HAL open science

Réponses cellulaires et tissulaires de la peau humaine à l'application d'un champ électrique externe de type électroporation

Sara Gouardères

▶ **To cite this version:**

Sara Gouardères. Réponses cellulaires et tissulaires de la peau humaine à l'application d'un champ électrique externe de type électroporation. Biologie moléculaire. Université Paul Sabatier - Toulouse III, 2021. Français. NNT : 2021TOU30236 . tel-04390881

HAL Id: tel-04390881

https://theses.hal.science/tel-04390881

Submitted on 12 Jan 2024

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

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

Sara GOUARDERES

Le 17 décembre 2021

Réponses cellulaires et tissulaires de la peau humaine à l'application d'un champ électrique externe de type électroporation

---

Ecole doctorale : **SDM - SCIENCES DE LA MATIERE - Toulouse**

Spécialité : **Chimie-Biologie-Santé**

Unité de recherche :
IMRCP - Laboratoire des Interactions Moléculaires et Réactivité Chimique et Photochimique

Thèse dirigée par
Mme Laure Gibot

Jury
M. Walid RACHIDI, Rapporteur
Mme Christelle BONOD, Rapporteure
M. Pierre FOURNIE, Examinateur
M. Serge MORDON, Examinateur
Mme Laure GIBOT, Directrice de thèse

« I’m just a child who has never grown up and keeps asking these “how” and “why” questions. Occasionally, I find an answer. »

Stephen Hawking

Remerciements

Je tiens tout d'abord à remercier mes deux rapporteurs pour avoir accepté d'évaluer ce travail de thèse, Mme Christelle Bonod et Mr Walid Rachidi, ainsi que Mr Pierre Fournié et Mr Serge Mordon d'avoir accepté de faire partie de mon jury en tant qu'examinateurs.

Un merci particulier à ma directrice de thèse Laure Gibot pour m'avoir fait confiance, pour ses conseils et pour tout ce qu'elle m'a transmis. Merci de m'avoir aidée à me surpasser et à prendre confiance en moi. Tu as toujours été disponible et tes suggestions ont largement contribué à la réussite de cette thèse. Merci de m'avoir conduite sur les routes sinueuses du doctorat aussi bien que sur celles de Transylvanie.

Merci au directeur des IMRCP, Christophe Mingotaud, de m'avoir accueillie comme biologiste dans le laboratoire. Merci aux membres de l'équipe IDeAS, en particulier à Anne-Françoise Mingotaud et Patricia Vicendo pour leurs très précieux conseils et leur participation active aux discussions scientifiques autour de ce projet ; à Clément Roux pour m'avoir prêté son matériel et m'avoir aidée en matière de photographie ; et à Stéphane Gineste grâce à qui tout problème trouve sa solution.

Merci à tous les collaborateurs qui ont permis de mener à bien ce travail : Layal Doumard ; les membres du CIRIMAT « phypol », Camille Ober, Jany Danduran et Valérie Samouillan ; les collaborateurs du projet plasma, Aurélie Marches, Nofel Merbahi et Michel Simon.

Un grand merci également à toute l'équipe de la plateforme de microscopie électronique et spécialement à Isabelle Fourquaux pour la préparation minutieuse de nos échantillons.

Une pensée aux élèves et collègues que j'ai croisés pendant mes années d'enseignement, qui ont rendu cette expérience merveilleusement enrichissante et m'ont donné l'envie de poursuivre dans cette voie.

Merci à tous mes collègues et amis non-permanents, passés et présents, tout particulièrement à Camille, Marjorie, Judith, Orélia, Nadiia, Alexis et Maxime pour leur soutien indéfectible et pour tous les moments d'amitié partagés au labo et en dehors. Merci à tous pour les parties de tarots endiablées.

Merci et félicitations aux bientôt docteurs : Camille, Valentin, Julien, Léonie, … à nos jeudis soir au Mumu.

Merci à mes amies pour leurs encouragements et leur présence dans ma vie depuis tant d'années : Alice, Valentine, Aurélie, Clotilde.

Merci Lys et Patrick pour votre aide de relecture du manuscrit,

Merci aux membres de ma famille, mes parents pour m'avoir donné le goût des sciences et pour avoir développé ma curiosité depuis mon enfance, mes grands-parents qui ont toujours su me remonter le moral quand il le fallait. C'est grâce à vous que j'en suis là. Merci encore et toujours à ma sœur d'être mon pilier et de me soutenir dans tous mes choix.

Louis, merci d'être le phare qui me ramène au port.

Résumé

Les cellules cutanées sont naturellement électrosensibles, en raison de l'existence d'un potentiel électrique transépithélial endogène. L'application d'un champ électrique exogène pulsé (i.e électroporation) est utilisée en clinique humaine et vétérinaire pour le traitement local des cancers cutanés (électrochimiothérapie, ECT) et pour le transfert de gène (électrotransfert de gène, GET). L'hypothèse de ce projet de thèse est donc que le champ électrique seul, appliqué en ECT et en GET, peut affecter le comportement des cellules cutanées, moduler le remodelage de la matrice extracellulaire par les fibroblastes, promouvoir l'angiogenèse, et stimuler la migration et de la différenciation des kératinocytes. Ainsi, les objectifs de ce travail étaient de comprendre, visualiser et quantifier les réponses des cellules cutanées à la suite de l'application d'un champ électrique externe de type électroporation. Les études réalisées sur des cultures en 2D indiquent que l'électroporation directe des fibroblastes dermiques ne modifie ni leur prolifération ni leur migration. D'autre part, bien que les paramètres électriques appliqués assurent 100% d'électroperméabilisation réversible, une apoptose légère apparaît dans environ 30% de la population soumise aux champs électriques à l'intensité la plus élevée. Cette apoptose semble être la conséquence de la génération de stress mitochondrial. Fait intéressant, le sécrétome des cellules apoptotiques améliore significativement la migration de fibroblastes non exposés, vraisemblablement *via* une sécrétion accrue de facteurs de croissance des cellules exposées. Ensuite, un modèle de substitut dermique humain reconstruit par ingénierie tissulaire a été utilisé pour réaliser une analyse multi-échelle des processus électro-induits au niveau tissulaire. Nous avons démontré que le feuillet dermique est un modèle polarisé très riche en matrice extracellulaire endogène et que le haut degré de complexité de celle-ci en fait un modèle de choix pour l'étude du remodelage matriciel. Nos résultats montrent que les champs électriques de type électroporation induisent une modulation rapide des gènes associés au matrisome (c'est-à-dire les gènes codants des protéines de la matrice extracellulaire ou des protéines qui y sont associées), en particulier une régulation à la baisse des enzymes de maturation telles que la transglutaminase TG2 et la lysyl-oxydase like LOXL4. De plus, une diminution transitoire de la production du pro-collagène de type 1a1 et de la teneur en hydroxyproline dans le tissu a lieu dans la semaine suivant l'électroporation. Ce remodelage du collagène est principalement dépendant des MMPs en raison de leur suractivation ROS-dépendante. De plus, nos données démontrent que les champs de type électroporation régulent à la baisse le TGF-β (ARNm et protéine), un acteur clé de la fibrose pathologique. En outre, les fibroblastes dermiques électroporés sécrètent massivement des facteurs de croissances pro-angiogéniques tels que le FGFb, le VEGFA et le PDGFA. Le sécrétome de fibroblastes dermiques électroporés favorise ainsi la migration en 2D des cellules endothéliales non électroporés ainsi que la formation de réseaux vasculaires en 3D. En conclusion, ces travaux mettent en lumière la pertinence de l'utilisation de champs électriques pulsés comme stratégie de remodelage de l'environnement matriciel et vasculaire. Ces recherches présentent un fort potentiel translationnel car l'électroporation est déjà utilisée en clinique et des appareils validés sont disponibles, ce qui ouvre de nombreuses perspectives pour d'autres applications cliniques de cette technologie.

Abstract

Skin cells are electrosensitive, due to the existence of an endogenous transepithelial electrical potential. The application of a pulsed exogenous electric field is used in human and veterinary clinics for the local treatment of skin cancers (electrochemotherapy, ECT) and for gene transfer (gene electrotransfer, GET). The hypothesis of this thesis project is therefore that the electric field alone, applied during ECT and GET, can affect skin cells behavior, modulate extracellular matrix remodeling by fibroblasts, promote angiogenesis, and stimulate keratinocytes migration and differentiation. Thus, the objectives of this thesis were to understand, visualize and quantify the responses of skin cells following the application of an electroporation-type electric field. Studies carried out on 2D cultures indicate that direct electroporation of dermal fibroblasts does not modify their proliferation or migration properties. On the other hand, although the applied electrical parameters ensure 100% reversible electropermeabilisation, apoptosis occurs in about 30% of the population subjected to electric fields at the highest intensity. This apoptosis appears to be the consequence of mitochondrial stress generation. Interestingly, the secretome of apoptotic cells significantly enhances unexposed fibroblasts migration, presumably *via* an increased growth factors secretion from exposed cells. Then, one tissue-engineered human dermal substitute model was used to perform a multiscale analysis of electro-induced processes. Our results show that electroporation-type electric fields induce a rapid modulation of mRNA's genes composing the matrisome (i.e. genes encoding extracellular matrix proteins or associated-proteins), particularly a down-regulation of maturation enzymes such as transglutaminase TG2 and lysyl oxidase like LOXL4. In addition, a transient decrease in pro-collagen type 1a1 production and hydroxyproline content in the tissue occurs within a week after electroporation. This collagen remodeling is mainly dependent on MMPs due to their long-lasting ROS-dependent activation. In addition, our data demonstrate that electroporation-type electric fields downregulate TGF-β (mRNA and protein), a key player in pathological fibrosis. In addition, electroporated dermal fibroblasts massively secrete proangiogenic growth factors such as FGFb, VEGFA and PDGFA. The secretome of electroporated dermal fibroblasts thus promotes the migration of non-electroporated endothelial cells in 2D as well as the formation of vascular networks in 3D. In conclusion, this work sheds light on the relevance of the use of pulsed electric fields as a strategy for matrix and vascular remodeling. This research has strong translational potential since electroporation is already used in clinic and validated devices are available, which opens up many perspectives for other clinical applications of this technology.

Production scientifique

Cette thèse poursuivie entre le 1er novembre 2018 et le 31 décembre 2021 a été financée par **l'ANR JCJC WHEEL** (ANR-17-CE19-0013-01).

Ce projet a été encadré par le **Dr Laure Gibot** au sein du Laboratoire des Interactions Moléculaires et Réactivité Chimique et Photochimique IMRCP dans l'équipe IDeAS (Interfaces Dynamiques et Assemblages Stimulables) sur le site de l'Université Toulouse 3 Paul Sabatier.

Les travaux présentés dans ce manuscrit ont fait l'objet de **trois articles scientifiques** sur lesquels je suis première auteure : le premier dans le journal Bioelectrochemistry (2020, doi: 10.1016/j.bioelechem.2020.107531) sur l'influence des champs électriques sur les propriétés prolifératives et migratoires de fibroblastes dermiques cultivés en monocouche, le deuxième dans le Journal of Investigative Dermatology (2021, doi: 10.1016/j.jid.2021.09.025) sur les mécanismes cellulaires expliquant le remodelage transitoire de la matrice extracellulaire dans un substitut tissulaire dermique suite à une exposition aux champs électriques pulsés, résultats valorisés par un **communiqué de presse national** du CNRS, et un troisième dans Bioelectrochemistry (2021, sous presse) sur un projet parallèle portant sur l'étude de l'effet d'un jet de plasma froid d'hélium sur le remodelage des collagènes dans un modèle de substitut dermique, projet financé par le GDR HAPPYBIO. Je suis également première auteure d'**une revue** dans Expert Opinion in Drug Delivery (2020, doi: 10.1080/17425247.2020.1814735) sur les approches thérapeutiques physiques pour remodeler localement le réseau vasculaire et le compartiment matriciel dans un contexte tumoral.

Mes travaux ont été présentés lors de **trois communications orales** au GDR HAPPYBIO en novembre 2020, au Symposium international de bioélectrochimie en Mai 2021, ainsi qu'au Congrès joint des sociétés allemandes et françaises de la matrice extracellulaire en Mai 2021. Ils ont fait l'objet de **deux présentations de posters** au Congrès annuel de la Société Française de Biologie de la Matrice Extracellulaire en Mai 2019 et au Workshop International d'Electroporation à Ljubljana (Slovénie) en novembre 2019. J'ai reçu **deux bourses** de voyage qui m'ont permis de partir en congrès, une de la Société Française de Biologie de la Matrice extracellulaire (300€), et une de la société TEBU-Bio (400€).

Pendant cette thèse j'ai eu l'opportunité d'avoir des expériences à l'international grâce au Workshop International d'Electroporation qui s'est tenu pendant une semaine à Ljubljana **(Slovénie, 2018)** et au programme scientifique PHC BRANCUSI qui m'a permis de passer une semaine au National Institute for Physics and Nuclear Engineering de Bucarest **(Roumanie, 2019)** dans le cadre d'une collaboration entre nos deux laboratoires sur la vectorisation de peptides antimicrobiens. Enfin, le programme Samuel De Champlain m'a permis de réaliser une mission d'un mois à Québec **(Canada, 2021)** au laboratoire d'organogénèse expérimentale (LOEX) afin de travailler sur un projet visant à étudier le potentiel antitumoral de micelles contenant un photosensibilisateur pour la photothérapie dynamique du cancer de la vessie.

Durant cette thèse j'ai également encadré **un stagiaire de Licence** pendant 4 semaines et **enseigné l'embryologie** pendant 2 ans à la faculté sciences et ingénierie de l'Université Paul Sabatier dans le cadre d'un contrat DCE.

Enfin, je me suis investie au sein du **conseil de laboratoire** en tant que représentante du corps des non-permanents (Doctorants et CDD).

Table des matières

Liste des abréviations ..... a
Liste des figures c
Liste des tableaux l
Liste des annexes ..... m
I. Introduction bibliographique 1
1. L'électroporation 3
a. Théorie et principes 3
b. Applications cliniques de l'électroporation 8
i. L'électrochimiothérapie (ECT) 8
ii. L'électrotransfert de gène (GET) 9
iii. L'électroporation irréversible (IRE) 10
2. La peau humaine 11
a. Structure et fonctions 11
iv. L'épiderme 11
v. Le derme 14
3. Les modèles de recherche sur la peau 23
a. In vivo 23
b. Ex vivo 24
c. In vitro 25
i. Modèles 2D 25
ii. L'ingénierie tissulaire 25
iii. L'auto-assemblage 26
iv. Avantages et limites du modèle auto-assemblé 27
II. Objectifs scientifiques 29
III. Matériels et méthodes 31
IV. Résultats 49
1. Étude de l'effet des champs de type électroporation sur la prolifération et la migration des cellules cutanées. 51
a. Résumé 52
b. Résultats 54
c. Discussion 68
2. Étude de l'effet des champs de type électroporation sur le remodelage matriciel dans des substituts de derme humain reconstruits par ingénierie tissulaire. 71
a. Résumé 72
b. Résultats 74

c. Discussion 101
3. Étude du potentiel pro-angiogénique des champs de type électroporation dans des substituts dermiques micro-vascularisés. 103
a. Résumé 104
b. Résultats 107
c. Discussion 115
4. Étude de l'effet des champs de type électroporation sur un modèle de plaie dans un substitut cutané. 117
a. Résumé 118
b. Résultats 120
c. Discussion 125
VI. Discussion générale 127
VIII. Références 133
IX. Annexes 149

Liste des abréviations

2D : Deux dimensions
3D : Trois dimensions
ACP : Analyse en composantes principales
ADAMST : metallopeptidase with thrombospondin
ADN : Acide Désoxyribonucléique
ARN : Acide ribonucléique
ATP : Adénosine triphosphate
BSA : Bovine serum albumin
COL : Collagène
CS : Chondroïtine sulfate
CTGF: Connective tissue growth factor
CTRL : Contrôle
DDC : Cellules dendritiques du derme
DMEM : Dubelcco's Modified Eagle Medium
DS : Dermatane sulfate
DSC : Differential Scanning Calorimetry / Calorimétrie différentielle à balayage
ECT : Electrochimiothérapie
EGF : Epidermal growth factor
ELISA : Enzyme-linked immunosorbent assay
ENac : Epithelial sodium channel
EP : Electroporation (Seuil de perméabilisation)
FDR : False Discovery Rate
FGF : Fibroblast growth factor
FIB : Focused Ion Beam
GAG : Glycosaminoglycanes
GET : Electrotransfert de gènes
GFP : Green fluorescent protein
HS: Héparane sulfate
HUVEC : Human umbilical vein endothelial cell
IL: Interleukin
IRE: Electroporation irréversible
IRTF-ATR : Spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier - réflectance totale atténuée
KS : Kératane sulfate
LOX : Lysyl oxydase
MEB : Microscope électronique à balayage
MEC : Matrice extracellulaire
MET: Microscope électronique à transmission

MMP: Métalloprotéase
NS : Non significatif
PBS : Phosphate buffered saline
PDGF : Platelet-derived growth factor
PG : Protéoglycane
PI : Iodure de propidium
PTE : Potentiel transépithélial
RONS : Espèces réactives de l'oxygène et de l'azote
ROS : Espèces réactives de l'oxygène
SHG : Génération de seconde harmonique
TGM: Transglutaminase
TIMP: Tissue inhibitors of metalloproteinases
UV : Ultra violet
VEGF : Vascular endothelial growth factor
α-SMA : Alpha-Smooth muscle actin

Liste des figures

Figure 1 : Effets et différentes applications des impulsions de type électroporation (ondes carrées définies par le champ électrique E, la durée t, la période P ou fréquence F et le nombre de répétitions N. 4

Figure 2 : A. Schéma représentant les potentiels transmembranaires de repos ΔΨ0 et induit ΔΨi lors de l'application d'un champ électrique externe B. Courbe représentant la différence de potentiel transmembranaire total en fonction de l'angle ϑ, dans le cas d'une cellule sphérique. E l'intensité du champ électrique et r le rayon de la cellule. Adapté de [6] 5

Figure 3: Résultats de la simulation de dynamique moléculaire. A. Bicouche à l'équilibre. B. Formation de doigts d'eau dans la bicouche soumise à un champ électrique transversal. C. Pores hydrophiles stabilisés par les têtes polaires. D. Pores vus de dessus. Rouge = O, blanc= H, vert=N, jaune= têtes polaires, cyan=queues lipidiques. Tiré de [14] 7

Figure 4 : Schéma hypothétique des zones de peroxydation qui devraient se former dans la membrane cellulaire après exposition à des impulsions électriques. Adapté de [15] 8

Figure 5 : Aspect de tumeurs avant et après le traitement par électrochimiothérapie. [20,28,31] 9

Figure 6 : Schéma représentant la structure de la peau et ses annexes. Réalisé grâce à la base d'images Servier Medical Art 11

Figure 7 : A. Histologie d'une coupe d'épiderme humain après coloration à hématoxyline/éosine. Tiré de [44] B. Les principaux marqueurs de la différenciation des kératinocytes dans l'épiderme et la formation du potentiel transépithélial (TEP). A travers l'épiderme, le mouvement des ions sodium se fait vers la couche basale, produisant une accumulation de ces ions dans cette partie de l'épiderme. La différence de concentration des ions sodium dans l'épiderme crée le potentiel transépithélial. C. Schéma représentant le potentiel transmembranaire dans un kératinocyte. Réalisé grâce à la base d'images Servier Medical Art 13

Figure 8 : Formation des boucles de champ électrique endogène aux abords d'une plaie. Adapté de [46] 14

Figure 9 : Expression de l'α-SMA, de la F-actin et de la vinculin dans les fibroblastes et les myofibroblastes in vitro. [54] 15

Figure 10: A. Histologie d'une coupe de peau humaine après coloration à l'hématoxyline/éosine/safran (HES). Tiré de [62]. B. Schéma simplifié de l'organisation de la matrice extracellulaire entourant les cellules. 17

Figure 11 : Schéma résumant la biosynthèse des collagènes in vivo. Réalisé grâce à la base d'images Servier Medical Art 18

Figure 12 : Structure, substrats et principales sources des MMPs. Librement adapté de [70] 21

Figure 13 : Comparaison histologique de la peau humaine, porcine et murine. e, épiderme; d, derme; h, hypoderme, hf, follicule pileux, Ad, adipocytes ; SG, glande sébacée ; SwG , glande sudoripare, Mu , muscle. D'après [78,79] 24

Figure 14 : Coloration histologique au trichrome de Masson d'une peau humaine native et d'un substitut cutané humain reconstruit par auto-assemblage (L. Gibot) 27

Figure 15: Protocole de culture des substituts dermiques (A) dermiques micro-vascularisés (B) cutanés (C) cutanés blessés (D)..... 35

Figure 16 : Dispositif d'électroporation des feuillets. A. Générateur electrocell S20, électrodes en position d'électroporation d'un feuillet dermique, vue macroscopique d'un feuillet dermique âgé de 4 semaines entouré d'un ancrage en papier. B. Profils des paramètres électriques appliqués en électrotransfert de gène (GET) et électrochimiothérapie (ECT) extraits avec un oscilloscope. 37

Figure 17 : Electroperméabilisation efficace et transitoire des fibroblastes en monocouche. Intégrité de la membrane plasmique évaluée par la pénétration d'iodure de propidium (rouge) pendant l'électroporation (GET : 10 impulsions, 5 ms, 1Hz, 200V/cm ; ECT : 8 impulsions, 100 µs, 1Hz, 600 V/cm) (panel du haut) ou 30 minutes après (panel du bas). Les noyaux sont marqués au Hoeschst (bleu). Barre d'échelle 200 µm..... 39

Figure 18: Vue d'ensemble du plan expérimental pour tester les effets directs (A) ou indirects (B) de l'électroporation des fibroblastes dermiques humains sur le comportement cellulaire. A. Les propriétés de migration et de prolifération des fibroblastes soumis à l'électroporation sont suivies par vidéomicroscopie. B. Évaluation de l'effet indirect de l'électroporation via le sécrétome. Pour ces expériences, des fibroblastes non exposés au champ électrique sont cultivés dans un milieu de culture cellulaire conditionné pendant 24h par des fibroblastes électroporés. Les capacités de migration sont ensuite suivies par vidéomicroscopie. 53

Figure 19: Détermination des paramètres électriques assurant une électroperméabilisation transitoire efficace des fibroblastes sans affecter leur viabilité. A. Quantification de la libération d'ATP par luminescence 10 min après l'application des paramètres électriques d'électrochimiothérapie (ECT) et d'électrotransfert de gène (GET). N = 2; n = 6. B. Suivi de l'électroperméabilisation cellulaire en cytométrie en flux par pénétration d'iodure de propidium (PI) immédiatement après l'application des paramètres électriques ECT et GET. Axe gauche : % de cellules positives à l'iodure de propidium (point); Axe droit: intensité de fluorescence en unité arbitraire (a.u) (triangle). n = 3. C. Suivi du recouvrement de l'intégrité membranaire en cytométrie en flux par incubation à l'iodure de propidium 30 min après l'application des paramètres électriques ECT et GET. n = 3. D. Viabilité cellulaire à long terme évaluée par clonogénie après l'application des paramètres électriques ECT et GET, N = 3; n = 9. Analyses par Anova unidirectionnelles. 55

Figure 20: Les paramètres électriques ECT et GET n'ont pas affecté les propriétés de migration des fibroblastes dermiques dans le test de fermeture de la plaie. A. Détermination par cytométrie en flux de la synchronisation du cycle cellulaire après privation de sérum pendant une nuit. N = 3; n = 8. B. Quantification de la migration des fibroblastes dermiques dans les tests de fermeture de la plaie grâce à l'application de masques. Le masque de la plaie initiale (t = 0h) est représenté en jaune. Le masque de confluence identifiant toutes les zones occupées par les cellules est représenté en orange. Le masque de confluence est utilisé en combinaison avec le masque de plaie initial pour déterminer la confluence cellulaire de la plaie à chaque instant (film 1). C. Évolution dans le temps de la migration cellulaire après l'application des paramètres électriques de type ECT et GET sur des fibroblastes synchronisés et soumis au test de la rayure. La confluence de la plaie (%) représente la zone de la plaie qui est occupée par des cellules à chaque temps. N = 5; n = 30 Analyses statistiques par Anova bidirectionnelles. D. Valeurs de pentes calculées par régression linéaire représentant la vitesse de migration pendant les premières 24h. N = 3, n = 9. E. Diagramme de dispersion de la confluence de la plaie (%) 24h. N = 5; n = 30. Analyses

statistiques par Anova unidirectionnelles. Conditions contrôle (Ctrl ●), électrotransfert de gènes (GET ■) et électrochimiothérapie (ECT ▲)..... 57

Figure 21 : Aucun phénomène de galvanotaxis des fibroblastes dermiques n'est induit par les paramètres électriques de type ECT et GET. A. Représentation schématique de la position des électrodes sur le site de la plaie. La ligne jaune délimite la zone occupée par les cellules dans le panel anode (1) et le panel cathode (2). B. Zone occupée par les cellules (μm^2) dans le panel supérieur de la plaie (1) ou dans le panel inférieur de la plaie (2) 12h après application du champ électrique. Analyse statistique par Anova unidirectionnelle. N=3; n=18. Conditions contrôle (0 V/cm), électrotransfert de gènes (GET) et électrochimiothérapie (ECT)..... 58

Figure 22 : Les paramètres électriques ECT n'ont pas affecté la prolifération des fibroblastes dermiques tandis que certains paramètres GET ont réduit le nombre de cellules. A. Traitement des images avec des masques pour quantifier la prolifération des fibroblastes dermiques. Comme les images de contraste de phase n'étaient pas exploitables telles quelles, un masque présentant les noyaux fluorescents marqués par le réactif rouge Nuclight a été ajouté sur les mêmes images. Ce processus a permis de déterminer le nombre de noyaux dans l'image à chaque temps. B. Prolifération des fibroblastes dermiques au cours du temps après l'application des champs électriques de type ECT et GET. Analyse statistique par Anova bidirectionnelle C. Nombre de noyaux 70h après l'application des paramètres électriques de type ECT et GET. N=6; n=24. Analyse statistique par Anova unidirectionnelle. 60

Figure 23: Certains paramètres électriques GET ont induit l'apoptose et un stress mitochondrial dans les fibroblastes électroporés. A. Pourcentage de cellules apoptotiques quantifié avec le système d'analyse IncuCyte ZOOM 24h après électroporation grâce à un double marquage avec le réactif Caspase-3/7 Green Apoptosis Assay et le réactif Nuclight Red. N = 2; n = 12. Analyse statistique par Anova unidirectionnelle et bidirectionnelle B. Quantification de la perte de potentiel de membrane mitochondrial 1h après application du champ électrique, en utilisant la sonde fluorescente MitoView633. N = 1; n = 3. Analyse statistique par Anova unidirectionnelle. C. Détection fluorescente de la génération d'anion superoxyde mitochondrial O_2^- en utilisant la sonde MitoSOX en vidéomicroscopie. N = 2; n = 12. Analyse statistique par Anova bidirectionnelle. 62

*Figure 24 : Les milieux conditionnés par des fibroblastes électroporés ont stimulé la migration des fibroblastes non exposés. A. Évolution temporelle de la migration des fibroblastes dermiques cultivés dans des milieux de culture cellulaire conditionnés par les paramètres électriques de type ECT et GET. N = 3; n = 18. Seule la condition 200 V/cm a montré une différence statistique avec la condition témoin (0 V/cm). Analyse statistique par Anova bidirectionnelle * = p <0,05; ** = p <0,01; *** = p <0,001 B. Diagramme de dispersion de la confluence de la plaie après 24h de culture dans un milieu conditionné par les paramètres électriques de type ECT ou GET pendant 24h. N = 3; n = 18. Analyse statistique par Anova unidirectionnelle ** = p <0,01. Conditions contrôle (Ctrl ●), électrotransfert de gènes (GET ■) et électrochimiothérapie (ECT ▲). 64*

Figure 25: Analyse de l'expression des gènes codants les facteurs de croissance dans les fibroblastes dermiques 4h après l'exposition aux paramètres électriques de type ECT et GET. A. L'expression génique a été quantifiée par RT-qPCR. Les changements d'expression sont exprimés par rapport à la condition témoin. Condition témoin et ECT (600 V/cm) n = 3, condition GET (200 V/cm) n = 2. Angiopoïétine 1 (ANGPT1); Facteur de stimulation de colonies 2 et 3 (CSF2,3); Facteur de croissance du tissu conjonctif (CTGF); Facteur de croissance épidermique (EGF); Facteur de croissance des fibroblastes 2,7 et 10 (FGF2,7,10); Facteur de croissance de type EGF se liant à l'héparine (HBEGF); Facteur de croissance des hépatocytes (HGF); Facteur de croissance analogue à l'insuline 1 (IGF1); Facteur inhibiteur de migration des macrophages (MIF); Sous-unité A du facteur de croissance dérivé des plaquettes (PDGFA); Facteur

de croissance transformant alpha (TGFα); Facteur de croissance transformant bêta 1 (TGF-β1); Facteur de croissance endothélial vasculaire A (VEGFA). B. Expression de la protéine VEGFA quantifiée par ELISA dans un milieu de culture cellulaire 24h après l'électroporation des fibroblastes dermiques en monocouche avec les paramètres de type ECT (600 V/cm) et GET (200 V/cm) N = 1, n = 5. Analyse statistique par test de Mann Whitney C. Expression de la protéine PDGFAA quantifiée par ELISA dans un milieu de culture cellulaire 6h, 24h et 48h après l'électroporation des fibroblastes dermiques en monocouche avec les paramètres de type ECT (600 V/cm) et GET (200 V/cm) N = 2, n = 8. Analyse statistique par Anova unidirectionnelle. Conditions contrôle (Ctrl ●), électrotransfert de gènes (GET ■) et électrochimiothérapie (ECT ▲). 66

Figure 26: Les paramètres électriques ECT et GET n'ont pas affecté les propriétés de migration des kératinocytes dans le test de fermeture de la plaie. A. Évolution dans le temps de la migration cellulaire après l'application des paramètres électriques de type ECT et GET sur des kératinocytes synchronisés et soumis au test de la rayure. La confluence de la plaie (%) représente la zone de la plaie qui est occupée par des cellules à chaque temps. N = 2; n = 12 Analyses statistiques par Anova bidirectionnelle. B. Diagramme de dispersion de la confluence de la plaie (%) 24h après les pulses. N = 2; n = 12. Analyse statistique par Anova unidirectionnelle. Conditions contrôle (Ctrl ●), électrotransfert de gènes (GET ■) et électrochimiothérapie (ECT ▲). C. Image microscopique du test de migration des kératinocytes dans les tests de fermeture de la plaie 12h après les pulses de type ECT (800V/cm). Le masque de la plaie initiale (t = 0h) est représenté en bleu. 67

Figure 27 : Les paramètres d'électroperméabilisation choisis maintiennent la viabilité cellulaire au sein du modèle. A. Electoperméabilisation évaluée par pénétration d'iodure de propidium (rouge) pendant l'électroporation observée par microscopie bi-photonique sur toute l'épaisseur du feuillet. B. Évaluation de la viabilité cellulaire par Prestoblue dans les feuillets 24h après l'application des champs électriques, N=3, n=14. Analyse statistique par Anova unidirectionnelle. C. Vue transversale d'un feuillet traité par GET observé par microscopie bi-photonique (SHG Cyan ; Hoechst Bleu ; iodure de propidium rouge). CTRL (0 V/cm) ; GET: Protocole d'électrotransfert de gènes (10 impulsions, 5ms, 1Hz, 600V/cm) ; ECT: protocole d'électrochimiothérapie (8 impulsions, 100 µs, 1Hz, 1000V/cm)..... 74

Figure 28: Caractérisation multi-échelle de la matrice extracellulaire et plus spécifiquement des collagènes dans un substitut dermique humain. Observation à l'œil nu (A), génération de seconde harmonique par microscopie bi-photonique (B), microscopie électronique à balayage (MEB) (C, D), microscopie électronique à transmission (MET) (E, F, G, H), coloration histologique HES (les collagènes sont en jaune) (I)..... 76

*Figure 29: Caractérisation des collagènes dans un substitut dermique humain au microscope électronique à balayage à faisceau d'ions focalisés (FIB). Coupe transversale du feuillet dermique imagé par microscopie à balayage. * Collagènes 77*

Figure 30: Différences dans la signature spectrale des deux faces du feuillet. A. Spectres IRTF-ATR moyens du substitut dermique témoin dans la gamme [1500-900 cm^{-1}]. B. Répartition des acides nucléiques et des collagènes entre le côté milieu (face supérieure) et le côté Pétri (face inférieure) mesurée par IRTF-ATR. n> 6. Analyses statistiques par Anova unidirectionnelles 79

Figure 31 : Le contenu en ARN a été modulé dans le feuillet dermique soumis à l'électroporation. A. Signal ARN côté milieu (enrichi en cellules) et côté Pétri (enrichi en ECM) du substitut dermique mesuré par IRTF-ATR 24h et 48h après application de champs électriques de type GET et ECT. n>5, Analyses statistiques par Anova unidirectionnelles. Conditions contrôle (Ctrl ●), électrotransfert de gènes (GET ■) et électrochimiothérapie (ECT ▲). n> 6. B. Gènes différentiellement exprimés 4h après électrostimulation en conditions de contrôle, GET et ECT, mesurés par analyse transcriptomique à l'aide

d'une puce Affymetrix Clariom S. n = 4. C. Graphique représentant les gènes du matrisome différentiellement exprimés 4h après application de champs électriques de type GET et ECT. La limite de significativité (ligne noire) est fixée pour une valeur p corrigée de 0,05. Les cercles rouges et verts indiquent respectivement des gènes significativement sur-exprimés et sous-exprimés. Analyse transcriptomique réalisée à l'aide d'une puce Affymetrix Clariom S. n = 4. 82

Figure 32 : Aucune variation majeure de l'intégrité des collagènes n'a lieu après l'application des champs de type GET et ECT. A. Courbe DSC représentative de la dénaturation thermique des collagènes dans la fenêtre [50-75 °C]. B. Enthalpie spécifique de dénaturation ΔHd mesurée par DSC sur des feuillets dermiques après application de champs électriques de type GET et ECT. C. Température de dénaturation des collagènes des feuillets dermiques (Tmid) mesurée par DSC après application de champs électriques de type GET et ECT. n>6 Analyses statistiques par Anova unidirectionnelles. Conditions contrôle (Ctrl), électrotransfert de gènes (GET) et électrochimiothérapie (ECT). 84

Figure 33 : La teneur en collagènes diminue de façon transitoire après l'électroporation. A. Fraction de collagènes côté milieu (enrichi en cellules) et côté Pétri (enrichi en ECM) du substitut dermique mesuré par IRTF-ATR 24h et 48h après application de champs électriques de type GET et ECT. n>6. Analyses statistiques par Anova unidirectionnelles B. Teneur en hydroxyproline dans les substituts dermiques après application de champs électriques de type GET et ECT. N=3, n≥5. Analyses statistiques par Anova unidirectionnelles C. Quantité de procollagène 1a1 dans le surnageant de feuillets contrôles et électroporés. N=3, n≥12. Analyses statistiques par Anova unidirectionnelles D. Quantité relative d'ARNm de la famille des collagènes dans les feuillets dermiques 4h après application de champs électriques de type électrotransfert de gènes (GET) et électrochimiothérapie (ECT). Analyse transcriptomique réalisée à l'aide d'une puce Affymetrix Clariom S. n = 4. Conditions contrôle (Ctrl ●), électrotransfert de gènes (GET ■) et électrochimiothérapie (ECT ▲). 86

Figure 34 : L'expression de la Lysyl-oxydase LOXL4 et de la transglutaminase TGM2 diminue dans les fibroblastes après l'électroporation. Quantité relative d'ARNm de la famille LOX (A) et TGM (B) dans les feuillets dermiques 4h après application de champs électriques de type électrotransfert de gènes (GET) et électrochimiothérapie (ECT). Analyse transcriptomique réalisée à l'aide d'une puce Affymetrix Clariom S. n = 4. 87

Figure 35 : L'électroporation augmente l'activité des MMPs sécrétées. A. Activité des MMPs activées de manière endogène dans le surnageant de feuillets dermiques après application de champs électriques de type GET et ECT. N=3, n=12. Analyses statistiques par Anova unidirectionnelles B. Activité des MMPs après activation chimique de toutes les pro-MMP sécrétées dans le surnageant. N=2, n≥4. Analyses statistiques par Anova unidirectionnelles. Conditions contrôle (Ctrl ●), électrotransfert de gènes (GET ■) et électrochimiothérapie (ECT ▲). 88

Figure 36: Le protocole GET augmente la sécrétion de MMP9. A. Quantité relative d'ARNm de la famille des MMPS dans les feuillets dermiques 4h après application de champs électriques de type électrotransfert de gènes (GET) et électrochimiothérapie (ECT). Analyse transcriptomique réalisée à l'aide d'une puce Affymetrix Clariom S. n = 4. B. Quantité de MMP-1, -2, -3 et -9, dans le surnageant de feuillets dermiques après application de champs électriques de type GET et ECT. N=2, n=6. Analyses statistiques par Anova unidirectionnelles. Conditions contrôle (Ctrl ●), électrotransfert de gènes (GET ■) et électrochimiothérapie (ECT ▲). 89

Figure 37 : L'électroporation augmente l'activité des MMPs sécrétées indépendamment des TIMPs. A. Quantité relative d'ARNm de la famille TIMPs dans les feuillets dermiques 4h après application de champs électriques de type GET et ECT. Analyse transcriptomique réalisée à l'aide d'une puce Affymetrix Clariom S. n = 4 B. Quantité de TIMP-3 dans le surnageant de feuillets dermiques après

application de champs électriques de type GET et ECT. N=2, n=7. Analyses statistiques par Anova unidirectionnelles. Conditions contrôle (Ctrl ●), électrotransfert de gènes (GET ■) et électrochimiothérapie (ECT ▲). 90

Figure 38: L'électroporation induit un remodelage transitoire des collagènes principalement par les MMPs dans un substitut cutané humain. A. Quantification par fluorimétrie de l'activité endogène des MMPs dans le surnageant 48h après application de champs électriques de type GET et ECT en présence de 100 µM de GM6001. N=3, n=12 B. Teneur en hydroxyproline dans le substitut dermique une semaine après application de champs électriques de type GET et ECT cultivée en présence (symboles vides) ou en l'absence de GM6001 (symboles pleins). N=3, n≥6 C. Fraction de collagènes côté pétri (enrichi en MEC) du substitut dermique mesuré par IRTF-ATR 24h et 48h après application de champs électriques de type GET et ECT en présence (symboles vides) ou en l'absence de GM6001 (symboles pleins). n=6. Conditions contrôle (Ctrl ●), électrotransfert de gènes (GET ■) et électrochimiothérapie (ECT ▲). Analyses statistiques par Anova unidirectionnelles. 92

Figure 39 : Les espèces réactives de l'oxygène sont responsables de l'activation soutenue des MMPs après l'électroporation. A. Activité plasmine quantifiée dans le surnageant 24h après l'électroporation. N=2, n=. n> 6. Analyses statistiques par Anova unidirectionnelles B. Quantification par fluorimétrie de l'activité des MMPs endogènes dans le surnageant 24h après application de champs électriques de type GET et ECT et culture en présence de concentrations croissantes d'inhibiteur de ROS N-acétyl-L-cystéine (NAC). N=2 ou 3, n≥4. n> 6. Analyses statistiques par Anova unidirectionnelles. C. L'activité gélatinase des MMP-2 et -9 a été quantifiée par fluorimétrie en présence ou en l'absence de 5 mM de NAC. N=2, n=12 D. L'activité des MMP-3 et 10 a été quantifiée par fluorimétrie en présence ou en l'absence de 5 mM de NAC. N=2, n=12 E. L'activité des MMP-1, -7, -8, -12, -13, -14, -15, -16 a été quantifiée par fluorimétrie en présence ou en l'absence de 5 mM de NAC. N=2, n=12. Conditions contrôle (Ctrl ●), électrotransfert de gènes (GET ■) et électrochimiothérapie (ECT ▲). Analyses statistiques par Anova unidirectionnelles 94

Figure 40: La quantité de glycosaminoglycanes sulfatés dans les feuillets n'est pas affectée par l'application des champs électriques. Quantification des glycosaminoglycanes sulfatés contenus dans les feuillets dermiques après application de champs électriques de type GET et ECT. N=3, n=12. Analyses statistiques par Anova unidirectionnelles. Conditions contrôle (Ctrl ●), électrotransfert de gènes (GET ■) et électrochimiothérapie (ECT ▲). 95

Figure 41 : Le facteur pro-fibrogénique TGF-β1 est régulé à la baisse par l'application de champs électriques pulsés. A. Modulation de l'ARNm TGF-β1 4h après électrostimulation. Analyse transcriptomique réalisée à l'aide d'une puce Affymetrix Clariom S. n = 4 B. Quantité de TGF-β 1 dans le surnageant de feuillets dermiques quantifiée par ELISA. N=3, n=12 Analyse statistique par Anova unidirectionnelle. C. Quantité d'IL-4 dans le surnageant de feuillets quantifiée par ELISA. N=2, N=6. Analyse statistique par Anova unidirectionnelle D. Quantité d'IL-13 dans le surnageant de feuillets quantifiée par ELISA. N=2, N=6. Analyse statistique par Anova unidirectionnelle. Conditions contrôle (Ctrl ●), électrotransfert de gènes (GET ■) et électrochimiothérapie (ECT ▲) 96

Figure 42 : L'électroporation n'induit pas de surexpression de l'α-SMA par les fibroblastes. A. Fibre de stress α-SMA+ (vert) détectées par immunofluorescence dans des fibroblastes dermiques cultivés en monocouche, 4h30 après électroporation par ECT (600 V/cm) et GET (200 V/cm). Les noyaux sont marqués avec du Hoeschst (bleu). Barre d'échelle 50µm. B. Fibre de stress α-SMA+ (vert) détectées par immunofluorescence dans des substituts dermiques, 4h30 après électroporation par ECT (1000 V/cm) et GET (600V/cm). Les noyaux sont marqués avec du Hoeschst (bleu). Barre d'échelle 100µm C. Pourcentage de cellules positives à l'α-SMA après électroporation des fibroblastes en monocouche.

n=10 Analyses statistiques par Anova unidirectionelles. Conditions contrôle (Ctrl ●), électrotransfert de gènes (GET ■) et électrochimiothérapie (ECT▲). 97

Figure 43 : Les champs électriques de type électroporation augmentent la contractilité des fibroblastes dermiques. A. Photos macroscopiques de gels de collagène au cours du temps. Barre d'échelle 0,5 cm. B. Contraction de gels de collagène au cours du temps. Gel ensemencé avec des fibroblastes non traités (Ctrl ●), gel ensemencé avec des fibroblastes traités en électrotransfert de gènes (GET ■) et électrochimiothérapie (ECT▲). N=6. Analyse statistique par Anova bidirectionnelle. 98

Figure 44 : Les résultats obtenus sont comparables chez les 3 donneurs. A. Caractéristiques des différents donneurs. B. Aspect macroscopique des feuillets dermiques issus des trois donneurs. C. Quantité de procollagène 1a1 dans le surnageant de feuillets dermiques 24h après application de champs électriques de type GET et ECT. N=1, n= 6. Analyses statistiques par Anova unidirectionnelles. D. Quantification par fluorimétrie de l'activité endogène des MMPs dans le surnageant de feuillets dermiques 24h après application de champs électriques de type GET et ECT. N=1, n= 12. Analyses statistiques par Anova unidirectionnelles. Conditions contrôle (Ctrl ●), électrotransfert de gènes (GET ■) et électrochimiothérapie (ECT ▲). Barre d'échelle 0,8 cm. 100

Figure 45 : Impact de l'homogénéité et de la densité d'ensemencement sur la formation de réseaux vasculaires. Les cellules endothéliales HUVEC-GFP+ sont en vert. 104

Figure 46 : Vue d'ensemble du plan expérimental pour tester les effets directs, indirects et mixtes de l'électroporation sur les cellules endothéliales par vidéomicroscopie. A. Migration des cellules endothéliales cultivées en 2D en présence de milieu conditionné 24h (sécrétome de feuillets dermiques électroporés). B. Longueur et nombre de ramifications du réseau vasculaire de substituts dermiques micro-vascularisés cultivés en présence de milieu conditionné 24h (sécrétome de feuillets dermiques électroporés). C. Formation des réseaux vasculaires après l'ensemencement des HUVECs sur des substituts dermiques électroporés 24h auparavant. D. Suivi de l'apoptose des réseaux vasculaires de substituts micro-vascularisés après électroporation. 106

Figure 47 : Les fibroblastes électroporés sécrètent des facteurs pro-angiogéniques. A. Modulation des ARNm VEGFA, PDFGA et FGFb dans les feuillets dermiques 4h après application de champs électriques de type GET et ECT. n= 4. B. Quantité de VEGFA dans le surnageant de feuillets dermiques après application de champs électriques de type GET et ECT. N = 1, n = 8. C. Quantité de PDGFA dans le surnageant de feuillets dermiques après application de champs électriques de type GET et ECT. N = 2, n = 12. D. Quantité de FGFb dans le surnageant de feuillets dermiques après application de champs électriques de type GET et ECT. N = 1, n = 8. E. Modulation des ARNm PGF et VEGFC dans les feuillets dermiques 4h après application de champs électriques de type GET et ECT. n= 4. F. Quantité de PGF et de VEGFC dans le surnageant de feuillets dermiques après application de champs électriques de type GET et ECT. N = 1, n = 8. Conditions contrôle (Ctrl ●), électrotransfert de gènes (GET ; 10 impulsions, 5ms, 1Hz, 600V/cm ■) et électrochimiothérapie (ECT ; 8 impulsions, 100 µs, 1Hz, 1000V/cm ▲). Analyses statistiques par Anova unidirectionnelles. Facteur de croissance des fibroblastes basique (FGFb); Sous-unité A du facteur de croissance dérivé des plaquettes (PDGFA) ; Facteur de croissance placentaire (PGF) ; Facteur de croissance endothélial vasculaire A (VEGFA) ; Facteur de croissance endothélial vasculaire C (VEGFC). 108

Figure 48 : Les milieux conditionnés par les fibroblastes électroporés améliorent la migration des HUVECs. A. Quantification de la migration des HUVECs dans les tests de fermeture de la plaie. La ligne bleu clair délimite la zone occupée par les cellules au fil du temps et la ligne bleu foncé la zone de plaie initiale B. Évolution temporelle de la migration des HUVECs après l'application de milieux conditionnés

de substituts dermiques électroporés. N=1, n=3. Conditions contrôle (Ctrl ●), électrotransfert de gènes (GET ■) et électrochimiothérapie (ECT ▲). Analyses statistiques par Anova bidirectionnelles. 110

Figure 49 : Les milieux conditionnés des feuillets dermiques électroporés n'ont pas d'effet sur les réseaux vasculaires matures. A. Évolution dans le temps de la longueur du réseau mature (7j) après l'application de milieux conditionnés 24h de substituts dermiques électroporés. B. Évolution dans le temps du nombre de ramifications du réseau mature (7j) après l'application de milieux conditionnés 24h de substituts dermiques électroporés. N=1, n=8. Conditions contrôle (Ctrl ●), électrotransfert de gènes (GET ■) et électrochimiothérapie (ECT ▲). Analyses statistiques par Anova bidirectionnelles. 111

Figure 50 : L'électroporation des substituts dermiques stimulent la formation des réseaux d'HUVECs. A. Formation d'un réseau d'HUVEC (vert) détecté par vidéomicroscopie 0h, 24h et 96h après l'ensemencement des HUVECs sur des feuillets dermiques électroporés 24h auparavant. B. Évolution dans le temps de la longueur du réseau après ensemencement sur substituts dermiques électroporés 24h auparavant. C. Evolution dans le temps du nombre de ramifications du réseau après ensemencement sur substituts dermiques électroporés 24h auparavant. N=1, n=8. Conditions contrôle (Ctrl ●), électrotransfert de gènes (GET ■) et électrochimiothérapie (ECT ▲). Analyses statistiques par Anova bidirectionnelles. 112

Figure 51 : Les deux protocoles d'électroporation induisent différents mécanismes de mort cellulaire des réseaux d'HUVECs. A. Réseaux HUVEC GFP+ (vert) et annexine V+ (rouge) détectés par vidéomicroscopie sur des substituts dermiques micro-vascularisés 40h après application de champs électriques de type GET et ECT. B. Évolution dans le temps de la surface totale d'image occupée par des objets rouges (annexine V+) après application de champs électriques de type GET et ECT. C. Évolution temporelle de la surface totale d'image occupée par des objets verts (GFP+) après application de champs électriques de type GET et ECT. D. Evolution temporelle de la longueur du réseau après application de champs électriques de type GET et ECT. N=1, n=6. Conditions contrôle (Ctrl ●), électrotransfert de gènes (GET ■) et électrochimiothérapie (ECT ▲). Analyses statistiques par Anova bidirectionnelles. 114

Figure 52 : Les grandes étapes de la cicatrisation. Réalisé grâce à la banque d'images Biorender ... 118

Figure 53 : Protocole de culture des substituts cutanés 120

Figure 54 : Caractérisation histologique du modèle de substitut cutané reconstruit par auto-assemblage. A. Coloration Hématoxyline-Eosine-Safran. Les collagènes sont marqués en orange. B. Coloration au Trichrome de Masson-Goldner. Les collagènes sont en bleu. C. Coloration au Picrosirius Red. Les collagènes sont en rose. D. Coloration Periodic Acid Schiff. Les polysaccharides sont en fuchsia. E. Immuomarquage contre la fibronectine (vert). Barre d'échelle 100 µm 121

Figure 55 : Caractérisation histologique du modèle de substitut cutané reconstruit par auto-assemblage. A. Marquage des cellules positives Ki67 (marron). B. Marquage contre la kératine 14 (vert). C. Marquage contre la loricrine (rouge). Barre d'échelle 100 µm 122

Figure 56 : Caractérisation du modèle de plaie A. Substitut cutané fraichement punché et déposé sur les feuillets de migration. B. Coloration Hématoxyline-Eosine-Safran des punchs. Les collagènes sont marqués en orange. C. Coloration au Trichrome de Masson-Goldner des punchs. Les collagènes sont en bleu. e= épiderme , d= derme 123

Figure 57 : A. Mesure de la perte d'eau transépidermique (TEWL) dans les substituts blessés soumis au non à un champ électrique de type ECT (1300V/cm). B. Calcul de la taille de la plaie au cours du temps dans les substituts blessés soumis ou non à un champ électrique de type ECT (1300V/cm). Analyse

statistique par ANOVA bidirectionelle. Conditions contrôle (Ctrl ●) et électrochimiothérapie (ECT▲). *124*

Figure 58 : Colorations histologiques Hématoxyline-Eosine-Safran (HES), Trichrome de Masson-Goldner (TMG), Ki67, et immunomarquages contre la Loricrine et le Collagène IV (Col IV) de la partie non lésée mais exposée aux champs électriques..... *124*

Figure 59 : Analyse du sécrétome par NTA. A. Concentration moyenne des particules dans le sécrétome des feuillets dermiques. Distribution de taille des particules dans le sécrétome des feuillets dermiques contrôles (0 V/cm) (B), et 4h après l'application des champs électriques de type GET (600V/cm) (C) et ECT (1000 V/cm) (D). La zone rouge représente l'erreur standard à la moyenne (SEM). *131*

Liste des tableaux

Tableau 1 : Paramètres des champs électriques appliqués en électrochimiothérapie (ECT) et électrotransfert de gène (GET) sur les modèles 2D (monocouches) et 3D (feuillets). 36

Tableau 2 : Liste des gènes contenus dans le PCR Array Human Wound Healing kit..... 42

Tableau 3 : Liste des kits ELISA et des dilutions utilisées 45

Liste des annexes

Annexe 1: Electroporation does not affect human dermal fibroblast proliferation and migration properties directly but indirectly via the secretome. Gouarderes S, Doumard L, Vicendo P, Mingotaud AF, Rols MP, Gibot L. Bioelectrochemistry. 2020 doi: 10.1016/j.bioelechem.2020.107531

Annexe 2: Pulsed electric fields induce extracellular matrix remodeling through MMPs activation and decreased collagen production, Gouarderes S, Ober C, Doumard L, Dandurand J, Vicendo P, Fourquaux I, Golberg A, Samouillan V, Gibot L, The Journal of Investigative Dermatology (2021), doi: https://doi.org/10.1016/j.jid.2021.09.025.

