol Pathol* 35, 495–516.
- Erinjeri, J.P., and Clark, T.W.I. (2010). Cryoablation: Mechanism of Action and Devices. *Journal of Vascular and Interventional Radiology* 21, S187–S191.
- Escoffre, J.-M., Dean, D.S., Hubert, M., Rols, M.-P., and Favard, C. (2007). Membrane perturbation by an external electric field: a mechanism to permit molecular uptake. *Eur Biophys J* 36, 973–983.
- Escoffre, J.-M., Bellard, E., Faurie, C., Sébaï, S.C., Golzio, M., Teissié, J., and Rols, M.-P. (2014). Membrane disorder and phospholipid scrambling in electropermeabilized and viable cells. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* 1838, 1701–1709.
- Fanning, A.S., and Anderson, J.M. (2009). Zonula Occludens-1 and -2 Are Cytosolic Scaffolds That Regulate the Assembly of Cellular Junctions. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1165, 113–120.
- Faurie, C., Rebersek, M., Golzio, M., Kanduser, M., Escoffre, J.-M., Pavlin, M., Teissie, J., Miklavcic, D., and Rols, M.-P. (2010). Electro-mediated gene transfer and expression are controlled by the life-time of DNA/membrane complex formation. *The Journal of Gene Medicine* 12, 117–125.
- Fear, E.C., and Stuchly, M.A. (1998). Modeling assemblies of biological cells exposed to electric fields. *IEEE Trans. Biomed. Eng.* 45, 1259–1271.
- Filomeni, G., De Zio, D., and Cecconi, F. (2015). Oxidative stress and autophagy: the clash between damage and metabolic needs. *Cell Death Differ* 22, 377–388.
- Fitzwalter, B.E., and Thorburn, A. (2015). Recent insights into cell death and autophagy. *The FEBS Journal* 282, 4279–4288.
- Folkman, J., and Kalluri, R. (2003). Tumor Angiogenesis. *Holland-Frei Cancer Medicine*. 6th Edition.

- Fredricks, D.N. (2001). Microbial Ecology of Human Skin in Health and Disease. *Journal of Investigative Dermatology Symposium Proceedings* 6, 167–169.
- Freund, E., Liedtke, K.R., van der Linde, J., Metelmann, H.-R., Heidecke, C.-D., Partecke, L.-I., and Bekeschus, S. (2019). Physical plasma-treated saline promotes an immunogenic phenotype in CT26 colon cancer cells in vitro and in vivo. *Sci Rep* 9, 634.
- Fridman, G., Shereshevsky, A., Jost, M.M., Brooks, A.D., Fridman, A., Gutsol, A., Vasilets, V., and Friedman, G. (2007). Floating Electrode Dielectric Barrier Discharge Plasma in Air Promoting Apoptotic Behavior in Melanoma Skin Cancer Cell Lines. *Plasma Chem Plasma Process* 27, 163–176.
- Fridman, G., Friedman, G., Gutsol, A., Shekhter, A.B., Vasilets, V.N., and Fridman, A. (2008). Applied Plasma Medicine. *Plasma Processes and Polymers* 5, 503–533.
- Ganley, I.G., Lam, D.H., Wang, J., Ding, X., Chen, S., and Jiang, X. (2009). ULK1·ATG13·FIP200 Complex Mediates mTOR Signaling and Is Essential for Autophagy. *J. Biol. Chem.* 284, 12297–12305.
- Gascoigne, K.E., and Taylor, S.S. (2009). How do anti-mitotic drugs kill cancer cells? *Journal of Cell Science* 122, 2579–2585.
- Geboers, B., Scheffer, H.J., Graybill, P.M., Ruarus, A.H., Nieuwenhuizen, S., Puijk, R.S., van den Tol, P.M., Davalos, R.V., Rubinsky, B., de Gruijl, T.D., *et al.* (2020). High-Voltage Electrical Pulses in Oncology: Irreversible Electroporation, Electrochemotherapy, Gene Electrotransfer, Electrofusion, and Electroimmunotherapy. *Radiology* 192190.
- Gehl, J. (2003). Electroporation: theory and methods, perspectives for drug delivery, gene therapy and research. *Acta Physiol Scand* 177, 437–447.
- Gehl, J., Skovsgaard, T., and Mir, L.M. (1998). Enhancement of cytotoxicity by electroporation: an improved method for screening drugs. *Anti-Cancer Drugs* 9, 319–326.
- Gehl, J., Skovsgaard, T., and Mir, L.M. (2002). Vascular reactions to in vivo electroporation: characterization and consequences for drug and gene delivery. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects* 1569, 51–58.
- Georgescu, N., and Lupu, A.R. (2010). Tumoral and Normal Cells Treatment With High-Voltage Pulsed Cold Atmospheric Plasma Jets. *IEEE Trans. Plasma Sci.* 38, 1949–1955.
- Geukes Foppen, M.H., Donia, M., Svane, I.M., and Haanen, J.B.A.G. (2015). Tumor-infiltrating lymphocytes for the treatment of metastatic cancer. *Molecular Oncology* 9, 1918–1935.
- Ghosh, S., Joshi, M.B., Ivanov, D., Feder-Mengus, C., Spagnoli, G.C., Martin, I., Erne, P., and Resink, T.J. (2007). Use of multicellular tumor spheroids to dissect endothelial cell-tumor cell interactions: A role for T-cadherin in tumor angiogenesis. *FEBS Letters* 581, 4523–4528.
- Gibot, L., and Rols, M.-P. (2013a). 3D Spheroids' Sensitivity to Electric Field Pulses Depends on Their Size. *The Journal of Membrane Biology* 246, 745–750.

- Gibot, L., and Rols, M.-P. (2013b). Progress and prospects: the use of 3D spheroid model as a relevant way to study and optimize DNA electrotransfer. *Curr Gene Ther* *13*, 175–181.
- Gibot, L., Wasungu, L., Teissié, J., and Rols, M.-P. (2013). Antitumor drug delivery in multicellular spheroids by electropermeabilization. *Journal of Controlled Release* *167*, 138–147.
- Gilman, A. (1963). The initial clinical trial of nitrogen mustard. *The American Journal of Surgery* *105*, 574–578.
- Gingras, A.-C., Gygi, S.P., Raught, B., Polakiewicz, R.D., Abraham, R.T., Hoekstra, M.F., Aebersold, R., and Sonenberg, N. (1999). Regulation of 4E-BP1 phosphorylation: a novel two-step mechanism. *Genes & Development* *13*, 1422–1437.
- Girard, P.-M., Arbabian, A., Fleury, M., Bauville, G., Puech, V., Dutreix, M., and Sousa, J.S. (2016). Synergistic Effect of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and NO<sub>2</sub> in Cell Death Induced by Cold Atmospheric He Plasma. *Sci Rep* *6*.
- Glick, D., Barth, S., and Macleod, K.F. (2010). Autophagy: cellular and molecular mechanisms. *J. Pathol.* *221*, 3–12.
- Glimelius, B., Norling, B., Nederman, T., and Carlsson, J. (1988). Extracellular matrices in multicellular spheroids of human glioma origin: Increased incorporation of proteoglycans and fibronectin as compared to monolayer cultures. *APMIS* *96*, 433–444.
- Golombek, S.K., May, J.-N., Theek, B., Appold, L., Drude, N., Kiessling, F., and Lammers, T. (2018). Tumor Targeting via EPR: Strategies to Enhance Patient Responses. *Adv Drug Deliv Rev* *130*, 17–38.
- Golzio, M., Teissie, J., and Rols, M.-P. (2002). Direct visualization at the single-cell level of electrically mediated gene delivery. *Proceedings of the National Academy of Sciences* *99*, 1292–1297.
- Gould, S.E., Junttila, M.R., and de Sauvage, F.J. (2015). Translational value of mouse models in oncology drug development. *Nat Med* *21*, 431–439.
- Grantab, R., Sivananthan, S., and Tannock, I.F. (2006). The Penetration of Anticancer Drugs through Tumor Tissue as a Function of Cellular Adhesion and Packing Density of Tumor Cells. *Cancer Res* *66*, 1033–1039.
- Guillaume, L., Rigal, L., Fehrenbach, J., Severac, C., Ducommun, B., and Lobjois, V. (2019). Characterization of the physical properties of tumor-derived spheroids reveals critical insights for pre-clinical studies. *Sci Rep* *9*.
- Guo, L., Xu, R., Gou, L., Liu, Z., Zhao, Y., Liu, D., Zhang, L., Chen, H., and Kong, M.G. (2018). Mechanism of Virus Inactivation by Cold Atmospheric-Pressure Plasma and Plasma-Activated Water. *Appl Environ Microbiol* *84*.
- Gurtner, G.C., Werner, S., Barrandon, Y., and Longaker, M.T. (2008). Wound repair and regeneration. *Nature* *453*, 314–321.