Annexe 3 : A. Courbes d'étalonnage de la concentration en peroxyde d'hydrogène. B. Concentration de peroxyde d'hydrogène dans des milieux frais conditionnés à partir de substituts cutanés électrostimulés 24h après l'application d'impulsions de type GET et ECT, ou dans le tampon de pulsation (ZAP) avant et après l'application d'impulsions de type GET et ECT.

Annexe 4: Vascular and extracellular matrix remodelling by physical approaches to improve drug delivery at tumour site. Gouarderes S, Mingotaud AF, Vicendo P, Gibot L. Expert Opin Drug Deliv. 2020 Aug 24

Annexe 5: Cold helium plasma jet does not stimulate collagen remodeling in a 3D human dermal substitute. Gouarderes S, Marches A, Vicendo P, Simon M, Merbahi N, Gibot L. Bioelectrochemistry. 2021

n

I. Introduction bibliographique

1. L'électroporation

a. Théorie et principes

La membrane plasmique qui garantit l'intégrité cellulaire et le contrôle des échanges entre le milieu intracellulaire et extracellulaire est un obstacle à certaines molécules d'intérêt thérapeutique. Les stratégies d'optimisation de la biodisponibilité de ces molécules reposent essentiellement sur la délivrance par vecteurs biologiques et le transfert par approches chimiques ou physiques. Parmi ces méthodes, l'électroporation est largement utilisée pour augmenter la perméabilité des tissus et des cellules. Ce phénomène a été décrit par Neumann et al en 1972 dans une étude réalisée sur des vésicules issues de cellules bovines, révélant que des impulsions électriques brèves de haute intensité induisaient une perméabilisation de la membrane plasmique se traduisant par l'augmentation des échanges entre les milieux intracellulaires et extracellulaires [1–3]. L'électroperméabilisation présente l'avantage d'être contrôlable dans l'espace et dans le temps (entre les électrodes). Elle peut en effet être réversible ou irréversible selon les paramètres électriques choisis et le résultat thérapeutique recherché (Figure 1). Dans le cas de l'électroporation réversible, la membrane plasmique va retrouver son intégrité quelques minutes après la fin des impulsions électriques contrairement à l'électroporation irréversible (IRE) entraînant des dommages excessifs aux cellules et aux membranes conduisant à la mort cellulaire [4]. Les paramètres des impulsions électriques, tels que l'amplitude, la durée et le nombre d'impulsions, jouent un rôle majeur dans l'efficacité des traitements basés sur l'électroporation. La mise au point de paramètres optimaux peut aujourd'hui être planifiée par la prédiction de la distribution du champ électrique dans les tissus grâce à des modèles numériques [4].

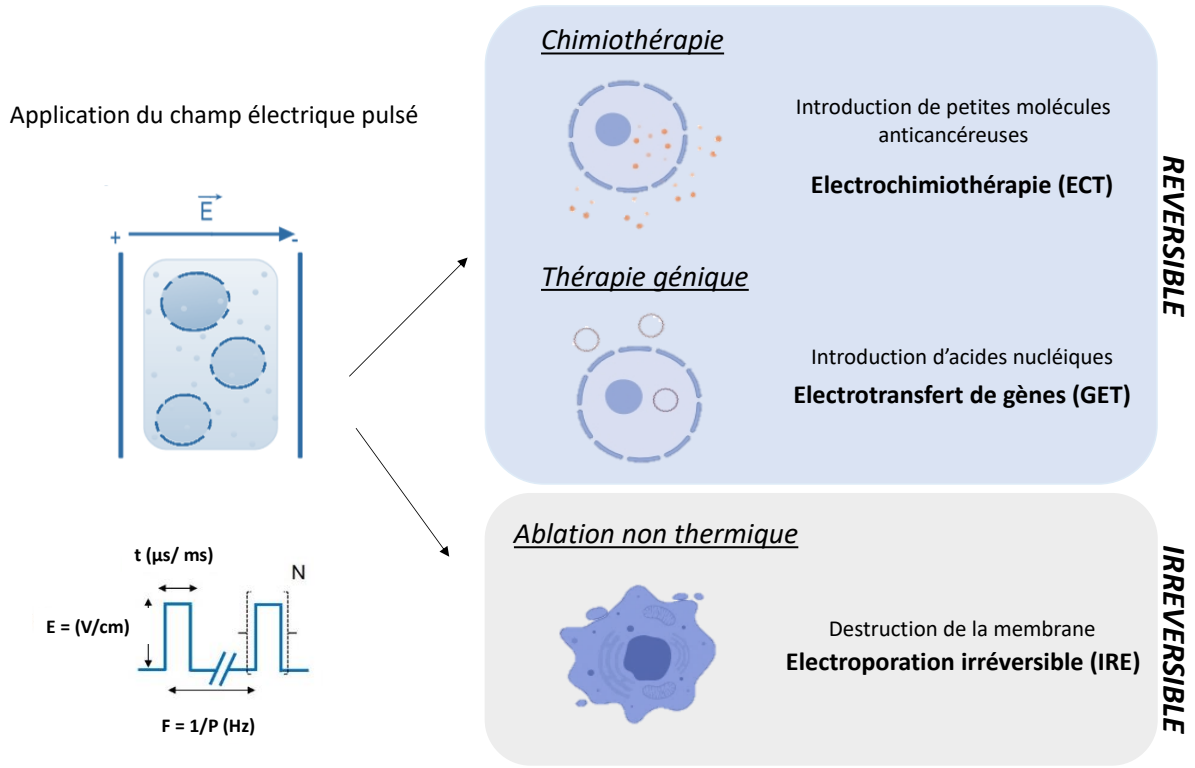


Figure 1 : Effets et différentes applications des impulsions de type électroporation (ondes carrées définies par le champ électrique E, la durée t, la période P ou fréquence F et le nombre de répétitions N.

Dans des conditions physiologiques normales et quand aucun champ électrique n'est appliqué, seul le potentiel transmembranaire de repos existe au niveau de la membrane plasmique. Il est généré par le gradient de concentration ionique de part et d'autre de la membrane consécutif au mouvement des ions Na^+ et K^+ à travers les pompes Na^+/K^+ ATPase [5]. Ce potentiel transmembranaire de repos ($\Delta\Psi 0$) a une valeur comprise entre -20 mV et -200 mV selon les types cellulaires, homogène le long de la membrane plasmique [5]. Lorsqu'une cellule est exposée à un champ électrique pulsé externe, la membrane plasmique devient transitoirement perméable aux ions qui vont se déplacer sous l'action de la force électrophorétique. Les anions vont alors se déplacer vers l'anode et les cations vers la cathode ce qui a pour conséquence l'établissement d'un nouveau potentiel, appelé potentiel transmembranaire induit ($\Delta\Psi i$). Le potentiel transmembranaire induit se superpose au potentiel transmembranaire de repos. Ainsi, le potentiel transmembranaire résultant est une somme des deux (Figure 2).

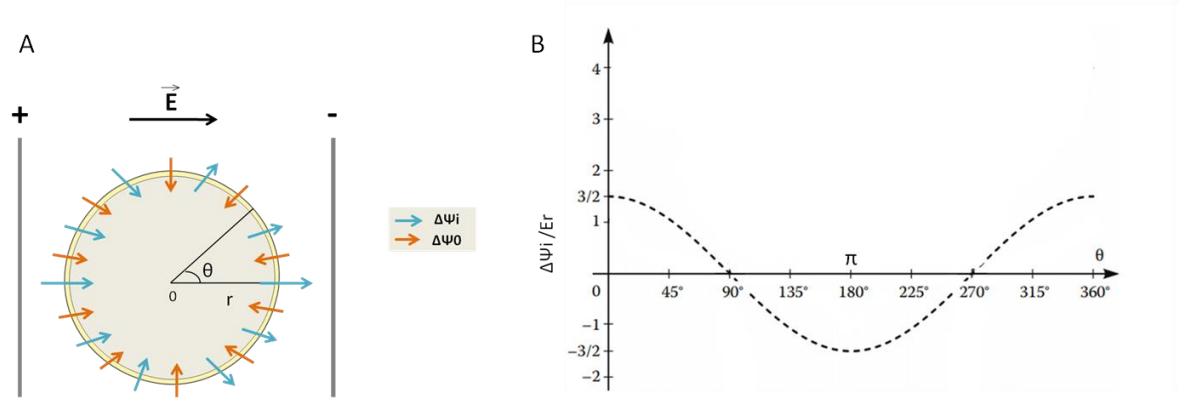


Figure 2 : A. Schéma représentant les potentiels transmembranaires de repos ΔΨ0 et induit ΔΨi lors de l'application d'un champ électrique externe B. Courbe représentant la différence de potentiel transmembranaire total en fonction de l'angle θ, dans le cas d'une cellule sphérique. E l'intensité du champ électrique et r le rayon de la cellule. Adapté de [6]

Dans les zones de la membrane où le potentiel transmembranaire dépasse une valeur seuil (Ep), appelée seuil de perméabilisation, des changements se produisent dans la membrane cellulaire, conduisant à une augmentation de la perméabilité membranaire aux ions et molécules [5]. Si la différence de potentiel transmembranaire franchit la valeur Ep de +/- 200-300 mV, la perméabilisation s'observe en premier là où la membrane fait face aux électrodes : ΔΨi maximum pour θ = 0 ° ou 180° [7] (Equation 1). Cette valeur décroît progressivement le long de la membrane jusqu'à valoir ΔΨi = 0 pour θ = 90 ° ou 270 °.

$$|\Delta\Psi i + \Delta\Psi 0| \geq 200 \text{ mV} \quad (1)$$

L'étendue de la perméabilisation est contrôlée à la fois par le nombre d'impulsions (N), la durée des pulses (t) et leur fréquence (F), ainsi que par l'intensité du courant (U) [8]. La différence de potentiel transmembranaire induit $\Delta\Psi_i$, est définie par l'équation (2) où f est la forme de la cellule, g(λ) une fonction complexe des conductivités spécifiques de membrane, du tampon de pulsation et du cytoplasme, r la taille de la cellule, E l'intensité du champ électrique, cos θ l'endroit où l'on se trouve sur la membrane et τ le temps de charge de la membrane (Equation 2) [9] :

$$\Delta\Psi_i = fg(\lambda)rEcos(\theta)(1 - e^{-\frac{t}{\tau}}) \quad (2)$$

À l'équilibre, si la cellule est présumée être une sphère homogène isolée (f=3/2), que la membrane est considérée comme un diélectrique pur (g=1), et que le temps de charge τ est beaucoup plus petit que la durée d'impulsion (t), alors on peut simplifier l'équation comme ceci (Equation 3) :

$$\Delta\Psi i = (3/2)\ Er \cos\theta \quad (3)$$

Dans le cas d'une cellule en suspension, le modèle le plus simple est effectivement une sphère, qui pour généraliser peut-être remplacée par un sphéroïde ou un ellipsoïde. Cependant, si les cellules en

suspension peuvent raisonnablement être modélisées comme ceci, ce n'est plus du tout le cas pour les cellules au sein d'un tissu. Il n'existe pas de corps géométrique simple pouvant modéliser les cellules d'un tissu, chaque cellule présentant en outre une forme unique [10]. Avec des géométries irrégulières et/ou des cellules proches les unes des autres, la tension induite ne peut pas être formulée comme une fonction. Différentes techniques pour la détermination de cette tension sont synthétisées dans « Advanced Electroporation Techniques in Biology and Medicine », Chapitre 3 [10].

En conclusion, l'électroperméabilisation est dépendante des paramètres électriques appliqués, des caractéristiques morphologiques du type cellulaire et de l'environnement cellulaire.

Les termes d'électroporation et d'électroperméabilisation sont tous deux utilisés pour décrire le même phénomène, l'un défendant l'existence de « pores », et l'autre plus général, défendant l'hypothèse d'une augmentation de la perméabilité en raison de réarrangements physico-chimiques au niveau de la bicouche lipidique créant des défauts membranaires. Depuis les années 70, plusieurs théories ont été proposées pour expliquer l'augmentation de la perméabilisation membranaire à la suite de l'application d'un champ électrique. Ces théories sont basées notamment sur les réponses supposées des lipides de la bicouche, comme une transition de phase [11] ou des ruptures des interfaces entre les domaines lipidiques [12], mais aucune ne peut solidement expliquer le mécanisme d'électroporation. De nos jours, il existe un consensus sur le fait que l'électroporation repose sur la formation de pores hydrophiles dans la bicouche lipidique, ce qui soutient le choix du terme électroporation [13]. En effet, les simulations de dynamique moléculaire suggèrent que de petits pores instables s'ouvrent et se referment dans la membrane lipidique, et ce, même en l'absence d'un champ électrique externe. Toutefois, une exposition de la membrane à un champ électrique réduit considérablement l'énergie nécessaire à la pénétration de l'eau dans la bicouche, augmentant donc la probabilité de formation de pores. Ceux-ci se forment en moyenne plus fréquemment et avec une durée de vie beaucoup plus élevée que ceux formés en l'absence de champ électrique [13]. Selon les modélisations moléculaires de Mounir Tarek effectuées sur des modèles de bicouches lipidiques, les « doigts » d'eau commencent par pénétrer à l'intérieur de la zone hydrophobe de la membrane, de chaque côté de la membrane et quelle que soit l'orientation du champ. Ces doigts vont ensuite se joindre pour former des colonnes d'eau qui traversent la membrane. Les têtes polaires des lipides se réorientent alors vers l'intérieur de la bicouche, formant des pores hydrophiles métastables. L'augmentation de l'intensité du champ accélère la formation de ces structures [14] (Figure 3).

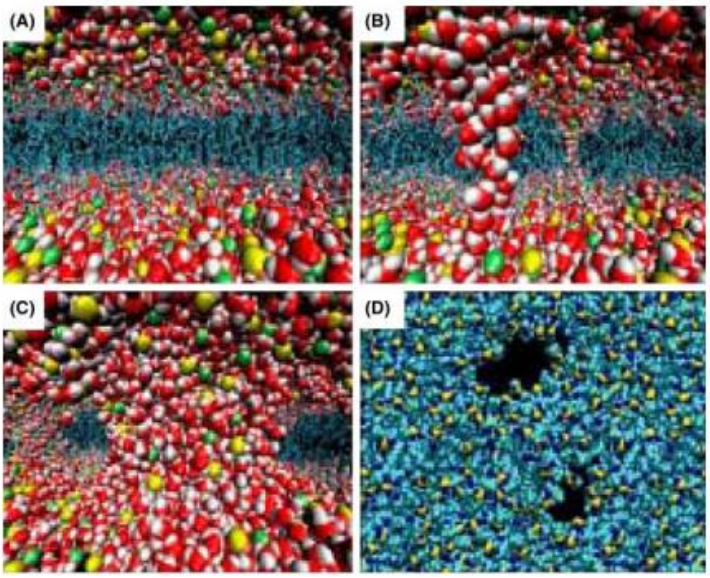


Figure 3: Résultats de la simulation de dynamique moléculaire. A. Bicouche à l'équilibre. B. Formation de doigts d'eau dans la bicouche soumise à un champ électrique transversal. C. Pores hydrophiles stabilisés par les têtes polaires. D. Pores vus de dessus. Rouge = O, blanc= H, vert=N, jaune= têtes polaires, cyan=queues lipidiques. Tiré de [14]

Cependant, les « électropores » induits par le champ électrique ne semblent pas pouvoir expliquer tous les aspects du phénomène d'électroperméabilisation, notamment la perméabilisation longue durée observée après certains protocoles. Les études de modélisation moléculaire montrent que la peroxydation lipidique peut être considérée comme un mécanisme important dans la perméabilisation membranaire prolongée induite par les champs électriques [15]. La peroxydation lipidique fait référence à la dégénérescence oxydative des lipides, qui est caractérisée par la formation d'un groupe hydroperoxyde dans les queues lipidiques. Des réactions en chaîne ont alors lieu, durant lesquelles les produits de peroxydation intermédiaires propagent les dommages radicaux aux molécules adjacentes conduisant ainsi à la peroxydation d'une grande quantité de lipides [16,17]. La présence de lipides oxydés dans une membrane lipidique augmente considérablement la perméabilité et la conductance de celle-ci et favorise la formation de doigts d'eau. De plus, les régions de la membrane contenant des lipides oxydés fragmentés, pourraient présenter une formation de pores spontanée qui auraient une durée de vie beaucoup plus longue que les électropores induits par un champ électrique dans les parties non oxydées de la bicouche [15] (Figure 4).

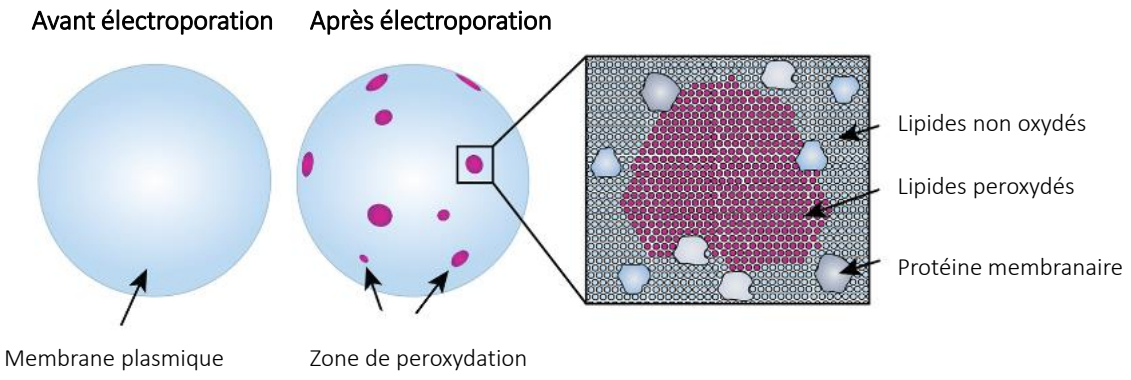


Figure 4 : Schéma hypothétique des zones de peroxydation qui devraient se former dans la membrane cellulaire après exposition à des impulsions électriques. Adapté de [15]

b. Applications cliniques de l'électroporation

i. L'électrochimiothérapie (ECT)

L'électrochimiothérapie (ECT) qui est la principale application clinique de l'électroporation a atteint une pole position en Europe, constituant même le traitement de première intention dans le traitement local des cancers cutanés au Royaume-Uni. L'application d'impulsions électriques visant à augmenter la cytotoxicité de molécules anticancéreuses a été décrite pour la première fois par Orlowski et al. en 1988. Les impulsions utilisées en ECT sont dites « microsecondes » et sont généralement de l'ordre de 100 µs pour un champ électrique d'environ 1000 V/cm. Ce type d'impulsions permet de faire pénétrer en grande quantité des molécules telles que la bléomycine ou le cisplastine dans le cytoplasme. Afin que le traitement soit efficace en combinaison avec l'électroporation les drogues sélectionnées doivent être hydrophiles ou ne pas pouvoir être facilement transportées à travers la membrane [13]. En oncologie vétérinaire, l'ECT a également été utilisée comme traitement unique ou traitement adjuvant et s'est avérée très efficace contre différentes tumeurs et métastases primaires chez le chien, le chat et les chevaux [18–22].

Sur la base de vastes données précliniques, l'ECT est rapidement entrée en phase d'essais cliniques. La première étude clinique sur l'ECT a été publiée en 1991 par Mir et al [23] et a démontré la faisabilité, la sécurité et l'efficacité de l'ECT, suivie par des rapports de groupes des États-Unis, Slovénie, France et du Danemark tous confirmant les résultats de la première étude [24–27]. En 2006 a été publié le rapport du projet européen intitulé «Procédures opératoires européennes en Electrochimiothérapie »(ESOPE) qui fut le point de départ d'une plus large utilisation de l'ECT à travers l'Europe [28]. La majorité des tumeurs traitées sont les mélanomes, ou les métastases cutanées d'autres types de tumeurs en raison de leur accessibilité. Mais des applications plus larges sont désormais possibles grâce à la mise au point de différents types d'électrodes qui permettent d'atteindre des tissus profonds ou difficiles d'accès [29].

Fait intéressant, les cliniciens observent couramment, sans pouvoir l'expliquer, la guérison esthétique et fonctionnelle des plaies sur les sites traités par électrochimiothérapie (Figure 5). En outre, les données cliniques disponibles concernant le traitement de tumeurs cutanées par électrochimiothérapie démontrent une réponse au traitement de près de 84% pour la bléomycine et d'environ 82% pour le cisplatine, associé avec la préservation des tissus sains [30].

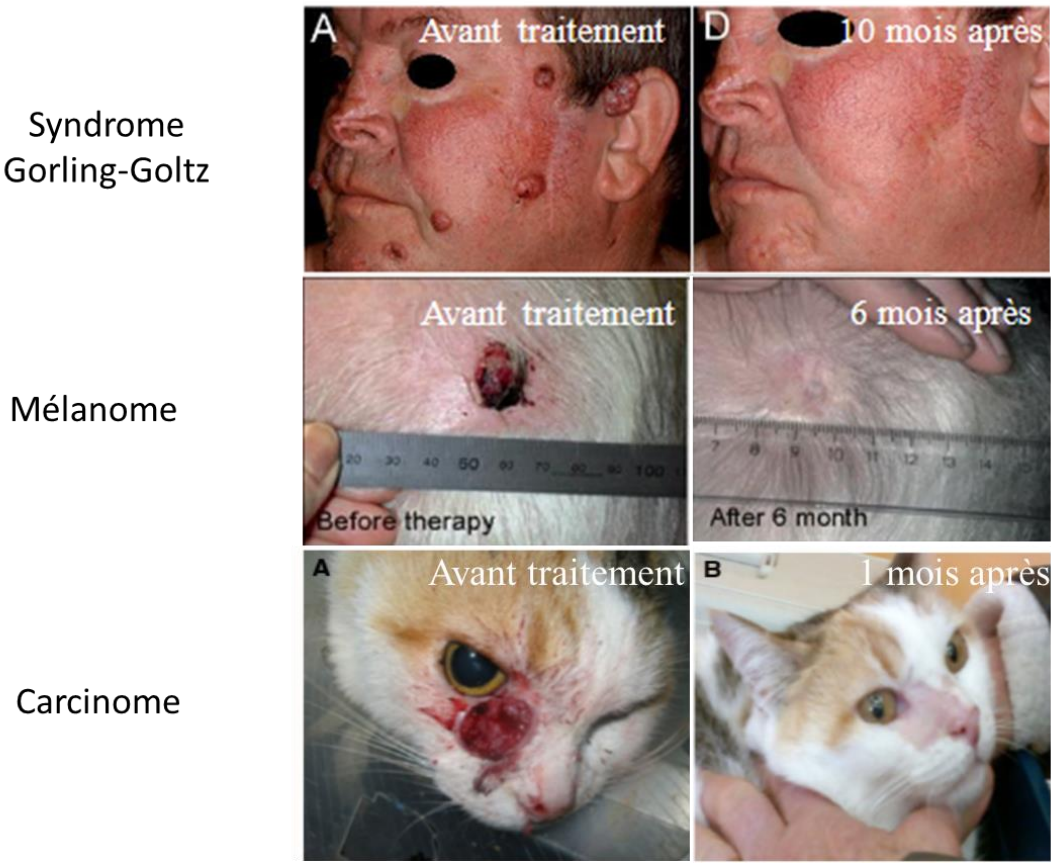


Figure 5 : Aspect de tumeurs avant et après le traitement par électrochimiothérapie. [20,28,31]

ii. L'électrotransfert de gène (GET)

Une autre application de l'électroporation en médecine est l'électrotransfert de gène. Il peut être utilisé soit pour la vaccination ADN contre les maladies infectieuses, soit pour le traitement de diverses maladies, telles que le cancer, pour cibler directement les cellules tumorales ou augmenter la réponse immunitaire de l'organisme contre les cellules cancéreuses. La délivrance de gènes *in vivo* par électroporation a été réalisée pour la première fois dans les années 1990 et depuis différents types de tissus ont été transfectés avec succès en utilisant cette approche : tumeurs, muscle squelettique, peau, foie… En GET les impulsions utilisées sont dites « millisecondes », ce qui permet à la fois de perméabiliser la membrane plasmique et de générer une force électrophorétique facilitant la migration des molécules chargées, telles que l'ADN, vers les cellules perméabilisées. Contrairement

aux petites molécules délivrées en ECT qui peuvent entrer dans les cellules pendant l'application des champs électriques et jusqu'à ce que la membrane recouvre son intégrité, les acides nucléiques entrent seulement pendant l'application des impulsions grâce à la force électrophorétique générée. Si l'efficacité de transfection de l'électrotransfert est encore faible par rapport aux vecteurs viraux, elle est 10 à 1000 fois supérieure à l'injection d'ADN plasmidique nu. Le GET est toutefois avantageux principalement par le manque de pathogénicité et d'immunogénicité qui en fait une méthode prometteuse[13]. La thérapie génique peut être réalisée en utilisant deux approches différentes. La première est la méthode *ex vivo*, où les cellules, y compris les cellules souches, sont retirées du patient, transfectées *in vitro* avec le plasmide, sélectionnées, amplifiées, puis réinjectées au patient. L'autre approche est la thérapie génique *in vivo*, où l'ADN exogène est délivré directement dans le tissu cible, par exemple, localement à la tumeur ou à sa périphérie, ou pour la libération systémique *via* le muscle squelettique. Dans la majorité des cas, l'expression du transgène est transitoire car il n'est pas intégré dans le génome des cellules cibles. Des résultats prometteurs ont été obtenus avec cette technique, notamment dans le cadre du traitement des métastases du mélanome par l'électrotransfert d'IL-12. Les résultats ont montré que l'électrotransfert d'un plasmide codant pour l'IL-12 avait un effet thérapeutique sur les tumeurs primaires ainsi que sur les tumeurs et métastases distantes [32].

iii. L'électroporation irréversible (IRE)

L'électroporation irréversible (IRE) est une technique d'ablation tumorale non thermique utilisant un champ électrique pour induire la mort cellulaire. Des électrodes placées autour de la tumeur délivrent de courtes impulsions (µs) à haute tension qui perturbent le potentiel de membrane cellulaire, résultant en la création de défauts permanents dans la membrane plasmique. Ces défauts irréversibles induisent une fuite importante du contenu intracellulaire conduisant à la mort cellulaire par perte d'homéostasie [33]. Bien que l'IRE détruise efficacement les cellules dans la zone d'ablation, la nature non thermique de la méthode semble conserver l'architecture de la matrice extracellulaire et de la vasculature après le traitement [34,35]. L'IRE partielle a également démontré de bons résultats dans la lutte contre le vieillissement cutané et dans la réduction des cicatrices chez les modèles de rats [36,37]. Cependant, les analyses étaient généralement effectuées plusieurs semaines ou mois après la fin du traitement, ainsi, les effets à court terme des champs électriques sur la matrice extracellulaire font toujours défaut.

La peau est un organe particulièrement adapté à l'étude des mécanismes d'électroporation. Du fait de leur accessibilité, les tumeurs cutanées ont été largement étudiées en électrochimiothérapie, et cet organe présente également l'avantage d'être riche en cellules dendritiques ce qui en fait une cible de choix pour la vaccination ADN par électrotransfert de gène.

2. La peau humaine

a. Structure et fonctions

La peau est un tissu complexe comprenant un épiderme stratifié multicouche, un derme riche en collagène et en fibres élastiques, des structures annexes telles que les follicules pileux, les glandes sudoripares et les glandes sébacées, et une couche de graisse sous-cutanée sous-jacente [38] (Figure 6). La peau constitue l'interface entre l'organisme et l'environnement extérieur et joue de nombreux rôles de protection en formant une barrière à toutes les échelles. Elle joue également un grand rôle dans les fonctions sensorielles et métaboliques par la synthèse de vitamine D. La barrière cutanée est majoritairement assurée par l'épiderme et sa couche cornée. Elle assure le maintien de l'homéostasie hydrique grâce notamment à la présence de jonctions serrées, de lipides intercornéocytaires, et des composants du Facteur Naturel d'Hydratation (NMF , « Natural Moisturizing Factor ») [39] . La barrière hydrique n'est cependant pas absolue et le mouvement normal de l'eau dans l'atmosphère est appelé perte d'eau transépidermique (TEWL)[40]. Elle joue également un rôle dans la thermorégulation, la défense contre les agressions extérieures qu'elles soient physiques, chimiques ou biologiques [40].

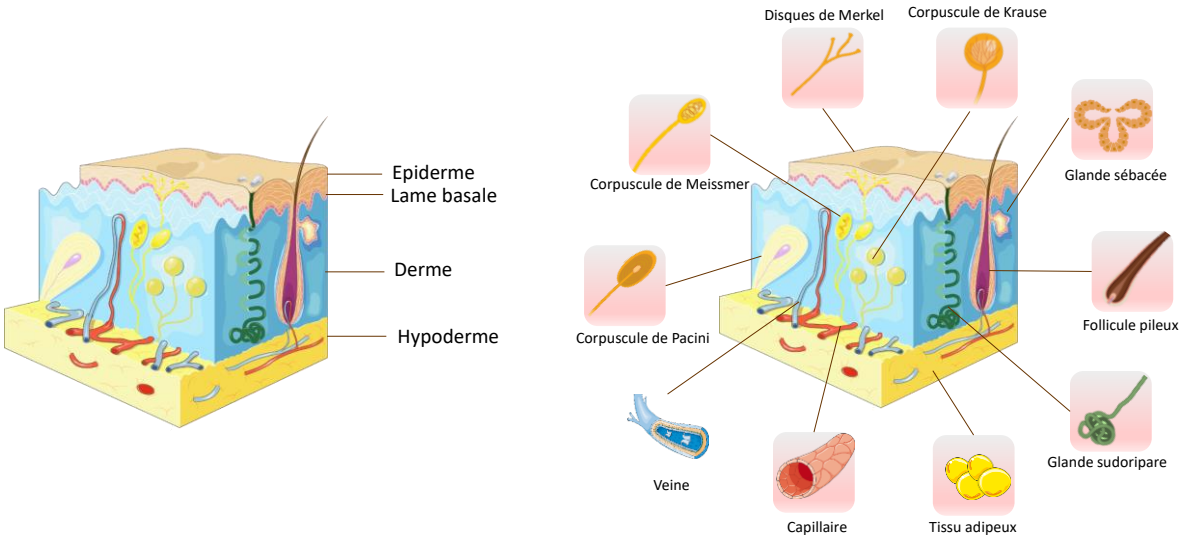


Figure 6 : Schéma représentant la structure de la peau et ses annexes. Réalisé grâce à la base d'images Servier Medical Art

iv. L'épiderme

L'épiderme est un épithélium stratifié avasculaire constitué à 95% de kératinocytes. Les autres types cellulaires présents sont : les mélanocytes, cellules dendritiques dérivées de la crête neurale synthétisant la mélanine dans des organites subcellulaires appelés mélanosomes avant de la transporter vers les kératinocytes. Chaque mélanocyte fournit des mélanosomes pour une trentaine de kératinocytes autour desquels ils forment une « capsule mélanique » protégeant les noyaux des rayonnements solaires ultraviolets [38] ; les cellules de Langerhans (LC) qui constituent un sous-ensemble

de cellules présentatrices d'antigène (APC), résidentes entre les kératinocytes et jouant un rôle important dans l'immunité cutanée [41] ; les cellules de Merkel retrouvées près ou au contact de très fins nerfs non myélinisés avec lesquels ils forment des synapses jouent un rôle de mécanorécepteur.

L'épiderme est divisé en quatre couches principales en fonction de l'état de différenciation des kératinocytes qui s'effectue verticalement en s'éloignant de la jonction dermo-épidermique vers la surface : la couche basale, la couche épineuse, la couche granuleuse et la couche cornée. La différenciation progressive de l'épiderme est associée à des modifications spécifiques de l'expression et de la fonction des protéines (Figure 7) [42].

La couche basale (ou germinative) est constituée d'une seule couche de kératinocytes qui prolifèrent et engagent les cellules filles dans la différenciation terminale, qui aboutit à la formation de la couche cornée. Ce processus prend habituellement quelques dizaines de jours, mais peut être plus court dans certaines pathologies telles que le psoriasis[38]. On retrouve aussi dans cette couche les mélanocytes et les cellules de Merkel. La couche basale est mécaniquement liée au derme par la membrane basale composée d'un réseau complexe de macromolécules qui relient les filaments intermédiaires des kératinocytes basaux aux fibres de collagène du derme superficiel. La fonction principale de ces protéines est d'assurer l'adhérence entre l'épiderme et le derme [43].

La couche épineuse, qui tire son nom de la forme particulière de ses kératinocytes, produit un réseau dense de filaments de kératines 1/10 qui interagit avec les desmosomes donnant ainsi l'aspect épineux de ces cellules en microscopie optique[42].

Dans la couche granuleuse, les kératinocytes subissent un mécanisme particulier de mort cellulaire programmée, appelée cornification, entraînant un aplatissement cellulaire ainsi qu'une désintégration progressive du noyau et des organites intracellulaires. Les granules de kératohyalines s'accumulent et le contenu des corps lamellaires est sécrété dans l'espace extracellulaire[42].

La couche cornée est composée de cornéocytes anucléés (kératinocytes morts) enrichis en kératines liés à une enveloppe cornée périphérique composée de protéines réticulées. La fonction barrière de la couche cornée est principalement assurée par des lamelles lipidiques localisées dans les espaces extracellulaires situés entre les cornéocytes[42]. Les enzymes présentes dans le compartiment extracellulaire sont responsables du remodelage des lipides ainsi que des réactions conduisant à la desquamation[40]. La couche cornée est une barrière antimicrobienne à la fois composée de peptides et lipides antimicrobiens, de chimiokines, et de conditions défavorables à la croissance des pathogènes (pH acide, faible humidité, température de surface inférieure à 37°C). Cette composante est complétée par le processus de desquamation qui permet l'élimination des micro-organismes présents à la surface. Cependant, même si la couche cornée représente la principale composante de la barrière épidermique, les autres couches y contribuent également *via* la présence de jonctions serrées adhérentes (type ZO, Claudin), de desmosomes et d'autres éléments du cytosquelette.

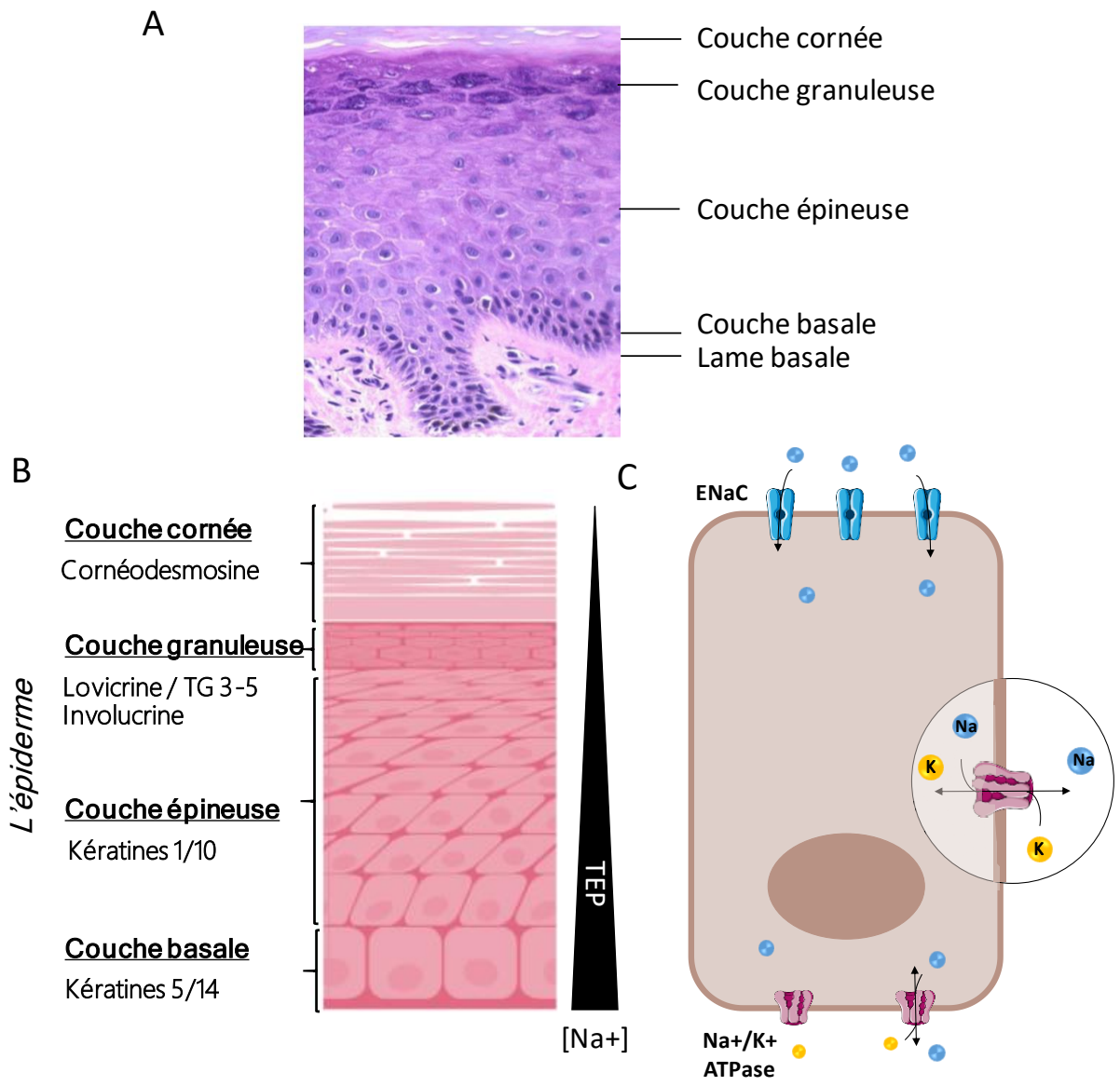


Figure 7 : A. Histologie d'une coupe d'épiderme humain après coloration à hématoxyline/éosine. Tiré de [44] B. Les principaux marqueurs de la différenciation des kératinocytes dans l'épiderme et la formation du potentiel transépithélial (TEP). A travers l'épiderme, le mouvement des ions sodium se fait vers la couche basale, produisant une accumulation de ces ions dans cette partie de l'épiderme. La différence de concentration des ions sodium dans l'épiderme crée le potentiel transépithélial. C. Schéma représentant le potentiel transmembranaire dans un kératinocyte. Réalisé grâce à la base d'images Servier Medical Art

- *Potentiel transépithélial et potentiel transmembranaire*

La différenciation baso-apicale des kératinocytes permet en outre la mise en place d'un potentiel transépithélial (PTE) dont la valeur est estimée entre 10 et 60 mV dépendamment de la localisation anatomique [45]. Il est la conséquence d'une distribution hétérogène des ions sodium à travers l'épiderme. Pour comprendre ce phénomène observé à l'échelle tissulaire, il convient tout d'abord de décrire les mécanismes de distribution des ions sodiques à l'échelle cellulaire, générant le potentiel transmembranaire des cellules. En effet, ces deux phénomènes sont étroitement liés. Comme l'explique la Figure 7, pour maintenir l'homéostasie, les ions potassium K^+ et sodium Na^+ sont

naturellement distribués de manière à conserver une différence de potentiel entre l'extérieur et l'intérieur de la cellule, résultant en une concentration faible en sodium dans le cytosol, et importante dans le milieu extracellulaire [46]. Le déséquilibre de charges créé par l'activité de la pompe Na^+/K^+ induit une différence de potentiel transmembranaire de l'ordre de -40 mV [47] qui favorise le transport actif secondaire de sodium vers l'intérieur de la cellule par les canaux ENac (Epithelial Na channel). Le potentiel transépithélial résulte ainsi de la création d'un gradient osmotique consécutif de l'activité conjuguée des deux principaux transporteurs d'ions sodiques [47].

L'endommagement des cellules épithéliales lors d'une blessure rompt le potentiel transépithélial. En conséquence, les ions sodium se relocalisent par diffusion passive, induisant la création d'un champ électrique endogène de 100 à 200 mV/mm aux marges de la plaie [48 49]. Ce champ électrique endogène trace des pseudo-boucles de 1mm sur la surface extérieure de la peau aux abords du site de lésion[49] (Figure 8). Les cellules non endommagées qui se trouvent à proximité vont alors tenter de maintenir le potentiel transépithélial en entretenant le transport des ions en position basale jusqu'à la ré-épithélialisation complète de la lésion [48]. Le champ électrique endogène semble jouer un rôle majeur dans le processus de fermeture de la plaie, en particulier *via* l'activation de la migration et de la prolifération des cellules épithéliales[50], ainsi que la promotion de l'angiogenèse [51,52].

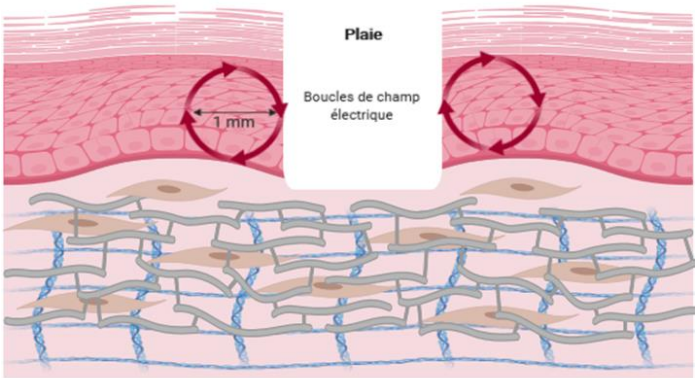


Figure 8 : Formation des boucles de champ électrique endogène aux abords d'une plaie. Adapté de [46]

v. Le derme

Les composants cellulaires du derme sont en majorité les fibroblastes, mais également les cellules immunitaires telles que les mastocytes, plasmocytes, lymphocytes et cellules dendritiques dermiques [38]. Le derme est divisé en deux couches principales : le derme papillaire et le derme réticulaire. Le derme papillaire en contact avec la membrane basale est richement alimenté en vaisseaux sanguins, lymphatiques (plexi superficiels et profonds) et en terminaisons nerveuses sensorielles (terminaisons nerveuses libres, corpuscules de Pacini et corpuscules de Meissner). Le derme réticulaire, qui est la partie principale du derme en contact avec les tissus sous-cutanés [38] est un coussin plus dur qui protège

les tissus sous-jacents et contient les structures annexes de l'épiderme telles que les glandes sébacées, sudoripares et les follicules pileux [42] (Figure 6).

- *Les fibroblastes*

Les fibroblastes sont des cellules de forme allongée très représentées dans tous les tissus, et en particulier au sein des tissus conjonctifs. Les fibroblastes jouent un rôle majeur dans la régulation et le renouvellement de la matrice extracellulaire en condition physiologique. En cas de blessure, ils sont activés et se différencient en myofibroblastes, un événement clé dans les processus de cicatrisation des tissus conjonctifs. Une des particularités fondamentales des myofibroblastes est la néo-expression de l'actine des muscles lisses (α-SMA) dans des fibres de stress, responsables de leur activité contractile permettant le rapprochement physique des bordures de la plaie [53] (Figure 9). Les fibroblastes et les myofibroblastes vont conjointement produire de la matrice extracellulaire (MEC), essentiellement des collagènes, principal composant du tissu cicatriciel. Les cytokines et facteurs impliqués dans l'activation des myofibroblastes sont, entre autres, les contraintes mécaniques (d'où l'importance des conditions de cultures *in vitro*), le facteur de croissance transformant β (TGF-β1), le facteur de croissance du tissu conjonctif (CTGF ou CCN2), le facteur de croissance dérivé des plaquettes (PDGF), et la voie de signalisation Wnt/β-catenin [54]. À noter l'importance de la matrice extracellulaire dans l'activation des myofibroblastes par le relargage mécanique du TGF-β1 latent stocké dans la matrice [54]. À la fin du processus de cicatrisation, les myofibroblastes sont éliminés par apoptose. Dans le cas contraire, l'accumulation de collagène et la contraction persistante de la matrice induisent une condition pathologique appelée fibrose [55].

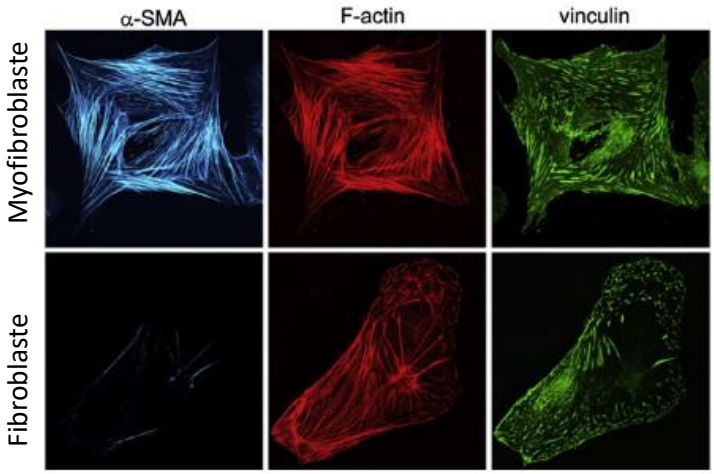


Figure 9 : Expression de l'α-SMA, de la F-actin et de la vinculin dans les fibroblastes et les myofibroblastes in vitro. [54]

- *Les cellules endothéliales*

Dans les vaisseaux sanguins, les cellules endothéliales polarisées sont positionnées en structures tubulaires et agissent comme une barrière polyvalente entre l'intérieur et l'extérieur du tissu

vasculaire. Les cellules péri-endothéliales telles que les péricytes, les fibroblastes, et les cellules musculaires lisses stabilisent les vaisseaux en améliorant le contact cellule-cellule au sein de l'endothélium, en produisant des protéines de la matrice extracellulaire et en régulant le diamètre des vaisseaux [56]. Dans la peau, la microcirculation sanguine est organisée en deux plexus vasculaires horizontaux, l'un superficiel dans le derme papillaire qui assure les échanges d'oxygène et de nutriments pour les tissus environnants, et l'autre plus profond localisé à la jonction dermo-hypodermique qui joue un grand rôle dans la thermorégulation [57]. Des artérioles et des veinules relient les deux plexus.

La vasculogenèse et l'angiogenèse sont les processus fondamentaux par lesquels les nouveaux vaisseaux sanguins sont formés. La vasculogenèse est définie comme la différenciation de précurseurs, appelés angioblastes, en cellules endothéliales conduisant à la formation d'un réseau vasculaire *de novo* [58]. Au contraire, l'angiogenèse est définie comme la croissance de nouveaux capillaires à partir de vaisseaux préexistants [59]. Dans l'embryon, les vaisseaux sanguins se forment à la fois par vasculogenèse et angiogenèse, puis chez l'adulte, la formation de nouveaux vaisseaux sanguins n'est plus observée que sous certaines conditions physiologiques ou pathologiques (la cicatrisation ou le cancer par exemple), et survient principalement par angiogenèse [60]. L'initiation de l'angiogenèse nécessite d'abord la déstabilisation de la structure tubulaire endothéliale préexistante, souvent causée par une lésion tissulaire ou une transformation néoplasique. Les facteurs de croissance solubles, les cytokines et les interactions cellules-cellules et cellules-matrice jouent un rôle déterminant dans l'initiation de l'angiogenèse. Les cellules endothéliales activées, les plaquettes, les cellules musculaires lisses, les monocytes/macrophages et les fibroblastes libèrent des cytokines pro-angiogéniques telles que le facteur de croissance endothélial vasculaire-A (VEGF-A), le facteur de croissance dérivé des plaquettes (PDGF), le facteur de croissance des fibroblastes basique (FGF-b), le facteur de croissance transformant bêta (TGF-b), et l'angiopoïetine-1 qui permettent aux cellules endothéliales de migrer à travers la matrice extracellulaire, de proliférer et de former de nouveaux tubules immatures. Pendant leur migration les cellules endothéliales digèrent la membrane basale et d'autres composants de la matrice en libérant des enzymes protéolytiques telles que l'urokinase plasminogène activateur (uPA) et les métalloprotéinases matricielles (MMP) et s'appuient également sur les molécules d'adhésion comme les intégrines. Au fur et à mesure qu'elles migrent vers la zone de néovascularisation, les cellules endothéliales prolifèrent et forment des vacuoles, qui deviendront des vaisseaux fonctionnels avec la coopération des cellules péri-endothéliales[56].

Les cellules endothéliales sont aussi impliquées dans la mise en place du système vasculaire lymphatique, essentiel au maintien d'un équilibre hydrique normal et aux réponses immunitaires [61]. Les facteurs de croissance endothélial vasculaire-C (VEGF-C) et D (VEGF-D) sont impliqués dans la

croissance de nouveaux vaisseaux lymphatiques *in vivo*, appelée lymphangiogenèse, avec la participation de la voie Tie/angiopoïétine, de la neuropiline-2 et de l'intégrine- 9 [61].

Quelques études ont déjà souligné le potentiel de certains types de champs électriques à induire la sécrétion de VEGF, la réorientation, l'allongement et la migration de cellules endothéliales HUVECs en culture *via* l'activation des récepteurs VEGF [51,52].

- *La matrice extracellulaire (MEC)*

Le derme est un tissu conjonctif caractérisé par une abondante matrice extracellulaire composée de fibres de collagènes, de fibres élastiques et d'une substance fondamentale amorphe contenant essentiellement des protéoglycanes. La matrice extracellulaire fournit un échafaudage structurel au tissu *via* un réseau d'interactions protéines-protéines et protéines-protéoglycanes. Ces interactions sont impliquées dans la formation d'assemblages supramoléculaires tels que des fibrilles de collagène et de fibres élastiques, dans l'architecture tissulaire et dans les interactions cellule-matrice qui régulent la croissance et le comportement des cellules (Figure 10).

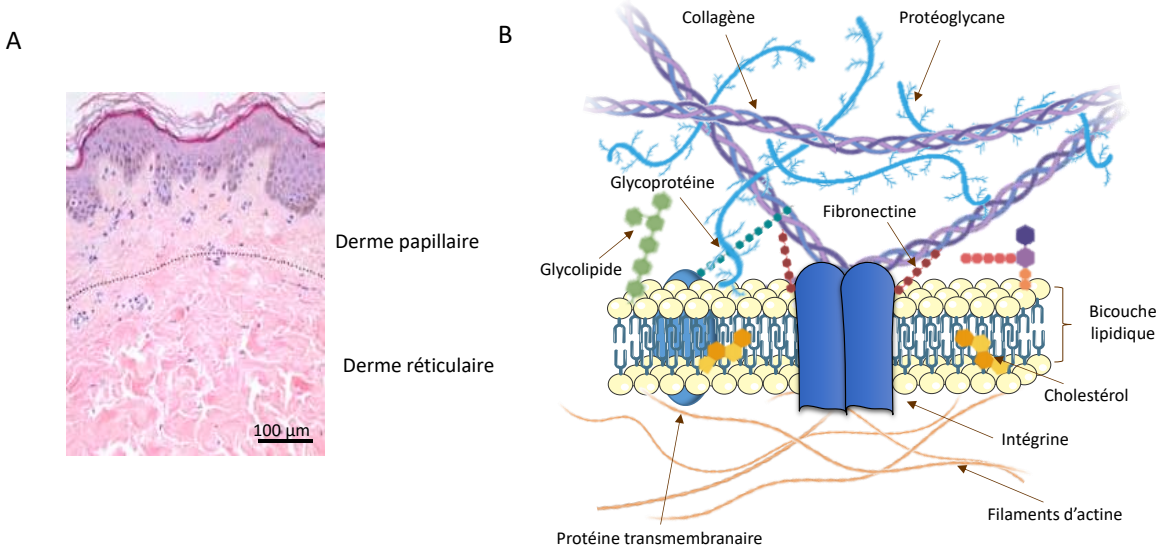


Figure 10: A. Histologie d'une coupe de peau humaine après coloration à l'hématoxyline/éosine/safran (HES). Tiré de [62].
B. Schéma simplifié de l'organisation de la matrice extracellulaire entourant les cellules.

- *Les collagènes*

Les collagènes sont les protéines les plus abondantes du corps, représentant près de 30% en masse des protéines totales chez les mammifères[63]. Les collagènes se composent de 3 chaînes α de polypeptides qui s'assemblent pour former une structure en triple hélice. Chez les vertébrés, 46 chaînes de collagènes distinctes s'assemblent pour former 28 types de collagènes classés en différents types selon s'ils s'assemblent en fibrilles (types I, II, III, V), en réseau comme c'est le cas dans la membrane basale (types IV, VII), ou en FACIT (Fibril Associated Collagen with Interrupted Triple

helixes ; types IX, XII) et autres (type VI). Les collagènes fibrillaires I, III et V sont très largement majoritaires dans le derme où ils représentent respectivement 85%, 10% et 2% des collagènes[63]. Dans la peau, les collagènes fibrillaires sont produits principalement par les fibroblastes. Chaque molécule de collagène fibrillaire est constituée de trois chaînes polypeptidiques, appelées chaînes α. Les chaînes α sont tout d'abord synthétisées par les ribosomes puis sécrétées dans le réticulum endoplasmique, où elles sont modifiées. En effet, les collagènes se composent d'une répétition de résidus (Gly-X-Y), et comportent fréquemment des triplets (Gly–Pro–Hyp) dans lesquels les prolines sont à 15% hydroxylées[64]. L'hydroxyproline est un résidu de proline spécifique aux collagènes qui résulte de l'hydroxylation de la proline par la prolyl 4-hydroxylase et la prolyl 3-hydroxylase, elle est donc fréquemment utilisée pour quantifier indirectement la quantité de collagènes dans un tissu. Certains résidus de lysine sont également hydroxylés par la lysyl hydroxylase[64]. Puis, les triples hélices de procollagènes subissent des glycosylations au niveau des résidus hydroxylysines lors de leur transit *via* le Golgi. Ces modifications participent à la stabilisation des triples hélices de procollagènes qui sont ensuite sécrétées dans l'espace extracellulaire. Les domaines N et C-terminaux sont alors clivés et éliminés. Les collagènes résultants, dorénavant nommés tropocollagènes, s'assemblent ensuite en fibrilles *via* des liaisons transversales covalentes formées entre les résidus de lysine de deux chaînes, par un processus catalysé par la lysyl oxydase (LOX) [65]. La transglutaminase 2 jouerait également un rôle dans la réticulation et la stabilisation des collagènes[66]. Les fibrilles peuvent ensuite s'associer entre elles et former des fibres de collagènes de 0,5 à 5 µm de diamètre[64] (Figure 11).

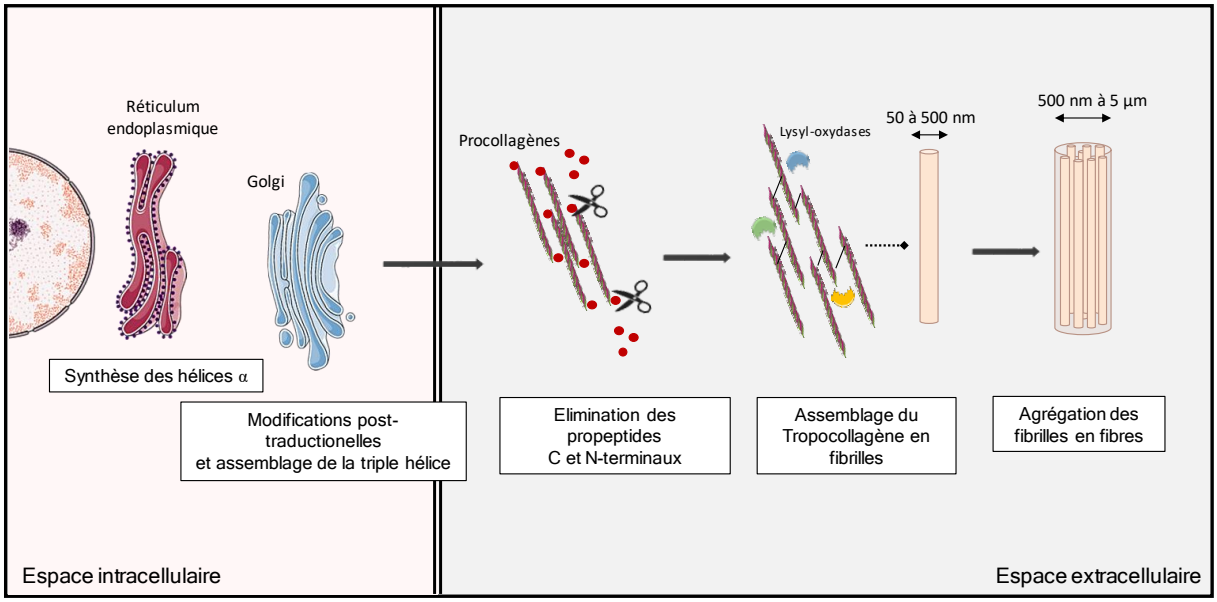


Figure 11 : Schéma résumant la biosynthèse des collagènes in vivo. Réalisé grâce à la base d'images Servier Medical Art

- *Les protéoglycanes*

Ils se composent d'une protéine centrale à laquelle sont attachées des chaînes latérales de glycosaminoglycanes (GAG). Les GAG sont des polysaccharides anioniques linéaires constitués d'unités disaccharidiques répétitives. Il existe plusieurs types de GAG : l'acide hyaluronique, les kératanes sulfates, la chondroïtine, les dermatanes sulfates et les héparanes sulfates (y compris l'héparine). Tous sauf l'acide hyaluronique sont des GAG sulfatés. Les chaînes GAG fortement chargées négativement permettent aux protéoglycanes de séquestrer l'eau et les cations divalents, conférant ainsi des fonctions de lubrification. Les protéoglycanes sécrétés comprennent les grands protéoglycanes, tels que l'aggrécane et le versicane, les petits protéoglycanes riches en leucine, tels que la décorine et le lumicane, et les protéoglycanes à membrane basale, tels que le perlecan. La décorine et le lumican ont un rôle régulateur dans l'assemblage des fibrilles de collagène. Les protéoglycanes interagissent également avec les facteurs de croissance et les récepteurs des facteurs de croissance et sont impliqués dans des processus biologiques tels que l'angiogenèse [65]. Les GAGs ont également la capacité de stocker et de séquestrer des facteurs de croissance et des cytokines, mais également d'établir des gradients de concentration et de limiter la portée de diffusion et l'accessibilité des ligands à leurs récepteurs [65,67]. Les FGF en particulier se lient fortement aux chaînes d'héparanes sulfates et de perlecanes. Les héparanes sulfates sont également impliqués dans la liaison, le transport et l'activation de facteurs de contrôle du développement tels que BMP, Hedgehogs, et Wnt [65,67].

Parmi les autres protéines importantes de la matrice extracellulaire, on retrouve :

- La famille des laminines, protéines essentielles au développement embryonnaire précoce et à l'organogenèse qui s'auto-assemblent pour former des réseaux étroitement liés aux cellules par le biais d'interactions avec les récepteurs de surface tels que les intégrines et les syndécans ;
- La fibronectine, qui est essentielle pour la fixation et la migration cellulaire en fonctionnant comme une « colle biologique ». Sécrétée sous forme de dimères, elle possède des sites de liaison aux autres dimères de la fibronectine, aux collagènes, à l'héparine et aux intégrines ;
- L'élastine, qui confère de l'élasticité aux tissus [65]

Les cellules se connectent à la MEC par le biais d'intégrines, de syndécans et d'autres récepteurs. Les intégrines sont des récepteurs hétérodimériques composés des sous-unités α et β qui fonctionnent comme des liens entre la MEC et le cytosquelette. L'activation des intégrines par les ligands de la matrice entraîne des changements conformationnels dans les intégrines qui initient des événements de signalisation affectant les processus de prolifération cellulaire, de différenciation, de contractilité et d'expression génique [68]. En parallèle, la signalisation intracellulaire peut induire des modifications

de conformation et d'activation des intégrines et modifier leur affinité avec les ligands. Les intégrines agissent donc comme un signal bidirectionnel entre les compartiments intra et extracellulaires [65].

La matrice peut en outre participer à la maturation des ligands tels que le TGF-β, d'abord sécrété sous forme latente et stocké dans la matrice. Il y reste inactif jusqu'à sa libération par protéolyse MMP-dépendante ou par tension mécanique. La thrombospondine 1 (TSP-1), joue également un rôle important dans la régulation de l'activation de TGF-β. Les niveaux de TSP-1 augmentent dans les plaies, il pourrait ainsi contribuer à l'activation du TGF-β1 pendant la cicatrisation [69].

- *Le remodelage de la matrice extracellulaire*

La MEC subit en permanence un remodelage dynamique qui permet de déposer, de dégrader ou de modifier ses composants. La réticulation intermoléculaire par les LOX est une modification clé post-traductionnelle pour les collagènes et l'élastine. La réticulation accrue due à une activité excessive de la LOX augmente la résistance à la traction du tissu et la rigidité de la matrice, ce qui affecte les comportements cellulaires. Les collagènes et autres éléments de la MEC sont des substrats pour les métalloprotéinases matricielles (MMP), les désintégrines (ADAM), ainsi que des protéases telles que la cathepsine G et l'élastase.

- *Les métalloprotéinases matricielles (MMPs)*

Les MMPs constituent une famille d'endopeptidases à doigt de zinc incluant au moins 28 membres connus, qui interviennent dans de nombreux processus physiologiques (morphogenèse, développement, cicatrisation) et pathologiques (arthrite, sclérose multiple, invasion tumorale et métastatique) [70,71]. La plupart des membres de la famille des MMPs sont sécrétés, mais il existe aussi des MMPs de type membranaire. La structure primaire des MMPs contient au minimum trois domaines : un pré-domaine, un pro-domaine et un domaine catalytique proprement dit (Figure 12). Le pré-domaine, au niveau N-terminal, correspond à un peptide signal. Il est nécessaire à la sécrétion des MMPs puis est rapidement dégradé. Le pro-domaine maintient l'activité enzymatique sous forme latente et est classiquement constitué d'une séquence peptidique comprenant un résidu cystéine qui interagit avec l'atome de zinc au niveau du domaine catalytique.

Classe	MMP	Structure	Principaux substrats	Principales sources cellulaires au niveau de la peau
Matrilysines	7 ; 26		Fibronectine, gélatines	
Collagénases	1 ; 8 ; 13 ;18		Collagènes fibrillaires (I, II, II) et collagènes VII, VIII, X, Serpine	Fibroblastes
Stromelysines	3 ; 10 ; 11		Glycoprotéines, protéoglycanes, collagenes IV, V, IX, X, E-cadherine	Fibroblastes, Keratinocytes
Gélatinases	2 ; 9		Gelatines, collagene IV, V, TGFb latent	Fibroblastes, Cellules immunitaires Cellules endotheliales
MMP membranaires (MT-MMP)	14 ; 15 ; 16 ; 24		Collagènes I, II, et III Pro-MMP	Fibroblastes ,Cellules endotheliales
MMP membranaires à ancre GPI	17 ; 25		Fibrine, fibrinogene, TNF precursor	

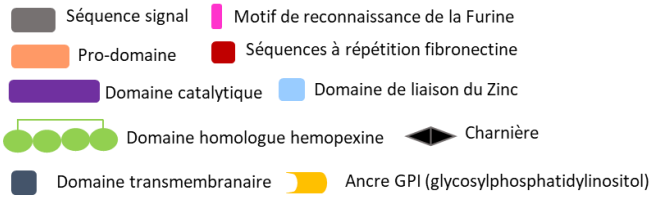


Figure 12 : Structure, substrats et principales sources des MMPs. Librement adapté de [70]

Les MMPs sont donc sécrétées sous forme latente ou zymogène. Pour être activé, le pro-domaine doit être éliminé ou modifié par clivage protéolytique, libérant ainsi l'atome de zinc du résidu cystéine et entraînant l'activation du domaine catalytique qui peut alors se lier à son substrat. La plupart des MMPs possèdent en plus un domaine charnière riche en proline et un domaine C-terminal contenant une séquence homologue à de l'hemopexine ou de la vitronectine. Ce dernier domaine intervient dans la reconnaissance du substrat des MMPs. Des particularités de structure sont observées pour certaines MMPs comme les MMP-2 et -9 qui possèdent, à l'intérieur de leur domaine catalytique, un domaine homologue à la fibronectine qui est responsable de la forte affinité de ces enzymes pour les collagènes et la gélatine. Les MMPs de type membranaire (MT-MMPs) possèdent un domaine additionnel qui leur permet l'ancrage à la membrane plasmique [70]. Les MMPs sont classées selon leur substrat préférentiel (Figure 12). On distingue au moins 5 classes : les collagénases (MMP-1, MMP-8, MMP-13 et MMP-18), les gélatinases (MMP-2 et MMP-9), les stromelysines (MMP-3, MMP-10 et MMP-11), les matrilysines (MMP-7 et MMP-26), et les MMPs de type membranaire, MT-MMP, (MMP-14, MMP-15, MMP-16, MMP-17, MMP-24 et MMP-25). Malgré une certaine spécificité de substrats, les spectres

protéolytiques des différentes MMPs sont assez larges et se recouvrent partiellement permettant ainsi la dégradation de l'ensemble des composants de la MEC, mais également le clivage d'autres composés non matriciels [70]. Parmi ces composés non-matriciels on retrouve des précurseurs de facteur de croissance, des protéines de liaison aux récepteurs d'adhésion de la surface cellulaire. Par exemple, le clivage du perlécan libère le facteur de croissance des fibroblastes (FGF) et celui de la décorine augmente la biodisponibilité du TGF-β latent qui peut ensuite être activé par MMP-2 et MMP-9 [70]. En outre, le clivage des composés matriciels peut libérer des fragments bioactifs appelés les matrikines et les matricryptines régulant un certain nombre de processus physiopathologiques tels que l'angiogenèse, la fibrose, la cicatrisation ou le cancer [63].

- *La régulation des MMPs*

L'activité des MMPs est contrôlée à différents niveaux : la transcription, l'activation protéolytique de la forme zymogène et l'inhibition de l'enzyme active par des inhibiteurs endogènes [71,72]. La plupart des MMPs sont exprimées à des niveaux faibles ou même pas du tout dans les tissus adultes en l'absence de stimulation. Les MMPs sont sécrétées sous forme de précurseurs « pro-MMPs » et restent inactives jusqu'à leur clivage. Cette inactivité est due à l'interaction du zinc du site actif avec une cystéine du protodomaine [73]. Ces pro-MMPs peuvent être activées dans l'espace extracellulaire par différents mécanismes comme l'action d'autres peptidases, dont d'autres MMPs, la plasmine et les kallikréines [63 64 73] . La voie d'activation plasminogène de type urokinase (PLAU) / activateur du plasminogène de type tissulaire (PLAT) / plasmine / MMPs contribuerait ainsi à la dégradation des collagènes [74]. Les MMPs de types membranaires et celles possédant un site de reconnaissance de la furine peuvent également être activées par des sérines protéases intracellulaires de type furine [75]. En outre, les MMPs sont connues pour être activées en réponse à des signaux exogènes tels qu'un pH faible, la chaleur, et les espèces réactives de l'oxygène (ROS) [75].

L'activité des MMPs est étroitement contrôlée par plusieurs inhibiteurs endogènes. L'α2-macroglobuline se lie aux MMPs et crée un complexe qui s'attache de manière irréversible à un récepteur de type scavenger. Les inhibiteurs de MMPs les plus étudiés sont cependant les TIMPs (tissus inibitor of metalloproteases). Les TIMPs sont des petites protéines de 21 à 28 kDa qui se lient aux MMPs dans un rapport stœchiométrique de 1:1 et bloquent de manière réversible leur activité. Les TIMPs diffèrent dans leurs modèles d'expression et leur affinité pour les diverses MMPs, ils peuvent dans certains cas se lier aux pro-MMPs et empêcher leur activation [70].

3. Les modèles de recherche sur la peau

a. In vivo

Les rongeurs sont classiquement utilisés dans les études portant sur la peau. Le modèle murin n'est toutefois pas toujours adapté à ce type d'étude, car la peau murine diffère de la peau humaine dans son architecture, sa composition cellulaire et également dans ses mécanismes de guérison des plaies. Même si la peau humaine et la peau de souris partagent beaucoup de caractéristiques communes, Gerber et al ont montré dans une étude transcriptomique que seulement 30% des gènes associés à la peau étaient identiques entre l'humain et la souris [76]. Une partie des gènes est seulement représentée dans l'une ou l'autre des espèces, mais beaucoup de gènes communs ont également une expression différente dans les peaux murines et humaines. La peau humaine exprime beaucoup plus de gènes de morphogenèse et de facteurs de croissance que son homologue murin, au contraire la peau de souris exprime elle plus de gènes associés à l'immunité[76]. Le nombre très important de follicules pileux dans la peau de souris (Figure 13) se manifeste également par une expression différente des gènes qui y sont associés. Concernant les processus de guérison des plaies, la peau de souris contient une couche musculaire sous-cutanée, le *panniculus carnosus*, qui est absent chez l'humain et qui induit une « contraction musculaire » permettant de rapprocher les extrémités de la plaie favorisant ainsi sa cicatrisation. La formation de chéloïdes et des cicatrices qui suivent la guérison des plaies chez l'humain n'est pas retrouvée chez les souris [76,77].

La peau de porc est très comparable à la peau humaine en termes de composition cellulaire, de physiologie et d'épaisseur, à l'exception de la couche de graisse sous-cutanée, qui est plus épaisse chez le porc (Figure 13). Les follicules pileux sont rares chez les deux espèces, la teneur cutanée en collagènes et en élastine est analogue[78]. De plus, la composition des cellules immunitaires et la distribution des mélanocytes sont similaires, et la peau de porc adhère aux tissus sous-jacents comme le fait la peau humaine. En raison de ces similitudes, le porc est un bon modèle pour les études sur la peau. La limite principale de l'utilisation de ce type de modèle est leur dimension et par conséquent leurs coûts logistiques et matériels ainsi que la difficulté de faire des modèles génétiquement modifiés[78].

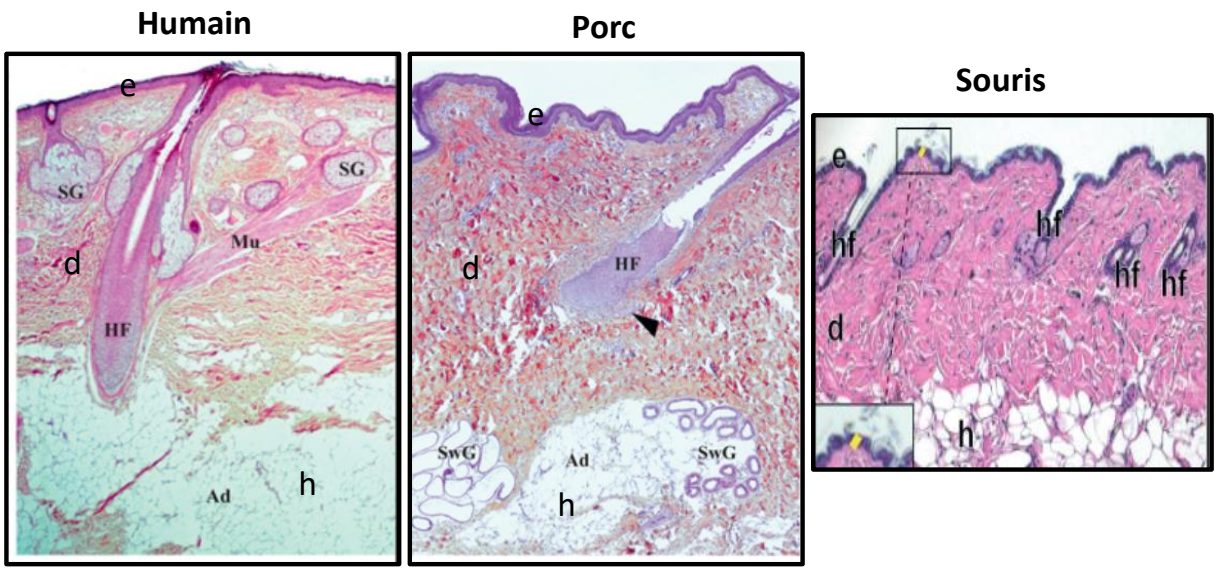


Figure 13 : Comparaison histologique de la peau humaine, porcine et murine. e, épiderme; d, derme; h, hypoderme, hf, follicule pileux, Ad, adipocytes ; SG, glande sébacée ; SwG , glande sudoripare, Mu , muscle. D'après [78,79]

D'autre part, la sensibilisation générale au bien-être animal et la désapprobation du grand public quant aux tests sur les animaux a encouragé la législation à limiter leur utilisation. L'OCDE a ainsi édité des directives basées sur la règle des 3R : Remplacement, Réduction, Raffinement. Elle vise à *Remplacer* les expériences animales quand cela est possible, à *Réduire* le nombre d'animaux utilisés dans les expériences et à *affiner* les méthodes expérimentales afin de minimiser la souffrance animale et améliorer le bien-être des animaux utilisés. Ces règles ont été premièrement décrites par W. M. S. Russell et R. L. Burch en 1959 dans « The Principles of Humane Experimental Technique »[80].

b. Ex vivo

C'est dans le cadre du développement d'approches alternatives à l'utilisation d'animaux qu'a émergé l'utilisation de la peau humaine issue de chirurgie comme un modèle expérimental. La mise en survie d'explants de peau humaine présente l'avantage de conserver temporairement la structure de la peau, sa population cellulaire et sa matrice extracellulaire. En dépit de ces avantages, cette méthode repose sur la disponibilité des tissus et sur la capacité de l'expérimentateur à assurer la survie de l'explant. La reproductibilité est donc limitée par la diversité des donneurs et le temps de survie des explants qui est assez court (une dizaine de jours) [81]. Toutefois, certains auteurs ont déjà démontré que la durée de vie d'explants de peau pouvait être améliorée par leur perfusion sur un système de puce micro fluidique [82]. La peau d'oreille de cochon est également souvent utilisée comme modèle *ex-vivo* d'étude sur la peau. Malgré une grande similitude avec la peau humaine, les conditions de préservation du tissu (impliquant généralement la congélation) ne permettent pas une conservation totale des structures cellulaires.

c. In vitro

i. Modèles 2D

Les modèles cutanés *in vitro* sont généralement des modèles de culture monocouche en 2D, contenants seulement un type cellulaire en monocouche. Certains modèles plus complexes contiennent deux types cellulaires en coculture (généralement kératinocytes et fibroblastes). Une partie de ces modèles ont été validés pour l'étude de la corrosion cutanée et pour les tests d'irritabilité (OCDE test n°404), mais aucun n'est capable de reproduire la complexité de la peau humaine native, notamment à cause du manque d'organisation tridimensionnel et des annexes cutanées. En outre, les cultures cellulaires 2D perdent un certain nombre de signaux mécaniques et biophysiques, la communication intercellulaire aussi bien que l'architecture du tissu dont ils sont issus. L'utilisation de cellules immortalisées peut également impacter les processus cellulaires, comme la différenciation chez les kératinocytes par exemple [78].

ii. L'ingénierie tissulaire

L'ingénierie tissulaire peut en partie répondre aux problématiques posées par les modèles 2D, en proposant des modèles complexes capables de restaurer, de maintenir ou d'améliorer des tissus endommagés ou des organes, mais également d'obtenir des modèles *in vitro* plus représentatifs des conditions physiologiques ou pathologiques [83]. Les approches actuelles en ingénierie tissulaire sont principalement représentées par trois stratégies :

- La bio-impression, que l'on ne détaillera pas dans ce manuscrit,
- L'approche « Scaffold-based » qui utilise un support permettant l'ancrage des cellules et leur prolifération jusqu'à la formation de tissu 3D. Cette approche présente l'avantage de varier les matériaux utilisés dépendamment des propriétés souhaitées pour, par exemple, faire correspondre le profil de dégradation du support à la formation de l'ECM *de novo* par les cellules, et fournir un environnement biomimétique pour les cellules tout en contrôlant les propriétés mécaniques et la libération de facteurs de croissance et de différenciation. Ce support peut être synthétique ou issu de la décellularisation d'organes [84]. Cependant, quelques inconvénients de cette approche sont des densités d'ensemencement peu homogènes, et le fait que le support peut gêner la mise en place et le remodelage du tissu et altérer la morphologie et la mécano-transduction dans les cellules. En outre, dans le contexte d'utilisation clinique cette approche présente un risque de toxicité et d'immunogénicité [85].
- L'approche « Scaffold-free », sans support, qui est basée sur l'utilisation de feuillets de cellules ou de sphéroïdes comme éléments de base de construction. Elle repose sur la capacité

inhérente de ces éléments de base à fusionner et à former des structures plus grandes. En raison de la densité d'ensemencement cellulaire initiale élevée, la prolifération et la migration des cellules ne sont pas des facteurs décisifs contrairement à l'approche avec support. Cette approche est très avantageuse, car elle permet de reconstruire des tissus complexes en assemblant des éléments de base hétérogènes constitués de différents types cellulaires et elle est compatible avec l'utilisation clinique. La principale limite réside dans les propriétés mécaniques parfois moins performantes et un temps d'immobilisation nécessaire au dépôt de MEC et à la fusion des éléments constitutifs [85]. L'auto-assemblage utilise cette approche pour reconstruire *in vitro* du tissu cutané notamment.

iii. L'auto-assemblage

La méthode d'auto-assemblage repose sur la culture des cellules en présence d'acide ascorbique (Vitamine C) [86], de cuivre [87] ou d'acide lysophosphatidique [88] dans le but de stimuler leur capacité à produire et organiser de la matrice extracellulaire autour d'elles. Cette technique permet de produire *in vitro* une peau reconstruite humaine possédant un derme et un épiderme stratifié [89–91] . Par exemple, l'acide ascorbique est un cofacteur des lysyl-hydroxylases et des prolyl-hydroxylases, des enzymes qui catalysent l'hydroxylation de la lysine et de la proline. Ces hydroxylases sont essentielles à l'assemblage intracellulaire de la triple hélice de collagène. Outre les effets de l'acide ascorbique sur la stabilisation et l'organisation des fibres de collagènes, des études ont rapporté que celui-ci pouvait augmenter significativement la sécrétion de collagènes avec des effets directs sur l'expression des gènes codants le collagène I, et une stabilisation de l'ARNm correspondant [92]. Ces différents mécanismes participent donc à augmenter la synthèse et la maturation de collagènes par les cellules et par conséquent de la matrice extracellulaire elle-même. De ce constat émerge le protocole de culture de substitut cutané par la technique d'auto-assemblage dont l'unité de base de ce processus est le feuillet dermique résultant de la culture en monocouche de fibroblastes dermiques pendant 4 semaines en présence d'acide ascorbique. Grâce à l'ajout d'acide ascorbique, ces fibroblastes dermiques synthétisent et organisent une quantité suffisante de MEC pour obtenir des substituts dermiques, ou feuillets, qui peuvent alors être empilés pour former un tissu plus épais. Les feuillets individuels vont en effet rapidement fusionner ce qui permet d'obtenir un derme reconstruit plus épais. Sur le feuillet supérieur peuvent être ensemencés des kératinocytes. La culture de cet assemblage à l'interface air-liquide assure la différenciation terminale des kératinocytes. Ainsi est produit un substitut cutané composé d'un derme et d'un épiderme stratifié représentatif d'un tissu natif [93] (Figure 14).

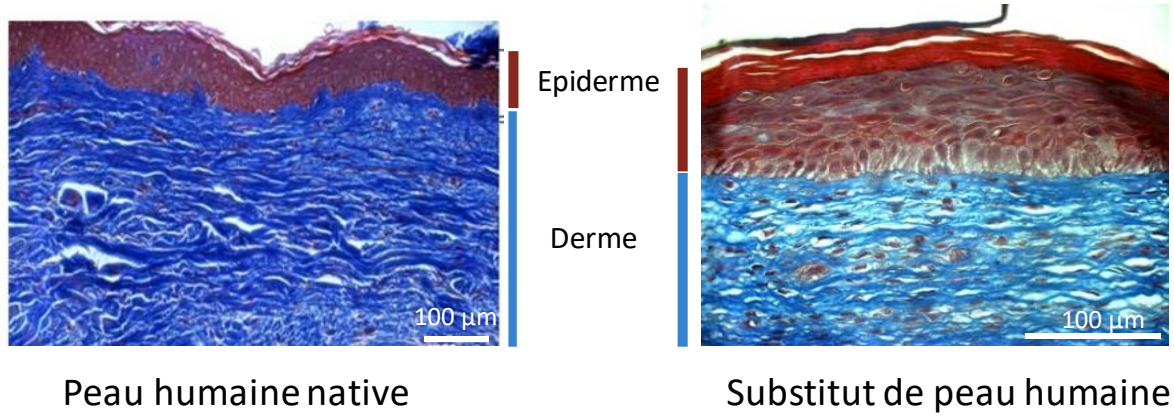


Figure 14 : Coloration histologique au trichrome de Masson d'une peau humaine native et d'un substitut cutané humain reconstruit par auto-assemblage (L. Gibot)

iv. Avantages et limites du modèle auto-assemblé

Cette méthode permet la production d'un substitut cutané entièrement autologue et ne nécessitant l'usage d'aucun biomatériau exogène synthétique ou naturel pour assurer son organisation tridimensionnelle. Cela garantit une compatibilité totale du tissu lors de la greffe dans une perspective clinique. Les kératinocytes et les fibroblastes de ces substituts peuvent être extraits à partir d'une seule biopsie de peau du patient ce qui représente un acte minime d'un point de vue clinique, mais qui permet la reconstruction d'une peau parfaitement autologue qui améliore la qualité de vie du patient. En effet, cela signifie un arrêt total du traitement antirejet qui accompagne usuellement les patients receveurs de greffes non autologues, traitement qui présente des effets secondaires délétères à long terme : risque d'infection accru, hypersensibilité, diabète, retard de croissance et apparition de cancers de la peau [94]. En outre, les substituts cutanés sont aussi un excellent modèle pour la recherche fondamentale et les tests toxicologiques en remplacement des modèles animaux et des modèles 2D. Quelques avantages de l'utilisation de ce modèle en recherche sont des coûts matériels et logistiques réduits en comparaison avec les approches *in vivo,* une bonne reproductibilité, la possibilité de générer des modèles génétiquement modifiés (dermatite atopique, psoriasis...) et la complexification du modèle par l'ajout de plusieurs types cellulaires et d'annexes cutanées. De plus, aisément manipulable il est un bon outil pour réaliser des études d'imagerie et de mécanique. Les limites résident essentiellement dans un temps de production relativement long (de 4 semaines pour un substitut dermique à 6 semaines pour un substitut cutané), une épaisseur du tissu limité (de 30 à 50 µm pour un substitut dermique âgé de 4 semaines) qui résulte en de moins bonnes propriétés mécaniques qu'un tissu natif.

II. Objectifs scientifiques

Nous avons vu dans l'introduction que la peau est une cible préférentielle pour l'application clinique de l'électroporation et que les cellules cutanées sont naturellement électrosensibles, en raison de l'existence d'un potentiel électrique transépithélial endogène.

L'hypothèse de ce projet de thèse est que le champ électrique seul, appliqué lors de l'électrochimiothérapie (ECT) et de l'électrotransfert de gène (GET), peut affecter le comportement des cellules cutanées en stimulant la migration et la différenciation, modulant le remodelage de la matrice extracellulaire et promouvant l'angiogenèse. Cette hypothèse est supportée par différents travaux dans la littérature. En effet, les cliniciens observent une cicatrisation esthétique et fonctionnelle des sites traités par électrochimiothérapie, ce que les patients eux-mêmes ont confirmé[95]. De plus, dans le contexte de l'électrotransfert de gène, Lee et ses collaborateurs ont démontré que le champ électrique de type GET appliqué seul, sans transfert de gène thérapeutique, améliorait de manière significative la fermeture des plaies diabétiques chez la souris [96]. Ainsi, les objectifs sont de comprendre, visualiser et quantifier les réponses des cellules cutanées humaines à la suite de l'application d'un champ électrique externe de type électroporation. Pour répondre à notre hypothèse, nous avons découpé ce travail en 4 axes, faisant appel à des modèles de plus en plus complexes :

Axe 1 : Étude de l'effet des champs de type électroporation sur la prolifération et la migration des cellules cutanées en monocouche.

Axe 2 : Étude de l'effet des champs de type électroporation sur le remodelage matriciel dans des substituts de derme humain reconstruits par ingénierie tissulaire.

Axe 3 : Étude du potentiel pro-angiogénique des champs de type électroporation dans des substituts dermiques microvascularisés.

Axe 4 : Étude de l'effet des champs de type électroporation sur un modèle de plaie dans un substitut cutané.

III. Matériels et méthodes

Culture cellulaire

Les fibroblastes dermiques et les kératinocytes humains primaires ont été isolés enzymatiquement à partir d'une biopsie cutanée (posthectomie d'un enfant de 3 ans) fournie par Icelltis (Toulouse, France) comme décrit précédemment [93].

Les fibroblastes ont ensuite été cultivés à une densité de 500 000 ¢ / 75 cm² dans un milieu Dubelcco's Modified Eagle Medium (DMEM) GlutaMAX (Gibco, #10569010) contenant 4.5g/L de D-glucose et 110 mg/L de sodium pyruvate, complémenté avec 1% de Pénicilline/Streptomycine 10,000 U/mL (Gibco, #15140122) et 10% de sérum de veau fœtal (Gibco, #10270106).

Les kératinocytes ont été cultivés à une densité de 1 Million ¢ / 75 cm² dans un milieu DermaLife K complete kit (Lifeline, #LL-0007) supplémenté avec 5 µg/ml rh Insulin LifeFactor, 6 mM L-glutamine LifeFactor, 1 µM Epinephrine LifeFactor, 5 µg/ml Apo-Transferrin LifeFactor, 0,5 ng/ml rh TGF-α LifeFactor, 0,4 % Extract P™ LifeFactor, 100 ng/ml Hydrocortisone Hemisuccinate LifeFactor, 1% de Pénicilline/Streptomycine 10,000 U/mL (Gibco, #15140122).

Les HUVEC-GFP+ ont été gracieusement fournies par le Dr Walid Rachidi du CEA de Grenoble puis cultivées dans des flasques gélatinées (0,2% de gélatine) à une densité de 500 000 ¢ / 75 cm² dans un milieu EBM-2 (Lonza, #CC-3162) complémenté pour 500ml avec SingleQuots™ Supplement Pack (Lonza, CC-4176) soit 200µL Hydrocortisone, 2mL hFGF-B, 500µL VEFG, 500µL R3-IGF-1, 500µL hEGF, 500µL GA-1000, 500µl Heparin et 2% de sérum de veau fœtal. 1% de Pénicilline/Streptomycine 10,000 U/mL (Gibco, #15140122) ont également été ajoutés.

Toutes les cellules ont été cultivées à 37°C dans un incubateur à 5% de CO_2 et les milieux ont été renouvelés 3 fois par semaine. L'absence de mycoplasmes a été régulièrement vérifiée en utilisant le kit de détection MycoAlert (Lonza #LT07-318).

Substitut dermique humain reconstruit par ingénierie tissulaire

Des substituts dermiques ont été générés suivant l'approche d'auto-assemblage précédemment décrite [97,89]. Des ancrages (anneaux) en papier-filtre Whatman n°4 (Whatman™, #1004150) ont été préalablement découpés pour s'adapter aux dimensions internes des puits d'une plaque 24 puits (Falcon #353047), autoclavés et disposés au fond de chacun d'eux. Les ancrages ont été lavés au DPBS calcium +/magnésium+ (Gibco, #14040091) afin d'éliminer les fibres de papiers. L'ancrage permet d'une part d'éviter la contraction du feuillet dermique par les fibroblastes et ainsi qu'une manipulation simplifiée de ceux-ci. Les fibroblastes dermiques humains primaires ont été ensemencés dans des plaques 24 puits contenant les ancrages, à une densité de 30 000¢ /cm². Les cellules ont ainsi été cultivées pendant 4 semaines dans du DMEM complet supplémenté de 50 µg/mL d'acide ascorbique

(Sigma #A4034, Merck KGaA, Darmstadt, Germany). Le milieu a été renouvelé 3 fois par semaine. Les expériences ont ensuite été réalisées sur des feuillets dermiques âgés de 4 semaines, contenant en moyenne 107 790 ± 13 266 fibroblastes dermiques (n=6) (Figure 15A).

Substitut dermique micro-vascularisé

Pour réaliser des substituts dermiques micro-vascularisés, des substituts dermiques ont été générés comme décrit ci-dessus pendant 3 semaines, puis des HUVEC-GFP+ ont été ensemencées sur ceux-ci à une densité de 13 000 ¢ / puits et cultivés une semaine dans du milieu composé de 50% de DMEM GlutaMAX complet et de 50% de milieu EBM-2 complet, supplémenté de 50 µg/mL d'acide ascorbique. Au bout de 7 jours, un réseau capillaire complet est formé sur le dessus du feuillet (Figure 15B).

Substitut cutané

Pour produire des substituts cutanés (Figure 15), des substituts dermiques ont été générés comme décrit ci-dessus puis des kératinocytes ont été ensemencés à une densité de 200 000 ¢ / puits sur 1/3 des feuillets dermiques et cultivés pendant 48h dans du milieu de prolifération DermaLife K complet (Lifeline, #LL-0007). Deux substituts dermiques et un substitut avec kératinocytes ont ensuite été empilés puis placés en culture à l'interface air-liquide pendant 12 jours dans un milieu contenant 1/4 de Ham's F-12 (Gibco, #11765054) et 3/4 de DMEM GlutaMAX complet supplémenté avec 0,4 µg/ml d'Hydrocortisone (Sigma, #H0888-1G), 5µg/ml d'Insuline (Sigma, #L6634-250 MG) et 10^{-10} M de toxine de Choléra (Sigma, #C8052-0.5MG). Cette étape permet la différenciation terminale des kératinocytes.