Halliwell, B., Clement, M.V., and Long, L.H. (2000). Hydrogen peroxide in the human body. *FEBS Letters* 486, 10–13.

Halsted, W.S. (1894). I. The Results of Operations for the Cure of Cancer of the Breast Performed at the Johns Hopkins Hospital from June, 1889, to January, 1894. *Ann Surg* 20, 497–555.

Han, K., Pierce, S.E., Li, A., Spees, K., Anderson, G.R., Seoane, J.A., Lo, Y.-H., Dubreuil, M., Olivas, M., Kamber, R.A., *et al.* (2020). CRISPR screens in cancer spheroids identify 3D growth-specific vulnerabilities. *Nature* 580, 136–141.

Hara, H., Taniguchi, M., Kobayashi, M., Kamiya, T., and Adachi, T. (2015). Plasma-activated medium-induced intracellular zinc liberation causes death of SH-SY5Y cells. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 584, 51–60.

Hara, H., Sueyoshi, S., Taniguchi, M., Kamiya, T., and Adachi, T. (2017). Differences in intracellular mobile zinc levels affect susceptibility to plasma-activated medium-induced cytotoxicity. *Free Radical Research* 51, 306–315.

Hattori, N., Yamada, S., Torii, K., Takeda, S., Nakamura, K., Tanaka, H., Kajiyama, H., Kanda, M., Fujii, T., Nakayama, G., *et al.* (2015). Effectiveness of plasma treatment on pancreatic cancer cells. *International Journal of Oncology* 47, 1655–1662.

Heinlin, J., Morfill, G., Landthaler, M., Stolz, W., Isbary, G., Zimmermann, J.L., Shimizu, T., and Karrer, S. (2010). Plasma medicine: possible applications in dermatology. *JDDG: Journal Der Deutschen Dermatologischen Gesellschaft* 8, 968–976.

Heller, R., Jaroszeski, M., Atkin, A., Moradpour, D., Gilbert, R., Wands, J., and Nicolau, C. (1996). In vivo gene electroinjection and expression in rat liver. *FEBS Letters* 389, 225–228.

Helmke, A., Hoffmeister, D., Mertens, N., Emmert, S., Schuette, J., and Viuel, W. (2009). The acidification of lipid film surfaces by non-thermal DBD at atmospheric pressure in air. *New J. Phys.* 11, 115025.

Herbst, F., van Schalkwyk, J., and McGovern, M. (2018). MicroPlaSter and SteriPlas. In *Comprehensive Clinical Plasma Medicine*, H.-R. Metelmann, T. von Woedtke, and K.-D. Weltmann, eds. (Cham: Springer International Publishing), pp. 503–509.

Hille, B. (1978). Ionic channels in excitable membranes. Current problems and biophysical approaches. *Biophys J* 22, 283–294.

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. *Journal of Biotechnology* 148, 3–15.

Holtfreter, J. (1944). A study of the mechanics of gastrulation. *J. Exp. Zool.* 95, 171–212.

Hong, K., and Georgiades, C. (2010). Radiofrequency Ablation: Mechanism of Action and Devices. *Journal of Vascular and Interventional Radiology* 21, S179–S186.

Housman, G., Byler, S., Heerboth, S., Lapinska, K., Longacre, M., Snyder, N., and Sarkar, S. (2014). Drug Resistance in Cancer: An Overview. *Cancers (Basel)* 6, 1769–1792.

- Ikeda, J., Tanaka, H., Ishikawa, K., Sakakita, H., Ikehara, Y., and Hori, M. (2018). Plasma-activated medium (PAM) kills human cancer-initiating cells: Effect of PAM on cancer-initiating cells. *Pathol Int* 68, 23–30.
- Inch, W.R., McCredie, J.A., and Sutherland, R.M. (1970). Growth of nodular carcinomas in rodents compared with multi-cell spheroids in tissue culture. *Growth* 34, 271–282.
- Isbary, G., Morfill, G., Schmidt, H.U., Georgi, M., Ramrath, K., Heinlin, J., Karrer, S., Landthaler, M., Shimizu, T., Steffes, B., *et al.* (2010). A first prospective randomized controlled trial to decrease bacterial load using cold atmospheric argon plasma on chronic wounds in patients: Argon plasma significantly decreases bacteria on wounds. *British Journal of Dermatology* no-no.
- Isbary, G., Heinlin, J., Shimizu, T., Zimmermann, J.L., Morfill, G., Schmidt, H.-U., Monetti, R., Steffes, B., Bunk, W., Li, Y., *et al.* (2012). Successful and safe use of 2 min cold atmospheric argon plasma in chronic wounds: results of a randomized controlled trial: Argon plasma significantly decreases bacteria on wounds. *British Journal of Dermatology* 167, 404–410.
- Isbary, G., Shimizu, T., Zimmermann, J.L., Thomas, H.M., Morfill, G.E., and Stolz, W. (2013). Cold atmospheric plasma for local infection control and subsequent pain reduction in a patient with chronic post-operative ear infection. *New Microbes New Infect* 1, 41–43.
- Isbary, G., Shimizu, T., Zimmermann, J.L., Heinlin, J., Al-Zaabi, S., Rechfeld, M., Morfill, G.E., Karrer, S., and Stolz, W. (2014). Randomized placebo-controlled clinical trial showed cold atmospheric argon plasma relieved acute pain and accelerated healing in herpes zoster. *Clinical Plasma Medicine* 2, 50–55.
- Ivorra, A., Al-Sakere, B., Rubinsky, B., and Mir, L.M. (2009). In vivo electrical conductivity measurements during and after tumor electroporation: conductivity changes reflect the treatment outcome. *Phys. Med. Biol.* 54, 5949–5963.
- Ja Kim, S., Min Joh, H., and Chung, T.H. (2013). Production of intracellular reactive oxygen species and change of cell viability induced by atmospheric pressure plasma in normal and cancer cells. *Appl. Phys. Lett.* 103, 153705.
- Jablonowski, H., and von Woedtke, T. (2015). Research on plasma medicine-relevant plasma–liquid interaction: What happened in the past five years? *Clinical Plasma Medicine* 3, 42–52.
- Jang, M., Kim, S.S., and Lee, J. (2013). Cancer cell metabolism: implications for therapeutic targets. *Experimental & Molecular Medicine* 45, e45–e45.
- Jarozeski, M.J., Dang, V., Pottinger, C., Hickey, J., Gilbert, R., and Heller, R. (2000). Toxicity of anticancer agents mediated by electroporation in vitro: *Anti-Cancer Drugs* 11, 201–208.
- José, A., Sobrevals, L., Ivorra, A., and Fillat, C. (2012). Irreversible electroporation shows efficacy against pancreatic carcinoma without systemic toxicity in mouse models. *Cancer Letters* 317, 16–23.