Substitut cutané blessé

Pour produire des substituts cutanés blessés (Figure 15C), des substituts cutanés ont d'abord été générés comme décrit ci-dessus. Au bout de 12 jours ils ont été punchés à l'aide de punchs à biopsies de 4mm (Kai medical, #LCH-PUK-40, Seki, Japan) puis superposés sur 3 feuillets dermiques âgés de 4 semaines. Ces feuillets serviront de support de migration aux kératinocytes. Le substitut cutané blessé est alors replacé à l'interface air/liquide dans un milieu contenant 1/4 de Ham's F-12 (Gibco, #11765054) et 3/4 de DMEM GlutaMAX complet supplémenté avec 0,4 µg/ml d'Hydrocortisone (Sigma, #H0888-1G), 5µg/ml d'Insuline (Sigma, #L6634-250 MG) et 10^{-10} M de toxine de Choléra (Sigma, #C8052-0.5MG). 24h après les punchs, les substituts ont été électroporés par ECT (1300 V/cm, 100 µs, 1Hz, x8) puis replacés à l'air/liquide jusqu'à fermeture de la plaie. Les substituts blessés ont été photographiés à l'aide d'un Olympus SZ-31MR jusqu'à fermeture de la plaie. Les plaies ont ensuite été mesurées au cours du temps sur le logiciel ImageJ.

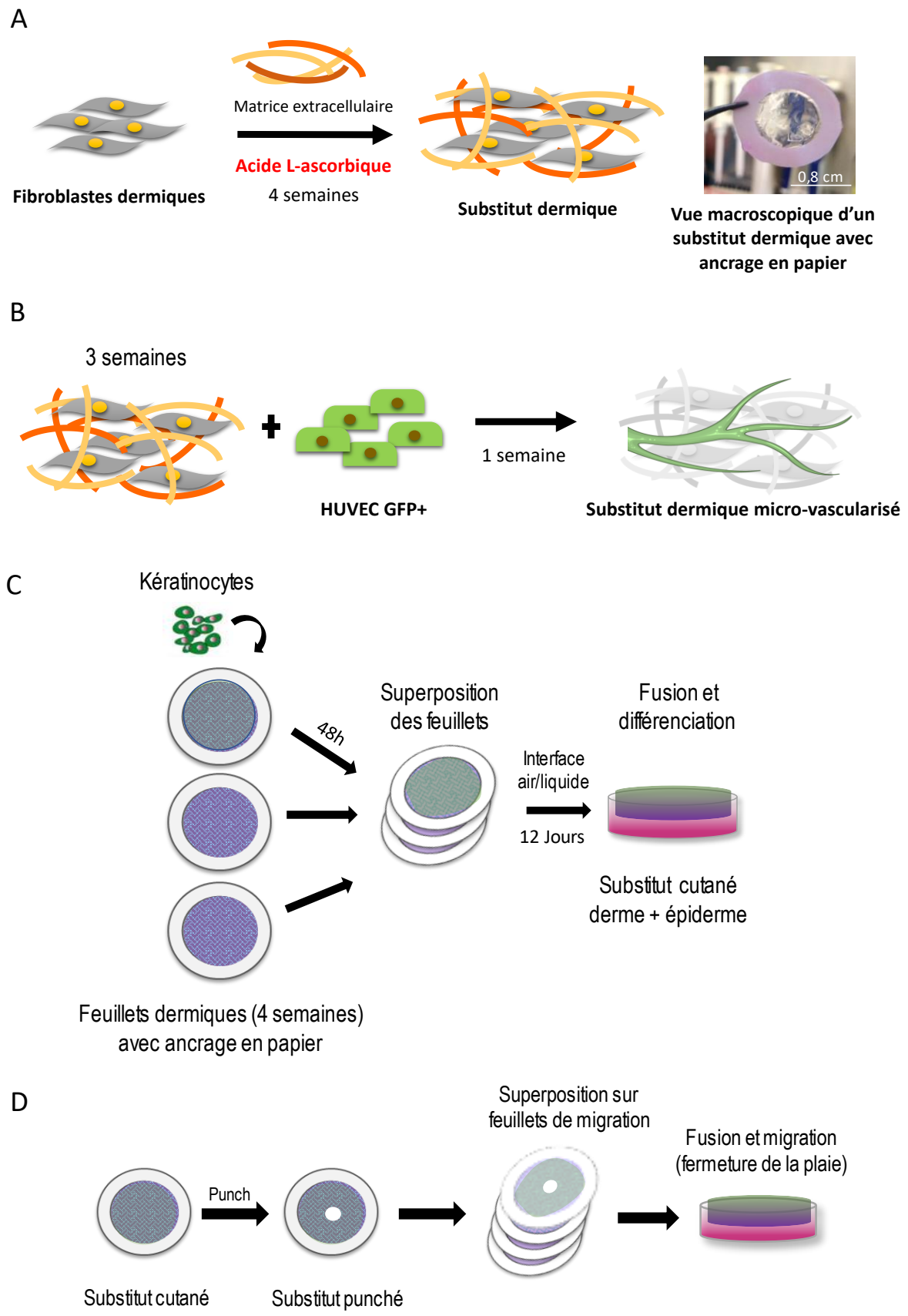


Figure 15: Protocole de culture des substituts dermiques (A) dermiques micro-vascularisés (B) cutanés (C) cutanés blessés (D)

Application de champs électriques pulsés

Milieu de pulsation

Le tampon de pulsation a été fabriqué à partir de 8,1 mM d'hydrogénophosphate de dipotassium K_2HPO_4 (Sigma, #P82581), 1,9 mM de dihydrogénophosphate de potassium KH_2PO_4 (Sigma, #P5655), 1 mM de chlorure de magnésium hexahydrate $MgCl_2/6H_2O$ (Sigma, #M2670) et de 250 mM de saccharose $C_{12}H_{22}O$ (Sigma, #S1888) dilués dans de l'eau MilliQ et filtré à 0,22µm. Un pH et une osmolarité physiologiques ainsi qu'une conductivité faible autour de 1,6 mS/cm sont respectés afin de limiter l'effet Joule qui se produit lors du passage du courant électrique.

Tableau 1 : Paramètres des champs électriques appliqués en électrochimiothérapie (ECT) et électrotransfert de gène (GET) sur les modèles 2D (monocouches) et 3D (feuillets).

Type de champs	**ECT**			**GET**	
Modèles	2D	3D	3D Plaie	2D	3D
Nombre d'impulsions	8			10	
Durée impulsions	100µs			5ms	
Fréquence	1Hz			1 Hz	
Intensité	200 à 800 V/cm	1000 V/cm	1300 V/cm	50 à 300 V/cm	600 V/cm

Sur les modèles en monocouche

Les cellules ont été cultivées soit sur des lamelles en verre rondes de 1 cm, préalablement recouvertes de gélatine 0,2%, soit dans une plaque 96 puits 24h avant les expériences. Le milieu de culture cellulaire a été retiré et remplacé par 100µL/ lamelle ou 50µL/puits de tampon de pulsation. Deux électrodes inoxydables, plates et parallèles espacées de 1cm (Megastil, Ljubljana, Slovénie) pour les lamelles ou de 0,35 cm (Megastil, Ljubljana, Slovénie) pour les plaques 96 puits ont été appliquées sur les cellules. Des champs électriques aux paramètres définis dans le tableau (Tableau 1) ont été délivrés à température ambiante par un générateur Electro cell S20 (LeroyBiotech, Saint Orens de Gameville, France). Après l'application des champs électriques, le tampon de pulsation a été retiré et remplacé par du milieu de culture cellulaire frais.

Une gamme plus large d'intensité a été appliquée lors des expériences du chapitre IV.1 afin de mieux imiter la distribution hétérogène du champ électrique qui se produit dans les tissus natifs tels que la peau lorsqu'ils sont soumis à l'électroporation (ECT : 200 à 800 V/cm ; GET : 50 à 300 V/cm).

Sur les feuillets

Deux électrodes en acier inoxydable, plates et parallèles d'un centimètre de long et espacées de 0,8cm (Megastil, Ljubljana, Slovénie) ont été placées sur le dessus d'un feuillet et immergées dans 100µl de tampon de pulsation (Figure 16). Un pulsateur Electro cell S20 a été utilisé pour délivrer des impulsions électriques carrées calibrées à température ambiante aux paramètres définis dans le tableau (Tableau 1). Les feuillets contrôles ont également été disposés sur une boîte de Pétri en présence du tampon de pulsation et des électrodes sans application du champ électrique.

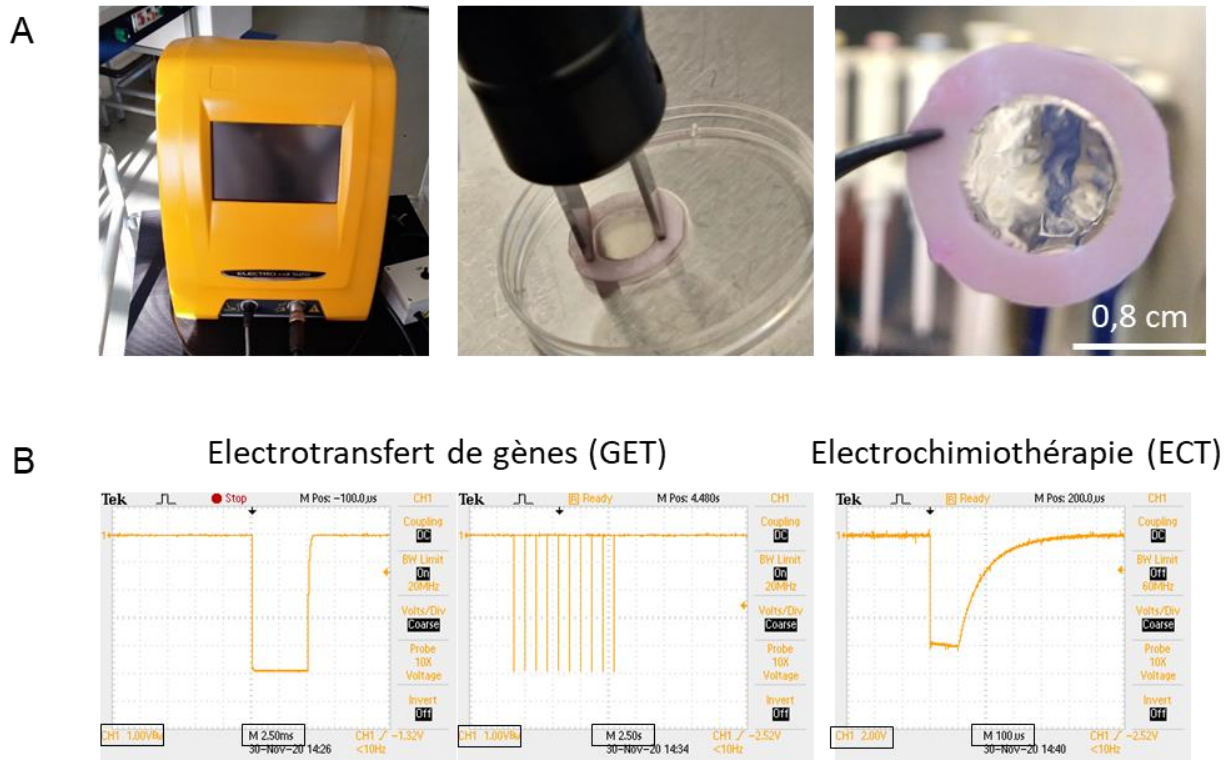


Figure 16 : Dispositif d'électroporation des feuillets. A. Générateur electrocell S20, électrodes en position d'électroporation d'un feuillet dermique, vue macroscopique d'un feuillet dermique âgé de 4 semaines entouré d'un ancrage en papier. B. Profils des paramètres électriques appliqués en électrotransfert de gène (GET) et électrochimiothérapie (ECT) extraits avec un oscilloscope.

Détermination de la perméabilité membranaire

Par dosage de la fuite d'ATP

L'électroperméabilisation cellulaire a été évaluée par quantification de la fuite d'ATP dans le milieu extracellulaire après l'électroporation. 10 minutes après l'application des champs électriques, 40µL de surnageant ont été placés dans une plaque 96 puits blanche et complétés avec 40µl de réactif CellTiter-Glo (Promega, #G7570), incubés pendant 5 minutes à température ambiante puis le signal de luminescence a été lu sur un lecteur de plaque (Clariostar, BMGLabtech).

Par pénétration d'iodure de propidium

L'électroperméabilisation a été détectée par ajout de 100µM d'iodure de propidium (Sigma #P4170) dans le tampon de pulsation pendant l'application des impulsions électriques. Le PI est un intercalant de l'ADN non perméant qui pénètre dans les cellules uniquement lorsque l'intégrité membranaire n'est plus assurée (mort cellulaire ou défauts membranaires) et devient hautement fluorescent lorsqu'il s'intercale dans l'ADN.

Cytométrie en flux sur les cellules en suspension : l'électroperméabilisation a été évaluée par cytométrie en flux grâce au suivi de la pénétration d'iodure de propidium. Immédiatement après les pulses, les cellules ont été lavées deux fois au PBS puis trypsinées, centrifugées et mises en suspension dans du PBS, placées sur glace et analysées par cytométrie en flux (cytomètre FACSCalibur, BD Bioscience). Pour faire la distinction entre l'électroporation réversible et irréversible dans le chapitre IV.1, 30 minutes après l'électroporation, les cellules ont été incubées pendant 5 minutes avec 100µM d'iodure de propidium, lavées, trypsinées et analysées par cytométrie en flux. Ces 30 minutes permettent aux cellules de retrouver leur intégrité membranaire.

Microscopie à fluorescence sur monocouches : l'électroperméabilisation a été détectée par microscopie à fluorescence sur les cellules en monocouches marquées à l'iodure de propidium. Le marquage nucléaire complémentaire a été réalisé par ajout de 1 ‰ de Hoechst 33342 (Sigma #B2261) dans le tampon de pulsation pendant l'application des impulsions électriques. Les images ont été analysées avec le logiciel Fiji (NIH, Bethesda, USA).(Figure 17).

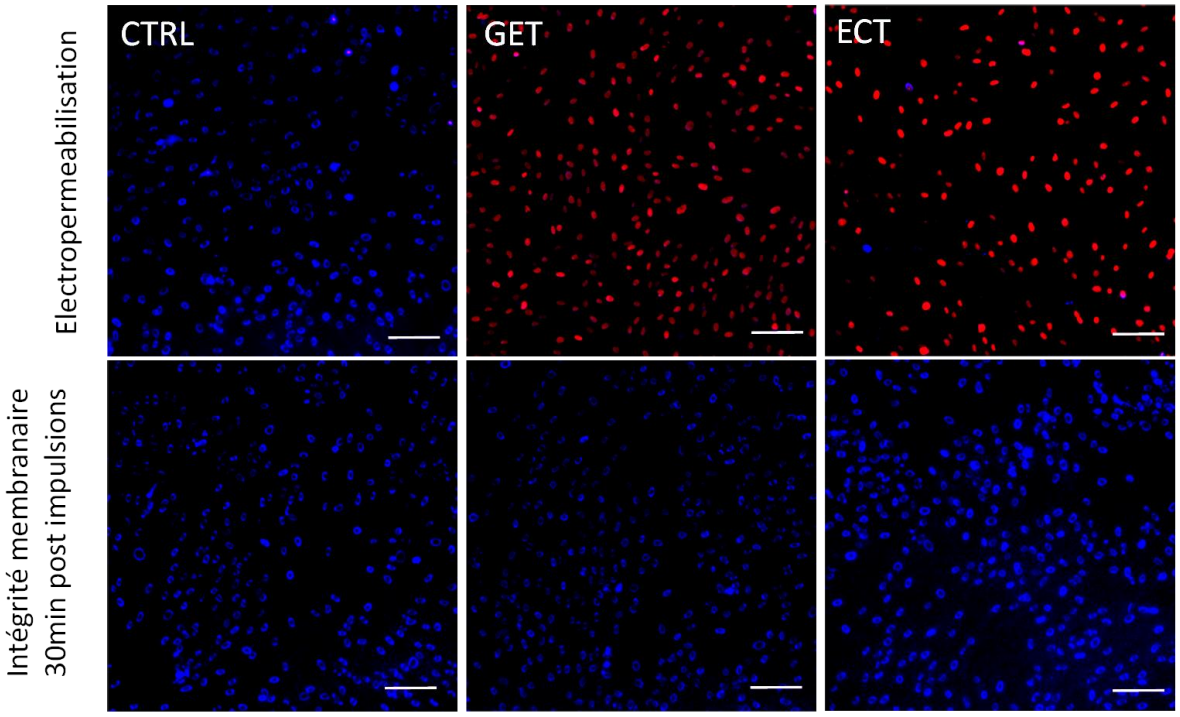


Figure 17 : Electroperméabilisation efficace et transitoire des fibroblastes en monocouche. Intégrité de la membrane plasmique évaluée par la pénétration d'iodure de propidium (rouge) pendant l'électroporation (GET : 10 impulsions, 5 ms, 1Hz, 200V/cm ; ECT : 8 impulsions, 100 µs, 1Hz, 600 V/cm) (panel du haut) ou 30 minutes après (panel du bas). Les noyaux sont marqués au Hoeschst (bleu). Barre d'échelle 200 µm.

Détermination de la viabilité cellulaire

Activité métabolique

La viabilité cellulaire a été déterminée *via* la quantification de l'activité métabolique 24h après l'application du champ électrique par incubation 30min à 37°C en présence de PrestoBlue® (Invitrogen #A13262) conformément aux instructions du fabricant. L'absorbance a été lue sur un lecteur de plaques Synergy H1 (BioTek, Winooski, VT, USA).

Test de clonogénie

Les cellules cultivées sur une lamelle ont été électroporées puis incubées pendant 1h à 37 °C pour laisser le temps à la membrane de regagner son intégrité. Ensuite, les cellules ont été trypsinées, comptées et 250 cellules ont été ensemencées dans des plaques 6 puits puis placées dans l'incubateur. 7 jours après l'ensemencement, les cellules ont été lavées et colorées avec du cristal violet (Sigma, #C6158) afin de visualiser et de compter manuellement les colonies de cellules.

Quantification de l'ATP intracellulaire dans les

Les feuillets ont été punchés (diamètre 8mm) puis digérés dans 40µL de PBS et 40µl de réactif CellTiter-Glo 3D (Promega, #G9681) pendant 30min sous forte agitation. 50µl de surnageant ont ensuite été

prélevés et transférés dans une plaque 96 puits blanche. Le signal de luminescence a été lu sur un lecteur de plaques Synergy H1 (BioTek, Winooski, VT, USA).

Apoptose

L'apoptose a été quantifiée dans les fibroblastes par vidéomicroscopie grâce au réactif IncuCyte® Caspase-3/7 Green Apoptosis Assay (dilué 1/1000) (Sartorius, #4440), couplé au réactif Nuclight Red (dilué 1/1000) (Sartorius, #4717) pour quantifier le nombre de noyaux par image, et dans les HUVECs par addition du réactif IncuCyte® Annexin V red (dilué 1/1000) (Sartorius, #4641) selon les protocoles du fabricant. Les images ont été obtenues à 10x avec un système d'analyse de cellules vivantes IncuCyte ZOOM (Sartorius) et analysées par le logiciel associé.

Synchronisation des cellules

Afin d'évaluer uniquement la migration pendant les premières 24 heures du test de fermeture de la plaie, la prolifération a dû être inhibée. À cette fin, une approche de privation de sérum pendant la nuit a été utilisée comme moyen biologique pour synchroniser les fibroblastes [98]. La distribution des cellules par phase du cycle cellulaire a été vérifiée par cytométrie en flux sur le FACSCalibur (BD Bioscience). La distribution du cycle cellulaire a été analysée à l'aide du logiciel Modfit.

Test de fermeture de la plaie par vidéomicroscopie.

25 000 fibroblastes, 80 000 kératinocytes ou 70 000 HUVECs ont été ensemencés puis cultivés jusqu'à post-confluence dans des plaques 96 puits ImageLock (Sartorius, #4379). Un outil nommé WoundMaker (Sartorius, #4493) a été utilisé pour réaliser des plaies de taille calibrée. Les cellules flottantes ont été retirées, le milieu de culture retiré et remplacé par du tampon de pulsation, avant application des champs électriques. Les électrodes ont été placées parallèlement à la plaie, la cathode et l'anode étant toujours du même côté de la plaie. Après avoir remplacé le tampon de pulsation par du milieu de culture, les plaques ont été placées dans l'IncuCyte ZOOM (Sartorius) et des images ont été prises au 10x toutes les heures pendant plusieurs jours, puis analysées avec le logiciel associé. Pour les mesures de galvanotaxie des fibroblastes, la zone colonisée par les cellules de chaque côté de la plaie a été quantifiée sur le logiciel Fiji (NIH).

- *Milieu conditionné sur monocouches de fibroblastes (IV.1)*

100µl de milieu de culture cellulaire conditionné ont été récoltés 24h après l'application de champ électrique sur une monocouche de fibroblastes et immédiatement placé sur une monocouche de fibroblastes dermiques fraîchement synchronisés et blessés.

- *Milieu conditionné sur monocouches d'HUVEC (IV.1)*

50µl de milieu de culture cellulaire conditionné ont été récoltés 24h après l'application de champ électrique sur des substituts dermiques et immédiatement placés sur une monocouche d'HUVEC blessée puis complétés avec 50µl de milieu frais.

Quantification de la prolifération cellulaire par vidéomicroscopie

5 000 fibroblastes dermiques ont été ensemencés en monocouche dans des plaques 96 puits, une densité qui correspond approximativement à une confluence de 30%. Après avoir été soumis à un champ électrique, les cellules ont été cultivées dans 200 µL de milieu de culture complet complété avec 1/1000 de réactif Nuclight Red (Sartorius, #4717) et placées dans l'IncuCyte ZOOM (Sartorius). Les photos ont été prises toutes les heures pendant au moins 72 heures sous un objectif 10x et analysées avec le logiciel associé.

Caractérisation mitochondriale par vidéomicroscopie

L'intégrité du potentiel de membrane mitochondrial a été évaluée par ajout de 1/000 de réactif MitoView 633 à une culture de fibroblastes en monocouche (Biotium, #BT70055) selon le protocole du fabricant. La fluorescence a été mesurée dans le vidéomicroscope IncuCyte ZOOM (Sartorius) et analysée avec le logiciel associé. Le stress oxydatif mitochondrial généré par l'électroporation a été évalué grâce à l'indicateur MitoSOX Red Mitochondrial SuperOxide (ThermoFisher Scientific, #M36008) selon le protocole du fabricant et la fluorescence a été observée pendant 12h après le traitement.

PCR Array Human Wound Healing kit

Trois conditions ont été analysées 4h après l'application du champ électrique sur des monocouches de fibroblastes : Contrôle (n = 3), ECT à 600 V/cm (n = 3) et GET à 200 V/cm (n = 2). Les ARNs totaux des fibroblastes cultivés sur 6 lamelles en verre pour chaque condition ont été isolés en utilisant le kit RNeasy MicroKit (Qiagen, #74004) selon les instructions du fabricant. La qualité et la quantité d'ARNs isolés ont été vérifiées sur un Nanodrop 2000 (ThermoFisher) et les ARNs ont ensuite été stockés à -80°C jusqu'à utilisation. La transcription inverse a été réalisée sur 500ng d'ARN avec le kit RT² First Strand (Qiagen, #330401) selon le protocole du fabricant. Les ADNc obtenus ont été directement soumis à une qPCR en utilisant le kit RT² SYBR Green qPCR Mastermix (Qiagen, #330500) et le kit RT² Profiler PCR Array Human Wound Healing kit (Qiagen # PAHS-121Z) dédié au panel des gènes clés de la cicatrisation (Tableau 2), strictement selon le protocole du fabricant. La plaque 96 puits a été traitée dans un système de détection par PCR en temps réel CFX96 CFX (BioRad). Les données ont été analysées grâce à la fiche technique proposée par Qiagen pour ce panel de gènes. Des transcrits d'actine, de bêta-2-microglobuline, de GAPDH, d'hypoxanthine phosphoribosyltransférase 1 (HPRT1),

de la protéine ribosomale P0 (RPLP0) ont été utilisés pour la normalisation. La HeatMap a été réalisée sur GraphPad Prism 8.

Tableau 2 : Liste des gènes contenus dans le PCR Array Human Wound Healing kit

Liste des gènes						
ACTA2	COL4A3	CXCL11	HGF	ITGA4	MMP2	SERPINE1
ACTC1	COL5A1	CXCL2	IFNG	ITGA5	MMP7	STAT3
ANGPT1	COL5A2	CXCL5	IGF1	ITGA6	MMP9	TAGLN
CCL2	COL5A3	EGF	IL10	ITGAV	PDGFA	TGFA
CCL7	CSF2	EGFR	IL1B	ITGB1	PLAT	TGFB1
CD40LG	CSF3	F13A1	IL2	ITGB3	PLAU	TGFBR3
CDH1	CTGF	F3	IL4	ITGB5	PLAUR	TIMP1
COL14A1	CTNNB1	FGA	IL6	ITGB6	PLG	TNF
COL1A1	CTSG	FGF10	IL6ST	MAPK1	PTEN	VEGFA
COL1A2	CTSK	FGF2	ITGA1	MAPK3	PTGS2	VTN
COL3A1	CTSL2	FGF7	ITGA2	MIF	RAC1	WISP1
COL4A1	CXCL1	HBEGF	ITGA3	MMP1	RHOA	WNT5A

Microscopie électronique à transmission (MET)

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

Microscopie électronique à balayage (MEB)

Les substituts dermiques entiers ont été fixés pendant 4h à 4°C dans 2% de glutaraldéhyde dans du tampon phosphate Sorensen 0,1 M (pH 7,4). Les échantillons ont ensuite été déshydratés par immersion dans des solutions d'éthanol à degré croissant puis séchés par séchage en point critique avec l'automate Leica EMSCOPE CPD 300. L'alcool absolu est remplacé par du CO2 liquide qui sera éliminé par transition au point super critique (31,1°C ; 73,8 bars). La surface des échantillons a été métallisée par une couche de 4 à 10 nm de platine avec un évaporateur (Leica EMSCOPE MED020) avant observation. Les observations au microscope électronique à balayage ont été réalisées sur la

plateforme d'imagerie du Centre de microscopie électronique appliquée à la biologie (CMEAB), une plateforme du TRI (Toulouse Réseau Imagerie) à l'aide d'un microscope électronique à balayage FEG FEI Quanta 250.

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

Focused Ion Beam (FIB)

Les substituts dermiques entiers ont été fixés et préparés par Bruno Payré sur la plateforme du CMEAB, puis imagés par un microscope MEB/FIB FEI HELIOS 600i au centre de microcaractérisation Raimond Castaing grâce à l'expertise de Mme Claudie Josse.

Génération de seconde harmonique (SHG)

Les collagènes fibrillaires organisés ont été imagés par génération de second harmonique (SHG) à l'aide d'un microscope multiphotonique droit LSM 7MP (Carl Zeiss SAS, Jena, Allemagne), équipé d'un objectif à immersion X20 (NA 0,95) et couplé à un laser Ti-Sapphire, Chameleon Ultra 2 (Coherent Inc). La longueur d'onde d'excitation a été fixée à 800 nm et la longueur d'onde d'émission à 400 nm. Les filtres utilisés sont les suivants : SHG, filtre d'émission LP 430 (BP 390-410 nm) ; Hoechst, filtre d'émission 495 (BP 435-485); Dch 690. La profondeur d'acquisition en Z a été fixée selon chaque échantillon de manière à imager l'épaisseur totale du feuillet et des Z-stacks tridimensionnels de 425 x 425 µm ont été obtenus.

Activité des métalloprotéases matricielles

La détermination de l'activité totale des métalloprotéases présentes dans le surnageant été effectuée à l'aide d'un kit SensoLyte™ 520 Generic MMP Assay Kit (Anaspec #AS-71158) conformément aux recommandations du fabriquant. Les MMPs sont sécrétées sous forme de pro-MMP puis activées dans le milieu extracellulaire par protéolyse en conditions *in vivo*. Pour la majeure partie des analyses, les pro-MMPs n'ont pas été chimiquement activées. Dans le cas contraire, les pro-MMP sécrétées dans le surnageant ont été activées en présence de 1 mM d'aminophenylmercuricacetate pendant 3h à 37°C. En outre, une partie de ces expériences ont été réalisées en présence d'un inhibiteur pharmacologique des MMPs, le GM6001 (Sigma, #CC1010) à 100Mm ajouté au milieu de culture après les impulsions. L'activité spécifique de certains types de MMPs a été analysée à l'aide de substrats commerciaux conformément aux instructions du fabricant : MMP-2, -9 (Gelatin Degradation Assay Kit (#ab234057)), MMP-3, -10 (R&D systems #ES002) et MMP-1, -2, -7,-8, -9, -12, -13, -14, -15, -16 (R&D systems #ES001).

Dosage de l'hydroxyproline

La teneur relative en collagènes dans les substituts dermiques a été mesurée après application des impulsions électriques, *via* le dosage de l'hydroxyproline à l'aide du kit Hydroxyproline Assay Kit conformément aux instructions du fabricant (Sigma #MAK008, Merck KGaA, Darmstadt, Germany). Pour rentrer dans la gamme de détection du kit, les feuillets ont été digérés dans 120 µl d'HCL/ feuillets. L'absorbance a été lue sur le lecteur de plaques Synergy H1 (BioTek, Winooski, VT, USA, Winooski, VT, USA).

Dosage des glycosaminoglycanes sulfatés

La quantité de glycosaminoglycanes sulfatés (GAGs) dans les substituts dermiques a été mesurée après application des champs électriques, à l'aide du kit Blyscan Glycosaminoglycan Assay Kit conformément aux instructions du fabricant (Biocolor Ltd, #B1000). Le réactif d'extraction a été préparé en ajoutant à 50 ml de PBS : 400 mg d'acétate de sodium (Fisher #BP2482-1), 200 mg d'EDTA (Prolab #27.652.298), 40 mg de cystéine HCl (Sigma #121800) et 250 µl d'une suspension de papaïne (Sigma #P3125) contenant environ 5 mg de l'enzyme. L'absorbance a été lue sur le lecteur de plaques Synergy H1 (BioTek, Winooski, VT, USA, Winooski, VT, USA).

Tests ELISA

Des feuillets dermiques âgés de 4 semaines ont été électroporés puis cultivés dans 600µl de milieu de culture cellulaire dans des plaques 24 puits. Les surnageants ont ensuite été récoltés 6h, 24h et 48h après électroporation et stockés à -80 °C pour être utilisés dans un délai d'un mois. Les kits ELISA suivants ont été utilisés strictement selon les protocoles du fabricant (Tableau 3): kit human Pro-Collagen I alpha 1 DuoSet ELISA (R&D Systems, #DY008, Minneapolis, MN, USA), kit human TGF-β1 DuoSet ELISA (R&D systems, #DY007), human TIMP-3 (Elabscience, # E-EL-H1454, Houston, TX, USA), human furin (RayBiotech, #ELH-Furin-1), human FGF-basic ELISA Kit (BioLegend, #434309), human VEGF-A ELISA Kit (Sigma, #RAB0507) human MMP-1 (ELISA Genie, #HUFI00205), human MMP-2 (ELISA Genie, #HUFI00017), human MMP-3 (ELISA Genie, #HUFI00208), human MMP-9 (ELISA Genie, # HUFI00211), human PDGF-AA ELISA Kit (Sigma #RAB0394), Vplex angiogenesis PANEL 1 HUMAN kit (Meso Scale Discovery, #K15190D, Rockville, MA, États-Unis) IL-4 et IL-13 étaient inclus dans le kit humain V-PLEX Proinflammatory Panel 1 (Meso Scale Discovery, #K15049D). L'absorbance a été lue en utilisant un lecteur de plaque Synergy H1 (BioTek, Winooski, VT, USA) ou Meso Scale QuickPlex SQ120 (MSD) pour les V-plex ELISA.

Tableau 3 : Liste des kits ELISA et des dilutions utilisées

Nom du Kit	Protéine cible	Dilution utilisée
Human PDGF-AA ELISA Kit (Sigma-Aldrich #RAB0394)	PDGFAA	0
Human Pro-Collagen I alpha 1 DuoSet ELISA (R&D systems DY008)	COL1A1	1/5000
Human TGF-beta 1 DuoSet ELISA (R&D systems DY007)	TGF-β1	0
Human TIMP-3 (Elabscience E-EL-H1454)	TIMP3	1/10
Human furin (ELH-Furin-1 RayBiotech)	FURIN	0
Human VEGF-A ELISA Kit (RAB0507 Sigma-Aldrich)	VEGFA	1/5
Human FGF-basic ELISA Kit (434309 BioLegend)	FGF-b	0
Human MMP-1 ELISA Kit (HUFI00205, ELISAgenie)	MMP1	1/200
Human MMP 2 ELISA Kit (HUFI00017, ELISAGenie)	MMP2	0
Human MMP3 ELISA Kit (HUFI00208, ELISAGenie)	MMP3	1/2000
Human MMP 9 ELISA Kit (HUFI00211, ELISAGenie)	MMP9	0
Vplex angiogenesis PANEL 1 HUMAN kit (K15190D, mesoscale)	Multiplex	1/2
Vplex pro-inflammatory PANEL 1 HUMAN kit (K15049D-1, mesoscale)	Multiplex	1/2

Étude transcriptomique

L'expression des gènes après l'application des champs électriques sur des substituts dermiques a été étudiée par transcriptomique grâce à des puces Clariom S Affymetrix sur la plateforme Génome et Transcriptome (GeT) de Genotoul (Toulouse, France). Les ARNs totaux ont préalablement été extraits 4h après application des impulsions électriques sur des feuillets de fibroblastes grâce au kit RNeasy Mini (Qiagen74104) selon les recommandations du fabricant. L'extraction a été facilitée par l'utilisation du Tissue Lyser II (Qiagen) et de billes en acier inoxydable de 5mm de diamètre. Le rendement et l'intégrité de l'ARN extrait ont été contrôlés à l'aide d'un Nanodrop ND-1000 et d'un Bioanalyzer 2100 Expert (Agilent). L'analyse a ensuite été réalisée avec le logiciel Affymetrix TAC (Transcriptome Analysis Control software) et les paramètres d'analyse d'expression étaient : Changement de niveau d'expression du gène <-2 ou > 2; FDR <0,05; Méthode ANOVA: ebayes. Les données transcriptomiques décrites dans cette thèse ont été déposées dans le Gene Expression Omnibus du NCBI [99] et sont accessibles *via* le numéro d'accès à la série GEO GSE180644 (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/query/acc.cgi?acc=GSE180644).

Immunomarquages

Des fibroblastes en monocouches ont été fixés au formaldéhyde 4% pendant 15min puis immunomarqués contre l'α-SMA par des anticorps monoclonaux de souris conjugués Alexa Fluor 488 (Cell signaling, #46469). Les cellules positives ont été détectées au microscope à fluorescence (Zeiss) et quantifiées à l'aide du logiciel ImageJ. L'objectif était de quantifier le pourcentage de myofibroblastes après les impulsions.

Gels de collagène

Des gels de collagène ont été préparés selon le protocole décrit par Donovan et al., 2013 [100]. Des plaques 24 puits ont préalablement été coatées avec 2% de sérum albumine bovine (BSA) dans du PBS

(2 ml/ puits) et incubées à 37°C pendant une nuit. Le lendemain, les puits ont été lavés trois fois avec du PBS puis les gels de collagène préparés sur glace comme ceci : une part d'HEPES 0.2M (pH 8), quatre parts de collagène (3mg/ml) (Sigma, #08-115) et cinq parts de DMEM. Une suspension cellule/collagène a été préparée afin d'obtenir une concentration finale de 60 000 cellules/ml et de 1,2 mg/ml de collagène. La suspension cellule/collagène a été ajoutée aux puits (1ml/puits) et incubée à 37°C pour permettre au collagène de polymériser. Au bout d'une heure, 1ml de DMEM a été additionné doucement dans chaque puits, ce qui entraîne le détachement des gels du plastique. Pendant 48h les gels ont été photographiés à l'aide d'un Canon EOS 600D équipé d'un objectif fixe 100mm. Les gels ont ensuite été mesurés sur le logiciel ImageJ afin de suivre leur contraction au cours du temps. Dans le cas où les gels ont été ensemencés avec des cellules pulsées, celles-ci ont été électroporées avec les paramètres GET ou ECT 4h30 avant leur inclusion dans le gel. L'objectif était de quantifier les propriétés contractiles des cellules pulsées.

Mesure de la perte d'eau transépidermique (TEWL)

La perte d'eau transépidermique a été mesurée sur les substituts cutanés (blessés ou non) à l'aide du VapoMeter® à chambre fermée (Delfin Technologies Ltd, Kuopio, Finland). Pour cela, les substituts cutanés ont été retirés de l'interface air/liquide et placés à sécher dans une boite de Pétri sous PSM pendant 10min avant la mesure.

NTA (Nanoparticle Tracking Analysis)

Les feuillets dermiques ont été électroporés puis cultivés 4h dans du milieu vierge sans phénol Fluorobrite DMEM (ThermoFisher Scientific, #A1896701). Les milieux conditionnés sont alors prélevés puis centrifugés à 1200 g pendant 4min afin d'éliminer les éventuels débris cellulaires. Les surnageants ont ensuite été analysés par NTA (camera level 8, température ambiante).

Spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier - réflectance totale atténuée (IRTF-ATR)

Les spectres IRTF-ATR des feuillets dermiques pulsés ou non ont été réalisés à l'aide d'un Nicolet 5700 (ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, USA) équipé d'un accessoire ATR (Smart Orbit avec un cristal de diamant de type IIA, indice de réfraction 2,4), d'un séparateur de faisceau KBr et d'un détecteur MCT / B. La profondeur de pénétration de l'onde évanescente dans les tissus biologiques a été estimée entre 0,4 et 3,6 µm. Des substituts dermiques hydratés ont été déposés sur le dispositif ATR et séchés pendant 20 min à température ambiante avant l'acquisition spectrale. Le côté milieu (face supérieure) et le côté Pétri (face inférieure) ont été successivement placés sur le cristal pour acquérir le spectre de chaque côté. Les spectres ont été enregistrés sur la région de 4000-450 cm-1 avec une résolution spectrale de 2 cm-1 et 32 accumulations. Le spectre de fond a été enregistré avant chaque expérience et soustrait du spectre de l'échantillon. Les données ont été recueillies à l'aide d'Omnic 8.0

(ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, USA). Ensuite, les spectres ont été corrigés de la ligne de base, lissés (11 points Savitzky Golay) et normalisés à l'amide II (1540-1550 cm-1). Les spectres présentés par groupe d'échantillons ont été calculés en faisant la moyenne des spectres de tous les échantillons dans chaque groupe. Pour quantifier les différents composants biologiques, les aires des bandes d'absorption spécifiques ont été calculées à partir du spectre individuel de chaque échantillon, et le rapport approprié des aires a été utilisé selon les données de la littérature [101,102]. Ces analyses ont été réalisées par nos collaboratrices au CIRIMAT UMR5085 (Toulouse, France), Camille Ober, Jany Danduran, et Valérie Samouillan.

Calorimétrie à balayage différentiel (DSC)

Des mesures DSC des feuillets dermiques hydratés électroporés ou non ont été effectuées avec un calorimètre DSC Pyris (Perkin Elmer, Waltham, MA) en utilisant un plateau vide comme référence. Les échantillons (10-30 mg en masse) ont été scellés dans des cassettes hermétiques en aluminium puis soumis à un programme de température sous atmosphère d'hélium : un premier balayage de refroidissement a été réalisé de 20°C à -100 °C à -10 °C min-1 suivi d'un balayage de chauffage de -100 à 85 °C à 10 °C min-1. Une fois que les mesures DSC ont été effectuées, les cassettes ont été repesées pour vérifier qu'elles avaient été correctement scellées. Les échantillons ont été percés et séchés à masse constante à 105 °C pendant 14 h pour déterminer la masse sèche de l'échantillon et par différence la quantité totale d'eau dans les échantillons. Ces analyses ont été réalisées par nos collaboratrices au CIRIMAT UMR5085 (Toulouse, France), Camille Ober, Jany Danduran, et Valérie Samouillan.

Analyses statistiques

L'analyse des données a été réalisée en utilisant le programme GraphPad Prism 8 (GraphPad Software, Inc., La Jolla, CA, USA), les données sont représentées individuellement et les barres d'erreurs représentent la moyenne ± SEM (erreur standard à la moyenne). Sauf indication contraire dans la légende des figures, les analyses statistiques des données ont été effectuées par analyse des variances unidirectionnelle (ANOVA) suivie du post-test de Dunnett pour comparer chaque condition de traitement (GET et ECT) au contrôle (0 V/cm). Les statistiques sont exprimées par rapport au contrôle où ns: non significatif, * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ et **** $p < 0,0001$.

IV. Résultats

1. Étude de l'effet des champs de type électroporation sur la prolifération et la migration des cellules cutanées.

Ce chapitre est en partie adapté d'un article publié dans la revue Bioelectrochemistry en août 2020 intitulé *« Electroporation does not affect human dermal fibroblast proliferation and migration properties directly but indirectly via the secretome. »* Gouarderes S, Doumard L, Vicendo P, Mingotaud AF, Rols MP, Gibot L. Volume 134, 2020, 107531, doi: 10.1016/j.bioelechem.2020.107531. (Annexe 1)

a. Résumé

Dans ce chapitre, nous avons émis l'hypothèse que les paramètres électriques de type ECT et GET pourraient stimuler la migration et la prolifération des cellules cutanées et ainsi améliorer la qualité de la cicatrisation après le traitement. Pour étudier cette hypothèse, nous avons travaillé avec des fibroblastes dermiques humains primaires cultivés en monocouche. Premièrement, les caractéristiques classiques de l'électroperméabilisation cellulaire, de la viabilité et de la mort cellulaire ont été évaluées après exposition aux paramètres électriques de type ECT et GET. Deuxièmement, nous avons utilisé la vidéomicroscopie pour observer et quantifier en temps réel la prolifération et la migration cellulaire.

L'hétérogénéité tissulaire (forme cellulaire, matrice extracellulaire ...) et l'augmentation de conductivité électrique générée par l'électroporation induisent une non-uniformité de la distribution du champ électrique dans la peau soumise aux impulsions. Par conséquent, les cellules situées entre les électrodes ne subissent pas toutes la même intensité de champ in vivo [103,104]. Dans cette étude, nous avons donc décidé de scanner une large gamme d'intensité électrique, induisant divers degrés d'électroperméabilisation cellulaire réversible, et de vérifier la prolifération des fibroblastes dermiques ainsi que leurs propriétés de migration. L'effet indirect de l'électroporation sur la migration cellulaire a été étudié en cultivant des fibroblastes dermiques non exposés dans un milieu de culture cellulaire conditionné 24h par des fibroblastes électroporés. Un aperçu de la procédure expérimentale est présenté dans le schéma ci-dessous (Figure 18).

L'analyse de données obtenues dans ce chapitre indique que l'exposition directe des fibroblastes dermiques humains aux champs de types électroporation ne modifie ni leur prolifération ni leurs propriétés migratoires. D'autre part, bien que les paramètres électriques appliqués permettent 100% d'électroperméabilisation réversible, une apoptose légère à modérée apparaît dans environ 30% de la population soumise aux champs électriques à l'intensité la plus élevée. Cette apoptose semble être la conséquence de la génération de stress mitochondrial. Fait intéressant, le sécrétome des cellules apoptotiques améliore significativement la migration de fibroblastes humains non exposés au champ électrique, vraisemblablement *via* une sécrétion accrue de facteurs de croissance des cellules exposées. Ces résultats mettent en lumière le rôle de la communication cellules-cellules dans la réponse à l'électroporation.

Concernant l'autre type cellulaire prédominant dans la peau, à savoir les kératinocytes, des expériences similaires réalisées par videomicroscopie, ont permis de constater que les propriétés migratoires des kératinocytes humains n'étaient pas statistiquement affectées par l'application des paramètres électriques ECT et GET**.** Toutefois, l'observation des images obtenues nous a permis de

voir que les kératinocytes avaient tendance à fusionner lorsqu'ils étaient soumis aux champs électriques, en particulier lors du test de fermeture de la plaie qui nécessite la confluence de la monocouche au moment de la plaie. Le phénomène d'électrofusion a déjà été constaté après l'application de champs de types électroporation[105,106]. L'électrofusion nécessitant un contact physique étroit entre les cellules, la présence de jonctions cellulaires serrées pourrait favoriser ce phénomène au sein des kératinocytes.

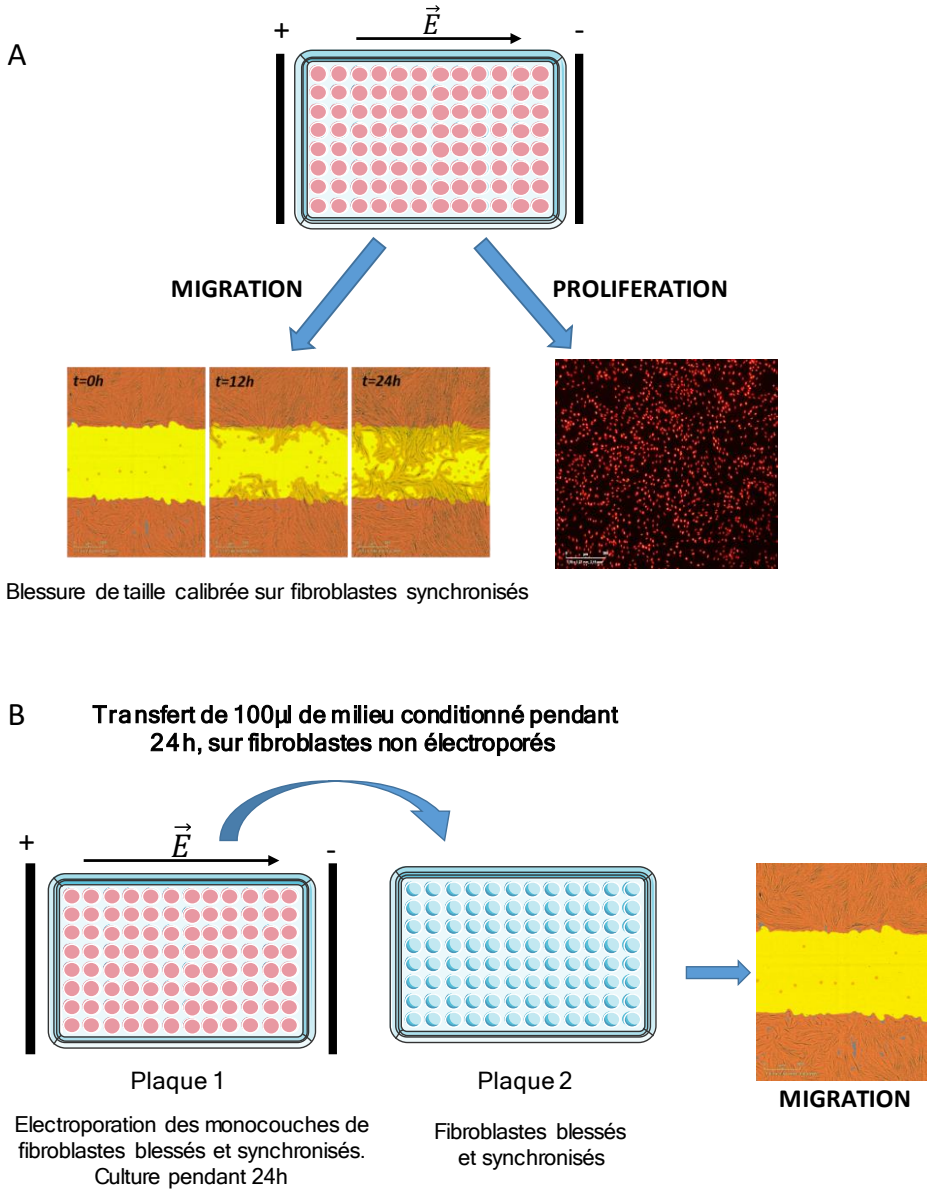


Figure 18: Vue d'ensemble du plan expérimental pour tester les effets directs (A) ou indirects (B) de l'électroporation des fibroblastes dermiques humains sur le comportement cellulaire. A. Les propriétés de migration et de prolifération des fibroblastes soumis à l'électroporation sont suivies par vidéomicroscopie. B. Évaluation de l'effet indirect de l'électroporation via le sécrétome. Pour ces expériences, des fibroblastes non exposés au champ électrique sont cultivés dans un milieu de culture cellulaire conditionné pendant 24h par des fibroblastes électroporés. Les capacités de migration sont ensuite suivies par vidéomicroscopie.

b. Résultats

Des intensités distinctes permettent de générer un gradient d'électroperméabilisation dans les fibroblastes dermiques.

Lorsque l'électroporation est appliquée sur le tissu cutané, la distribution du champ électrique n'est pas homogène, ce qui signifie que toutes les cellules du tissu ne sont pas exposées à la même intensité de champ électrique [104]. Par conséquent, l'un des objectifs de cette étude était de soumettre les cellules dermiques à des intensités croissantes de champ électrique. Pour la condition ECT, nous avons appliqué une série de 8 impulsions d'une durée de 100 µs à une fréquence de 1 Hz, avec une intensité croissante de 200 V / cm à 800 V / cm. Pour la condition GET, 10 impulsions d'une durée de 5 ms ont été appliquées à une fréquence de 1 Hz, avec des intensités allant de 50 V/cm à 300 V/cm (Tableau 1). Ces paramètres ont été choisis car ils sont classiquement utilisés en électroporation[28,107]. En augmentant l'intensité du champ électrique à la fois pour les conditions ECT et GET, une augmentation progressive et significative de la fuite d'ATP a été mesurée dans le milieu extracellulaire dès 10 minutes après l'application du champ électrique (Figure 19A). Pour confirmer que la fuite d'ATP observée était due à des défauts membranaires causés par l'électroporation, une expérience de cytométrie en flux a été réalisée afin de quantifier la pénétration d'iodure de propidium dans les cellules (Figure 19B). Le pourcentage de cellules électroperméabilisées ainsi que l'intensité de fluorescence de ces cellules ont augmenté avec l'intensité des impulsions dans les deux conditions. 100% de cellules électroperméabilisées ont été atteints à 600 V/cm en condition ECT et 200 V/cm en condition GET. Afin de s'assurer que les paramètres électriques appliqués induisent uniquement une perméabilisation réversible et non irréversible, une expérience de recouvrement de l'intégrité membranaire a été menée. 30 minutes après l'électroporation, les cellules ont été incubées avec de l'iodure de propidium 100 µM et le signal de fluorescence a été quantifié par cytométrie en flux (Figure 19C). Moins de 5% des cellules ont été marquées à l'iodure de propidium, quelle que soit la tension appliquée en condition ECT et GET. Cela signifie que les paramètres électriques appliqués n'ont pas induit de perméabilisation irréversible. Pour aller plus loin, la viabilité cellulaire à long terme après exposition à l'électroporation a été évaluée par clonogénie (Figure 19D). La clonogénie est un test de survie cellulaire *in vitro* visant à vérifier la capacité d'une seule cellule à se développer en une colonie, autrement dit sa capacité à subir des divisions « illimitées ». Les résultats montrent qu'en condition ECT, la viabilité cellulaire n'a pas été affectée jusqu'à 600 V/cm, mais une perte de viabilité d'environ 25% a été observée à 800 V/cm. Les cellules semblaient être plus sévèrement affectées par les conditions GET. En effet, jusqu'à 200 V/cm, la viabilité cellulaire n'était pas affectée, mais chutait drastiquement à 50% à 300 V/cm. En conclusion, les paramètres électriques choisis n'induisent pas d'électroporation irréversible bien que la viabilité cellulaire à long terme soit affectée par certains de ces paramètres.

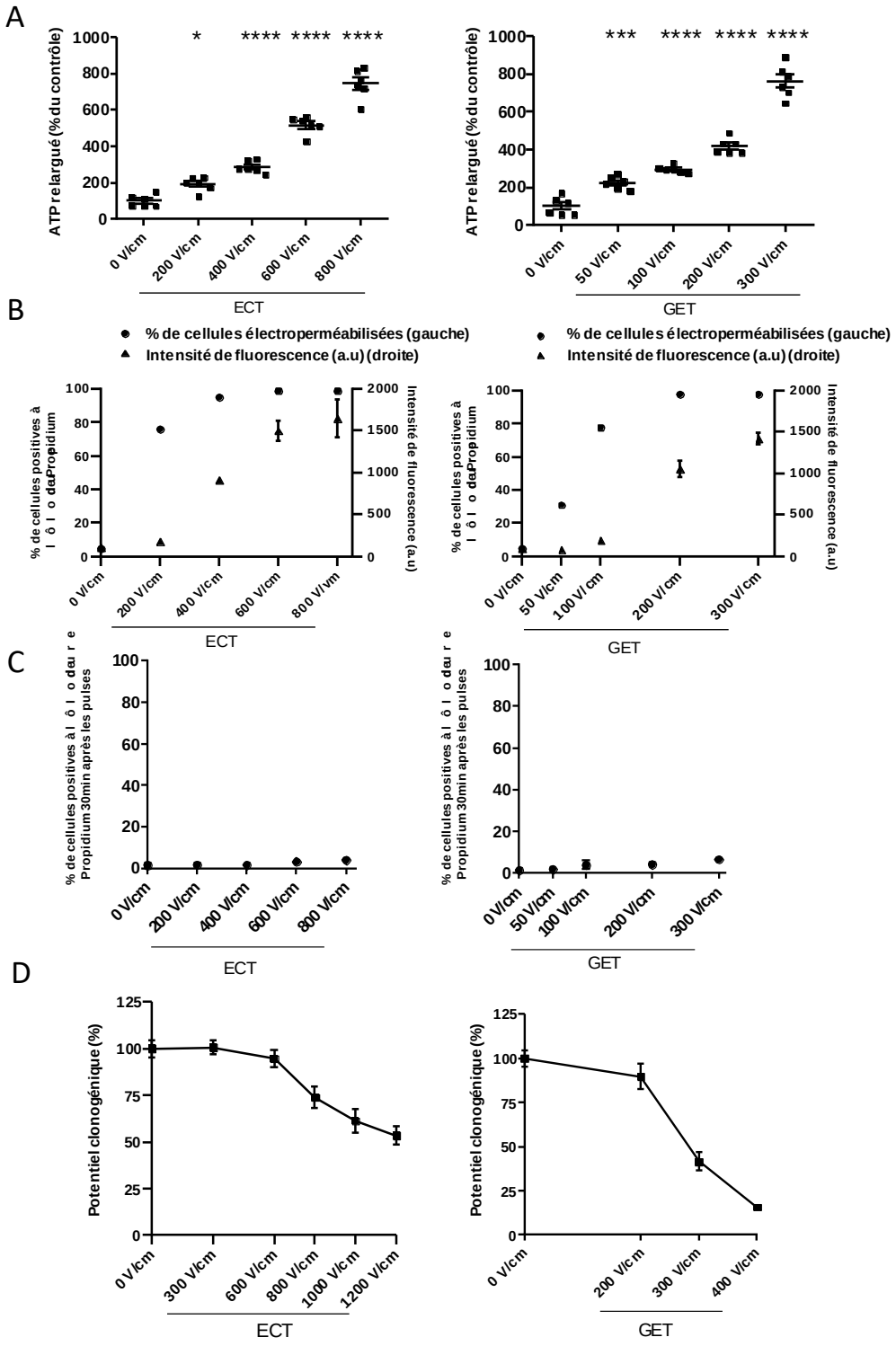


Figure 19: Détermination des paramètres électriques assurant une électroperméabilisation transitoire efficace des fibroblastes sans affecter leur viabilité. A. Quantification de la libération d'ATP par luminescence 10 min après l'application des paramètres électriques d'électrochimiothérapie (ECT) et d'électrotransfert de gène (GET). N = 2; n = 6. B. Suivi de l'électroperméabilisation cellulaire en cytométrie en flux par pénétration d'iodure de propidium (PI) immédiatement après l'application des paramètres électriques ECT et GET. Axe gauche : % de cellules positives à l'iodure de propidium (point); Axe droit: intensité de fluorescence en unité arbitraire (a.u) (triangle). n = 3. C. Suivi du recouvrement de l'intégrité membranaire en cytométrie en flux par incubation à l'iodure de propidium 30 min après l'application des paramètres électriques ECT et GET. n = 3. D. Viabilité cellulaire à long terme évaluée par clonogénie après l'application des paramètres électriques ECT et GET, N = 3; n = 9. Analyses par Anova unidirectionnelles.

Les propriétés migratoires des fibroblastes dermiques primaires humains ne sont pas statistiquement affectées par l'application des paramètres électriques ECT et GET.

Pendant le test de fermeture de la plaie, les cellules migrent et prolifèrent pour combler le vide généré. Afin d'étudier les capacités migratoires des fibroblastes après l'application des champs électriques, il était donc nécessaire de supprimer le processus de prolifération afin de mesurer uniquement la migration cellulaire durant les premières 24h [108]. La synchronisation *in vitro* des fibroblastes dermiques a été réalisée grâce à une méthode non pharmaceutique qui consiste à priver les cellules de sérum pendant une nuit. La quantité d'ADN cellulaire a ensuite été déterminée en colorant les cellules avec de l'iodure de propidium et en mesurant la fluorescence par cytométrie en flux. Le pourcentage de cellules dans les différentes phases du cycle cellulaire a été calculé en fonction de la quantité d'ADN de chaque cellule (n): G1 (2n), S (entre 2n et 4n) et G2 (4n). Comme le montre la Figure 20A, les fibroblastes dermiques primaires ont très bien répondu à cette méthode car environ 90% des cellules étaient synchronisées en phase de croissance G1 après la privation de sérum. Grâce à un module spécifique adapté, le système d'analyse IncuCyte ZOOM permet d'effectuer des plaies calibrées et de mesurer facilement la migration cellulaire au cours du temps. Grâce à l'application de masques lors du traitement des images (Figure 20B), la confluence dans la plaie a été déterminée heure par heure après l'application du champ électrique, et ce, durant 24h. La vidéo 1 montre que la fermeture des plaies par les fibroblastes dermiques était un processus hautement dynamique. Comme expliqué précédemment, la fermeture de la plaie n'a été analysée que pendant les premières 24h après l'application du champ électrique sur des cellules synchronisées, afin de ne prendre en compte que la composante de migration. L'absence d'événement de division cellulaire sur le film a confirmé que les cellules étaient effectivement en migration. Après 24h, la confluence cellulaire dans la plaie était d'environ 40%, quelle que soit la condition ECT ou GET (Figure 20C). Il est intéressant de noter que la migration cellulaire s'est produite immédiatement après la création de la blessure et s'est poursuivie régulièrement pendant des heures, avec ou sans application des paramètres électriques ECT ou GET. Aucune différence statistique n'a été observée sur le déroulement temporel de la migration en fonction des paramètres électriques appliqués, mais une régression linéaire a été réalisée pour obtenir la vitesse de migration de chaque condition au cours des 12 premières heures (Figure 20D). Aucune différence statistique n'a été observée quelles que soient les conditions. Enfin, la confluence de la plaie 24h post-application de champ électrique a été analysée (Figure 20E). Les conditions GET à 50 V/cm et 100 V/cm semblaient améliorer la migration des fibroblastes dermiques et donc la cicatrisation des plaies, mais malgré de nombreuses répétitions des expériences et des réplicas biologiques (jusqu'à 30), aucune différence statistique n'a été observée.

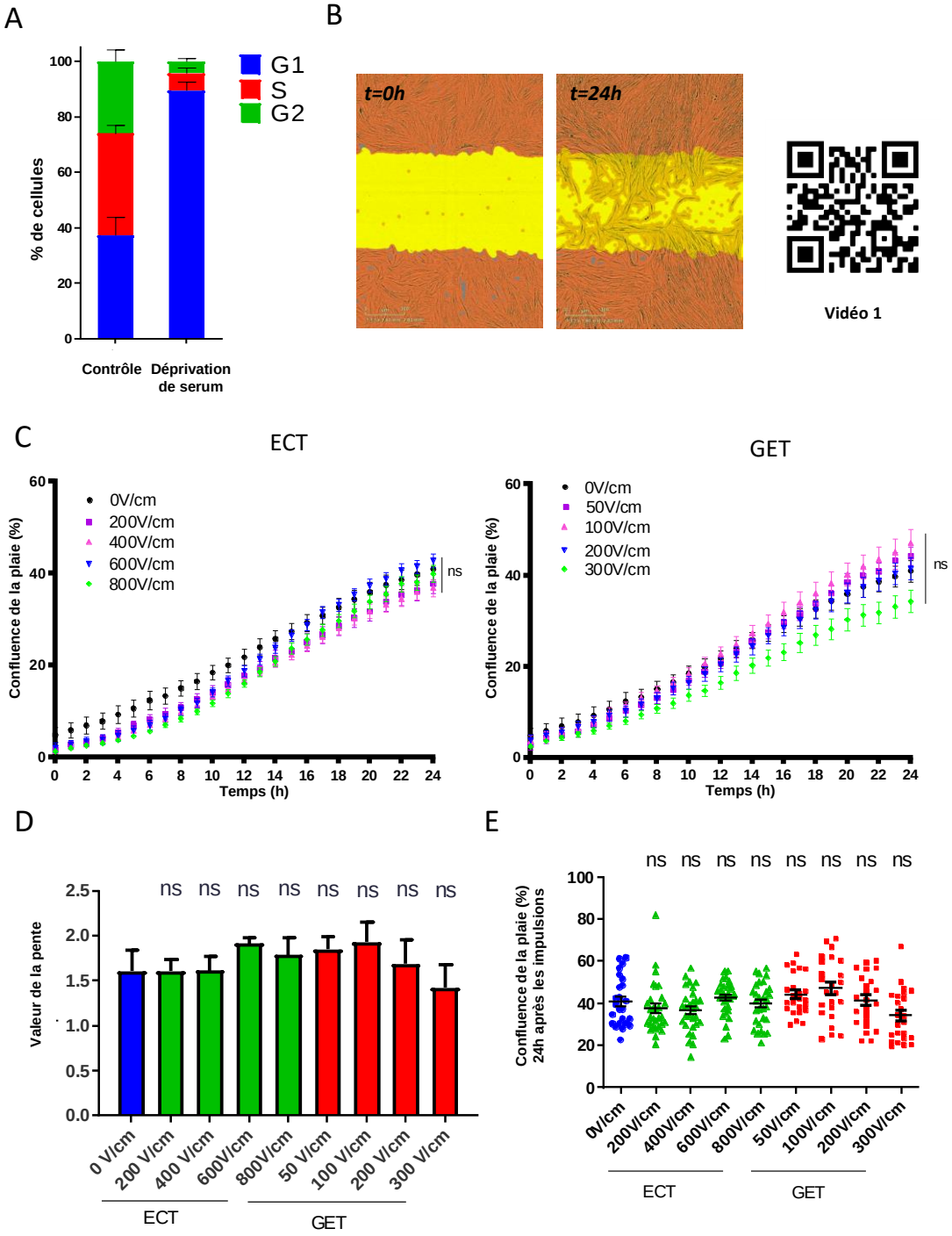


Figure 20: Les paramètres électriques ECT et GET n'ont pas affecté les propriétés de migration des fibroblastes dermiques dans le test de fermeture de la plaie. A. Détermination par cytométrie en flux de la synchronisation du cycle cellulaire après privation de sérum pendant une nuit. N = 3; n = 8. B. Quantification de la migration des fibroblastes dermiques dans les tests de fermeture de la plaie grâce à l'application de masques. Le masque de la plaie initiale (t = 0h) est représenté en jaune. Le masque de confluence identifiant toutes les zones occupées par les cellules est représenté en orange. Le masque de confluence est utilisé en combinaison avec le masque de plaie initial pour déterminer la confluence cellulaire de la plaie à chaque instant (film 1). C. Évolution dans le temps de la migration cellulaire après l'application des paramètres électriques de type ECT et GET sur des fibroblastes synchronisés et soumis au test de la rayure. La confluence de la plaie (%) représente la zone de la plaie qui est occupée par des cellules à chaque temps. N = 5; n = 30 Analyses statistiques par Anova bidirectionnelles. D. Valeurs de pentes calculées par régression linéaire représentant la vitesse de migration pendant les premières 24h. N = 3, n = 9. E. Diagramme de dispersion de la confluence de la plaie (%) 24h. N = 5; n = 30. Analyses statistiques par Anova unidirectionnelles. Conditions contrôle (Ctrl ●), électrotransfert de gènes (GET ■) et électrochimiothérapie (ECT ▲).

Aucun phénomène de galvanotaxis n'est induit par les paramètres électriques de type ECT et GET chez les fibroblastes dermiques.

Le champ électrique externe est un stimulus physique majeur du microenvironnement qui est connu pour guider la migration directionnelle des cellules qui y sont soumises. Ce phénomène est appelé galvanotaxis ou électrotaxis. Étant donné que les électrodes étaient systématiquement placées parallèlement à la plaie, avec l'anode au-dessus et la cathode au-dessous, nous avons pu déterminer si les fibroblastes à la marge de la plaie présentaient une migration dirigée préférentielle (Figure 21). Aucune différence statistique n'a été observée, ce qui signifie que les fibroblastes dermiques ont autant migré vers l'anode que vers la cathode.

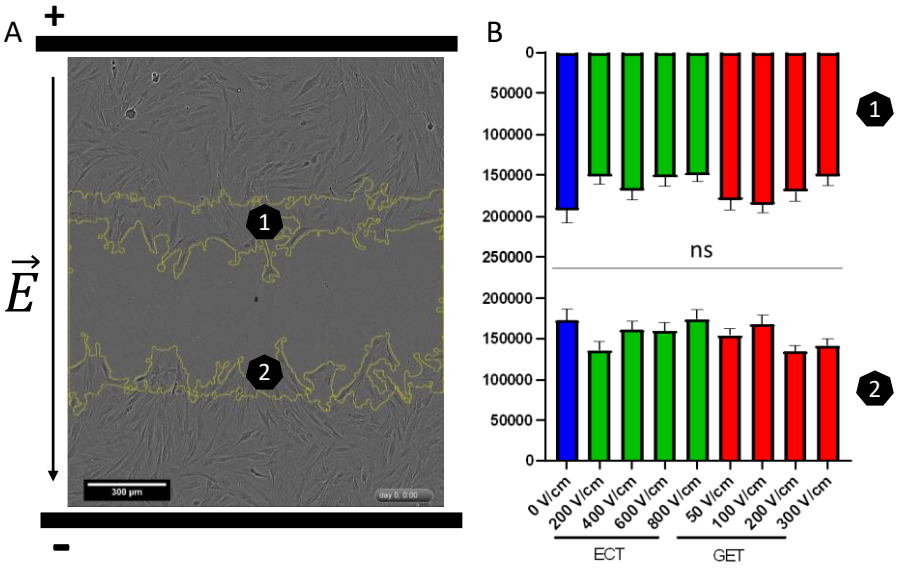


Figure 21 : Aucun phénomène de galvanotaxis des fibroblastes dermiques n'est induit par les paramètres électriques de type ECT et GET. A. Représentation schématique de la position des électrodes sur le site de la plaie. La ligne jaune délimite la zone occupée par les cellules dans le panel anode (1) et le panel cathode (2). B. Zone occupée par les cellules (µm²) dans le panel supérieur de la plaie (1) ou dans le panel inférieur de la plaie (2) 12h après application du champ électrique. Analyse statistique par Anova unidirectionnelle. N=3; n=18. Conditions contrôle (0 V/cm), électrotransfert de gènes (GET) et électrochimiothérapie (ECT).

Les intensités électriques élevées en GET réduisent considérablement le nombre de fibroblastes dermiques.

L'évolution du nombre de cellules pendant les 72h suivant l'application des champs électriques de type ECT et GET a été suivie par vidéomicroscopie (vidéo 2) *via* le comptage automatique des noyaux marqués par fluorescence (Figure 22A). Les paramètres électriques ECT n'ont pas conduit à une différence statistique entre le contrôle et les différentes intensités de champ électrique appliquées (Figure 22B). Pour les conditions GET, trois comportements distincts ont pu être distingués. Les cellules soumises aux champs électriques de 50 et 100V/cm se sont comportées de la même façon que les cellules témoins. À partir de 200 V/cm, le nombre de noyaux a diminué avec un retard de croissance important, et ce phénomène a été augmenté pour une intensité de champ électrique plus élevée (300 V/cm). Cette observation a été confirmée en analysant le nombre de noyaux dans le champ du microscope 70h après application des champs électriques (Figure 22C). Le retard de croissance cellulaire peut s'expliquer soit par un arrêt de la prolifération, soit par un équilibre dynamique entre les cellules mourantes et les cellules proliférantes comme nous l'avons observé lors de la clonogénie qui démontrait que les paramètres GET appliqués à une intensité de 300 V/cm altéraient la viabilité cellulaire à long terme de l'ordre de 60 % (Figure 19D).

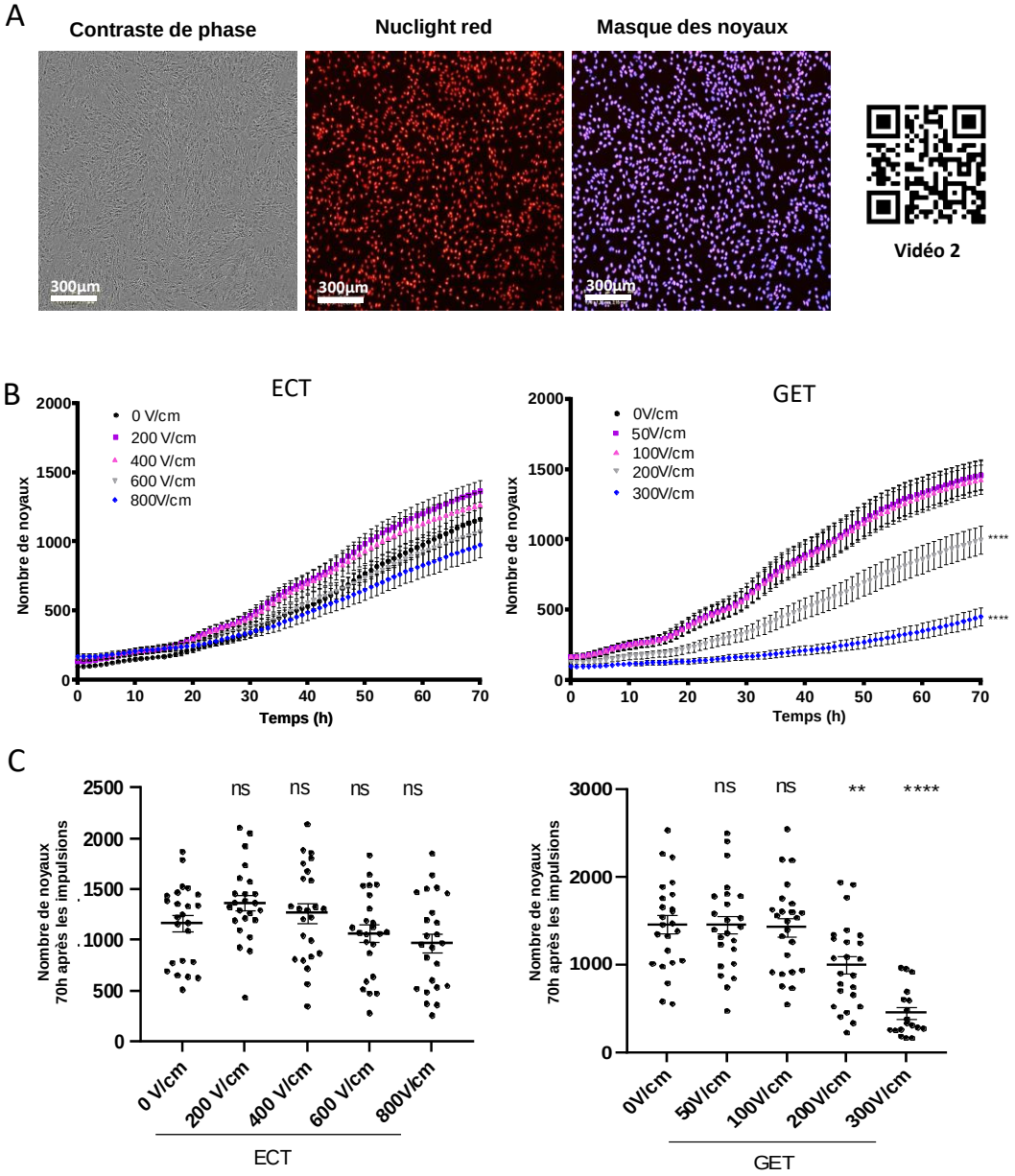


Figure 22 : Les paramètres électriques ECT n'ont pas affecté la prolifération des fibroblastes dermiques tandis que certains paramètres GET ont réduit le nombre de cellules. A. Traitement des images avec des masques pour quantifier la prolifération des fibroblastes dermiques. Comme les images de contraste de phase n'étaient pas exploitables telles quelles, un masque présentant les noyaux fluorescents marqués par le réactif rouge Nuclight a été ajouté sur les mêmes images. Ce processus a permis de déterminer le nombre de noyaux dans l'image à chaque temps. B. Prolifération des fibroblastes dermiques au cours du temps après l'application des champs électriques de type ECT et GET. Analyse statistique par Anova bidirectionnelle C. Nombre de noyaux 70h après l'application des paramètres électriques de type ECT et GET. N=6; n=24. Analyse statistique par Anova unidirectionnelle.

Les paramètres électriques de types GET les plus élevés provoquent l'apoptose des fibroblastes dermiques par induction d'un stress mitochondrial.

Seules certaines intensités de champ électrique de type GET ont montré des résultats antiprolifératifs sur les monocouches cellulaires. Nous avons donc décidé de nous concentrer sur les paramètres électriques de type GET pour l'analyse de l'apoptose et du stress mitochondrial. Afin d'expliquer le retard observé dans la croissance cellulaire après l'application des paramètres électriques de type GET, l'apoptose a été étudiée 24h après l'électroporation *via* l'activité des caspases 3/7 (Figure 23A). Le pourcentage de cellules en apoptose augmentait lorsque l'intensité du champ électrique augmentait. À 200 V/cm environ 10 % des cellules présentaient une activation des caspases 3 et 7 et ce pourcentage atteignait 30 % à 300 V/cm, 24h après l'application du champ électrique. Ces 30% de cellules apoptotiques à 300 V/cm différaient du pourcentage observé lors du test de clonogénie (perte de 60 % de la viabilité cellulaire à long terme (Figure 19D)), ce qui signifie que d'autres mécanismes de mort cellulaire pourraient être impliqués, comme la nécrose. Il a précédemment été démontré que l'ultrastructure des mitochondries était rapidement modifiée lorsque les cellules étaient soumises à l'électroporation[109]. Par conséquent, nous avons concentré les expériences suivantes sur la caractérisation mitochondriale. La sonde fluorescente MitoView a été utilisée pour suivre le potentiel de membrane mitochondriale après l'application des paramètres électriques de type GET (Figure 23B). La coloration fluorescente dépend du potentiel de la membrane mitochondriale et disparaît lorsque les mitochondries se dépolarisent [110]. Une perte significative de fluorescence a été observée sur les cellules vivantes 1h après l'application du champ électrique de type GET à 300 V/cm, ce qui signifie que les mitochondries ont subi une dépolarisation, phénomène qui pourrait conduire à l'initiation du processus de mort cellulaire, en particulier de l'apoptose [110]. La vidéomicroscopie a ensuite été utilisée pour suivre le stress oxydatif mitochondrial dans les cellules vivantes après l'application des paramètres électriques de type GET en utilisant le réactif MitoSOX (Figure 23C). Cette sonde cible spécifiquement les mitochondries et devient hautement fluorescente après son oxydation par l'anion superoxyde mitochondrial [111]. Aucun stress oxydatif mitochondrial immédiat n'a été observé après l'application des paramètres électriques de type GET. Cependant, un effet retardé a été observé pour les intensités de 200 V/cm et 300 V/cm dès 4h après les impulsions. Cette observation devient statistiquement significative 7h après les impulsions. Cela signifie qu'à 200 V/cm et d'autant plus à 300 V/cm, un stress oxydatif mitochondrial a été généré par production d'anion superoxyde dès 4h après les pulses.

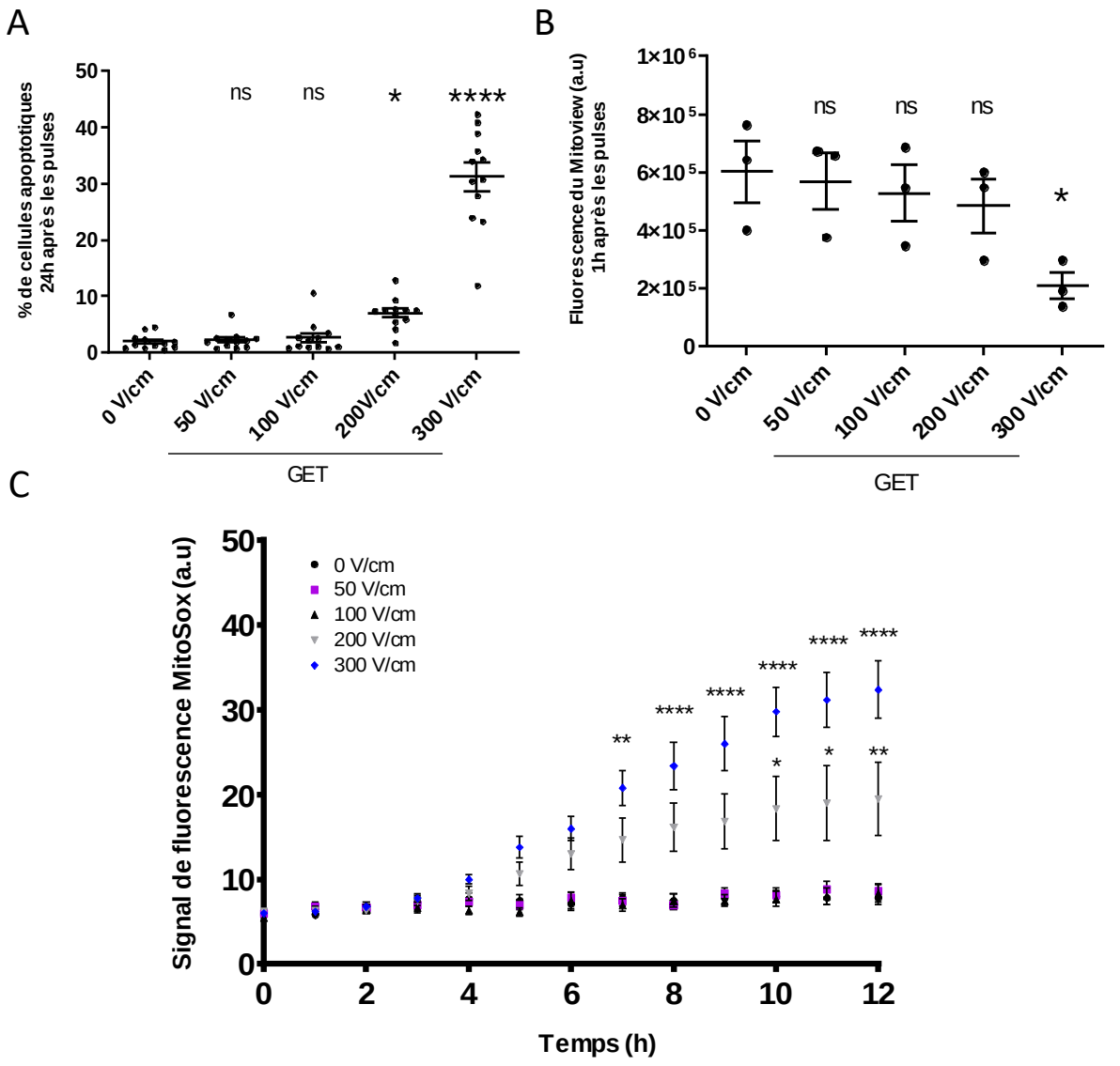


Figure 23: Certains paramètres électriques GET ont induit l'apoptose et un stress mitochondrial dans les fibroblastes électroporés. A. Pourcentage de cellules apoptotiques quantifié avec le système d'analyse IncuCyte ZOOM 24h après électroporation grâce à un double marquage avec le réactif Caspase-3/7 Green Apoptosis Assay et le réactif Nuclight Red. N = 2; n = 12. Analyse statistique par Anova unidirectionnelle et bidirectionnelle B. Quantification de la perte de potentiel de membrane mitochondrial 1h après application du champ électrique, en utilisant la sonde fluorescente MitoView633. N = 1; n = 3. Analyse statistique par Anova unidirectionnelle. C. Détection fluorescente de la génération d'anion superoxyde mitochondrial $O_2^{\cdot-}$ en utilisant la sonde MitoSOX en vidéomicroscopie. N = 2; n = 12. Analyse statistique par Anova bidirectionnelle.

Les propriétés de migration des fibroblastes non exposés ont été stimulées par un milieu conditionné pendant 24h par des fibroblastes électroporés.

Afin d'évaluer les effets indirects de l'application de champ électrique sur les propriétés de migration des fibroblastes dermiques, des tests de fermeture de la plaie ont été réalisés avec des fibroblastes cultivés en présence de milieux conditionnés (Figure 24). Dans cette condition, les fibroblastes dermiques analysés n'ont jamais été soumis à un champ électrique, mais ils ont été cultivés dans un milieu de culture conditionné pendant 24h par des fibroblastes dermiques eux-mêmes exposés aux différents paramètres électriques de type ECT et GET. Les analyses statistiques réalisées sur un grand nombre de réplicas ont indiqué qu'au cours des premières 24 heures, le milieu conditionné par les fibroblastes soumis à des impulsions de type GET 200 V/cm a amélioré la fermeture de la plaie par rapport au contrôle. Une tendance est apparue à partir de 10h, qui est devenue statistique à 18h puis a augmenté au cours des 6 dernières heures de l'expérience. Cependant, ces analyses n'ont pas révélé de différences statistiques pour les autres conditions GET ni pour les conditions ECT (Figure 24A). La confluence cellulaire dans la zone de la plaie après 24h de culture en présence de milieu conditionné a montré une tendance globale pour toutes les conditions de milieu conditionné à stimuler la migration cellulaire (Figure 24B). Cependant, seuls les milieux conditionnés par les fibroblastes soumis à des impulsions de type GET 200 V/cm ont statistiquement amélioré la fermeture de la plaie. Il faut souligner que les paramètres électriques appliqués dans cette condition sont ceux qui conduisent à une apoptose modérée. Nous avons donc émis l'hypothèse que les fibroblastes dermiques exposés à des champs électriques pulsés et subissant une apoptose modérée sécrètent plusieurs facteurs stimulant la migration des fibroblastes non exposés.

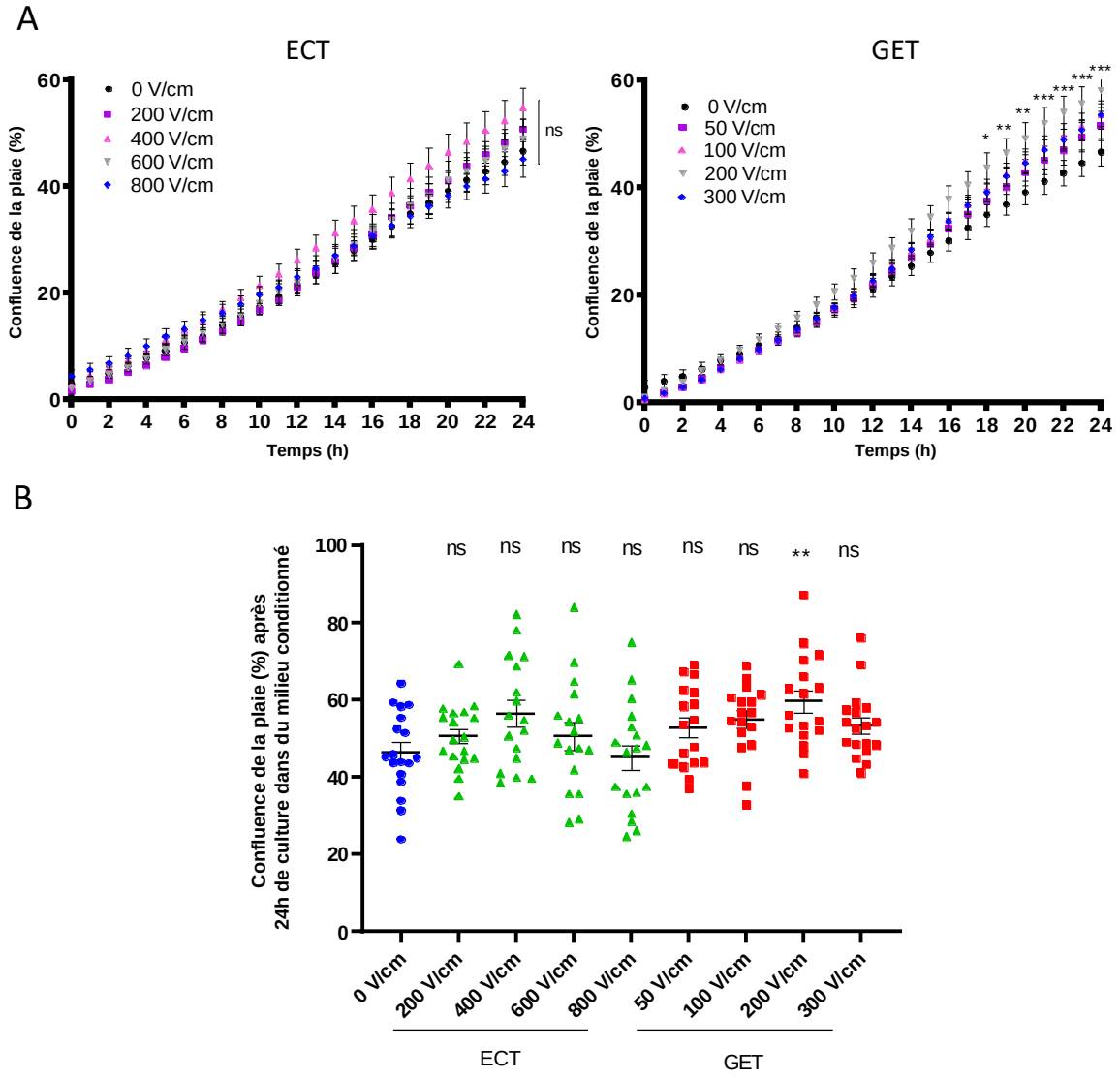


*Figure 24 : Les milieux conditionnés par des fibroblastes électroporés ont stimulé la migration des fibroblastes non exposés. A. Évolution temporelle de la migration des fibroblastes dermiques cultivés dans des milieux de culture cellulaire conditionnés par les paramètres électriques de type ECT et GET. N = 3; n = 18. Seule la condition 200 V/cm a montré une différence statistique avec la condition témoin (0 V/cm). Analyse statistique par Anova bidirectionnelle * = p <0,05; ** = p <0,01; *** = p <0,001 B. Diagramme de dispersion de la confluence de la plaie après 24h de culture dans un milieu conditionné par les paramètres électriques de type ECT ou GET pendant 24h. N = 3; n = 18. Analyse statistique par Anova unidirectionnelle ** = p <0,01. Conditions contrôle (Ctrl ●), électrotransfert de gènes (GET ■) et électrochimiothérapie (ECT ▲).*

Les paramètres électriques ECT et GET modulent fortement la transcription des facteurs de croissance.

Afin de comprendre les résultats ci-dessus, un kit de qPCR dédié à la cicatrisation (84 gènes analysés) disponible dans le commerce a été utilisé 4h après l'exposition des fibroblastes dermiques aux paramètres électriques de type ECT (600 V/cm) et GET (200 V/cm). Cette analyse a révélé des variations significatives du nombre de transcrits de plusieurs facteurs de croissance (Figure 25A). Les gènes surexprimés (en rouge sur la figure) dans les deux conditions comprennent le facteur de croissance du tissu conjonctif (CTGF), le facteur de croissance endothélial vasculaire A (VEGFA), la sous-unité A du facteur de croissance dérivé des plaquettes (PDGFA) et le facteur de croissance transformant alpha (TGFα) avec des variations au témoin non électroporé de l'ordre de 1,2 à 3,6 fois. Plusieurs facteurs de croissance ont également été sous-exprimés (en vert sur la figure) 4h après l'exposition aux paramètres électriques de type ECT et GET dont le TGF-β1, un protagoniste bien connu de la fibrose cutanée. Pour les paramètres de type GET, nous avons également noté des surexpressions spécifiques de facteurs liés à l'immunité comme le facteur de stimulation des colonies 3 (CSF3), ainsi que des facteurs angiogéniques comme le facteur de croissance épidermique (EGF). Cette expérience a confirmé que l'expression de plusieurs facteurs de croissance était rapidement et fortement modulée après l'électroporation. Pour aller plus loin et confirmer que cette modulation des transcrits a également lieu au niveau des protéines, nous avons quantifié par test ELISA deux d'entre eux dans le milieu de culture cellulaire 24h après l'électroporation des fibroblastes dermiques (Figure 25B,C). Nous nous sommes concentrés sur le facteur de croissance endothélial vasculaire A (VEGFA) et sur la sous-unité A du facteur de croissance dérivé des plaquettes (PDGFA) car ils étaient fortement surexprimés au niveau de l'ARN : 2,4 fois en condition ECT et 3,3 fois en condition GET pour le VEGFA, et 2,4 fois en condition ECT et 1,85 fois en condition GET pour le PDGFAA. Une augmentation de l'abondance des protéines VEGFA et PDGFAA a en effet été retrouvée dans le surnageant de culture cellulaire après l'électroporation. Cette augmentation était statistique dès 6h après les impulsions dans les deux conditions pour le PDGFAA et 24h après les impulsions pour le VEGFA (même si non statistique en ECT). Nous avons ainsi confirmé au niveau protéique que l'électroporation augmentait l'expression des facteurs de croissance VEGFA et PDGFAA comme observé au niveau transcriptionnel.

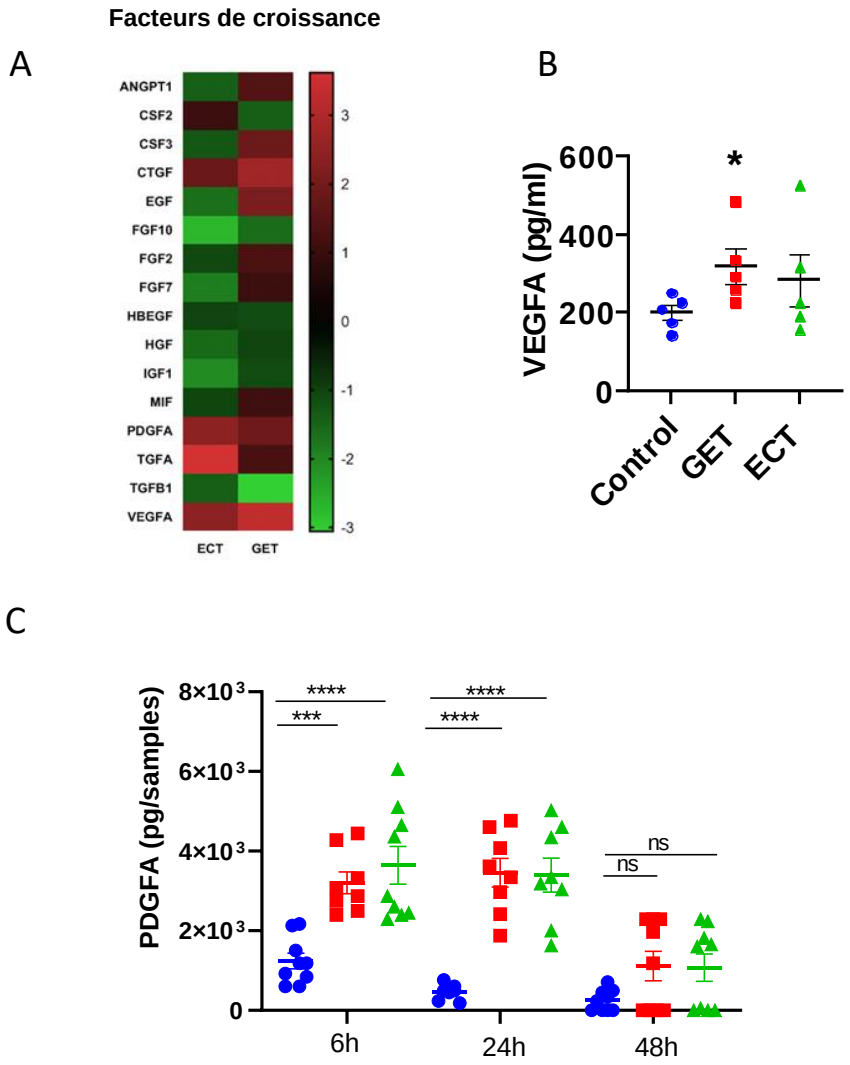


Figure 25: Analyse de l'expression des gènes codants les facteurs de croissance dans les fibroblastes dermiques 4h après l'exposition aux paramètres électriques de type ECT et GET. A. L'expression génique a été quantifiée par RT-qPCR. Les changements d'expression sont exprimés par rapport à la condition témoin. Condition témoin et ECT (600 V/cm) n = 3, condition GET (200 V/cm) n = 2. Angiopoïétine 1 (ANGPT1); Facteur de stimulation de colonies 2 et 3 (CSF2,3); Facteur de croissance du tissu conjonctif (CTGF); Facteur de croissance épidermique (EGF); Facteur de croissance des fibroblastes 2,7 et 10 (FGF2,7,10); Facteur de croissance de type EGF se liant à l'héparine (HBEGF); Facteur de croissance des hépatocytes (HGF); Facteur de croissance analogue à l'insuline 1 (IGF1); Facteur inhibiteur de migration des macrophages (MIF); Sous-unité A du facteur de croissance dérivé des plaquettes (PDGFA); Facteur de croissance transformant alpha (TGFα); Facteur de croissance transformant bêta 1 (TGF-β1); Facteur de croissance endothélial vasculaire A (VEGFA). B. Expression de la protéine VEGFA quantifiée par ELISA dans un milieu de culture cellulaire 24h après l'électroporation des fibroblastes dermiques en monocouche avec les paramètres de type ECT (600 V/cm) et GET (200 V/cm) N = 1, n = 5. Analyse statistique par test de Mann Whitney C. Expression de la protéine PDGFAA quantifiée par ELISA dans un milieu de culture cellulaire 6h, 24h et 48h après l'électroporation des fibroblastes dermiques en monocouche avec les paramètres de type ECT (600 V/cm) et GET (200 V/cm) N = 2, n = 8. Analyse statistique par Anova unidirectionnelle. Conditions contrôle (Ctrl ●), électrotransfert de gènes (GET ■) et électrochimiothérapie (ECT ▲).