- Judée, F., Wattieaux, G., Merbahi, N., Mansour, M., and Castanié-Cornet, M.P. (2014). The antibacterial activity of a microwave argon plasma jet at atmospheric pressure relies mainly on UV-C radiations. *J. Phys. D: Appl. Phys.* *47*, 405201.
- Judée, F., Fongia, C., Ducommun, B., Yousfi, M., Lobjois, V., and Merbahi, N. (2016a). Short and long time effects of low temperature Plasma Activated Media on 3D multicellular tumor spheroids. *Sci Rep* *6*, 21421.
- Judée, F., Merbahi, N., and Yousfi, M. (2016b). Genotoxic and Cytotoxic Effects of Plasma-Activated Media on Multicellular Tumor Spheroids. *Plasma Med* *6*, 47–57.
- Julák, J., Hujacová, A., Scholtz, V., Khun, J., and Holada, K. (2018). Contribution to the Chemistry of Plasma-Activated Water. *Plasma Phys. Rep.* *44*, 125–136.
- Jung, C.H., Ro, S.-H., Cao, J., Otto, N.M., and Kim, D.-H. (2010). mTOR regulation of autophagy. *FEBS Letters* *584*, 1287–1295.
- Jung, M., Choi, H., and Mun, J.Y. (2019). The autophagy research in electron microscopy. *Appl. Microsc.* *49*, 11.
- Jurkiewicz, P., Olżyńska, A., Cwiklik, L., Conte, E., Jungwirth, P., Megli, F.M., and Hof, M. (2012). Biophysics of lipid bilayers containing oxidatively modified phospholipids: Insights from fluorescence and EPR experiments and from MD simulations. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* *1818*, 2388–2402.
- Kanazawa, S., Kogoma, M., Moriwaki, T., and Okazaki, S. (1988). Stable glow plasma at atmospheric pressure. *J. Phys. D: Appl. Phys.* *21*, 838–840.
- Kandušer, M., Šentjerc, M., and Miklavčič, D. (2008). The temperature effect during pulse application on cell membrane fluidity and permeabilization. *Bioelectrochemistry* *74*, 52–57.
- Kantarjian, H., Stein, A., Gökbüget, N., Fielding, A.K., Schuh, A.C., Ribera, J.-M., Wei, A., Dombret, H., Foà, R., Bassan, R., *et al.* (2017). Blinatumomab versus Chemotherapy for Advanced Acute Lymphoblastic Leukemia. *N Engl J Med* *376*, 836–847.
- Kanthou, C., Kranjc, S., Sersa, G., Tozer, G., Zupanic, A., and Cemazar, M. (2006). The endothelial cytoskeleton as a target of electroporation-based therapies. *Molecular Cancer Therapeutics* *5*, 3145–3152.
- Karakas, E., and Laroussi, M. (2010). Experimental studies on the plasma bullet propagation and its inhibition. *Journal of Applied Physics* *108*, 063305.
- Kaushal, G.P., Chandrashekar, K., and Juncos, L.A. (2019). Molecular Interactions Between Reactive Oxygen Species and Autophagy in Kidney Disease. *IJMS* *20*, 3791.
- Kerbel, R.S. (2000). Tumor angiogenesis: past, present and the near future. *Carcinogenesis* *21*, 505–515.
- Kerr, J.F.R., Wyllie, A.H., and Currie, A.R. (1972). Apoptosis: A Basic Biological Phenomenon with Wideranging Implications in Tissue Kinetics. *Br J Cancer* *26*, 239–257.

- Khawar, I.A., Park, J.K., Jung, E.S., Lee, M.A., Chang, S., and Kuh, H.-J. (2018). Three Dimensional Mixed-Cell Spheroids Mimic Stroma-Mediated Chemoresistance and Invasive Migration in hepatocellular carcinoma. *Neoplasia* 20, 800–812.
- Kim, D.W., Park, T.J., Jang, S.J., You, S.J., and Oh, W.Y. (2016). Plasma treatment effect on angiogenesis in wound healing process evaluated *in vivo* using angiographic optical coherence tomography. *Appl. Phys. Lett.* 109, 233701.
- King, R.W.P. (2001). Low-frequency electric fields induced in spherical cells with gap junctions. *Radio Sci.* 36, 1653–1657.
- Kingham, T.P., Karkar, A.M., D’Angelica, M.I., Allen, P.J., DeMatteo, R.P., Getrajdman, G.I., Sofocleous, C.T., Solomon, S.B., Jarnagin, W.R., and Fong, Y. (2012). Ablation of Perivascular Hepatic Malignant Tumors with Irreversible Electroporation. *Journal of the American College of Surgeons* 215, 379–387.
- Kinosita, K., and Tsong, T.Y. (1977). Formation and resealing of pores of controlled sizes in human erythrocyte membrane. *Nature* 268, 438–441.
- Klämpfl, T.G., Isbary, G., Shimizu, T., Li, Y.-F., Zimmermann, J.L., Stolz, W., Schlegel, J., Morfill, G.E., and Schmidt, H.-U. (2012). Cold Atmospheric Air Plasma Sterilization against Spores and Other Microorganisms of Clinical Interest. *Appl Environ Microbiol* 78, 5077–5082.
- Kohama, K., Ye, L.-H., Hayakawa, K., and Okagaki, T. (1996). Myosin light chain kinase: an actin-binding protein that regulates an ATP-dependent interaction with myosin. *Trends in Pharmacological Sciences* 17, 284–287.
- Kolosnjaj-Tabi, J., Gibot, L., Fourquaux, I., Golzio, M., and Rols, M.-P. (2019). Electric field-responsive nanoparticles and electric fields: physical, chemical, biological mechanisms and therapeutic prospects. *Advanced Drug Delivery Reviews* 138, 56–67.
- Kong, M.G., Kroesen, G., Morfill, G., Nosenko, T., Shimizu, T., van Dijk, J., and Zimmermann, J.L. (2009). Plasma medicine: an introductory review. *New J. Phys.* 11, 115012.
- Koppenol, W.H., Bounds, P.L., and Dang, C.V. (2011). Otto Warburg’s contributions to current concepts of cancer metabolism. *Nat Rev Cancer* 11, 325–337.
- Korolov, I., Fazekas, B., Széll, M., Kemény, L., and Kutasi, K. (2016). The effect of the plasma needle on the human keratinocytes related to the wound healing process. *J. Phys. D: Appl. Phys.* 49, 035401.
- Kurake, N., Ishikawa, K., Tanaka, H., Hashizume, H., Nakamura, K., Kajiyama, H., Toyokuni, S., Kikkawa, F., Mizuno, M., and Hori, M. (2019). Non-thermal plasma-activated medium modified metabolomic profiles in the glycolysis of U251SP glioblastoma. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 662, 83–92.
- Lablanche, S.C. (2009). Rôle du pore de transition de perméabilité mitochondriale dans l’apoptose des cellules bêta pancréatiques. 68.
- Langmuir, I. (1928). Oscillations in Ionized Gases. *Proc Natl Acad Sci U S A* 14, 627–637.

- Lardner, A. (2001). The effects of extracellular pH on immune function. *Journal of Leukocyte Biology* 69, 522–530.
- Laroussi, M. (1996). Sterilization of contaminated matter with an atmospheric pressure plasma. *IEEE Transactions on Plasma Science* 24, 1188–1191.
- Laschke, M.W., and Menger, M.D. (2017). Spheroids as vascularization units: From angiogenesis research to tissue engineering applications. *Biotechnology Advances* 35, 782–791.
- Lengsfeld, A.M., Löw, I., Wieland, T., Dancker, P., and Hasselbach, W. (1974). Interaction of Phalloidin with Actin. *Proc Natl Acad Sci U S A* 71, 2803–2807.
- Lengyel, E., Burdette, J.E., Kenny, H.A., Matei, D., Pilrose, J., Haluska, P., Nephew, K.P., Hales, D.B., and Stack, M.S. (2014). Epithelial ovarian cancer experimental models. *Oncogene* 33, 3619–3633.
- Lerouge, S., Guignot, C., Tabrizian, M., Ferrier, D., Yagoubi, N., and Yahia, L. Plasma-based sterilization: Effect on surface and bulk properties and hydrolytic stability of reprocessed polyurethane electrophysiology catheters. 9.
- Levine, Z.A., and Vernier, P.T. (2010). Life Cycle of an Electropore: Field-Dependent and Field-Independent Steps in Pore Creation and Annihilation. *J Membrane Biol* 236, 27–36.
- Lietz, A.M., Damany, X., Robert, E., Pouvesle, J.-M., and Kushner, M.J. (2019). Ionization wave propagation in an atmospheric pressure plasma multi-jet. *Plasma Sources Sci. Technol.* 28, 125009.
- Lin, Z., Zhang, Q., and Luo, W. (2016). Angiogenesis inhibitors as therapeutic agents in cancer: Challenges and future directions. *European Journal of Pharmacology* 793, 76–81.
- Lin, Z.-H., Wu, J.-S., Tschang, C.-Y.T., Su, C.-F., Wu, T., Shen, Y.-N., Liu, C.-T., Jang, W.-Y., and Ho, M.-T. (2015). Development and Characterization of a Portable Atmospheric-Pressure Argon Plasma Jet for Sterilization. In *Volume 3: Biomedical and Biotechnology Engineering*, (Houston, Texas, USA: American Society of Mechanical Engineers), p. V003T03A075.
- Liou, G.-Y., and Storz, P. (2010). Reactive oxygen species in cancer. *Free Radic Res* 44.
- Liu, C.-C., Shen, Z., Kung, H.-F., and Lin, M.C. (2006). Cancer gene therapy targeting angiogenesis: An updated Review. *World J Gastroenterol* 12, 6941–6948.
- Lubner, M.G., Brace, C.L., Hinshaw, J.L., and Lee, F.T. (2010). Microwave Tumor Ablation: Mechanism of Action, Clinical Results and Devices. *J Vasc Interv Radiol* 21, S192–S203.
- Mai-Prochnow, A., Clauson, M., Hong, J., and Murphy, A.B. (2016). Gram positive and Gram negative bacteria differ in their sensitivity to cold plasma. *Sci Rep* 6, 38610.
- Majety, M., Pradel, L.P., Gies, M., and Ries, C.H. (2015). Fibroblasts Influence Survival and Therapeutic Response in a 3D Co-Culture Model. *PLoS One* 10.