Les propriétés migratoires des kératinocytes humains ne sont pas statistiquement affectées par l'application des paramètres électriques ECT et GET.

La migration des kératinocytes après l'application des paramètres électriques de type ECT et GET a été étudiée avec le même protocole expérimental que celui utilisé précédemment sur les fibroblastes dermiques. Aucune différence statistique n'a été observée sur la migration des kératinocytes au cours

du temps, et ce, quels que soit les paramètres électriques appliqués (Figure 26A). Cette observation a été confirmée par l'analyse statistique de la confluence de la plaie 24h après l'application des champs électriques (Figure 26B). L'observation des images obtenues par vidéo-microscopie laisse à penser que les champs électriques les plus forts induiraient une fusion des kératinocytes, probablement en raison de la présence de jonctions cellulaires serrées entre les cellules (Figure 26C).

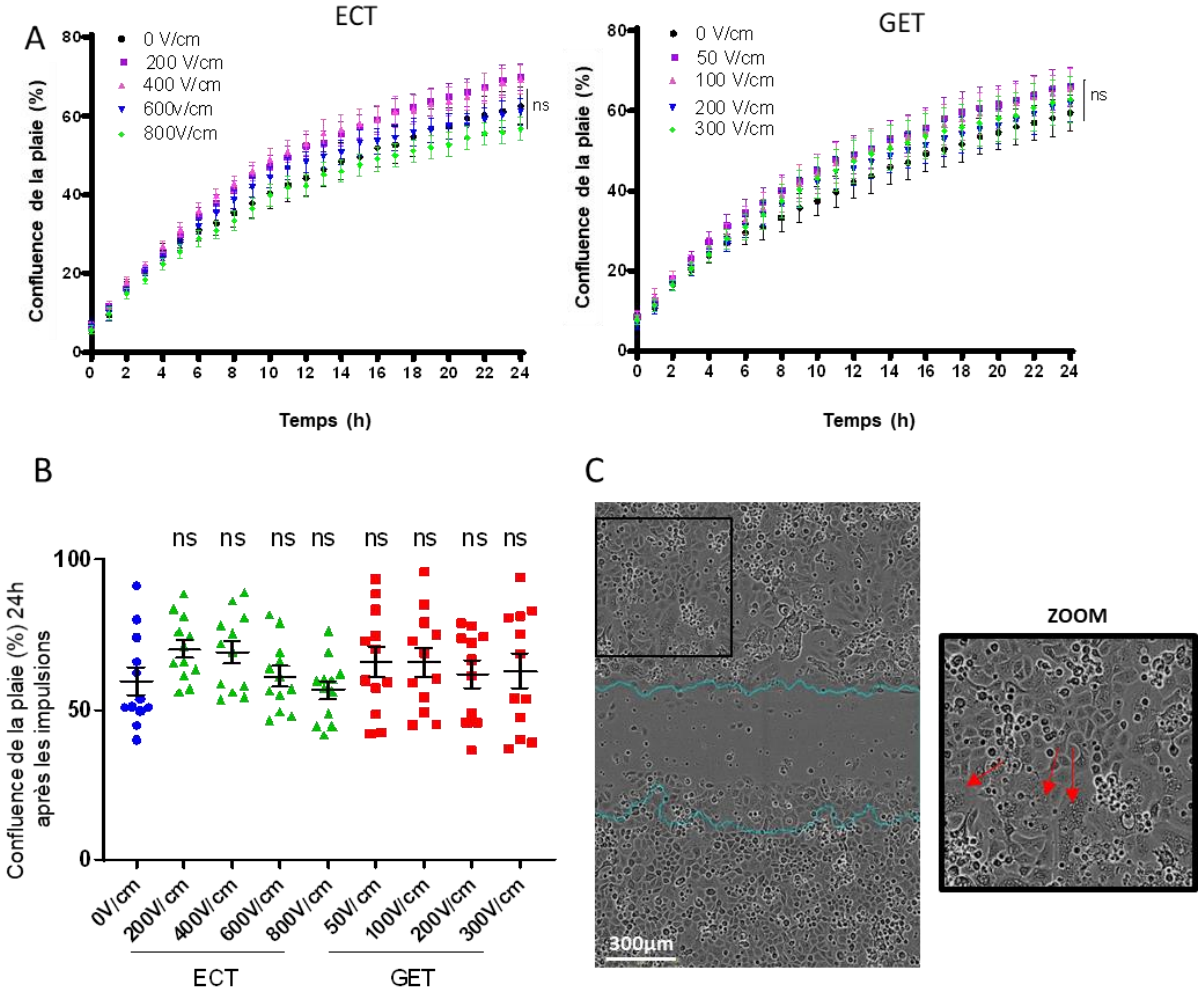


Figure 26: Les paramètres électriques ECT et GET n'ont pas affecté les propriétés de migration des kératinocytes dans le test de fermeture de la plaie. A. Évolution dans le temps de la migration cellulaire après l'application des paramètres électriques de type ECT et GET sur des kératinocytes synchronisés et soumis au test de la rayure. La confluence de la plaie (%) représente la zone de la plaie qui est occupée par des cellules à chaque temps. N = 2; n = 12 Analyses statistiques par Anova bidirectionnelle. B. Diagramme de dispersion de la confluence de la plaie (%) 24h après les pulses. N = 2; n = 12. Analyse statistique par Anova unidirectionnelle. Conditions contrôle (Ctrl ●), électrotransfert de gènes (GET ■) et électrochimiothérapie (ECT ▲). C. Image microscopique du test de migration des kératinocytes dans les tests de fermeture de la plaie 12h après les pulses de type ECT (800V/cm). Le masque de la plaie initiale (t = 0h) est représenté en bleu.

c. Discussion

L'existence d'un potentiel électrique transépithélial fait des cellules cutanées une cible idéale pour l'étude de la modulation du comportement cellulaire après l'électroporation. En effet, les champs électriques endogènes sont importants pour guider la migration cellulaire et prédominent souvent sur les signaux chimiques ou topographiques [112]. La migration directionnelle, ou galvanotaxie, le long d'un champ électrique a déjà été mise en évidence avec les fibroblastes [113–115]. Les fibroblastes dermiques humains soumis à un courant continu de 0,5 à 2 V/cm ont mis plus d'une heure à présenter une migration directionnelle mesurable vers l'anode [113,115]. Zhao et ses collaborateurs ont identifié la phosphatidyl-inositol 3 kinase (PI (3) K) et l'homologue de la phosphatase et de la tensine (PTEN) comme des gènes essentiels contrôlant la galvanotaxie [113]. Zhao et al ont ainsi montré que le champ électrique dirigeait la migration cellulaire en agissant comme signal directionnel principal, déclenchant l'activation de la signalisation Src et inositol-phospholipide[113]. Le rôle de la phosphatidyl-inositol 3 kinase dans la migration électro-induite a été confirmé par Guo et ses collègues en 2010 [115]. Un autre mécanisme suggéré est la redistribution asymétrique des récepteurs membranaires EGFR à la surface cellulaire [116–118]. Néanmoins, ces études ont principalement appliqué des courants continus durant de longue exposition, alors que dans cette étude nous avons utilisé un champ électrique pulsé. La différence de nature et d'intensité des champs électriques appliqués peut très vraisemblablement expliquer l'absence de résultats significatifs dans les expériences de migration et de galvanotaxie après l'électroporation.

Il a été démontré que les stimulations pulsées à haute tension (HVPG) ont un effet proliératif sur les fibroblastes pulmonaires fœtaux humains IMR-90 et stimulent la synthèse des protéines [119]. Cette étude a montré une augmentation des taux de synthèse des protéines 2h après la stimulation électrique et de la synthèse d'ADN entre 2 et 24h après la stimulation. La synthèse des protéines maximale avait lieu après l'application de champs électriques de 50 V/cm à une fréquence de 100 Hz, et la synthèse d'ADN maximale après l'application de champs électriques de 75 V/cm à une fréquence de 100 Hz. Toutefois, dans cette étude, les paramètres électriques ont été appliqués pendant au moins 20min, loin du champ électrique pulsé appliqué en électroporation. Ainsi, les mécanismes moléculaires impliqués peuvent différer et expliquer l'absence de prolifération après l'application des champs de type ECT et GET.

Les espèces réactives de l'oxygène (ROS) jouent un rôle majeur dans la réponse à la cicatrisation des plaies [120]. Fait intéressant, des études ont montré que l'électroporation génère des ROS telles que le H_2O_2 [121,122]. La peroxydation lipidique des membranes cellulaires après électroporation a également été rapportée[15]. La peroxydation des lipides et la concentration en ROS augmentent avec l'intensité du

champ électrique, la durée des impulsions et le nombre d'impulsions et sont corrélées à l'électroperméabilisation membranaire et à la mort cellulaire lorsque la quantité de dommages cellulaires est trop élevée[123]. Dans nos conditions expérimentales, l'électroporation de fibroblastes dermiques avec les intensités de champ les plus élevées en condition GET (200 V/cm et 300V/cm) a bloqué le processus de migration et induit partiellement la mort cellulaire. Ces résultats sont en accord avec ceux rapportés dans la littérature montrant les effets délétères des ROS sur les fibroblastes dermiques [124].

Dans ce chapitre, nous avons démontré que la modulation de l'intensité des champs électriques conduisait à un gradient d'électroperméabilisation cellulaire. Nous pouvons émettre l'hypothèse que les réponses cellulaires à ces défauts de la membrane plasmique seront différentes. En effet, l'induction de l'apoptose a été observée pour les paramètres électriques GET les plus intenses (soit 200 V/cm et 300 V/cm). Le sécrétome des cellules électroporées dans ces conditions a amélioré significativement la capacité de migration des fibroblastes non exposés. Nous pouvons supposer que cet effet peut se reproduire *in vivo*, où les cellules mourantes sécréteraient des facteurs spécifiques modifiant le comportement des cellules environnantes. Il a été précédemment démontré que la composante électrique des champs de type électroporation induisait l'externalisation de la calréticuline [125] alors que la calréticuline est généralement une protéine résidant dans le réticulum endoplasmique. Lorsqu'elle est extériorisée, elle devient une molécule associée aux dégâts (DAMP) et donc à une mort cellulaire immunogénique [126]. Fait intéressant, des études ont montré que l'externalisation de la calréticuline jouait un rôle important dans la cicatrisation cutanée en stimulant la prolifération, la migration et la différenciation des fibroblastes dermiques et des kératinocytes [127]. Plusieurs études ont déjà montré que les nucléotides libérés par les tissus endommagés, tels que l'ATP extracellulaire ou les purines et pyrimidines libérées suite à la mort cellulaire et à la fragmentation de l'ADN, régulaient de nombreuses fonctions importantes des cellules cutanées (prolifération, migration, contraction) et peuvent favoriser la cicatrisation des plaies [128].

D'autres expériences seraient nécessaires pour définir le type de facteurs sécrétés par les cellules mourantes. Nous avons obtenu des résultats encourageants sur la modulation d'un certain nombre de facteurs de croissance par l'électroporation. Le VEGFA et le PDGFAA ont été quantifiés au niveau protéique par ELISA et nous avons démontré que les fibroblastes dermiques électroporés libéraient une quantité significative de ces deux facteurs de croissance après les pulses. Cependant, des analyses complètes des facteurs de croissance et des cytokines sécrétées à la suite de l'électroporation doivent être menées de manière exhaustive au niveau des protéines (ELISA, protéomique) et des tests fonctionnels sont indispensables pour conclure. Toutefois, des réponses peuvent être trouvées dans la littérature pour enrichir la réflexion sur les effets du sécrétome. Certains auteurs ont démontré que

l'électroporation stimulait la libération de facteurs de croissance tels que PDGF-AA, TGF-b1 ou EGF par les plaquettes et qu'une modulation des paramètres de champ électrique affectait les facteurs sécrétés [129].

L'effet du sécrétome induit par l'électroporation a été étudié dans le contexte des cellules tumorales de mélanome [130]. Dans cette étude le sécrétome conduisait à la mort des cellules cultivées en présence de milieux conditionnés probablement due à la libération de microvésicules (<500 nm). Fait intéressant, les quantités de microvésicules dépendaient des paramètres électriques appliqués, confirmant que dans les tissus la réponse cellulaire sera différente en fonction de la distribution du champ électrique. Il serait intéressant de caractériser les vésicules extracellulaires sécrétées ainsi que leur contenu. La coculture de cellules serait une approche complémentaire à celle adoptée dans cette étude afin d'étudier la communication cellules-cellules. Pour aller plus loin, des modèles plus complexes comme le substitut cutané pourraient permettre d'étudier les effets du sécrétome dans des conditions plus représentatives que les cultures 2D.

2. Étude de l'effet des champs de type électroporation sur le remodelage matriciel dans des substituts de derme humain reconstruits par ingénierie tissulaire.

Ce chapitre est en partie adapté d'un article publié dans la revue *Journal of investigative dermatology* en octobre 2021 intitulé *« Pulsed electric fields induce extracellular matrix remodeling through MMPs activation and decreased collagen production »* Gouarderes S, Ober C., Doumard L., Dandurand J., Vicendo P., Fourquaux I., Goldberg A., Samouillan V., Gibot L.https://doi.org/10.1016/j.jid.2021.09.025 (Annexe 2)

Les expériences de DSC et IRTF-ATR ont été réalisées par Camille Ober, Jany Danduran et Valerie Samouillan du CIRIMAT UMR 5085, Université Toulouse III - Paul Sabatier. Les résultats, conclusions, ainsi que les méthodes de ces expériences ont été rédigés avec leur aide.

a. Résumé

Nous avons consacré ce chapitre à l'étude de la matrice extracellulaire avant et après l'électroporation dans un modèle de feuillet dermique humain reconstruit par auto-assemblage comme décrit dans le matériel et méthodes. Toutes les expériences réalisées dans ce chapitre ont utilisé des paramètres électriques de type électrotransfert de gène GET (10 impulsions, 5ms, 1Hz, 600V/cm) et électrochimiothérapie ECT (8 impulsions, 100 µs, 1Hz, 1000V/cm) qui ont été choisis pour permettre une perméabilité cellulaire à 100 % tout en maintenant la viabilité cellulaire à 95 % pour les paramètres ECT et à 90 % pour les paramètres GET. Etant donné la quantité d'échantillons à produire et à traiter pour les différentes analyses, il n'était pas réaliste de tester plusieurs intensités de champs, même si cela aurait été très intéressant.

La première partie de ce travail a consisté en l'apprentissage de la méthode expérimentale de fabrication des feuillets puis à la caractérisation multi-échelle du modèle. Les observations ont mis en évidence des différences organisationnelles entre les faces supérieures et inférieures de ce feuillet cellulaire. Souhaitant élargir les techniques de caractérisation de notre modèle à des approches plus physico-chimiques, nous avons noué une collaboration avec l'équipe du Dr Valérie Samouillan du CIRIMAT (UMR 5085 « Physique des polymères », Université Toulouse III - Paul Sabatier). Les analyses par spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier IRTF-ATR ont ainsi permis d'étudier la distribution cellule / matrice des deux côtés du feuillet grâce aux indicateurs vibrationnels des différents composants. La structure des collagènes dans les feuillets a également été étudiée par calorimétrie à balayage différentiel sans révéler de modifications majeures. Une étude transcriptionnelle menée sur les feuillets électroporés (4h après les pulses) a permis de démontrer que 606 gènes ont été modulés significativement après le traitement GET (dont 350 surexprimés et 256 sous-exprimés) et 351 gènes après le traitement ECT (dont 258 surexprimés et 93 sous-exprimés). La majorité étaient communs aux deux protocoles. Pour compléter, l'IRTF-ATR a été utilisé pour mesurer la fraction d'ARN sur les deux faces du feuillet après électroporation. Ces deux techniques ont permis de montrer que la composante électrique de l'électroporation augmentait significativement la transcription au sein des feuillets 24h après l'électroporation.

La deuxième partie de ce travail a consisté en l'étude de la matrice extracellulaire en tant que telle, ainsi que des mécanismes impliqués dans sa modification après les pulses. Le remodelage de la MEC après électroporation a été analysé en examinant la modulation des gènes du matrisome (c'est-à-dire les gènes codants des protéines de la matrice extracellulaire ou des protéines qui y sont associées[131]) ainsi que l'activité des enzymes de remodelage. La spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier et la calorimétrie à balayage différentielle ont été utilisées comme outils complémentaires pour

analyser la structure des collagènes. Nous avons démontré que les champs électriques pulsés appliqués dans les protocoles GET et ECT induisaient une modulation rapide (4h après électroporation) des gènes associés au matrisome, en particulier une régulation à la baisse des enzymes de maturation telles que la transglutaminase TG2 et la lysyl-oxydase like LOXL4. De plus, une diminution transitoire de la production du procollagène de type 1a1 et de la teneur en hydroxyproline dans le tissu a été observée dans la semaine suivant l'électroporation. Ce remodelage des collagènes s'est avéré être principalement dépendant des MMPs comme l'ont montré des expériences réalisées en présence d'un inhibiteur pharmacologique. La culture en présence d'un inhibiteur de ROS, à savoir la N-acétyl-L-cystéine (NAC), nous a permis de démontrer que la suractivation des MMPs après les impulsions était ROS-dépendante. Concernant les glycosaminoglycanes sulfatés, autres composants de la matrice, leur quantité n'a pas été affectée par l'application des champs électriques.

De plus, nos données démontrent que les champs de type électroporation régulent à la baisse le TGF-β (ARNm et protéine), un acteur clé de la fibrose pathologique. Les myofibroblastes sont des acteurs du remodelage matriciel par la sécrétion de matrice et leur action mécanique. Ils peuvent également être impliqués dans le processus de fibrose en cas de persistance anormale. Bien que le TGF-β soit le facteur le plus connu dans la différenciation des myofibroblastes, les fibroblastes électroporés ensemencés dans un gel de collagène ont significativement remodelé la matrice 3D induisant une contraction du gel. Des immunomarquages effectués contre l'α-SMA, le principal marqueur des myofibroblastes, ont montré que très peu de fibroblastes deviennent positifs après les impulsions, et que cela n'est pas statistiquement différent des conditions contrôles malgré l'acquisition de propriétés contractiles accrues. Il semble donc que l'électroporation ne favorise pas la transdifférenciation des fibroblastes en myofibroblastes.

Enfin, pour valider nos résultats à plus grande échelle nous avons cultivé des feuillets dermiques avec des fibroblastes issus de trois donneurs différents et avons répété quelques expériences clés mises au point pendant cette thèse. Cela a permis de montrer que les résultats obtenus au niveau du remodelage de la matrice étaient reproductibles.

Nos résultats indiquent que l'application de champs électriques de type électroporation induit une dégradation transitoire (sur une base mensuelle) des collagènes dermiques à la fois par une diminution significative de la production de collagène I et des enzymes de maturation, et surtout, *via* une suractivation ROS-dépendante soutenue des métalloprotéinases matricielles (MMP). L'application d'un champ électrique externe semble donc être un outil pertinent et original pour assurer le remodelage ciblé (entre les électrodes) et transitoire de la matrice extracellulaire cutanée.

b. Résultats

Les paramètres d'électroperméabilisation choisis maintiennent la viabilité cellulaire dans le modèle.

L'efficacité de l'électroperméabilisation des cellules dans les feuillets dermiques a été imagée au microscope biphotonique après application d'impulsions électriques de type électrotransfert de gène (GET : 10 impulsions, 5ms, 1Hz, 600V/cm) et électrochimiothérapie (ECT : 8 impulsions, 100 µs, 1Hz, 1000V/cm). La perméabilisation est détectée par l'incorporation d'iodure de propidium, un intercalant de l'ADN non perméant. Comme le montre la Figure 27, dans les feuillets contrôles non soumis à l'électroporation la proportion de cellules perméabilisées est quasi nulle (Figure 27A), contrairement aux feuillets soumis aux champs de types ECT et GET dans lesquels les cellules perméabilisées sont détectées en très grand nombre dans toute l'épaisseur du tissu (Figure 27A-C). Afin de déterminer la viabilité cellulaire dans les feuillets dermiques après application des champs électriques, l'activité métabolique a été quantifiée grâce à la méthode du PrestoBlue. La Figure 27B montre que les paramètres électriques utilisés ont permis de maintenir une viabilité cellulaire de 91 % dans les feuillets soumis aux champs de type GET et de 100% dans les feuillets soumis aux champs de type ECT. Aucune différence statistique n'a été observée entre les groupes. Ces résultats démontrent l'efficacité des paramètres sélectionnés pour assurer l'électroperméabilisation sans impacter la viabilité cellulaire au sein du modèle.

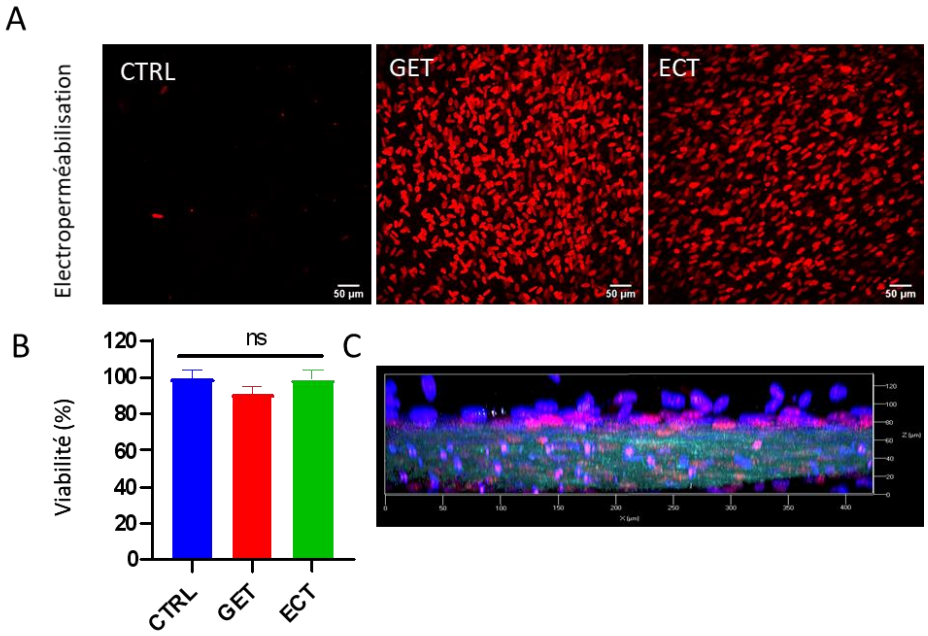


Figure 27 : Les paramètres d'électroperméabilisation choisis maintiennent la viabilité cellulaire au sein du modèle. A. Electoperméabilisation évaluée par pénétration d'iodure de propidium (rouge) pendant l'électroporation observée par microscopie bi-photonique sur toute l'épaisseur du feuillet. B. Évaluation de la viabilité cellulaire par Prestoblue dans les feuillets 24h après l'application des champs électriques, N=3, n=14. Analyse statistique par Anova unidirectionnelle. C. Vue transversale d'un feuillet traité par GET observé par microscopie bi-photonique (SHG Cyan ; Hoechst Bleu ; iodure de propidium rouge). CTRL (0 V/cm) ; GET: Protocole d'électrotransfert de gènes (10 impulsions, 5ms, 1Hz, 600V/cm) ; ECT: protocole d'électrochimiothérapie (8 impulsions, 100 µs, 1Hz, 1000V/cm)

Le feuillet dermique, un modèle polarisé et riche en matrice extracellulaire

Dans le modèle auto-assemblé les fibroblastes dermiques humains primaires produisent leur propre matrice extracellulaire en l'absence de support exogène, comme dans le derme humain natif qui se caractérise par l'abondance de matrice extracellulaire synthétisée par les cellules. En conséquence, après 4 semaines de culture en présence d'acide ascorbique, les feuillets dermiques générés par auto-assemblage deviennent aisément manipulables. La matrice extracellulaire des substituts dermiques peut alors être étudiée à l'aide d'une analyse multi-échelle (Figure 28). En observation macroscopique à l'échelle tissulaire, le substitut dermique se présente sous l'aspect d'une membrane cohésive, reliée à un ancrage en papier en forme d'anneau. En observation microscopique, la visualisation des collagènes par génération de seconde harmonique au microscope biphotonique permet de visualiser un assemblage supramoléculaire habituel de collagènes fibrillaires organisés. L'analyse de surface réalisée au microscope électronique à balayage montre les fibres de collagènes dans les espaces intercellulaires. Enfin, à l'échelle du nanomètre, l'ultrastructure de la matrice caractérisée par microscopie électronique confirme que la matrice contient des collagènes fibrillaires aisément caractérisables par la présence de striations d'une périodicité de 680 Å. Au niveau cellulaire, les fibroblastes présentent une forme allongée et un réticulum endoplasmique dense en raison de la forte sécrétion de matrice. Des vésicules d'exocytose ont également été largement observées au niveau de la membrane plasmique (Figure 28). Les observations multi-échelles ont mis en lumière des différences d'organisation entre les faces du feuillet. La microscopie électronique à transmission sur coupe transversale montre que la densité cellulaire dans les substituts dermiques augmente en se rapprochant de la face « milieu », tandis que la densité de collagènes augmente près de la face « Pétri» (Figure 28). L'analyse par microscopie à balayage met également en évidence cette différence dans la topographie des faces supérieures et inférieures. En effet, la face supérieure « milieu » est riche en cellules et moins dense en matrice tandis que la face inférieure est caractérisée par l'abondance de fibres de collagènes orientées dans tous les plans du feuillet (Figure 28).

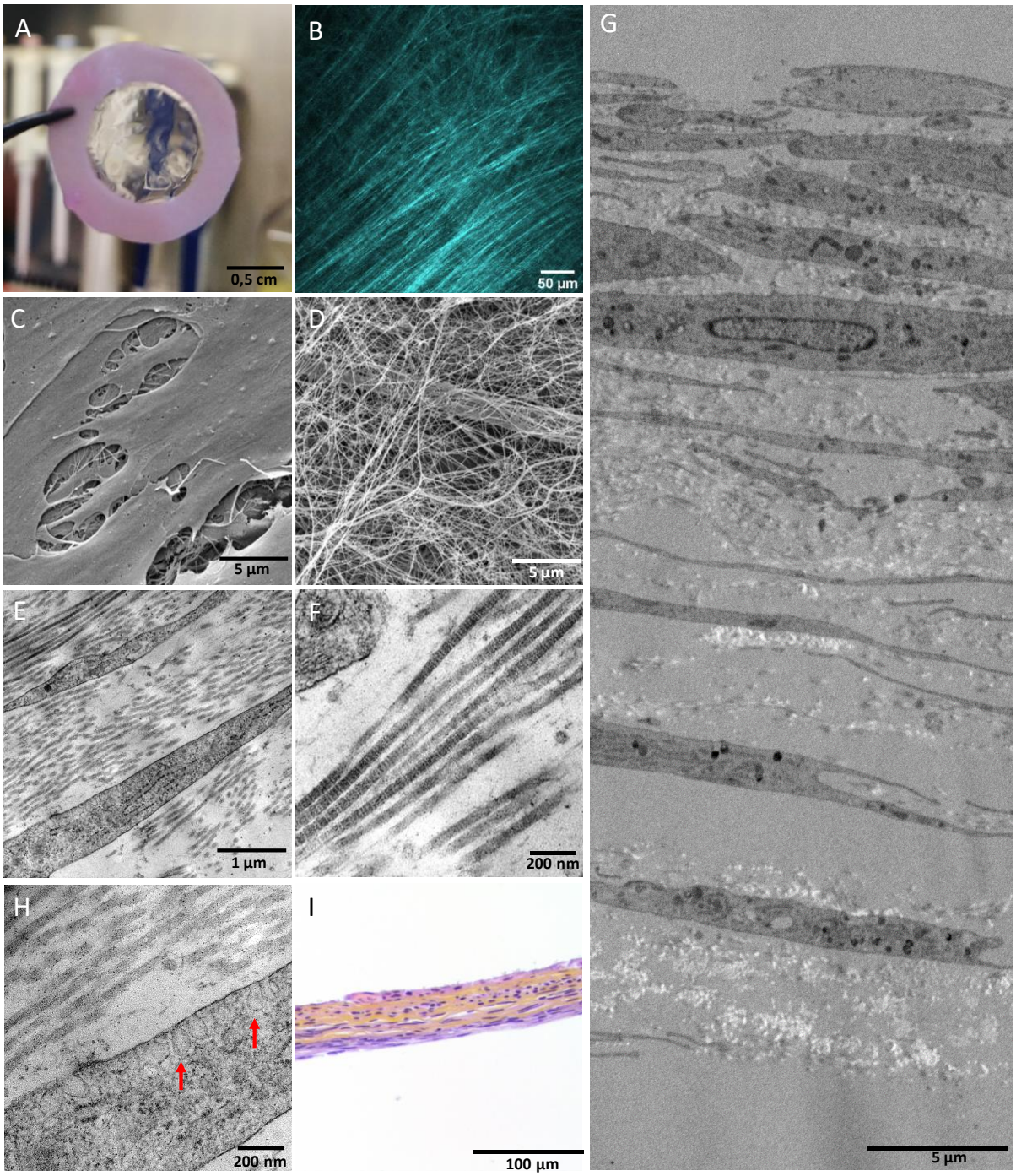


Figure 28: Caractérisation multi-échelle de la matrice extracellulaire et plus spécifiquement des collagènes dans un substitut dermique humain. Observation à l'œil nu (A), génération de seconde harmonique par microscopie bi-photonique (B), microscopie électronique à balayage (MEB) (C, D), microscopie électronique à transmission (MET) (E, F, G, H), coloration histologique HES (les collagènes sont en jaune) (I).

La microscopie à faisceaux d'ions focalisés (focused ion beam , FIB) a également été utilisée pour imager les feuillets dermiques. Cette méthode peu répandue pour l'étude d'échantillons biologiques se compose d'un microscope électronique à balayage couplé à une colonne ionique permettant d'obtenir un faisceau d'ions Ga^+ focalisés. Cette colonne permet l'abrasion ionique de la matière localement et précisément, à l'échelle du micromètre. Le principe est alors de réaliser des abrasions successives d'une zone d'intérêt tout en imageant chaque coupe transversale au MEB. La polarisation du feuillet dermique a pu être visualisée par cette méthode, qui a également mis en avant les fibres de collagènes en coupe transversale et sagittale (Figure 29).

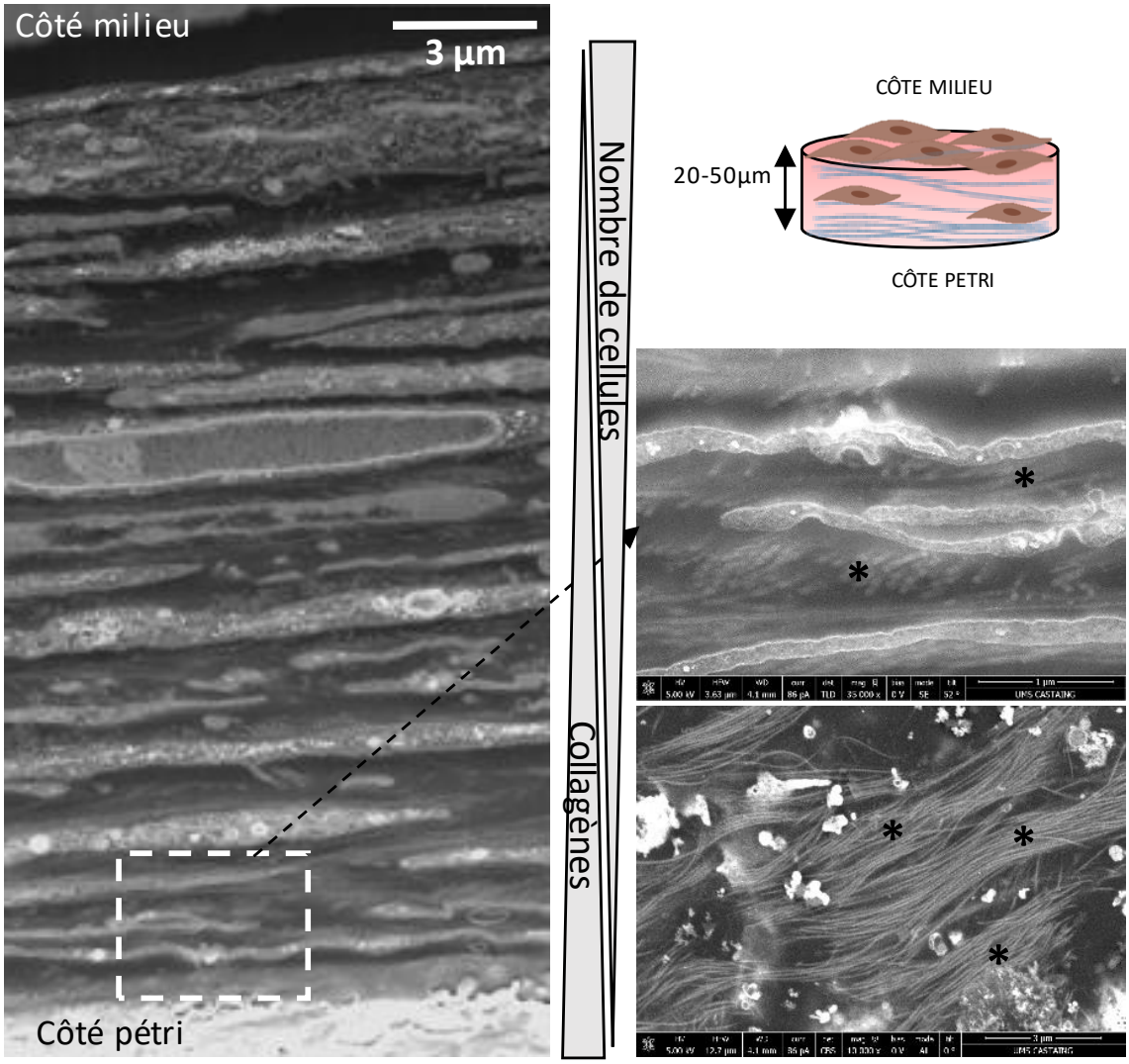


*Figure 29: Caractérisation des collagènes dans un substitut dermique humain au microscope électronique à balayage à faisceau d'ions focalisés (FIB). Coupe transversale du feuillet dermique imagé par microscopie à balayage. * Collagènes*

Les analyses vibrationnelles réalisées en collaboration avec le CIRIMAT ont permis d'étudier la distribution cellules/matrice sur les deux faces des feuillets grâce aux indicateurs vibrationnels indexés dans sur la courbe ci-dessous (Figure 30 et Annexe 2, Figure S1). La bande à 1338 cm^{-1} (agitation de la chaîne latérale de la proline) est référencée dans la littérature comme une bande d'absorption spécifique du collagène et peut par conséquent être utilisée pour quantifier cette protéine [132,133]. Comme indiqué dans la Figure 30, le rapport des aires A(1338 cm^{-1})/A(1452 cm^{-1}) était nettement moindre dans la face supérieure du feuillet (côté milieu) comparativement à la face inférieure (côté Pétri) . La bande à 970 cm^{-1} est quant à elle attribuée au squelette ribose-phosphate de l'ADN de l'ARN [134]. Comme le montre la Figure 30, l'augmentation significative du rapport de surface A(970 cm^{-1})/A(1452 cm^{-1}) confirme la prédominance du matériel cellulaire dans la face supérieure des feuilles dermiques. Ces indicateurs ont donc permis de confirmer le déséquilibre de répartition des collagènes et des acides nucléiques dans les feuillets dermiques, localisés préférentiellement sur les faces Pétri et milieu respectivement. Cette analyse confirme la capacité de cette méthode à mettre en évidence des différences dans la signature spectrale des deux faces du feuillet en raison de leur composition moléculaire distincte.

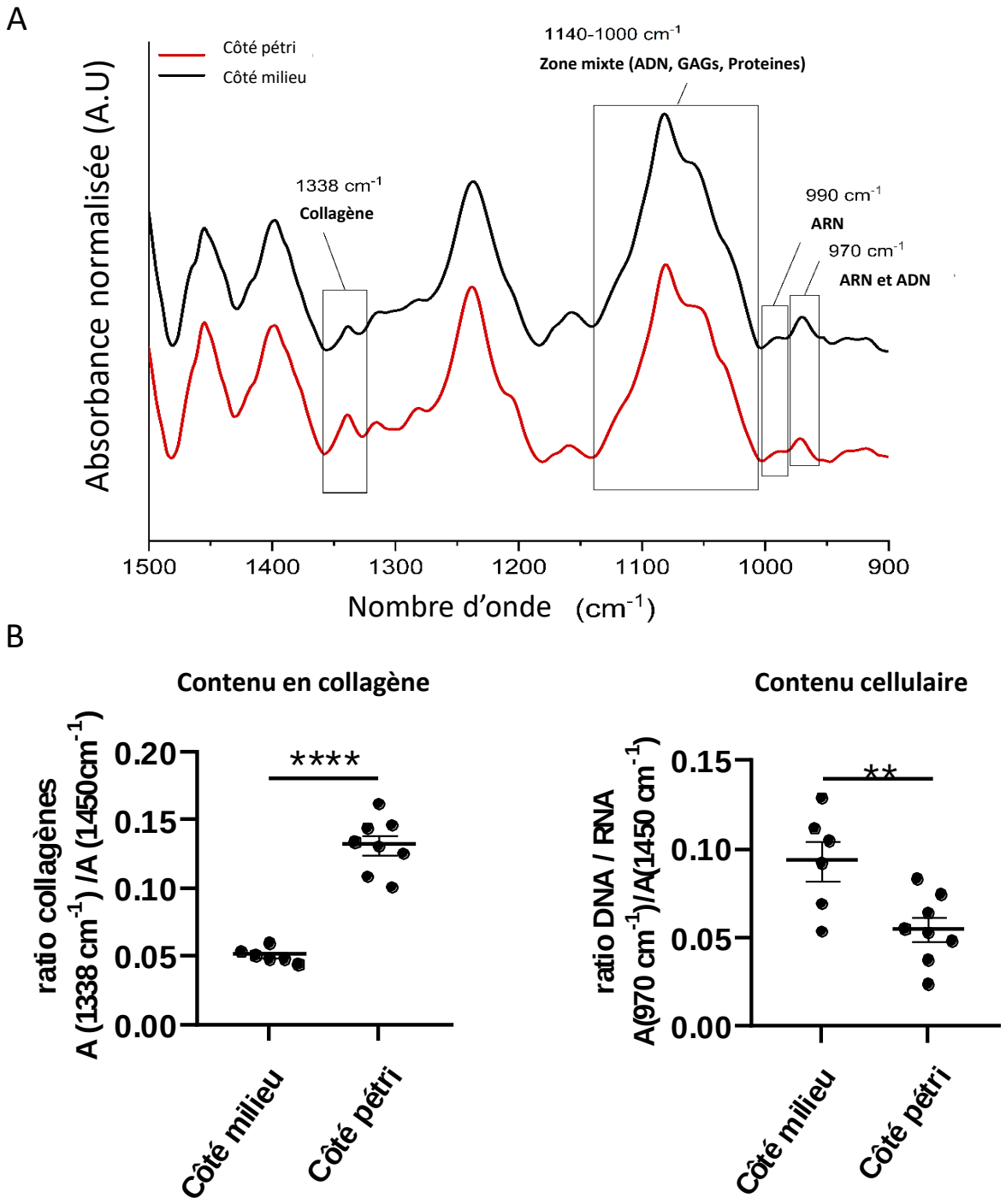


Figure 30: Différences dans la signature spectrale des deux faces du feuillet. A. Spectres IRTF-ATR moyens du substitut dermique témoin dans la gamme [1500-900 cm-1]. B. Répartition des acides nucléiques et des collagènes entre le côté milieu (face supérieure) et le côté Pétri (face inférieure) mesurée par IRTF-ATR. n> 6. Analyses statistiques par Anova unidirectionnelles

Le contenu en ARN a été modulé dans le feuillet dermique soumis à l'électroporation.

L'analyse des spectres IRTF-ATR moyens a souligné que l'électrostimulation n'a pas provoqué d'altération significative de la signature spectrale globale des différents composants biologiques mais des changements dans les intensités des bandes (Annexe 2, Figure S2). Fait intéressant, un focus sur la bande ARN (990 cm^{-1}) a montré que quel que soit le type de champ électrique utilisé, la fraction d'ARN augmentait très fortement dans les 24 premières heures puis retrouvait les valeurs du contrôle à 48 heures, même si pour la face supérieure (riche en cellules) cette tendance n'était pas statistique après le protocole GET (Figure 31A). Cette technique permet une vision à moyen terme (48 heures), mais sur une profondeur très réduite du feuillet (jusqu'à 3,6 µm). Afin de comprendre les changements transcriptomiques survenant dans les premières heures après le stress, une analyse transcriptomique a été menée dans les feuillets, 4h après l'application des paramètres électriques de type GET (600V/cm) et ECT (1000V/cm). Les gènes différentiellement exprimés ont été analysés à l'aide d'une puce à ARN Clariom S Affymetrix (20 000 gènes au total) (Figure 31B). Le nombre de gènes différentiellement exprimés entre le groupe GET et le groupe témoin était de 606 gènes dont 350 surexprimés et 256 sous-exprimés. Le nombre de gènes différentiellement exprimés entre le groupe ECT et le groupe témoin était de 351 gènes dont 258 surexprimés et 93 sous-exprimés. En outre, les résultats ont montré que la majorité de ces gènes étaient communs aux deux protocoles. Les critères de significativité retenus étaient une différence d'expression par rapport au contrôle inférieure ou égale à (-2) et supérieur ou égale à (+2) et une valeur p de $p<0,01$. Ces résultats confirment donc que la nature du champ électrique a peu d'impact sur le profil d'expression génique des échantillons traités, bien que les paramètres ECT semblent affecter le génome de manière plus limitée que les paramètres GET. De plus, l'effet de l'application des champs électriques sur les feuillets dermiques s'exerce en faveur de la surexpression des gènes, cette catégorie représentant 57,7% de tous les gènes différentiellement exprimés en GET et près de 73,5% de tous les gènes différentiellement exprimés en ECT (Figure 31B). Afin de mieux comprendre les processus biologiques dans lesquels est impliqué l'ensemble des gènes différentiellement exprimés, nous avons réalisé un enrichissement fonctionnel grâce à la plateforme GOrilla [135] (Annexe 2, Tableau S2). Il s'agit d'une analyse de la surreprésentation, c'est-à-dire d'un test statistique qui détermine si certaines voies sont surreprésentées (enrichies) dans les données soumises (liste des gènes différentiellement exprimés) par rapport à la totalité des gènes contenus sur la puce Affymetrix (≈20 000). Il est apparu que les processus métaboliques en général étaient principalement affectés. Les données transcriptomiques décrites dans cette thèse ont été déposées dans le Gene Expression Omnibus du NCBI [99] et sont accessibles *via* le numéro d'accès à la série GEO GSE180644.

Les résultats ci-dessus montrent que les champs de type électroporation ont un impact important sur le transcriptome. Dans le contexte de notre étude, nous nous sommes particulièrement intéressé aux gènes du matrisome, c'est-à-dire les gènes codants des protéines de la matrice extracellulaire ou des protéines qui y sont associées[131]. La liste des gènes issue de l'analyse transcriptomique a ainsi été analysée et annotée avec l'aide du « matrisome project » [136] et sont présentés de façon exhaustive dans les tableaux S3 (core matrisome) et S4 (matrisome-associated protein) en annexe 2. Les volcano-plot montrent que la plupart des gènes impactés par les impulsions électriques appartiennent au sous-groupe des protéines associées au matrisome et sont principalement des protéines sécrétées comme que des facteurs de croissance, des facteurs de régulation tels que les métalloprotéases MMPs et leurs inhibiteurs, et des enzymes responsables de la réticulation de la matrice (Figure 31C). Nos travaux présentés dans le chapitre précédent (IV.1) ont confirmé la capacité des champs de type électroporation à favoriser la libération de facteurs de croissance et de cytokines [137].

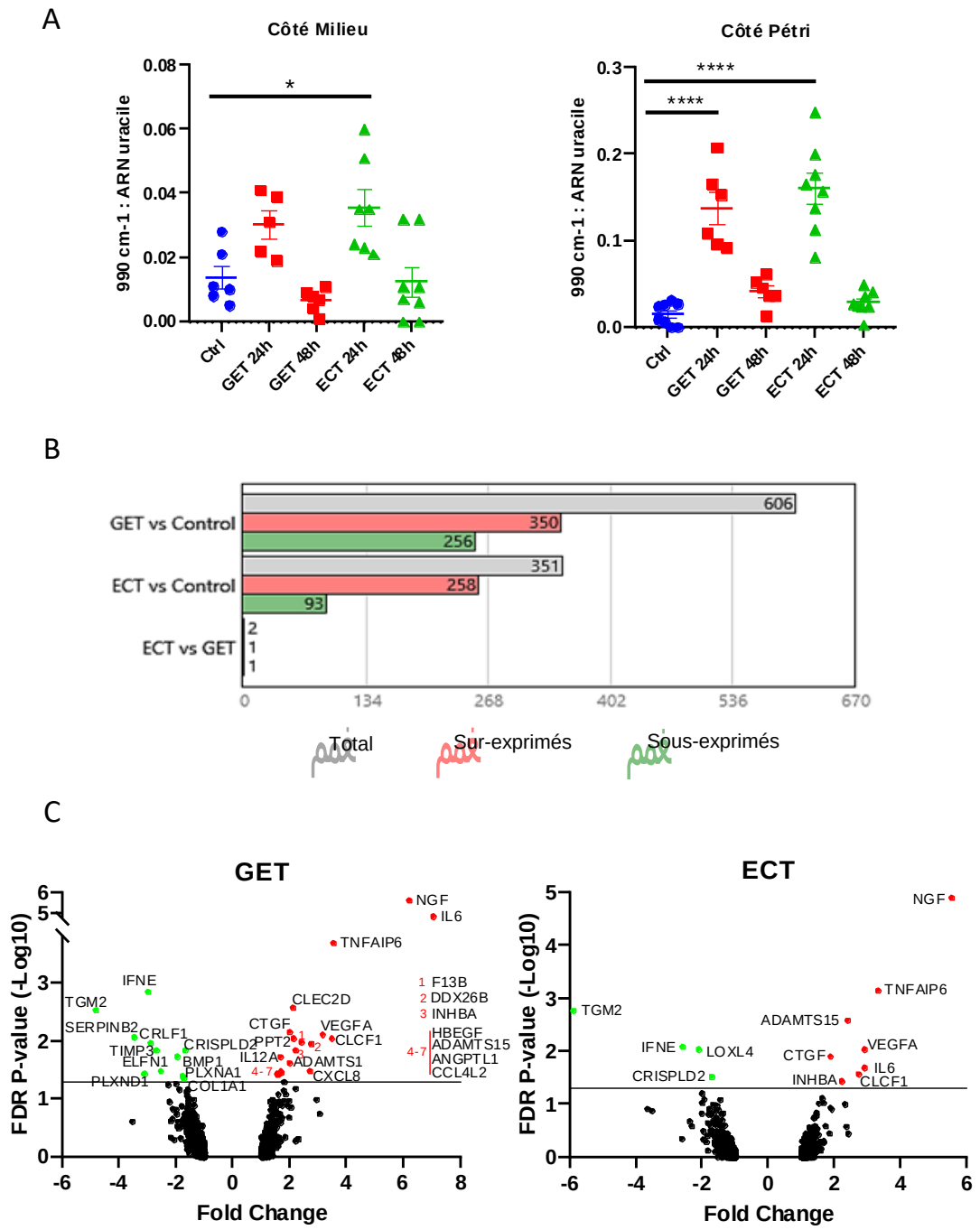


Figure 31 : Le contenu en ARN a été modulé dans le feuillet dermique soumis à l'électroporation. A. Signal ARN côté milieu (enrichi en cellules) et côté Pétri (enrichi en ECM) du substitut dermique mesuré par IRTF-ATR 24h et 48h après application de champs électriques de type GET et ECT. n>5, Analyses statistiques par Anova unidirectionnelles. Conditions contrôle (Ctrl ●), électrotransfert de gènes (GET ■) et électrochimiothérapie (ECT ▲). n> 6. B. Gènes différentiellement exprimés 4h après électrostimulation en conditions de contrôle, GET et ECT, mesurés par analyse transcriptomique à l'aide d'une puce Affymetrix Clariom S. n = 4. C. Graphique représentant les gènes du matrisome différentiellement exprimés 4h après application de champs électriques de type GET et ECT. La limite de significativité (ligne noire) est fixée pour une valeur p corrigée de 0,05. Les cercles rouges et verts indiquent respectivement des gènes significativement sur-exprimés et sous-exprimés. Analyse transcriptomique réalisée à l'aide d'une puce Affymetrix Clariom S. n = 4.