- Mallidi, S., Anbil, S., Bulin, A.-L., Obaid, G., Ichikawa, M., and Hasan, T. (2016). Beyond the Barriers of Light Penetration: Strategies, Perspectives and Possibilities for Photodynamic Therapy. *Theranostics* 6, 2458–2487.
- Marchal, F., Robert, H., Merbahi, N., Fontagné-Faucher, C., Yousfi, M., Romain, C.E., Eichwald, O., Rondel, C., and Gabriel, B. (2012). Inactivation of Gram-positive biofilms by low-temperature plasma jet at atmospheric pressure. *J. Phys. D: Appl. Phys.* 45, 345202.
- Markelc, B., Skvarca, E., Dolinsek, T., Kloboves, V.P., Coer, A., Sersa, G., and Cemazar, M. (2015). Inhibitor of endocytosis impairs gene electrotransfer to mouse muscle in vivo. *Bioelectrochemistry* 103, 111–119.
- Markelc, B., Bellard, E., Sersa, G., Jesenko, T., Pelofy, S., Teissié, J., Frangez, R., Rols, M.-P., Cemazar, M., and Golzio, M. (2018). Increased permeability of blood vessels after reversible electroporation is facilitated by alterations in endothelial cell-to-cell junctions. *Journal of Controlled Release* 276, 30–41.
- Martin, R.C.G., McFarland, K., Ellis, S., and Velanovich, V. (2013). Irreversible Electroporation in Locally Advanced Pancreatic Cancer: Potential Improved Overall Survival. *Ann Surg Oncol* 20, 443–449.
- Marty, M., Sersa, G., Garbay, J.R., Gehl, J., Collins, C.G., Snoj, M., Billard, V., Geertsen, P.F., Larkin, J.O., Miklavcic, D., *et al.* (2006). Electrochemotherapy – An easy, highly effective and safe treatment of cutaneous and subcutaneous metastases: Results of ESOPE (European Standard Operating Procedures of Electrochemotherapy) study. *European Journal of Cancer Supplements* 4, 3–13.
- Matsumura, Y., and Maeda, H. (1986). A New Concept for Macromolecular Therapeutics in Cancer Chemotherapy: Mechanism of Tumorotropic Accumulation of Proteins and the Antitumor Agent Smancs. 46, 6387–6392.
- Mazzio, E.A., Boukli, N., Rivera, N., and Soliman, K.F.A. (2012). Pericellular pH homeostasis is a primary function of the Warburg effect: Inversion of metabolic systems to control lactate steady state in tumor cells. *Cancer Science* 103, 422–432.
- Mesojednik, S., Pavlin, D., Sersa, G., Coer, A., Kranjc, S., Grosel, A., Tevz, G., and Cemazar, M. (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.
- Miklavcic, D., Beravs, K., Semrov, D., Cemazar, M., Demsar, F., and Sersa, G. (1998). The importance of electric field distribution for effective in vivo electroporation of tissues. *Biophys J* 74, 2152–2158.
- Miklavcic, D., Corovic, S., Pucihar, G., and Pavselj, N. (2006). Importance of tumour coverage by sufficiently high local electric field for effective electrochemotherapy. *European Journal of Cancer Supplements* 4, 45–51.
- Miklavčič, D., Mali, B., Kos, B., Heller, R., and Serša, G. (2014). Electrochemotherapy: from the drawing board into medical practice. *BioMed Eng OnLine* 13, 29.
- Milzani, A., DalleDonne, I., and Colombo, R. (1997). Prolonged Oxidative Stress on Actin. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 339, 267–274.

- Mir, L.M. (2006). Bases and rationale of the electrochemotherapy. *European Journal of Cancer Supplements* 4, 38–44.
- Mir, L.M., Orłowski, S., Belehradec, J., and Paoletti, C. (1991). Electrochemotherapy potentiation of antitumour effect of bleomycin by local electric pulses. *European Journal of Cancer and Clinical Oncology* 27, 68–72.
- Mir, L.M., Devauchelle, P., Quintin-Colonna, F., Delisle, F., Doliger, S., Fradelizi, D., Belehradec, J., and Orłowski, S. (1997). First clinical trial of cat soft-tissue sarcomas treatment by electrochemotherapy. *Br J Cancer* 76, 1617–1622.
- Mir, L.M., Bureau, M.F., Gehl, J., Rangara, R., Rouy, D., Caillaud, J.-M., Delaere, P., Branellec, D., Schwartz, B., and Scherman, D. (1999). High-efficiency gene transfer into skeletal muscle mediated by electric pulses. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 96, 4262–4267.
- Mir, L.M., Moller, P.H., André, F., and Gehl, J. (2005). Electric Pulse-Mediated Gene Delivery to Various Animal Tissues. In *Advances in Genetics*, (Elsevier), pp. 83–114.
- Mir, L.M., Gehl, J., Sersa, G., Collins, C.G., Garbay, J.-R., Billard, V., Geertsen, P.F., Rudolf, Z., O’Sullivan, G.C., and Marty, M. (2006). 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™ by means of invasive or non-invasive electrodes. *European Journal of Cancer Supplements* 4, 14–25.
- Mohanty, R., Chowdhury, C., Arega, S., Sen, P., Ganguly, P., and Ganguly, N. (2019). CAR T cell therapy: A new era for cancer treatment (Review). *Oncol Rep*.
- Moisan, M., Barbeau, J., Moreau, S., Pelletier, J., Tabrizian, M., and Yahia, L. (2001). Low-temperature sterilization using gas plasmas: a review of the experiments and an analysis of the inactivation mechanisms. *International Journal of Pharmaceutics* 226, 1–21.
- Morfill, G.E., Shimizu, T., Steffes, B., and Schmidt, H.-U. (2009). Nosocomial infections—a new approach towards preventive medicine using plasmas. *New J. Phys.* 11, 115019.
- Moscona, A. (1952). Cell suspensions from organ rudiments of chick embryos. *Experimental Cell Research* 3, 535–539.
- Mousa, S.A. (2018). Angiogenesis Inhibitors for Cancer Therapy. *BJSTR* 2.
- Mutschelknaus, L., Peters, C., Winkler, K., Yentrapalli, R., Heider, T., Atkinson, M.J., and Moertl, S. (2016). Exosomes Derived from Squamous Head and Neck Cancer Promote Cell Survival after Ionizing Radiation. *PLoS ONE* 11, e0152213.
- Nagy, J.A., Chang, S.-H., Shih, S.-C., Dvorak, A.M., and Dvorak, H.F. (2010). Heterogeneity of the Tumor Vasculature. *Semin Thromb Hemost* 36, 321–331.
- Nakamura, K., Peng, Y., Utsumi, F., Tanaka, H., Mizuno, M., Toyokuni, S., Hori, M., Kikkawa, F., and Kajiyama, H. (2017). Novel Intraperitoneal Treatment With Non-Thermal Plasma-Activated Medium Inhibits Metastatic Potential of Ovarian Cancer Cells. *Sci Rep* 7, 6085.