Aucune variation majeure de l'intégrité des collagènes n'a lieu après l'application des champs de type GET et ECT.

Pour analyser l'organisation des collagènes dans tout le feuillet après l'application des paramètres électriques, des mesures DSC ont été effectuées sur des feuillets dermiques avant, 24h ou 48h après l'électroporation. La Figure 32A montre l'agrandissement d'une courbe DSC représentative d'un feuillet dermique contrôle dans la fenêtre [50-75 °C]. Contrairement aux expériences IRTF-ATR, des analyses DSC ont été réalisées en utilisant l'échantillon dans son intégralité, sans tenir compte de la polarisation de l'échantillon. Le phénomène endothermique détecté dans la plage [55-70 °C] est attribué à la dénaturation thermique irréversible des collagènes fibrillaires [132,138,139]. La dénaturation est ainsi caractérisée par ΔH, l'aire sous l'endotherme qui une fois normalisé à la masse sèche donne une mesure de l'enthalpie spécifique de dénaturation ΔHd. La Figure 32B montre qu'aucune différence significative n'a été observée pour l'enthalpie de dénaturation ΔHd après l'application des champs électriques. L'analyse de la stabilité thermique des collagènes a également été réalisée *via* le calcul de la température de dénaturation Tmid (température à laquelle 50% des collagènes sont dénaturés). Aucune différence significative de la stabilité thermique des collagènes n'a été constatée (Figure 32B). Les résultats indiquent qu'aucune variation majeure de l'intégrité des collagènes n'a lieu dans les 48h qui suivent l'application des champs de type GET et ECT.

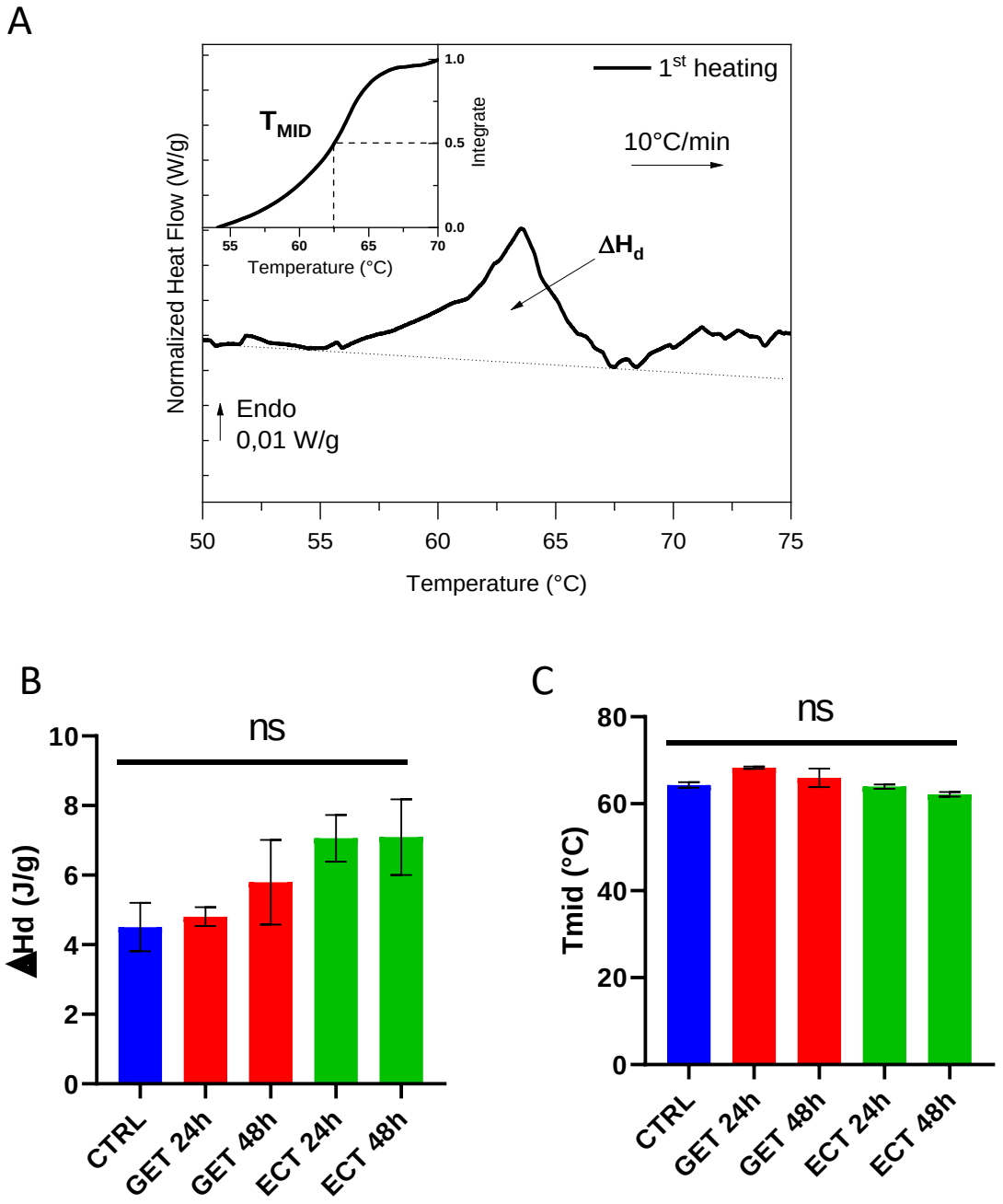


Figure 32 : Aucune variation majeure de l'intégrité des collagènes n'a lieu après l'application des champs de type GET et ECT. A. Courbe DSC représentative de la dénaturation thermique des collagènes dans la fenêtre [50-75 °C]. B. Enthalpie spécifique de dénaturation ΔHd mesurée par DSC sur des feuillets dermiques après application de champs électriques de type GET et ECT. C. Température de dénaturation des collagènes des feuillets dermiques (Tmid) mesurée par DSC après application de champs électriques de type GET et ECT. n>6 Analyses statistiques par Anova unidirectionnelles. Conditions contrôle (Ctrl), électrotransfert de gènes (GET) et électrochimiothérapie (ECT).

La teneur en collagènes diminue de façon transitoire après l'électroporation.

Le signal de la bande spécifique des collagènes (1338 cm-1) mesuré par IRTF-ATR a montré que la teneur en collagènes dans les tissus diminuait 24h et 48h après les impulsions du côté le plus riche en matrice (côté pétri), mais uniquement après le protocole d'électrochimiothérapie (Figure 33A). Sachant que l'IRTF-ATR permet une analyse superficielle du tissu (sur les premiers micromètres de profondeur), la teneur totale en hydroxyproline a en parallèle été quantifiée dans le tissu après l'électroporation (Figure 33B). Quel que soit le protocole électrique appliqué, une diminution significative allant de 35% à 50% de la teneur en collagènes dans le tissu a été observée une semaine après l'électroporation. Nous avons vérifié que cette diminution de la teneur en hydroxyproline une semaine après l'électrostimulation n'était pas due à une diminution du nombre de cellules vivantes capables de synthétiser des collagènes. Aucune différence statistique entre la condition témoin (110 000 cellules ± 10 300) et les conditions GET (116 000 cellules ± 8 600) et ECT (130 000 cellules ± 6 600) n'a été observée. Par ailleurs, la quantité d'hydroxyproline dans les feuillets électroporés recouvrait des niveaux équivalents au témoin 4 semaines après les impulsions, ce qui démontre que l'application des champs électriques a un effet transitoire (Figure 33B). Afin de déterminer si cette baisse de la teneur en collagènes dans les feuillets était due à une diminution de leur synthèse, le procollagène I (collagènes majoritaire dans le derme [140]) a été quantifié dans le surnageant de feuillets électroporés. Une diminution significative d'environ 25% par rapport au contrôle a été observée dès 24h après l'application des champs électriques et se maintenait au moins 48h après les impulsions (Figure 33C). D'autre part, l'analyse transcriptomique montre également une diminution de certains ARNm de la famille des collagènes (Figure 33D).

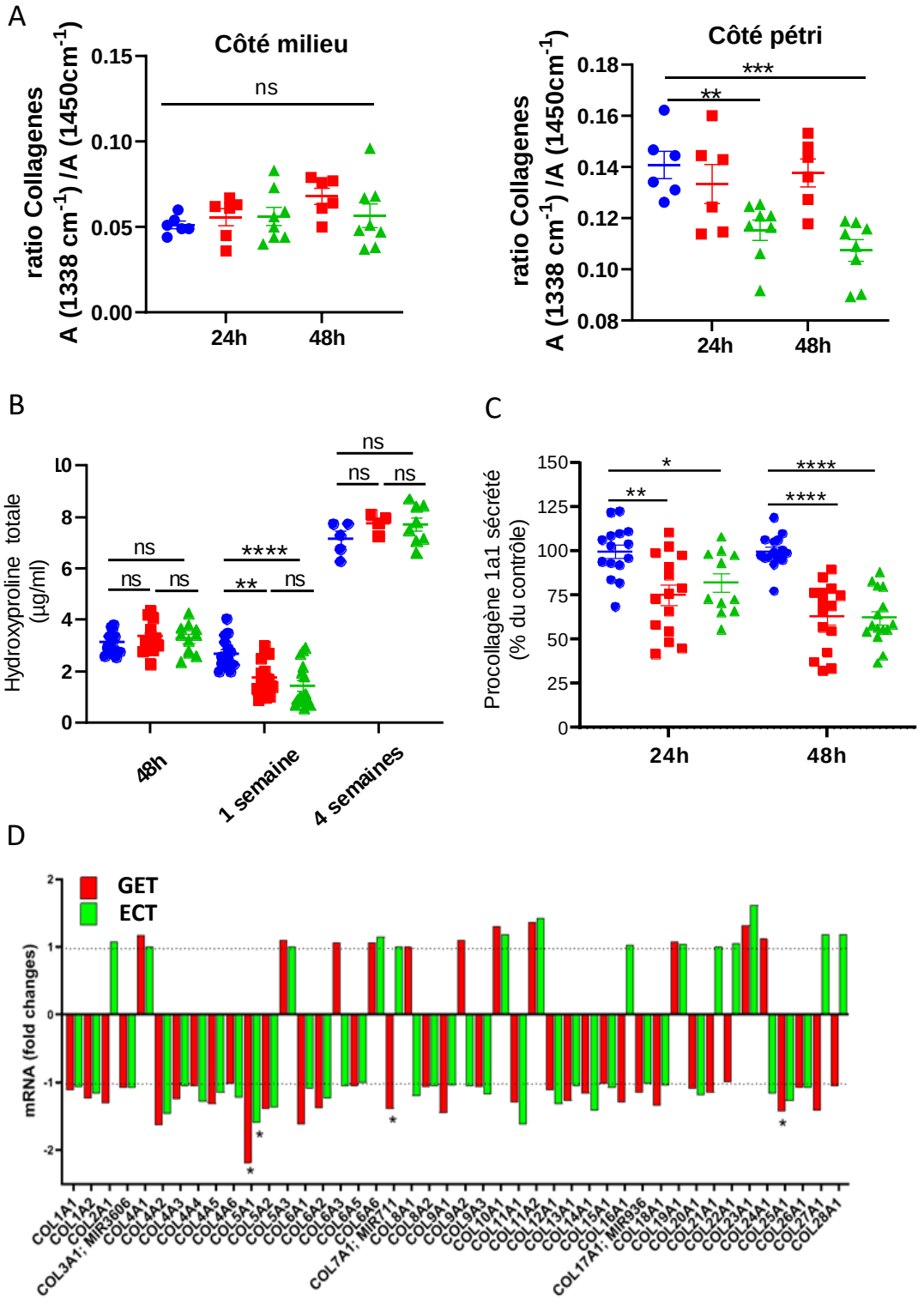


Figure 33 : La teneur en collagènes diminue de façon transitoire après l'électroporation. A. Fraction de collagènes côté milieu (enrichi en cellules) et côté Pétri (enrichi en ECM) du substitut dermique mesuré par IRTF-ATR 24h et 48h après application de champs électriques de type GET et ECT. n>6. Analyses statistiques par Anova unidirectionnelles B. Teneur en hydroxyproline dans les substituts dermiques après application de champs électriques de type GET et ECT. N=3, n≥5. Analyses statistiques par Anova unidirectionnelles C. Quantité de procollagène 1a1 dans le surnageant de feuillets contrôles et électroporés. N=3, n≥12. Analyses statistiques par Anova unidirectionnelles D. Quantité relative d'ARNm de la famille des collagènes dans les feuillets dermiques 4h après application de champs électriques de type électrotransfert de gènes (GET) et électrochimiothérapie (ECT). Analyse transcriptomique réalisée à l'aide d'une puce Affymetrix Clariom S. n = 4. Conditions contrôle (Ctrl ●), électrotransfert de gènes (GET ■) et électrochimiothérapie (ECT ▲).

L'électroporation diminue l'expression des enzymes de réticulation des collagènes.

La réticulation des composants de la matrice extracellulaire tels que les fibrilles de collagènes est effectuée par les lysyl-oxydases (LOX), des amines oxydases dépendantes du cuivre. Les transglutaminases jouent également un rôle dans la réticulation des collagènes[66]. Le panel d'expression de la famille des lysyl oxydases réalisé grâce aux résultats obtenus en transcriptomique a montré que l'homologue 4 de la lysyl oxydase (LOXL4) et la transglutaminase 2 (TGM2) étaient statistiquement sous-exprimés dans les feuillets après les impulsions de types GET (-1,58 et -4,82 respectivement) et ECT (-2,11 et -5,9 respectivement) (Figure 34A). L'analyse transcriptomique des ARNm de la famille des transglutaminases a indiqué une sous-expression de la transglutaminase 2 par des changements de -5 fois et de -6 fois respectivement pour les impulsions de type GET et ECT (Figure 34B). TG2 est le membre le plus répandu et le plus exprimé de la famille des transglutaminases [66]. Il serait intéressant de compléter ces résultats en quantifiant ces protéines par ELISA et en réalisant des tests fonctionnels.

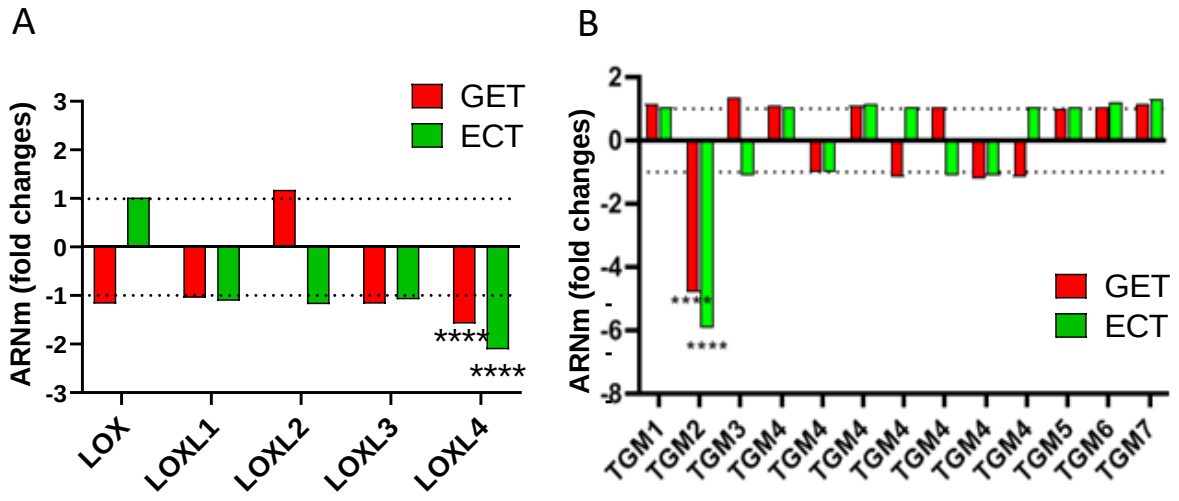


Figure 34 : L'expression de la Lysyl-oxydase LOXL4 et de la transglutaminase TGM2 diminue dans les fibroblastes après l'électroporation. Quantité relative d'ARNm de la famille LOX (A) et TGM (B) dans les feuillets dermiques 4h après application de champs électriques de type électrotransfert de gènes (GET) et électrochimiothérapie (ECT). Analyse transcriptomique réalisée à l'aide d'une puce Affymetrix Clariom S. n = 4.

L'électroporation augmente l'activité des MMPs sécrétées.

Les métalloprotéinases matricielles (MMP) sont les principales enzymes responsables de la dégradation et du renouvellement des collagènes dans le derme. Nous avons donc cherché à savoir si l'électroporation impactait la sécrétion et/ou l'activité des MMPs. L'activité des MMPs sécrétées dans le milieu de culture a été mesurée jusqu'à 48h après l'application des paramètres électriques de type GET et ECT. Les résultats indiquent une augmentation significative de l'activité des MMPs sécrétées

dès 6h après l'électroporation (Figure 35A). Pour comprendre si ces résultats sont dus à une activation accrue des MMPs déjà sécrétées ou à une augmentation de la quantité de MMPs sécrétées, toutes les pro-MMPs sécrétées ont été activées chimiquement avant de prendre les mesures. Les résultats n'ont montré aucune différence de signal global 6h et 24h après les impulsions, ce qui signifie que la quantité de MMPs dans le surnageant est similaire entre les conditions contrôle et électrostimulées. Cependant, 48h après les impulsions de type GET, l'activité des MMPs augmentait de manière significative, ce qui pourrait indiquer qu'il y a plus de MMPs dans le milieu dans ces conditions (Figure 35B).

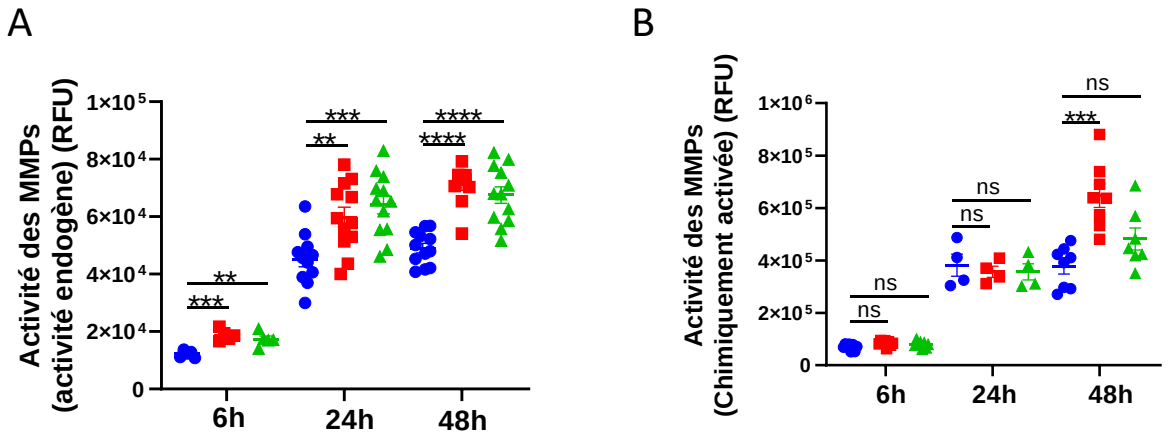


Figure 35 : L'électroporation augmente l'activité des MMPs sécrétées. A. Activité des MMPs activées de manière endogène dans le surnageant de feuillets dermiques après application de champs électriques de type GET et ECT. N=3, n=12. Analyses statistiques par Anova unidirectionnelles B. Activité des MMPs après activation chimique de toutes les pro-MMP sécrétées dans le surnageant. N=2, n≥4. Analyses statistiques par Anova unidirectionnelles. Conditions contrôle (Ctrl ●), électrotransfert de gènes (GET ■) et électrochimiothérapie (ECT ▲).

Nous avons ensuite analysé la modulation des ARNm de l'ensemble des membres de la famille des MMPs (Figure 36A). 4h après l'électrostimulation, les ARNm MMP-1 (-3,5), et dans une moindre mesure MMP-2, -14, -16 étaient régulés à la baisse tandis que l'ARNm de MMP-19 était régulé à la hausse. Au niveau protéique, nous avons quantifié les MMPs les plus représentées au niveau cutané par ELISA, à savoir MMP-1, -2, -3, et -9 [71,72]. Ces quatre métalloprotéinases matricielles ont été dosées dans le milieu de culture cellulaire, dès 6h après l'application des paramètres électriques de type GET et ECT. La quantité de MMP-1 et MMP-2 diminuait légèrement et transitoirement 6h après les impulsions alors qu'aucune différence significative n'était observée après les impulsions pour MMP-3. En revanche, MMP-9 était 2 à 5 fois plus abondante dans le milieu, dès 24h après les impulsions de type GET (Figure 36B). Au regard des résultats obtenus après l'activation chimique des MMPS, on peut supposer que la MMP9 est plus présente dans le milieu 48h après les impulsions de type GET (Figure 35).

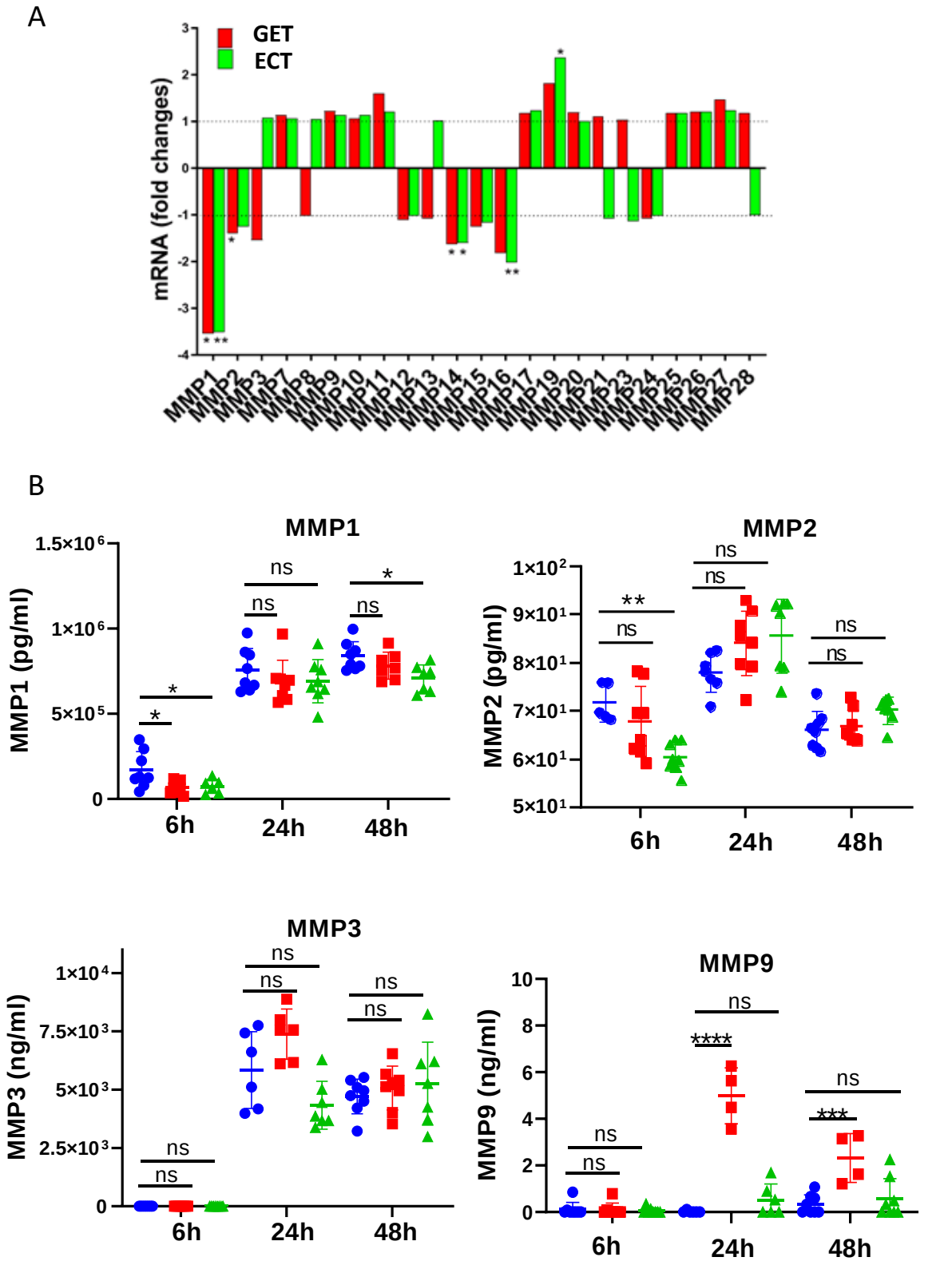


Figure 36: Le protocole GET augmente la sécrétion de MMP9. A. Quantité relative d'ARNm de la famille des MMPS dans les feuillets dermiques 4h après application de champs électriques de type électrotransfert de gènes (GET) et électrochimiothérapie (ECT). Analyse transcriptomique réalisée à l'aide d'une puce Affymetrix Clariom S. n = 4. B. Quantité de MMP-1, -2, -3 et -9, dans le surnageant de feuillets dermiques après application de champs électriques de type GET et ECT. N=2, n=6. Analyses statistiques par Anova unidirectionnelles. Conditions contrôle (Ctrl ●), électrotransfert de gènes (GET ■) et électrochimiothérapie (ECT ▲).

Étant donné que l'augmentation de l'activité des MMPs dès 6h après les impulsions n'était pas due à une surproduction de ces protéines, telle que quantifiée au niveau des protéines, nous avons émis l'hypothèse que les inhibiteurs endogènes des MMPs étaient régulés à la baisse. L'analyse transcriptomique des ARNm de la famille des TIMPs a mis en évidence une diminution des ARNm codants pour TIMP3, un inhibiteur endogène des MMP-1, -2, -3, -7, -9, -13, -14 et -15 (Figure 37A). Dans les feuillets soumis à des impulsions de type GET, la différence d'expression de TIMP3 était de -2,81 par rapport aux témoins. Cette diminution n'était pas significative dans les feuillets soumis aux impulsions de type ECT. Nous avons donc cherché à valider ces données au niveau protéique grâce à un test ELISA, afin de savoir si l'augmentation de l'activité des MMPs sécrétées pouvait être en lien avec la diminution de cet inhibiteur endogène. Cette analyse n'a révélé aucune différence statistique d'abondance de TIMP3 dans le milieu après l'application des champs électriques des deux types (Figure 37B).

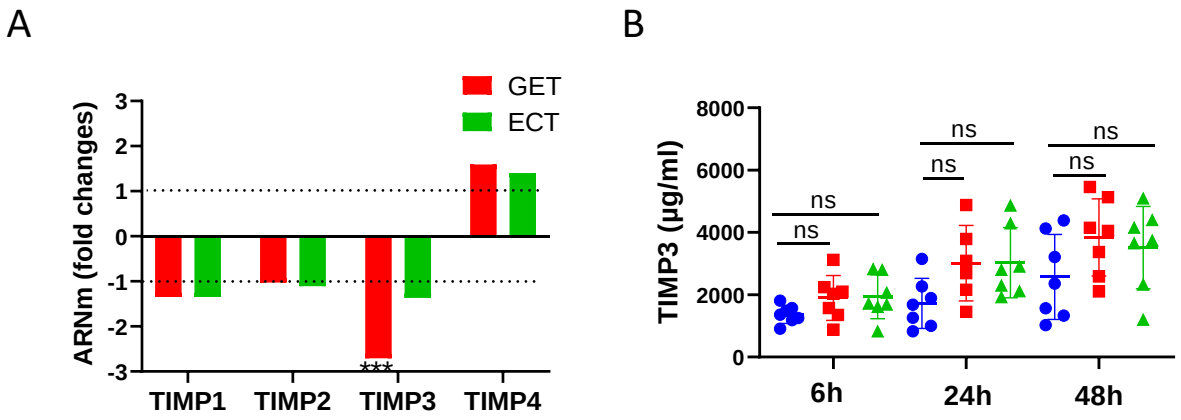


Figure 37 : L'électroporation augmente l'activité des MMPs sécrétées indépendamment des TIMPs. A. Quantité relative d'ARNm de la famille TIMPs dans les feuillets dermiques 4h après application de champs électriques de type GET et ECT. Analyse transcriptomique réalisée à l'aide d'une puce Affymetrix Clariom S. n = 4 B. Quantité de TIMP-3 dans le surnageant de feuillets dermiques après application de champs électriques de type GET et ECT. N=2, n=7. Analyses statistiques par Anova unidirectionnelles. Conditions contrôle (Ctrl ●), électrotransfert de gènes (GET ■) et électrochimiothérapie (ECT ▲).

L'inhibiteur pharmacologique des MMPs restaure en partie la teneur en collagènes dans le tissu électroporé.

Afin de déterminer le rôle des MMPs dans la diminution de la quantité d'hydroxyproline observée après les impulsions, un inhibiteur pharmacologique à large spectre appelé GM6001, également connu sous le nom d'Ilomastat, a été ajouté dans le milieu de culture des feuillets après les impulsions. L'efficacité d'inhibition a été validée *in vitro* sur des feuillets témoins ainsi que sur des feuillets électroporés (Figure 38A) puis la teneur en hydroxyproline dans les feuillets cultivés en présence de 100µM de GM6001 a été mesurée chimiquement 48h et une semaine après l'électroporation, de la même façon que précédemment. Dans ces expériences d'inhibition, la teneur en hydroxyproline dans les feuillets une semaine après l'application des champs électriques de type ECT était statistiquement identique à celle dosée dans les feuillets contrôles, alors que l'efficacité semblait moindre après le protocole de GET (Figure 38). Les analyses complémentaires effectuées en IRTF-ATR sur la face Pétri (plus riche en MEC) des substituts dermiques 24h et 48h après l'électroporation ont confirmé que la teneur en collagènes était restaurée en présence de GM6001 après le protocole d'ECT, alors qu'aucun effet n'était détectable avec cette technique pour le protocole GET, indiquant que d'autres processus pourraient être impliqués. Le remodelage matriciel est un équilibre subtil entre synthèse, maturation et dégradation qui semble plus complexe après le protocole GET qu'après le protocole ECT. Étant donné que les impulsions durent plus longtemps dans le protocole GET, il est possible que les cellules soient plus affectées et développent une réponse plus complexe à ce stress. Un élément clé pour soutenir cette hypothèse est le nombre plus élevé de gènes modulés par le protocole GET par rapport au protocole ECT (606 contre 351 respectivement) tel que déterminé par l'analyse transcriptomique.

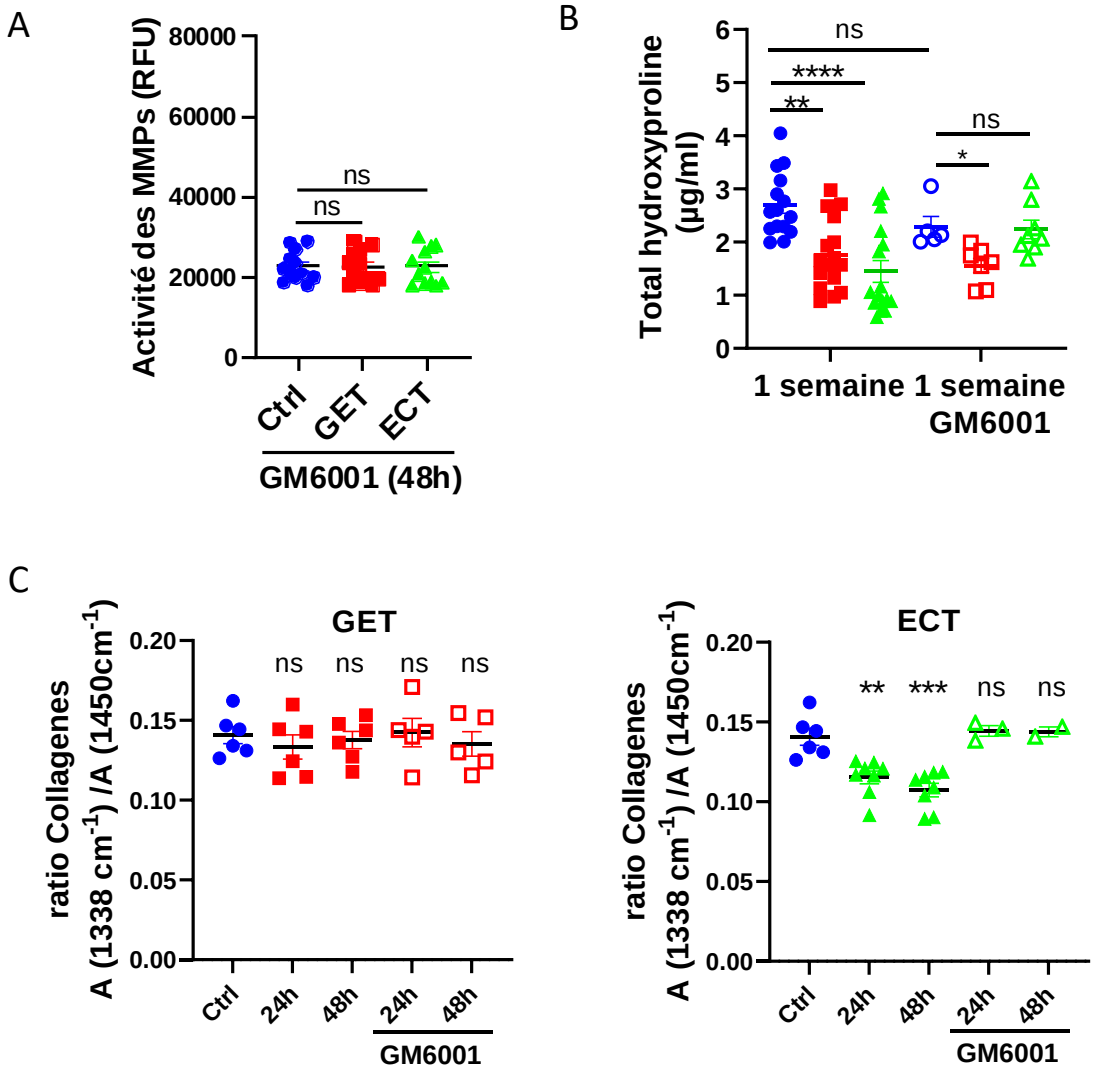


Figure 38: L'électroporation induit un remodelage transitoire des collagènes principalement par les MMPs dans un substitut cutané humain. A. Quantification par fluorimétrie de l'activité endogène des MMPs dans le surnageant 48h après application de champs électriques de type GET et ECT en présence de 100 µM de GM6001. N=3, n=12 B. Teneur en hydroxyproline dans le substitut dermique une semaine après application de champs électriques de type GET et ECT cultivée en présence (symboles vides) ou en l'absence de GM6001 (symboles pleins). N=3, n≥6 C. Fraction de collagènes côté pétri (enrichi en MEC) du substitut dermique mesuré par IRTF-ATR 24h et 48h après application de champs électriques de type GET et ECT en présence (symboles vides) ou en l'absence de GM6001 (symboles pleins). n=6. Conditions contrôle (Ctrl ●), électrotransfert de gènes (GET ■) et électrochimiothérapie (ECT ▲). Analyses statistiques par Anova unidirectionnelles.

Les ROS sont responsables de l'activation soutenue des MMPs après les impulsions.

Les pro-MMPs inactives sont connues pour être activées protéolytiquement dans l'espace extracellulaire par des protéases endogènes et d'autres MMPs actives ou pour être activées en réponse à des signaux exogènes tels qu'un pH bas, de la chaleur, des espèces réactives de l'oxygène (ROS) [71,72]. Un pH bas peut être raisonnablement exclu en raison du tamponnage du milieu de pulsation et de culture cellulaire. La chaleur est un paramètre qui peut également être exclu car le tampon de pulsation et les paramètres électriques sont conçus pour rester dans des conditions athermiques [123]. Il est bien documenté que l'axe plasminogène de type urokinase uPA /tPA /plasmine /MMPs contribue à la dégradation des collagènes [74]. Il a été rapporté que la plasmine active les pro-MMP-1, -3, -7, -9, -10 et -13 dans un contexte de remodelage vasculaire [141]. Nos résultats indiquent que les ARNm de la famille SERPIN, également appelés inhibiteurs de l'activateur du plasminogène (PAI), qui est un puissant inhibiteur de l'uPA/tPA, étaient fortement et statistiquement modulés après l'électroporation (Annexe 2, tableau S4), en particulier la SERPINB2 en protocole GET (-3,48). Ainsi, nous avons choisi de quantifier l'activité de la plasmine dans le surnageant 24h après l'électroporation, un moment auquel la suractivité des MMP est significative. Étonnamment, les résultats ont montré que l'application de champs électriques induisait une diminution significative de l'activité de la plasmine dans le surnageant des tissus (Figure 39A). La plasmine n'est donc pas responsable de l'activation des MMPs observée après l'électrostimulation. En revanche, il a été démontré que les champs électriques pulsés induisent la production de ROS [123]. Des concentrations croissantes (1 mM et 5 mM) de N-acétyl-L-cystéine (NAC), un puissant antioxydant qui augmente les pools cellulaires de piégeurs de radicaux libres, ont été ajoutées [142], à la fois au tampon de pulsation (lors de l'application des impulsions électriques) et dans un milieu de culture cellulaire (Figure 39B). L'augmentation de la concentration de NAC a conduit à une diminution statistique de la suractivation des MMPs. Cette dose-réponse observée établit clairement le lien entre la suractivation des MMPs et les ROS. Afin de mieux discriminer quelle famille de MMPs était impliquée dans cette suractivation dépendante des ROS, nous avons utilisé des substrats plus spécifiques (Figure 39C,D,E). Nous avons ainsi démontré que les gélatinases MMP-2 et -9 ainsi que les stromélysines MMP-3 et -10 n'étaient pas activées par l'électroporation, même si la MMP-3 était la MMP la plus abondante au niveau protéique (de l'ordre du ng/ml) (Figure 36). Il apparaît ainsi que la suractivation ROS-dépendante des MMPs suite aux impulsions est due à l'activité d'une ou plusieurs des MMPs suivantes, à savoir MMP-1, -7, -8, -12, -13, -14, -15, -16, sans pouvoir identifier expérimentalement plus précisément les responsables.

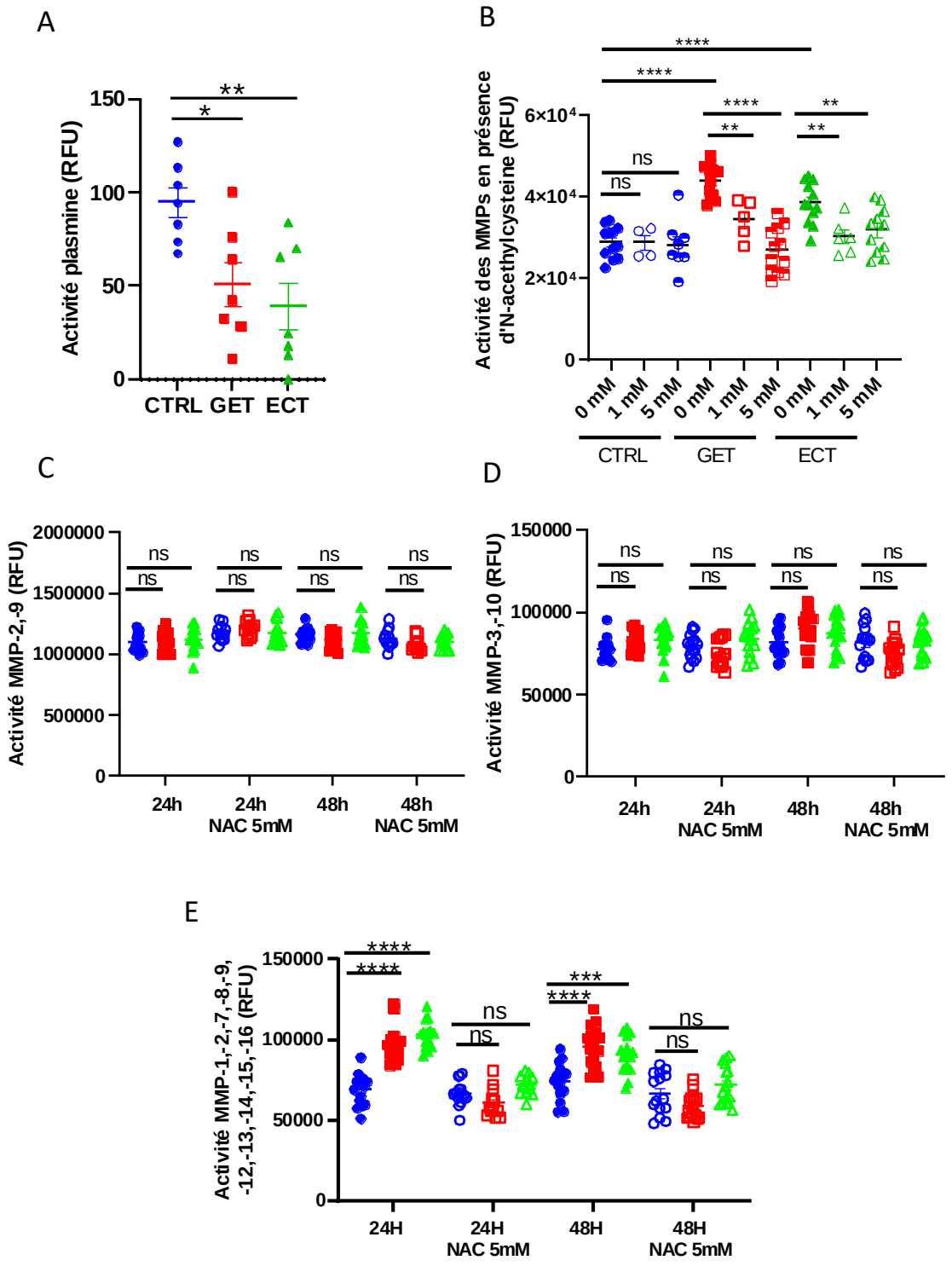


Figure 39 : Les espèces réactives de l'oxygène sont responsables de l'activation soutenue des MMPs après l'électroporation. A. Activité plasmine quantifiée dans le surnageant 24h après l'électroporation. N=2, n=7. Analyses statistiques par Anova unidirectionnelles B. Quantification par fluorimétrie de l'activité des MMPs endogènes dans le surnageant 24h après application de champs électriques de type GET et ECT et culture en présence de concentrations croissantes d'inhibiteur de ROS N-acétyl-L-cystéine (NAC). N=2 ou 3, n≥4. Analyses statistiques par Anova unidirectionnelles. C. L'activité gélatinase des MMP-2 et -9 a été quantifiée par fluorimétrie en présence ou en l'absence de 5 mM de NAC. N=2, n=12. D. L'activité des MMP-3 et 10 a été quantifiée par fluorimétrie en présence ou en l'absence de 5 mM de NAC. N=2, n=12 E. L'activité des MMP-1, -7, -8, -12, -13, -14, -15, -16 a été quantifiée par fluorimétrie en présence ou en l'absence de 5 mM de NAC. N=2, n=12. Conditions contrôle (Ctrl ●), électrotransfert de gènes (GET ■) et électrochimiothérapie (ECT ▲). Analyses statistiques par Anova unidirectionnelles

La quantité de glycosaminoglycanes sulfatés dans les feuillets n'est pas affectée par l'application des champs électriques.

Les glycosaminoglycanes sont d'autres constituants de la matrice extracellulaire sujets au remodelage par les MMPs. Comme l'ont démontré Magnan et ses collaborateurs [143], le modèle de feuillet dermique est riche en GAGs. La teneur totale en glycosaminoglycanes sulfatés dans le substitut dermique, soit principalement les kératanes et les dermatanes sulfates, a été déterminée après application des champs électriques de type GET et ECT. Cette analyse a démontré que la quantité de GAGs n'était pas affectée par l'application des champs électriques. On peut toutefois constater une grande variabilité entre les réplicas (Figure 40).

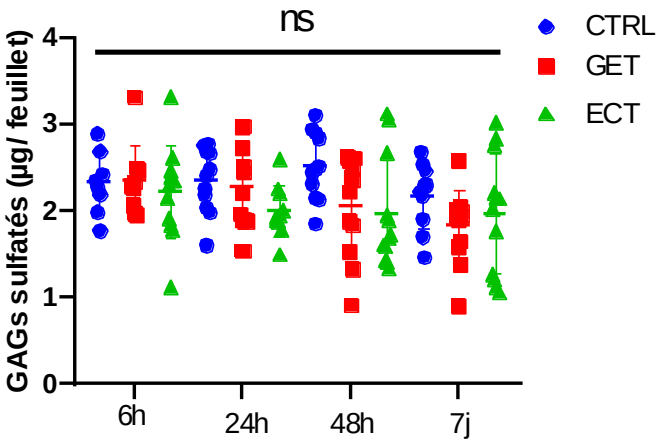


Figure 40: La quantité de glycosaminoglycanes sulfatés dans les feuillets n'est pas affectée par l'application des champs électriques. Quantification des glycosaminoglycanes sulfatés contenus dans les feuillets dermiques après application de champs électriques de type GET et ECT. N=3, n=12. Analyses statistiques par Anova unidirectionnelles. Conditions contrôle (Ctrl ●), électrotransfert de gènes (GET ■) et électrochimiothérapie (ECT ▲).

Le facteur de croissance pro-fibrotique TGF-β1 est régulé à la baisse par l'application des champs électriques.