- Narayanan, G., Hosein, P.J., Arora, G., Barbery, K.J., Froud, T., Livingstone, A.S., Franceschi, D., Rocha Lima, C.M., and Yrizarry, J. (2012). Percutaneous Irreversible Electroporation for Downstaging and Control of Unresectable Pancreatic Adenocarcinoma. *Journal of Vascular and Interventional Radiology* 23, 1613–1621.
- Neumann, E., and Rosenheck, K. (1972). Permeability changes induced by electric impulses in vesicular membranes. *J. Membrin Biol.* 10, 279–290.
- Neumann, E., Toensing, K., Kakorin, S., Budde, P., and Frey, J. (1998). Mechanism of Electroporative Dye Uptake by Mouse B Cells. *Biophysical Journal* 74, 98–108.
- Ngo, M.-H.T., Liao, J.-D., Shao, P.-L., Weng, C.-C., and Chang, C.-Y. (2014). Increased Fibroblast Cell Proliferation and Migration Using Atmospheric N<sub>2</sub>/Ar Micro-Plasma for the Stimulated Release of Fibroblast Growth Factor-7: Stimulated Fibroblast Cell Functions by FGF7 Release. *Plasma Process. Polym.* 11, 80–88.
- Nishida, N., Yano, H., Nishida, T., Kamura, T., and Kojiro, M. (2006). Angiogenesis in Cancer. *Vasc Health Risk Manag* 2, 213–219.
- Oiseth, S.J., and Aziz, M.S. (2017). Cancer immunotherapy: a brief review of the history, possibilities, and challenges ahead. *JCMT* 3, 250.
- Oloumi, A., Lam, W., Banáth, J.P., and Olive, P.L. (2002). Identification of genes differentially expressed in V79 cells grown as multicell spheroids. *International Journal of Radiation Biology* 78, 483–492.
- Orlowski, S., Belehradek, J., Paoletti, C., and Mir, L.M. (1988). Transient electropermeabilization of cells in culture. *Biochemical Pharmacology* 37, 4727–4733.
- Overwijk, W.W., and Restifo, N.P. (2000). B16 as a Mouse Model for Human Melanoma. *Current Protocols in Immunology* 39.
- Pakhomov, A.G., Xiao, S., Pakhomova, O.N., Semenov, I., Kuipers, M.A., and Ibey, B.L. (2014). Disassembly of actin structures by nanosecond pulsed electric field is a downstream effect of cell swelling. *Bioelectrochemistry* 100, 88–95.
- Palenik, C.J., and Golden, L.C. (1994). Effectiveness of two types of sterilizers on the contents of sharps containers. *Am J Dent* 7, 98–102.
- Palmer, G.M., Fontanella, A.N., Shan, S., Hanna, G., Zhang, G., Fraser, C.L., and Dewhirst, M.W. (2011). In vivo optical molecular imaging and analysis in mice using dorsal window chamber models applied to hypoxia, vasculature and fluorescent reporters. *Nat Protoc* 6, 1355–1366.
- Papadopoulos, M.C., and Saadoun, S. (2015). Key roles of aquaporins in tumor biology. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* 1848, 2576–2583.
- Pardoll, D.M. (2012). The blockade of immune checkpoints in cancer immunotherapy. *Nat Rev Cancer* 12, 252–264.

- Pasquet, L., Chabot, S., Bellard, E., Markelc, B., Rols, M.-P., Reynes, J.-P., Tiraby, G., Couillaud, F., Teissie, J., and Golzio, M. (2018). Safe and efficient novel approach for non-invasive gene electrotransfer to skin. *Sci Rep* 8, 16833.
- Pasquet, L., Bellard, E., Chabot, S., Markelc, B., Rols, M.-P., Teissie, J., and Golzio, M. (2019). Pre-clinical investigation of the synergy effect of interleukin-12 gene-electro-transfer during partially irreversible electropermeabilization against melanoma. *J. Immunotherapy Cancer* 7, 161.
- Pavlin, M., Pavselj, N., and Miklavcic, D. (2002). Dependence of induced transmembrane potential on cell density, arrangement, and cell position inside a cell system. *IEEE Trans. Biomed. Eng.* 49, 605–612.
- Pavlin, M., Leben, V., and Miklavčič, D. (2007). Electroporation in dense cell suspension—Theoretical and experimental analysis of ion diffusion and cell permeabilization. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects* 1770, 12–23.
- Pavselj, N., Bregar, Z., Cukjati, D., Batiuskaite, D., Mir, L.M., and Miklavcic, D. (2005). The Course of Tissue Permeabilization Studied on a Mathematical Model of a Subcutaneous Tumor in Small Animals. *IEEE Trans. Biomed. Eng.* 52, 1373–1381.
- Pelofy, S., Teissié, J., Golzio, M., and Chabot, S. (2012). Chemically Modified Oligonucleotide—Increased Stability Negatively Correlates with Its Efficacy Despite Efficient Electrotransfer. *J Membrane Biol* 245, 565–571.
- Pereira, S., Pinto, E., Ribeiro, P.A., and Sério, S. (2019). Study of a Cold Atmospheric Pressure Plasma jet device for indirect treatment of Squamous Cell Carcinoma. *Clinical Plasma Medicine* 13, 9–14.
- Privat-Maldonado, A., Gorbanev, Y., Dewilde, S., Smits, E., and Bogaerts, A. (2018). Reduction of Human Glioblastoma Spheroids Using Cold Atmospheric Plasma: The Combined Effect of Short- and Long-Lived Reactive Species. *Cancers* 10, 394.
- Pron, G., Belehradec, J., Orlowski, S., and Mir, L.M. (1994). Involvement of membrane bleomycin-binding sites in bleomycin cytotoxicity. *Biochemical Pharmacology* 48, 301–310.
- Pron, G., Mahrour, N., Orlowski, S., Tounekti, O., Poddevin, B., Belehradec, J., and Mir, L.M. (1999). Internalisation of the bleomycin molecules responsible for bleomycin toxicity: a receptor-mediated endocytosis mechanism. *Biochemical Pharmacology* 57, 45–56.
- Pryor, W.A. (1986). Oxy-Radicals and Related Species: Their Formation, Lifetimes, and Reactions. *Annual Review of Physiology* 48, 657–667.
- Pucihar, G., Kotnik, T., Teissié, J., and Miklavčič, D. (2007). Electropermeabilization of dense cell suspensions. *Eur Biophys J* 36, 173–185.
- Puligundla, P., and Mok, C. (2018). Inactivation of spores by nonthermal plasmas. *World J Microbiol Biotechnol* 34, 143.
- Rankin, E., and Giaccia, A. (2008). The role of hypoxia-inducible factors in tumorigenesis. *Cell Death Differ* 15, 678–685.

- Remic, T., Sersa, G., Ursic, K., Cemazar, M., and Kamensek, U. (2020). Development of Tumor Cell-Based Vaccine with IL-12 Gene Electrotransfer as Adjuvant. *Vaccines* 8, 111.
- Rems, L., Viano, M., Kasimova, M.A., Miklavčič, D., and Tarek, M. (2019). The contribution of lipid peroxidation to membrane permeability in electroporation: A molecular dynamics study. *Bioelectrochemistry* 125, 46–57.
- Ricci-Vitiani, L., Pallini, R., Biffoni, M., Todaro, M., Invernici, G., Cenci, T., Maira, G., Parati, E.A., Stassi, G., Larocca, L.M., *et al.* (2010). Tumour vascularization via endothelial differentiation of glioblastoma stem-like cells. *Nature* 468, 824–828.
- Richter, J.A., and Kahaleh, M. (2010). Photodynamic therapy: Palliation and endoscopic technique in cholangiocarcinoma. *World J Gastrointest Endosc* 2, 357–361.
- Ringe, K.I., Lutat, C., Rieder, C., Schenk, A., Wacker, F., and Raatschen, H.-J. (2015). Experimental Evaluation of the Heat Sink Effect in Hepatic Microwave Ablation. *PLoS One* 10.
- Ringel-Scaia, V.M., Beitel-White, N., Lorenzo, M.F., Brock, R.M., Huie, K.E., Coutermarsh-Ott, S., Eden, K., McDaniel, D.K., Verbridge, S.S., Rossmesl, J.H., *et al.* (2019). High-frequency irreversible electroporation is an effective tumor ablation strategy that induces immunologic cell death and promotes systemic anti-tumor immunity. *EBioMedicine* 44, 112–125.
- Rols, M.-P. (2006). Electroporation, a physical method for the delivery of therapeutic molecules into cells. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* 1758, 423–428.
- Rols, M.-P., and Teissié, J. (1992). Experimental evidence for the involvement of the cytoskeleton in mammalian cell electroporation. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* 1111, 45–50.
- Rols, M.P., and Teissié, J. (1998). Electroporation of mammalian cells to macromolecules: control by pulse duration. *Biophys J* 75, 1415–1423.
- Rols, M.P., Femenia, P., and Teissie, J. (1995). Long-Lived Macropinocytosis Takes Place in Electroporated Mammalian Cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 208, 26–35.
- Rols, M.-P., Delteil, C., Golzio, M., Dumond, P., Cros, S., and Teissie, J. (1998). In vivo electrically mediated protein and gene transfer in murine melanoma. *16*, 4.
- Rols, M.P., Tamzali, Y., and Teissié, J. (2002). Electrochemotherapy of horses. A preliminary clinical report. *Bioelectrochemistry* 55, 101–105.
- Rosazza, C., Escoffre, J.-M., Zumbusch, A., and Rols, M.-P. (2011). The Actin Cytoskeleton Has an Active Role in the Electrotransfer of Plasmid DNA in Mammalian Cells. *Molecular Therapy* 19, 913–921.
- Rosazza, C., Deschout, H., Buntz, A., Braeckmans, K., Rols, M.-P., and Zumbusch, A. (2016). Endocytosis and Endosomal Trafficking of DNA After Gene Electrotransfer In Vitro. *Molecular Therapy - Nucleic Acids* 5, e286.

- Rossi, A., Pakhomova, O.N., Pakhomov, A.G., Weygandt, S., Bulysheva, A.A., Murray, L.E., Mollica, P.A., and Muratori, C. (2019a). Mechanisms and immunogenicity of nsPEF-induced cell death in B16F10 melanoma tumors. *Sci Rep* 9, 431.
- Rossi, A., N. Pakhomova, O., Mollica, P.A., Casciola, M., Mangalanathan, U., G. Pakhomov, A., and Muratori, C. (2019b). Nanosecond Pulsed Electric Fields Induce Endoplasmic Reticulum Stress Accompanied by Immunogenic Cell Death in Murine Models of Lymphoma and Colorectal Cancer. *Cancers (Basel)* 11.
- Rumbach, P., Witzke, M., Sankaran, R.M., and Go, D.B. (2013). Decoupling Interfacial Reactions between Plasmas and Liquids: Charge Transfer vs Plasma Neutral Reactions. *J. Am. Chem. Soc.* 135, 16264–16267.
- Saadati, F., Mahdikia, H., Abbaszadeh, H.-A., Abdollahifar, M.-A., Khoramgah, M.S., and Shokri, B. (2018). Comparison of Direct and Indirect cold atmospheric-pressure plasma methods in the B16F10 melanoma cancer cells treatment. *Sci Rep* 8, 7689.
- Saito, K., Asai, T., Fujiwara, K., Sahara, J., Koguchi, H., Fukuda, N., Suzuki-Karasaki, M., Soma, M., and Suzuki-Karasaki, Y. (2016). Tumor-selective mitochondrial network collapse induced by atmospheric gas plasma-activated medium. *Oncotarget* 7.
- Samukawa, S., Hori, M., Rauf, S., Tachibana, K., Bruggeman, P., Kroesen, G., Whitehead, J.C., Murphy, A.B., Gutsol, A.F., Starikovskaia, S., *et al.* (2012). The 2012 Plasma Roadmap. *J. Phys. D: Appl. Phys.* 45, 253001.
- Sato, Y., Yamada, S., Takeda, S., Hattori, N., Nakamura, K., Tanaka, H., Mizuno, M., Hori, M., and Kodera, Y. (2018). Effect of Plasma-Activated Lactated Ringer's Solution on Pancreatic Cancer Cells In Vitro and In Vivo. *Ann Surg Oncol* 25, 299–307.
- Sauer, H., Pütz, V., Fischer, K., Hescheler, J., and Wartenberg, M. (1999). Increased doxorubicin uptake and toxicity in multicellular tumour spheroids treated with DC electrical fields. *British Journal of Cancer* 80, 1204–1213.
- Schmolka, I.R. (1994). Physical Basis for Poloxamer Interactions. *Annals of the New York Academy of Sciences* 720, 92–97.
- Schreiber, R.D., Old, L.J., and Smyth, M.J. (2011). Cancer Immunoediting: Integrating Immunity's Roles in Cancer Suppression and Promotion. *Science* 331, 1565–1570.
- Scott, A.M., Allison, J.P., and Wolchok, J.D. (2012). Monoclonal antibodies in cancer therapy. *Cancer Immun* 12.
- Selcuk, M., Oksuz, L., and Basaran, P. (2008). Decontamination of grains and legumes infected with *Aspergillus* spp. and *Penicillium* spp. by cold plasma treatment. *Bioresource Technology* 99, 5104–5109.
- Šemrov, D., and Miklavcic, D. (2000). Numerical Modeling for In Vivo Electroporation. In *Electrochemotherapy, Electrogenotherapy, and Transdermal Drug Delivery*, (New Jersey: Humana Press), pp. 63–81.

Seror, O. (2015). Ablative therapies: Advantages and disadvantages of radiofrequency, cryotherapy, microwave and electroporation methods, or how to choose the right method for an individual patient? *Diagnostic and Interventional Imaging* 96, 617–624.

Sersa, G., Miklavc, D., Cemazar, M., Belehradek, J., Jarm, T., and Mir, L.M. (1997). Electrochemotherapy with CDDP on LPB sarcoma: comparison of the anti-tumor effectiveness in immunocompetent and immunodeficient mice. 279–283.

Serša, G., Beravs, K., Čemazar, M., Miklavc, D., and Demsar, F. (1998). Contrast Enhanced MRI Assessment of Tumor Blood Volume After Application of Electric Pulses. *Electro- and Magnetobiology* 17, 299–306.

Sersa, G., Jarm, T., Kotnik, T., Coer, A., Podkrajsek, M., Sentjurc, M., Miklavcic, D., Kadivec, M., Kranjc, S., Secerov, A., *et al.* (2008). Vascular disrupting action of electroporation and electrochemotherapy with bleomycin in murine sarcoma. *British Journal of Cancer* 98, 388–398.

Shackelford, R.E., Kaufmann, W.K., and Paules, R.S. (2000). Oxidative stress and cell cycle checkpoint function. 18.

Sharma, P., and Allison, J.P. (2015). Immune Checkpoint Targeting in Cancer Therapy: Toward Combination Strategies with Curative Potential. *Cell* 161, 205–214.

Shi, L., Yu, L., Zou, F., Hu, H., Liu, K., and Lin, Z. (2017). Gene expression profiling and functional analysis reveals that p53 pathway-related gene expression is highly activated in cancer cells treated by cold atmospheric plasma-activated medium. *PeerJ* 5, e3751.

Shintani, H., SAKUDO, A., BURKE, P., and McDONNELL, G. (2010). Gas plasma sterilization of microorganisms and mechanisms of action. *Exp Ther Med* 1, 731–738.

Shirakashi, R., Sukhorukov, V.L., Tanasawa, I., and Zimmermann, U. (2004). Measurement of the permeability and resealing time constant of the electroporated mammalian cell membranes. *International Journal of Heat and Mass Transfer* 47, 4517–4524.

Silk, M., Tahour, D., Srimathveeravalli, G., Solomon, S., and Thornton, R. (2014). The State of Irreversible Electroporation in Interventional Oncology. *Seminars in Interventional Radiology* 31, 111–117.

Simon, C.J., Dupuy, D.E., and Mayo-Smith, W.W. (2005). Microwave Ablation: Principles and Applications. *RadioGraphics* 25, S69–S83.

Sindram, D., Lau, K.N., Martinie, J.B., and Iannitti, D.A. (2010). Hepatic Tumor Ablation. *Surgical Clinics of North America* 90, 863–876.

Siska, P.J., Singer, K., Evert, K., Renner, K., and Kreutz, M. The immunological Warburg effect: Can a metabolic-tumor-stroma score (MeTS) guide cancer immunotherapy? *Immunological Reviews* *n/a*.

Skeate, J.G., Da Silva, D.M., Chavez-Juan, E., Anand, S., Nuccitelli, R., and Kast, W.M. (2018). Nano-Pulse Stimulation induces immunogenic cell death in human papillomavirus-transformed tumors and initiates an adaptive immune response. *PLoS ONE* 13, e0191311.

- Sorrin, A.J., Ruhi, M.K., Ferlic, N.A., Karimnia, V., Polacheck, W.J., Celli, J.P., Huang, H.-C., and Rizvi, I. (2020). Photodynamic Therapy and the Biophysics of the Tumor Microenvironment. *Photochemistry and Photobiology* *96*, 232–259.
- Spang-Thomsen, M., and Visfeldt, J. (1976). Homozygous nu/nu mice with transplanted human malignant tumors. *Am J Pathol* *84*, 193–196.
- Steuer, A., Wolff, C.M., von Woedtke, T., Weltmann, K.-D., and Kolb, J.F. (2018). Cell stimulation versus cell death induced by sequential treatments with pulsed electric fields and cold atmospheric pressure plasma. *PLoS ONE* *13*, e0204916.
- Su, S., and Wu, Y.-L. (2017). Clinical trials of tyrosine kinase inhibitors for lung cancer in China: a review. *J Hematol Oncol* *10*, 147.
- Sukharev, S.I., Klenchin, V.A., Serov, S.M., Chernomordik, L.V., and Chizmadzhev YuA (1992). Electroporation and electrophoretic DNA transfer into cells. The effect of DNA interaction with electropores. *Biophys J* *63*, 1320–1327.
- Susil, R., Šemrov, D., and Miklavčič, D. (1998). Electric Field-Induced Transmembrane Potential Depends on Cell Density and Organizatio. *Electro- and Magnetobiology* *17*, 391–399.
- Sutherland, R. (1988). Cell and environment interactions in tumor microregions: the multicell spheroid model. *Science* *240*, 177–184.
- Sutherland, R.M., Inch, W.R., McCredie, J.A., and Kruuv, J. (1970). A Multi-component Radiation Survival Curve Using an *in Vitro* Tumour Model. *International Journal of Radiation Biology and Related Studies in Physics, Chemistry and Medicine* *18*, 491–495.
- Sutherland, R.M., McCredie, J.A., and Rodger Inch, W. (1971). Growth of Multicell Spheroids in Tissue Culture as a Model of Nodular Carcinomas. *Journal of the National Cancer Institute*.
- Takeda, S., Yamada, S., Hattori, N., Nakamura, K., Tanaka, H., Kajiyama, H., Kanda, M., Kobayashi, D., Tanaka, C., Fujii, T., *et al.* (2017). Intraperitoneal Administration of Plasma-Activated Medium: Proposal of a Novel Treatment Option for Peritoneal Metastasis From Gastric Cancer. *Ann Surg Oncol* *24*, 1188–1194.
- Taketo, A. (1988). DNA transfection of *Escherichia coli* by electroporation. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Gene Structure and Expression* *949*, 318–324.
- Tamzali, Y., Borde, L., Rols, M.P., Golzio, M., Lyazrhi, F., and Teissie, J. (2012). Successful treatment of equine sarcoids with cisplatin electrochemotherapy: A retrospective study of 48 cases: Cisplatin electrochemotherapy of equine sarcoid. *Equine Veterinary Journal* *44*, 214–220.
- Tanaka, H., Mizuno, M., Ishikawa, K., Nakamura, K., Kajiyama, H., Kano, H., Kikkawa, F., and Hori, M. (2011). Plasma-Activated Medium Selectively Kills Glioblastoma Brain Tumor Cells by Down-Regulating a Survival Signaling Molecule, AKT Kinase. *Plasma Med* *1*, 265–277.

- Tanaka, H., Mizuno, M., Ishikawa, K., Nakamura, K., Utsumi, F., Kajiyama, H., Kano, H., Maruyama, S., Kikkawa, F., and Hori, M. (2012). Cell survival and proliferation signaling pathways are downregulated by plasma-activated medium in glioblastoma brain tumor cells. *Plasma Med* 2, 207–220.
- Tanaka, H., Nakamura, K., Mizuno, M., Ishikawa, K., Takeda, K., Kajiyama, H., Utsumi, F., Kikkawa, F., and Hori, M. (2016). Non-thermal atmospheric pressure plasma activates lactate in Ringer's solution for anti-tumor effects. *Sci Rep* 6, 36282.
- Tannock, I.F., Lee, C.M., Tunggal, J.K., Cowan, D.S.M., and Egorin, M.J. (2002). Limited Penetration of Anticancer Drugs through Tumor Tissue: A Potential Cause of Resistance of Solid Tumors to Chemotherapy. 8.
- Tarek, M. (2005). Membrane Electroporation: A Molecular Dynamics Simulation. *Biophys J* 88, 4045–4053.
- Tauffenberger, A., Fiumelli, H., Almustafa, S., and Magistretti, P.J. (2019). Lactate and pyruvate promote oxidative stress resistance through hormetic ROS signaling. *Cell Death Dis* 10, 653.
- Teissie, J. (2007). Biophysical effects of electric fields on membrane water interfaces: a mini review. *Eur Biophys J* 36, 967–972.
- Teissié, J., and Rols, M.P. (1993). An experimental evaluation of the critical potential difference inducing cell membrane electropermeabilization. *Biophysical Journal* 65, 409–413.
- Teissié, J., Eynard, N., Gabriel, B., and Rols, M.P. (1999). Electropermeabilization of cell membranes. *Advanced Drug Delivery Reviews* 35, 3–19.
- Teissie, J., Golzio, M., and Rols, M.P. (2005). Mechanisms of cell membrane electropermeabilization: A minireview of our present (lack of?) knowledge. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects* 1724, 270–280.
- Theodorescu, D. (2004). Cancer Cryotherapy: Evolution and Biology. *Rev Urol* 6, S9–S19.
- Tieleman, D.P. (2004). The molecular basis of electroporation. *BMC Biochem* 5, 10.
- Tinari, A., Garofalo, T., Sorice, M., Esposti, M.D., and Malorni, W. (2007). Mitoptosis: Different Pathways for Mitochondrial Execution. *Autophagy* 3, 282–284.
- Titomirov, A.V., Sukharev, S., and Kistanova, E. (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, 131–134.
- Tiwari, B.S., Belenghi, B., and Levine, A. (2002). Oxidative Stress Increased Respiration and Generation of Reactive Oxygen Species, Resulting in ATP Depletion, Opening of Mitochondrial Permeability Transition, and Programmed Cell Death. *Plant Physiol.* 128, 1271–1281.
- Tornin, J., Mateu-Sanz, M., Rodríguez, A., Labay, C., Rodríguez, R., and Canal, C. (2019). Pyruvate Plays a Main Role in the Antitumoral Selectivity of Cold Atmospheric Plasma in Osteosarcoma. *Sci Rep* 9, 10681.

- Trachootham, D., Alexandre, J., and Huang, P. (2009). Targeting cancer cells by ROS-mediated mechanisms: a radical therapeutic approach? *Nat Rev Drug Discov* 8, 579–591.
- Utsumi, F., KAJIYAMA, H., Nakamura, K., Tanaka, H., Mizuno, M., Toyokuni, S., Hori, M., and Kikkawa, F. (2016). Variable susceptibility of ovarian cancer cells to non-thermal plasma-activated medium. *Oncol Rep* 35, 3169–3177.
- Valic, B., Golzio, M., Pavlin, M., Schatz, A., Faurie, C., Gabriel, B., Teissié, J., Rols, M.-P., and Miklavcic, D. (2003). Effect of electric field induced transmembrane potential on spheroidal cells: theory and experiment. *European Biophysics Journal* 32, 519–528.
- Van Boxem, W., Van der Paal, J., Gorbanev, Y., Vanuytsel, S., Smits, E., Dewilde, S., and Bogaerts, A. (2017). Anti-cancer capacity of plasma-treated PBS: effect of chemical composition on cancer cell cytotoxicity. *Sci Rep* 7, 16478.
- Van den Broeke, A., and Burny, A. (2003). Retroviral Vector Biosafety: Lessons from Sheep. *J Biomed Biotechnol* 2003, 9–12.
- Van Straten, D., Mashayekhi, V., de Bruijn, H.S., Oliveira, S., and Robinson, D.J. (2017). Oncologic Photodynamic Therapy: Basic Principles, Current Clinical Status and Future Directions. *Cancers (Basel)* 9.
- Vaughan, E.E., and Dean, D.A. (2006). Intracellular trafficking of plasmids during transfection is mediated by microtubules. *Mol Ther* 13, 422–428.
- Verkman, A.S. (2012). Aquaporins in Clinical Medicine. *Annual Review of Medicine* 63, 303–316.
- Vernier, P.T., Levine, Z.A., Wu, Y.-H., Joubert, V., Ziegler, M.J., Mir, L.M., and Tieleman, D.P. (2009). Electroporating Fields Target Oxidatively Damaged Areas in the Cell Membrane. *PLoS One* 4.
- Wada, N., Ikeda, J., Tanaka, H., Sakakita, H., Hori, M., Ikehara, Y., and Morii, E. (2017). Effect of plasma-activated medium on the decrease of tumorigenic population in lymphoma. *Pathology - Research and Practice* 213, 773–777.
- Ware, M.J., Keshishian, V., Law, J.J., Ho, J.C., Favela, C.A., Rees, P., Smith, B., Mohammad, S., Hwang, R.F., Rajapakshe, K., *et al.* (2016). Generation of an in vitro 3D PDAC stroma rich spheroid model. *Biomaterials* 108, 129–142.
- Wasungu, L., Escoffre, J.-M., Valette, A., Teissie, J., and Rols, M.-P. (2009). A 3D in vitro spheroid model as a way to study the mechanisms of electroporation. *International Journal of Pharmaceutics* 379, 278–284.
- Weber, S.M., Lee, F.T., Chinn, D.O., Warner, T., Chosy, S.G., and Mahvi, D.M. (1997). Perivascular and intralesional tissue necrosis after hepatic cryoablation: Results in a porcine model. *Surgery* 122, 742–747.
- Weiner, G.J. (2010). Rituximab: mechanism of action. *Semin Hematol* 47, 115–123.
- Wende, K., Williams, P., Dalluge, J., Van Gaens, W., Aboubakr, H., Bischof, J., von Woedtke, T., Goyal, S.M., Weltmann, K.-D., Bogaerts, A., *et al.* (2015). Identification of the

biologically active liquid chemistry induced by a nonthermal atmospheric pressure plasma jet. *Biointerphases* 10, 029518.

Wirtz, M., Stoffels, I., Dissemond, J., Schadendorf, D., and Roesch, A. (2018). Actinic keratoses treated with cold atmospheric plasma. *J Eur Acad Dermatol Venereol* 32, e37–e39.

Wolff, C.M., Kolb, J.F., Weltmann, K.-D., von Woedtke, T., and Bekeschus, S. (2020). Combination Treatment with Cold Physical Plasma and Pulsed Electric Fields Augments ROS Production and Cytotoxicity in Lymphoma. *Cancers* 12, 845.

Wong-ekkabut, J., Xu, Z., Triampo, W., Tang, I.-M., Peter Tieleman, D., and Monticelli, L. (2007). Effect of Lipid Peroxidation on the Properties of Lipid Bilayers: A Molecular Dynamics Study. *Biophysical Journal* 93, 4225–4236.

Yamaoka, T., Kusumoto, S., Ando, K., Ohba, M., and Ohmori, T. (2018). Receptor Tyrosine Kinase-Targeted Cancer Therapy. *Int J Mol Sci* 19.

Yan, D., Talbot, A., Nourmohammadi, N., Cheng, X., Canady, J., Sherman, J.H., and Keidar, M. (2015a). Principles of using Cold Atmospheric Plasma Stimulated Media for Cancer Treatment. *Scientific Reports* 5, 17.

Yan, D., Talbot, A., Nourmohammadi, N., Sherman, J.H., Cheng, X., and Keidar, M. (2015b). Toward understanding the selective anticancer capacity of cold atmospheric plasma—A model based on aquaporins (Review). *Biointerphases* 10, 040801.

Yan, D., Sherman, J.H., and Keidar, M. (2016). Cold atmospheric plasma, a novel promising anti-cancer treatment modality. *Oncotarget* 8, 15977–15995.

Yan, D., Cui, H., Zhu, W., Nourmohammadi, N., Milberg, J., Zhang, L.G., Sherman, J.H., and Keidar, M. (2017a). The Specific Vulnerabilities of Cancer Cells to the Cold Atmospheric Plasma-Stimulated Solutions. *Sci Rep* 7, 4479.

Yan, D., Xiao, H., Zhu, W., Nourmohammadi, N., Zhang, L.G., Bian, K., and Keidar, M. (2017b). The role of aquaporins in the anti-glioblastoma capacity of the cold plasma-stimulated medium. *J. Phys. D: Appl. Phys.* 50, 055401.

Yoshii, S.R., and Mizushima, N. (2017). Monitoring and Measuring Autophagy. *IJMS* 18, 1865.

Yoshikawa, N., Liu, W., Nakamura, K., Yoshida, K., Ikeda, Y., Tanaka, H., Mizuno, M., Toyokuni, S., Hori, M., Kikkawa, F., *et al.* (2020). Plasma-activated medium promotes autophagic cell death along with alteration of the mTOR pathway. *Sci Rep* 10, 1614.

Yousfi, M., Eichwald, O., Merbahi, N., and Jomaa, N. (2012). Analysis of ionization wave dynamics in low-temperature plasma jets from fluid modeling supported by experimental investigations. *Plasma Sources Sci. Technol.* 21, 045003.

Yousfi, M., Merbahi, N., Pathak, A., and Eichwald, O. (2014). Low-temperature plasmas at atmospheric pressure: toward new pharmaceutical treatments in medicine. *Fundam Clin Pharmacol* 28, 123–135.

- Yusupov, M., Van der Paal, J., Neyts, E.C., and Bogaerts, A. (2017). Synergistic effect of electric field and lipid oxidation on the permeability of cell membranes. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects* *1861*, 839–847.
- Zaharoff, D.A., Barr, R.C., Li, C.-Y., and Yuan, F. (2002). Electromobility of plasmid DNA in tumor tissues during electric field-mediated gene delivery. *Gene Ther* *9*, 1286–1290.
- Zanoni, M., Piccinini, F., Arienti, C., Zamagni, A., Santi, S., Polico, R., Bevilacqua, A., and Tesei, A. (2016). 3D tumor spheroid models for in vitro therapeutic screening: a systematic approach to enhance the biological relevance of data obtained. *Sci Rep* *6*.
- Zhang, Y., and Weinberg, R.A. (2018). Epithelial-to-mesenchymal transition in cancer: complexity and opportunities. *Frontiers of Medicine* *12*, 361–373.
- Zhang, J.-P., Guo, L., Chen, Q.-L., Zhang, K.-Y., Wang, T., An, G.-Z., Zhang, X.-F., Li, H.-P., and Ding, G.-R. (2019). Effects and mechanisms of cold atmospheric plasma on skin wound healing of rats. *Contributions to Plasma Physics* *59*, 92–101.
- Zhivotovsky, B., and Kroemer, G. (2004). Apoptosis and genomic instability. *Nat Rev Mol Cell Biol* *5*, 752–762.
- Zhu, S., Wang, K., Gan, S., Xu, J., Xu, S., and Sun, S. (2013). Expression of aquaporin8 in human astrocytomas: Correlation with pathologic grade. *Biochemical and Biophysical Research Communications* *440*, 168–172.
- Zhu, Y., Li, C., Cui, H., and Lin, L. (2020). Feasibility of cold plasma for the control of biofilms in food industry. *Trends in Food Science & Technology* *99*, 142–151.
- Ziegler, U., and Groscurth, P. (2004). Morphological Features of Cell Death. *Physiology* *19*, 124–128.
- Zimna, A., and Kurpisz, M. (2015). Hypoxia-Inducible Factor-1 in Physiological and Pathophysiological Angiogenesis: Applications and Therapies. *Biomed Res Int* *2015*.