La fibrose est associée à des modifications quantitatives et qualitatives de l'expression et du dépôt des collagènes. Il résulte de modifications de l'expression des collagènes, de leur biosynthèse, de leur réticulation enzymatique et de leur dégradation par les MMPs. Ces modifications moléculaires conduisant à une signature fibrotique sont majoritairement régulées par le TGF-β, considéré comme le principal inducteur pro-fibrotique[144]. Fait intéressant, il apparaît dans nos expériences que les champs électriques externes ont considérablement régulé à la baisse le TGF-β à la fois au niveau de l'ARNm et des protéines (Figure 41 A, B). Pour aller plus loin, nous avons analysé d'autres facteurs connus pour être pro-fibrotiques et associés à des maladies fibrotiques, à savoir l'interleukine IL-4 et surtout l'IL-13, dans l'espoir d'observer une diminution de leur expression après électroporation, mais leurs taux protéiques n'ont pas été modifiés dans nos expériences (Figure 41 C, D).

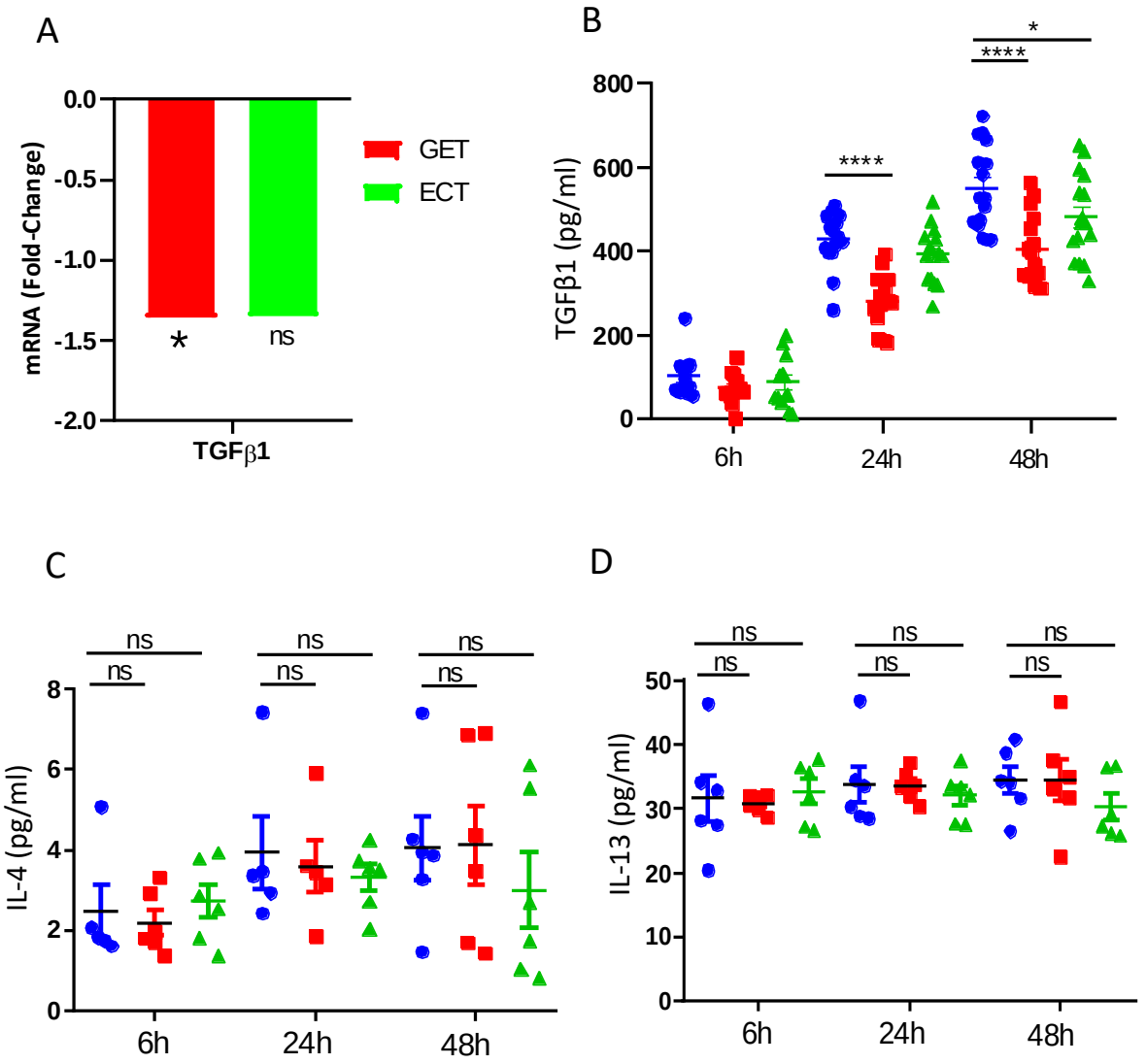


Figure 41 : Le facteur pro-fibrogénique TGF-β1 est régulé à la baisse par l'application de champs électriques pulsés. A. Modulation de l'ARNm TGF-β1 4h après électrostimulation. Analyse transcriptomique réalisée à l'aide d'une puce Affymetrix Clariom S. n = 4 B. Quantité de TGF-β 1 dans le surnageant de feuillets dermiques quantifiée par ELISA. N=3, n=12. Analyse statistique par Anova unidirectionnelle. C. Quantité d'IL-4 dans le surnageant de feuillets quantifiée par ELISA. N=2, n=6. Analyse statistique par Anova unidirectionnelle D. Quantité d'IL-13 dans le surnageant de feuillets quantifiée par ELISA. N=2, n=6. Analyse statistique par Anova unidirectionnelle. Conditions contrôle (Ctrl ●), électrotransfert de gènes (GET ■) et électrochimiothérapie (ECT ▲)

L'électroporation augmente la contractilité des fibroblastes dermiques.

Durant cette étude, nous avons constaté que les feuillets électroporés avaient plus tendance à se déchirer que les feuillets non électroporés du même âge. Cela semblait être la résultante de l'augmentation des tensions mécaniques au sein du tissu après les impulsions. Nous avons donc émis l'hypothèse que l'application des champs de types GET et ECT pourrait favoriser la transdifférenciation des fibroblastes en myofibroblastes. Le facteur le plus connu d'activation des fibroblastes, le TGF-β a

cependant été régulé à la baisse après les impulsions comme nous l'avons présenté ci-dessus (Figure 41). Des fibroblastes cultivés en monocouche et des feuillets dermiques témoins ou soumis à des champs de type GET et ECT ont été fixés 4h30 après les impulsions puis marqués contre l'α-SMA, le marqueur principal des myofibroblastes. Ces immunomarquages ont révélé que très peu de fibroblastes étaient en effet positifs après les impulsions et que ce pourcentage n'était pas statistiquement différent des témoins (Figure 42C).

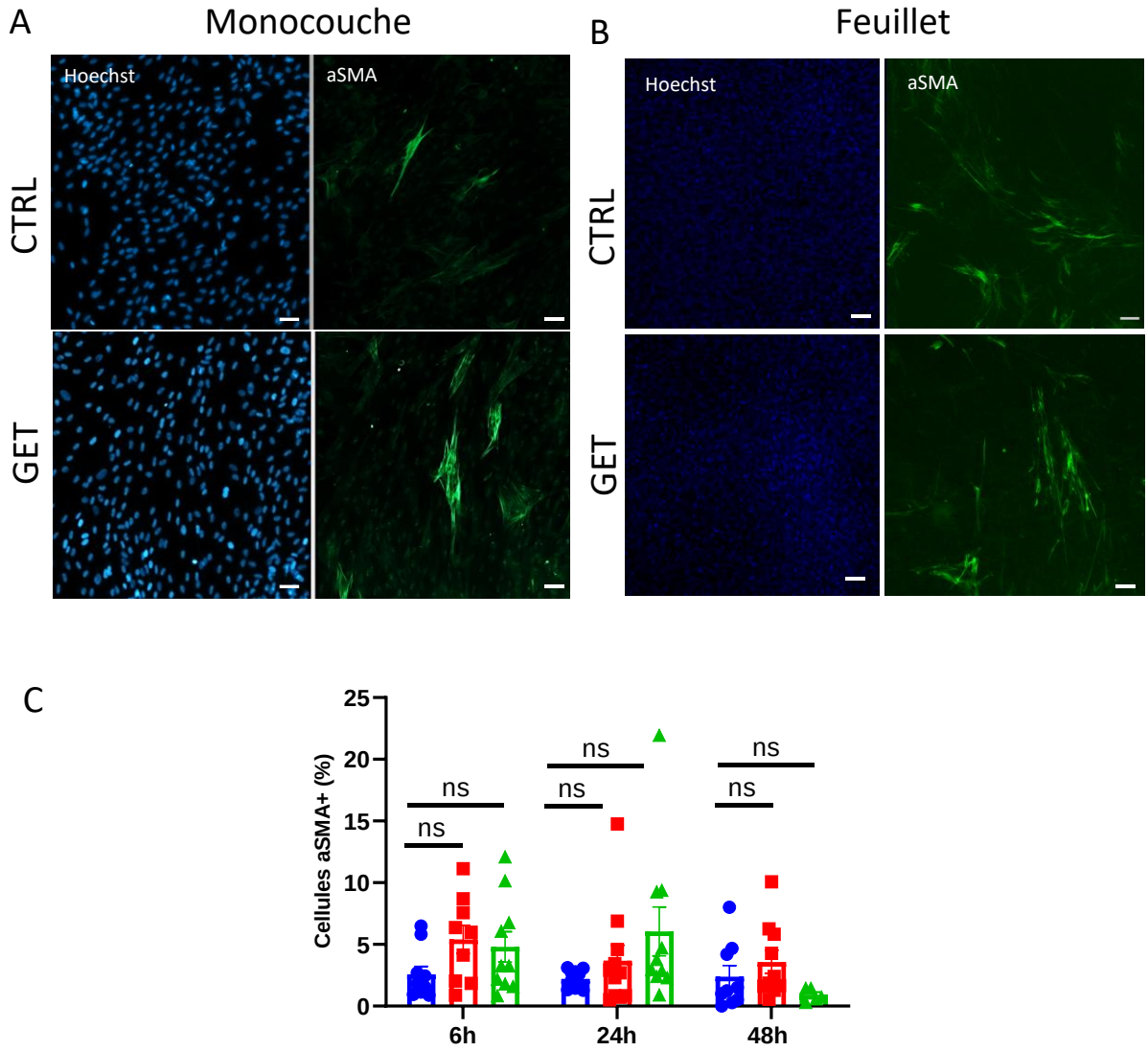


Figure 42 : L'électroporation n'induit pas de surexpression de l'α-SMA par les fibroblastes. A. Fibre de stress α-SMA+ (vert) détectées par immunofluorescence dans des fibroblastes dermiques cultivés en monocouche, 4h30 après électroporation par ECT (600 V/cm) et GET (200 V/cm). Les noyaux sont marqués avec du Hoeschst (bleu). Barre d'échelle 50µm. B. Fibre de stress α-SMA+ (vert) détectées par immunofluorescence dans des substituts dermiques, 4h30 après électroporation par ECT (1000 V/cm) et GET (600V/cm). Les noyaux sont marqués avec du Hoeschst (bleu). Barre d'échelle 100µm C. Pourcentage de cellules positives à l'α-SMA après électroporation des fibroblastes en monocouche. n=10 Analyses statistiques par Anova unidirectionelles. Conditions contrôle (Ctrl ●), électrotransfert de gènes (GET ■) et électrochimiothérapie (ECT ▲).

Il est bien connu que les myofibroblastes α-SMA+ ont une activité contractile plus forte que les fibroblastes α-SMA négatifs[53]. Pour analyser la capacité des myofibroblastes à contracter la matrice extracellulaire après application de champ électrique, les fibroblastes ont été électroporés 4h30 avant leur incorporation dans des gels de collagène. Le test de contraction sur gel de collagène, d'abord décrit par Bell et al. en 1979, est un outil classique en mécanobiologie pour étudier la contraction de la matrice extracellulaire induite par les cellules [145]. Les forces contractiles générées par les fibroblastes intégrés dans la matrice 3D de collagène se propagent dans tout le gel et réorganisent les fibres, ce qui entraîne une diminution de la taille du gel au cours du temps[146]. La mesure de la diminution de la taille fournit alors un moyen direct d'évaluer la contractilité cellulaire. Pour cette expérience, les fibroblastes dermiques ont été soumis à des champs électriques de type ECT (600 V/cm) et GET (200 V/cm) avant leur intégration dans les gels de collagène. Les gels ont ensuite été incubés dans du DMEM pendant 48h au cours desquelles l'aire du gel a été mesurée. Un gel sans cellules (non représenté) et un gel contenant des fibroblastes non électroporés ont été utilisés comme témoins. Les fibroblastes soumis aux deux protocoles d'électroporation ont contracté davantage le gel que les fibroblastes non électroporés, et les gels acellulaires n'étaient pas du tout contractés (Figure 43). Aucune différence n'a été observée entre les gels contenants des fibroblastes soumis au protocole GET et ceux soumis au protocole ECT. Cela démontre que les champs électriques de type électroporation augmentent la contractilité des fibroblastes dermiques sans pour autant induire la transdifférenciation des fibroblastes.

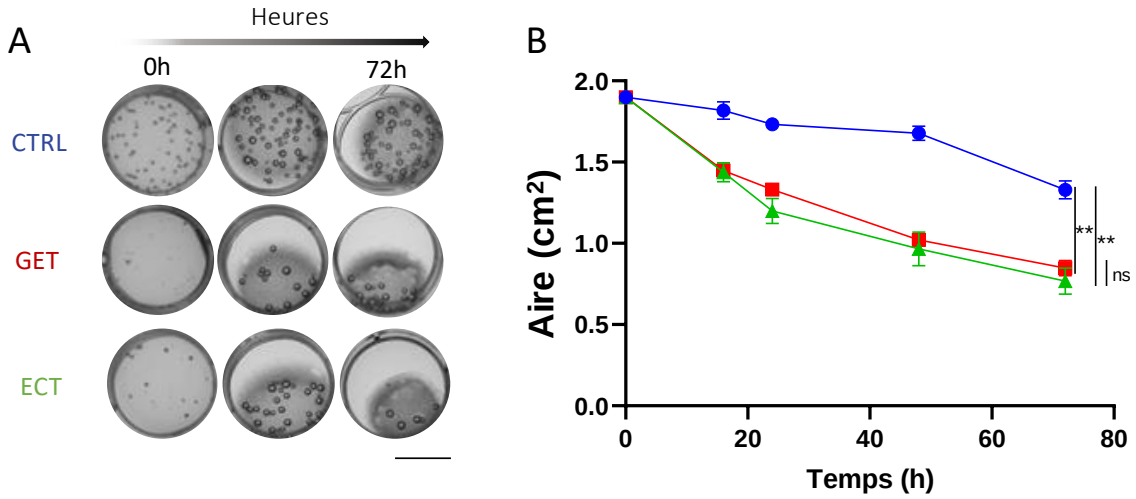


Figure 43 : Les champs électriques de type électroporation augmentent la contractilité des fibroblastes dermiques. A. Photos macroscopiques de gels de collagène au cours du temps. Barre d'échelle 0,5 cm. B. Contraction de gels de collagène au cours du temps. Gel ensemencé avec des fibroblastes non traités (Ctrl ●), gel ensemencé avec des fibroblastes traités en électrotransfert de gènes (GET ■) et électrochimiothérapie (ECT ▲). N=6. Analyse statistique par Anova bidirectionnelle.

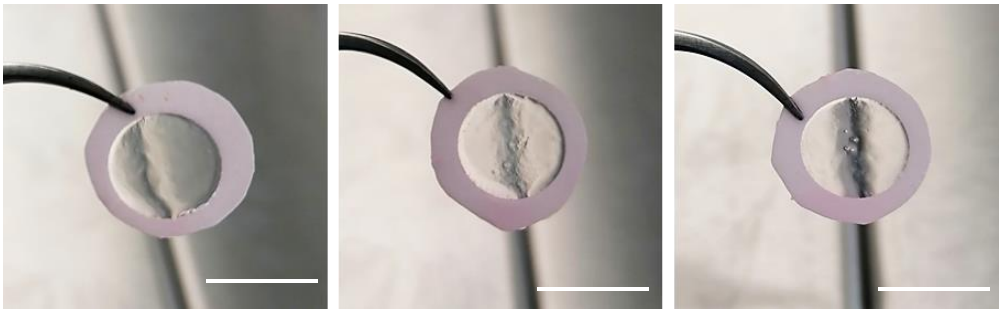
Influence du donneur sur les résultats obtenus.

Dans le but de valider la reproductibilité des résultats obtenus dans ce chapitre, des feuillets dermiques ont été cultivés avec des fibroblastes issus de trois donneurs différents ; le donneur 1 est celui utilisé pour toutes les expériences de cette thèse (Figure 44A). D'un point de vue macroscopique aucune différence n'est visible entre les feuillets issus des trois donneurs (Figure 44B). Le procollagène I a été quantifié dans le surnageant des feuillets 24h après l'électroporation. Une diminution significative a été observée chez tous les donneurs après l'application des champs électriques et était particulièrement importante dans le surnageant des feuillets du donneur 3 (D3) (Figure 44C). De façon intéressante, la quantité de procollagène I sécrété par les fibroblastes dans les feuillets contrôles était statistiquement équivalente (Figure 44C). L'activité des MMPs sécrétées dans le milieu de culture a ensuite été mesurée 24h après l'application des champs électriques. Les résultats ont là encore confirmé une augmentation significative de l'activité des MMPs sécrétées, bien que cette augmentation soit plus faible dans le surnageant des feuillets D3 (Figure 44D). Comme pour le procollagène I, il n'y avait pas de différence statistique entre les surnageants des feuillets contrôles des trois donneurs (Figure 44D).

A

Nom	Sexe	Age	Origine du prélèvement
D1	Masculin	3 ans	Posthectomie
D2	Masculin	3 ans	Posthectomie
D3	Féminin	34 ans	Réduction mammaire

B



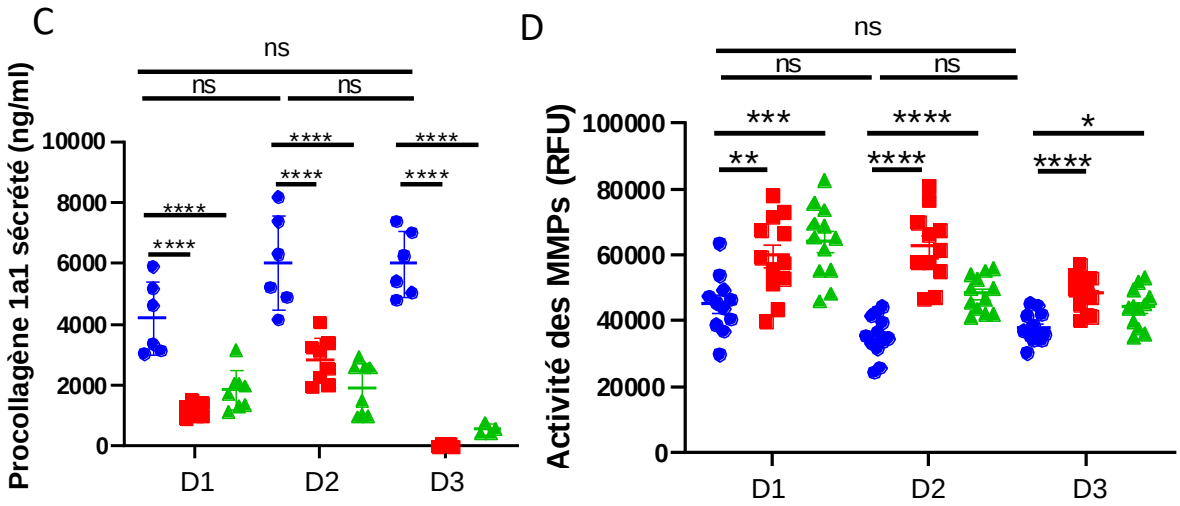


Figure 44 : Les résultats obtenus sont comparables chez les 3 donneurs. A. Caractéristiques des différents donneurs. B. Aspect macroscopique des feuillets dermiques issus des trois donneurs. C. Quantité de procollagène 1a1 dans le surnageant de feuillets dermiques 24h après application de champs électriques de type GET et ECT. N=1, n= 6. Analyses statistiques par Anova unidirectionnelles. D. Quantification par fluorimétrie de l'activité endogène des MMPs dans le surnageant de feuillets dermiques 24h après application de champs électriques de type GET et ECT. N=1, n= 12. Analyses statistiques par Anova unidirectionnelles. Conditions contrôle (Ctrl ●), électrotransfert de gènes (GET ■) et électrochimiothérapie (ECT ▲). Barre d'échelle 0,8 cm.

c. Discussion

Dans ce chapitre nous avons démontré que le feuillet dermique était un modèle polarisé très riche en matrice extracellulaire endogène. Ceci avait été suggéré par Magnan et al en 2018 [143] sur un modèle similaire. En effet, cette équipe avait constaté que les fibroblastes dans les feuillets dermiques étaient principalement concentrés à la surface, tandis que les fibroblastes à l'intérieur de ceux-ci étaient moins nombreux et aplatis [143]. Ils avaient également identifié par protéomiques dans le modèle plus de 56 protéines de la matrice extracellulaire, parmi lesquelles des membres de 4 familles de collagènes, 11 protéoglycanes, 14 protéines impliquées dans les interactions cellule-matrice et matrice-membrane basale et 8 protéines liées aux fibres élastiques [143]. Cela démontre le haut degré de complexité de la matrice extracellulaire du modèle de feuillet produit par auto-assemblage et confirme la pertinence de son utilisation dans le contexte de cette étude. Nous avons également utilisé des méthodes physiques telles que la spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier et la calorimétrie différentielle à balayage qui se sont montrées particulièrement intéressantes en combinaison avec les approches classiques de biologie cellulaire et d'imagerie pour la caractérisation du modèle et l'étude de l'effet des impulsions électriques.

L'analyse transcriptomique nous a permis d'enrichir cette étude et nous a montré que l'expression des gènes était fortement modifiée par l'application des champs électriques. Ce type de technique dite « omics » génère une très grande quantité de données et par conséquent seulement une faible partie de ces données ont été exploitées pendant cette thèse. Les outils de visualisation tels que GOrilla[135] fournissent une représentation graphique simple et informative des voies significativement enrichies dans la liste des gènes identifiés par transcriptomique. Une étude plus approfondie grâce notamment aux outils de bio-informatique permettrait de comprendre l'implication de certaines voies de signalisation dans la réponse aux impulsions électriques.

Dans ce chapitre, nous avons montré que l'exposition aux champs de type électroporation induit un remodelage transitoire des collagènes dermiques *via* la suractivation ROS-dépendante des métalloprotéinases matricielles. A ce stade des investigations, aucune réponse claire ne peut être apportée concernant l'origine et le maintien de ces ROS. Étant donné que l'électrostimulation est un événement bref (moins de 12 secondes), que la demi-vie des ROS est très courte et que les substituts dermiques sont retirés du tampon de pulsation quelques secondes après les impulsions, l'origine cellulaire de ces ROS est la plus susceptible d'expliquer la suractivation soutenue des MMPs. Cette suractivation résultait de l'activité d'une ou plusieurs des MMPs suivantes, à savoir MMP-1, -7, -8, -12, -13, -14, -15, -16. De façon intéressante, les fibroblastes sont la source principale des collagènases MMP-1, -8, -13 et des MMPs transmembranaires -14, -15, -16, dans la peau. Ces MMPs sont

spécialisées dans la dégradation des collagènes fibrillaires (I, II, III) [70] ce qui corrèle avec la dégradation des collagènes observée dans le tissu après les impulsions lors du dosage de l'hydroxyproline et dans les mesures par IRTF-ATR.

D'autres part, nous avons vu que les fibroblastes électroporés avaient la capacité de remodeler une matrice 3D de collagène grâce à l'acquisition de propriétés contractiles accrues. Cette observation n'était pas corrélée à l'augmentation du nombre de myofibroblastes α-SMA+. Idéalement, il aurait été intéressant de vérifier la quantité d'α-SMA exprimée en western blot. Cette partie n'étant pas au cœur de ce travail, nous n'avons pas poussé plus loin les investigations. Toutefois, la capacité des champs électriques à stimuler la contractilité des fibroblastes a été démontrée par Rouabhia et ses collaborateurs [147]. Dans cette étude, les fibroblastes soumis à des courants continus de 0,5 à 2 V/cm pendant 2 à 6h ont beaucoup plus contracté la matrice de gel de collagène que les fibroblastes non soumis aux champs électriques[147]. Cette contraction accrue était corrélée à un niveau plus élevé d'α-SMA exprimée par les fibroblastes après la stimulation[147]. Cependant, les paramètres électriques employés dans cette étude étaient très éloignés de ceux utilisés dans cette thèse.

Les résultats obtenus en terme de remodelage matriciel pourraient être corrélés avec les observations réalisées par les médecins utilisant l'électrochimiothérapie, tout comme les patients eux-mêmes, qui notent une guérison esthétique et fonctionnelle des sites traités [28,148]. Puisque l'électroporation est déjà employée de nos jours, des appareils validés (générateur, électrodes, dosimétrie, etc.) sont disponibles et les médecins habitués à ce type de protocole. Ces recherches présentent donc un fort potentiel translationnel, avec des résultats qui font de l'électroporation une stratégie thérapeutique réaliste notamment dans le cas d'un dépôt excessif de collagènes, comme la fibrose cutanée par exemple.

3. Étude du potentiel pro-angiogénique des champs de type électroporation dans des substituts dermiques micro-vascularisés.

Les résultats présentés dans cette partie seront valorisés dans une publication en cours de rédaction.

a. Résumé

Ce chapitre est consacré à l'étude du potentiel pro-angiogénique des champs de type électroporation. Toutes les expériences dans ce chapitre ont été réalisées avec les mêmes paramètres électriques que ceux utilisés dans le chapitre précédent sur les substituts dermiques soit : électrotransfert de gène GET (10 impulsions, 5ms, 1Hz, 600V/cm) et électrochimiothérapie ECT (8 impulsions, 100 µs, 1Hz, 1000V/cm), comme dans le chapitre IV.2. Ces paramètres assurent 100% d'électroperméabilisation réversible et maintiennent la viabilité des fibroblastes dermiques dans le modèle de feuillet. Pour ce volet, nous avons utilisé deux types de modèles : le modèle simple de cellules endothéliales cultivées en 2D en monocouche et le modèle 3D de substituts dermiques micro-vascularisés. Ce modèle 3D consiste à cultiver des feuillets dermiques comme précédemment et à les ensemencer avec des cellules endothéliales de manière à favoriser l'auto-assemblage d'un réseau microvasculaire à la surface des feuillets. Nous avons utilisé des cellules endothéliales de veine de cordon ombilical (HUVEC) GFP+, gracieusement données par l'équipe du Dr Rachidi, afin de pouvoir visualiser le réseau sous microscopie à fluorescence. La mise au point du modèle micro-vascularisé a demandé quelques semaines. En effet, la densité d'ensemencement des HUVECs est une condition critique pour la formation de réseaux. Tandis qu'une trop faible densité induit la mort des cellules, une densité trop élevée ou une mauvaise homogénéité dans les puits a pour conséquence la formation de plaques de cellules qui ne forment pas de réseaux (Figure 45).

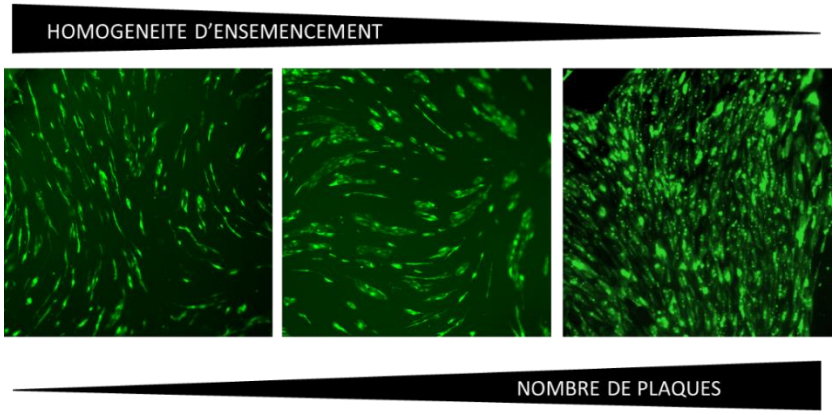


Figure 45 : Impact de l'homogénéité et de la densité d'ensemencement sur la formation de réseaux vasculaires. Les cellules endothéliales HUVEC-GFP+ sont en vert.

Le schéma de notre stratégie expérimentale est décrit dans la Figure 46. Les résultats obtenus en transcriptomique et par tests ELISA après l'électroporation de feuillets de fibroblastes non-vascularisés, décrits plus loin dans ce chapitre, montrent que les champs de type ECT et GET stimulent la sécrétion de facteurs pro-angiogéniques tels que VEGFA, bFGF et PDGFA. Nous avons donc choisi d'étudier l'effet du sécrétome de feuillets électroporés sur la migration de cellules endothéliales cultivées en 2D et sur la formation de réseaux vasculaires dans le modèle de substitut dermique micro-

vascularisé. Pour réaliser ce suivi en temps réel, nous avons utilisé le vidéomicroscope IncuCyte (Sartorius) pour générer et analyser les images.

Ces expériences ont montré que le sécrétome de feuillets dermiques électroporés avec des paramètres de type GET et ECT stimule significativement la migration d'HUVECs en monocouche dans un test de fermeture de plaie standardisé. Dans un contexte 3D, les réseaux matures (J7) de feuillets micro-vascularisés ne sont pas du tout affectés par la présence de milieux conditionnés, ni en termes de longueur du réseau, ni en nombre de ramifications. Cette expérience devra être répétée sur des réseaux immatures en cours de formation (J3) car ceux-ci pourraient être stimulés par les facteurs de croissance présents dans les milieux conditionnés. D'autre part, les cellules endothéliales ensemencées sur des feuillets dermiques électroporés 24h auparavant forment des réseaux plus longs et plus ramifiés que celles ensemencées sur des feuillets non électroporés. Nous avons démontré dans le chapitre IV.2 que 7 jours après les impulsions, la quantité de collagènes était significativement diminuée dans le tissu. Il serait intéressant de réitérer cette expérience en ensemençant les HUVECs sur des feuillets dermiques une semaine après l'électroporation afin d'observer l'effet du remaniement matriciel sur la formation des réseaux.

La survie des cellules du réseau microvasculaire à la suite de l'application directe des champs électriques sur le feuillet micro-vascularisé a également été suivie par vidéomicroscopie en temps réel. L'électroporation directe de réseaux vasculaires (paramètres conservant la viabilité des fibroblastes dermiques dans le modèle) a induit une apoptose précoce des cellules endothéliales conduisant à une chute drastique de la longueur du réseau pour les paramètres de GET, mais permet, pour des raisons non encore élucidées, le maintien du réseau pour les paramètres ECT. Cette différence de réponse montre que les paramètres utilisés en GET affectent plus les cellules que les paramètres ECT (Figure 46D). Cela corrèle avec différentes observations faites au cours de cette thèse montrant notamment un plus fort impact du GET sur l'expression des gènes et des mécanismes plus complexes mis en jeu lors du remodelage matriciel.

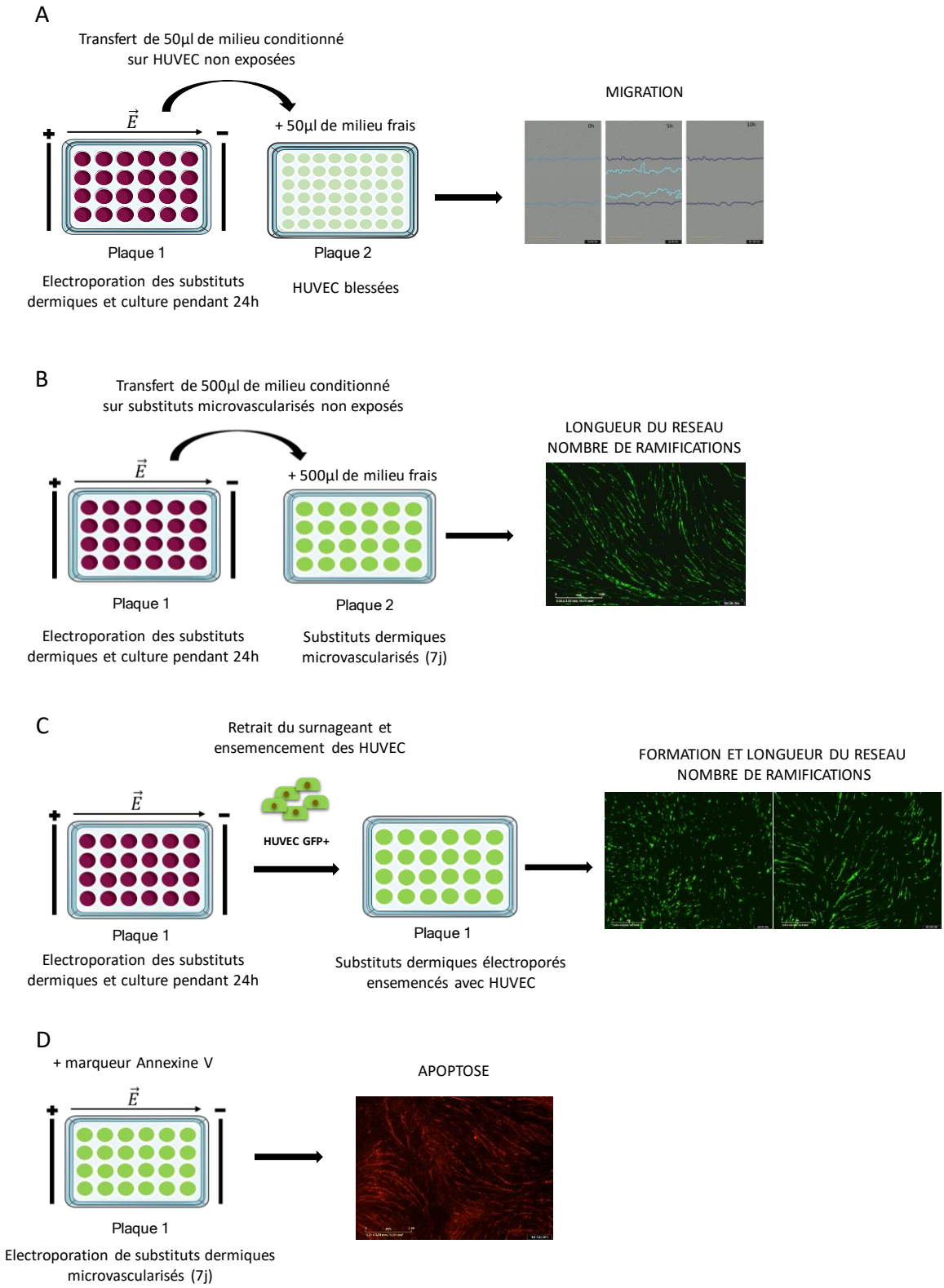


Figure 46 : Vue d'ensemble du plan expérimental pour tester les effets directs, indirects et mixtes de l'électroporation sur les cellules endothéliales par vidéomicroscopie. A. Migration des cellules endothéliales cultivées en 2D en présence de milieu conditionné 24h (sécrétome de feuillets dermiques électroporés). B. Longueur et nombre de ramifications du réseau vasculaire de substituts dermiques micro-vascularisés cultivés en présence de milieu conditionné 24h (sécrétome de feuillets dermiques électroporés). C. Formation des réseaux vasculaires après l'ensemencement des HUVECs sur des substituts dermiques électroporés 24h auparavant. D. Suivi de l'apoptose des réseaux vasculaires de substituts micro-vascularisés après électroporation.

b. Résultats

Les fibroblastes électroporés sécrètent des facteurs pro-angiogéniques.

Physiologiquement, l'angiogenèse est un processus finement régulé par un équilibre entre des facteurs pro- et anti-angiogéniques. Les facteurs pro-angiogéniques classiques sont le facteur de croissance endothélial vasculaire (VEGF), le facteur de croissance des fibroblastes-2 aussi appelé FGF-basic (FGF-2 ; FGFb), et le facteur de croissance dérivé des plaquettes (PDGF) [56]. Le panel d'expression des ARNm codant ces facteurs pro-angiogéniques réalisé grâce aux résultats obtenus en transcriptomique a montré que l'isoforme A du VEGF et du PDGF étaient statistiquement surexprimés dans les feuillets 4h après les impulsions de types GET (+3,15 et +1,91 respectivement) et ECT (+2,92 et +2,32). L'expression du facteur de croissance des fibroblastes basique n'était au contraire pas statistiquement modifiée après les impulsions (Figure 47A). Au niveau protéique, la quantification des facteurs pro-angiogéniques dans le milieu conditionné montre que les fibroblastes électroporés sécrètent plus de VEGFA dès 24h après les impulsions de type GET et ECT (Figure 47B), et sécrètent massivement du PDGFA dès 6h (Figure 47C). La quantité de FGFb explosait dans le milieu 6h après les impulsions puis retrouvait des niveaux équivalents au contrôle dans les 24H, ce qui pourrait s'expliquer par un relargage de facteurs préexistants contenus dans des vésicules (Figure 47D). Ces résultats sont en accord avec ceux observés en monocouche, où l'on observait également une augmentation des ARNm VEGFA et PDGFA mais pas de l'ARNm FGFb (FGF-2) ainsi qu'une augmentation de l'abondance de VEGFA et PDGFAA dans le milieu (Chapitre 1, Figure 25). Un ELISA multiplex a permis de quantifier rapidement un panel de facteurs lié à l'angiogenèse, notamment les isoformes VEGFC et VEGFD, ainsi que le facteur de croissance placentaire PGF. Une tendance à la baisse de la quantité de VEGFC et de PGF dans le milieu était observable après les impulsions (Figure 47F), tandis que le VEGFD était indétectable quelles que soient les conditions (données non présentées). Aucune modulation des ARNm correspondants n'avait lieu 4h après l'application des impulsions d'après les données obtenues en transcriptomique (Figure 47E).

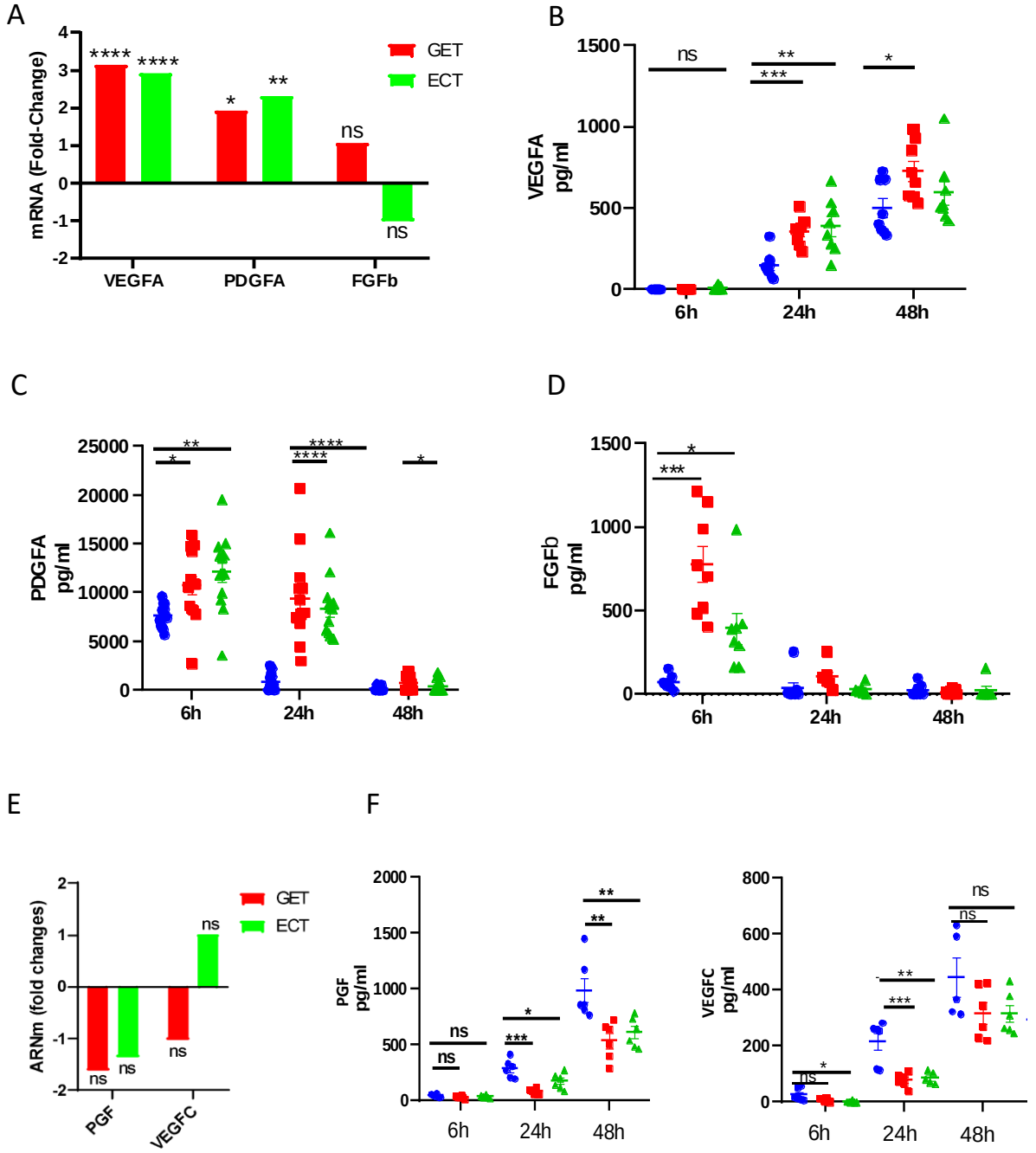
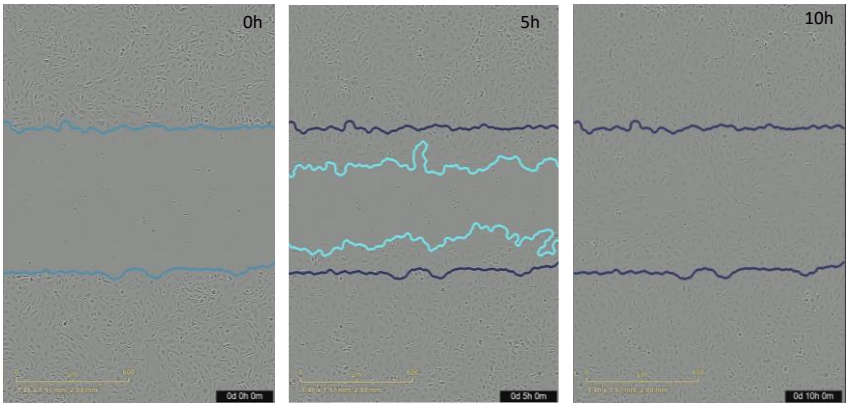


Figure 47 : Les fibroblastes électroporés sécrètent des facteurs pro-angiogéniques. A. Modulation des ARNm VEGFA, PDFGA et FGFb dans les feuillets dermiques 4h après application de champs électriques de type GET et ECT. n= 4. B. Quantité de VEGFA dans le surnageant de feuillets dermiques après application de champs électriques de type GET et ECT. N = 1, n = 8. C. Quantité de PDGFA dans le surnageant de feuillets dermiques après application de champs électriques de type GET et ECT. N = 2, n = 12. D. Quantité de FGFb dans le surnageant de feuillets dermiques après application de champs électriques de type GET et ECT. N = 1, n = 8. E. Modulation des ARNm PGF et VEGFC dans les feuillets dermiques 4h après application de champs électriques de type GET et ECT. n= 4. F. Quantité de PGF et de VEGFC dans le surnageant de feuillets dermiques après application de champs électriques de type GET et ECT. N = 1, n = 8. Conditions contrôle (Ctrl ●), électrotransfert de gènes (GET ; 10 impulsions, 5ms, 1Hz, 600V/cm ■) et électrochimiothérapie (ECT ; 8 impulsions, 100 µs, 1Hz, 1000V/cm ▲). Analyses statistiques par Anova unidirectionnelles. Facteur de croissance des fibroblastes basique (FGFb); Sous-unité A du facteur de croissance dérivé des plaquettes (PDGFA) ; Facteur de croissance placentaire (PGF) ; Facteur de croissance endothélial vasculaire A (VEGFA) ; Facteur de croissance endothélial vasculaire C (VEGFC).

Les milieux conditionnés par les feuillets dermiques électroporés améliorent la migration des HUVECs.

Afin d'évaluer les effets indirects de l'application d'un champ électrique sur les propriétés des cellules endothéliales, des tests de fermeture de plaie ont été réalisés avec des cellules endothéliales de veine de cordon ombilical (HUVEC) cultivées en présence de milieux conditionnés 24h par les feuillets dermiques électroporés. À cet effet, des plaies de taille calibrée ont été réalisées grâce au Woundmaker sur des monocouches d'HUVECs puis les images de fermeture ont été acquises et analysées par le videomicroscope IncuCyte et son logiciel associé. L'application de masques lors du traitement des images permet ainsi de déterminer la confluence de la plaie heure par heure après l'ajout des milieux conditionnés (Figure 48A et Vidéo 3). Dans ce plan expérimental, les HUVECs n'ont jamais été soumises à un champ électrique, mais ont été cultivées dans un milieu composé pour moitié de milieu de culture conditionné pendant 24h par des feuillets de fibroblastes dermiques exposés aux champs de type GET et ECT et pour moitié de milieu de culture frais. Les analyses statistiques réalisées montrent qu'au cours des premières 24 heures, le milieu conditionné par les fibroblastes soumis à des impulsions de type GET et ECT a significativement amélioré la fermeture de la plaie par rapport au contrôle. Cette augmentation de la migration est significative dès la première heure dans les conditions GET et la fermeture totale de la plaie a lieu environ 12h après l'ajout de milieu conditionné dans les conditions en électroporation et seulement 16h après dans la condition contrôle (Figure 48B). Afin de s'assurer de la fiabilité des résultats obtenus, il faudra augmenter le nombre d'expériences indépendantes.

A



Vidéo 3

B

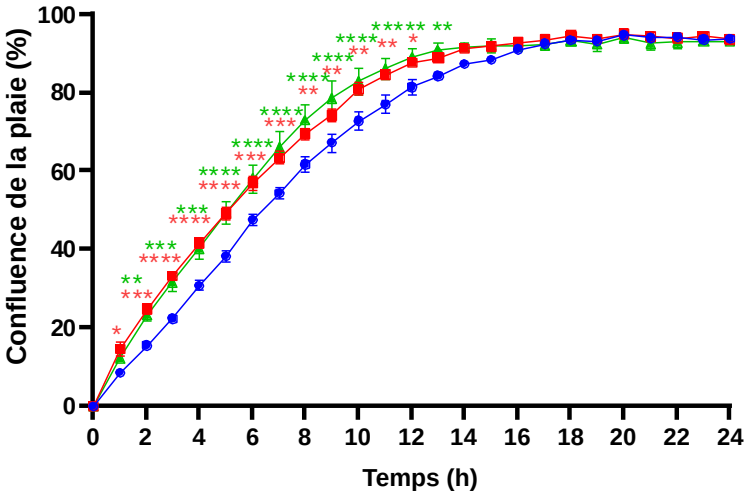


Figure 48 : Les milieux conditionnés par les fibroblastes électroporés améliorent la migration des HUVECs. A. Quantification de la migration des HUVECs dans les tests de fermeture de la plaie. La ligne bleu clair délimite la zone occupée par les cellules au fil du temps et la ligne bleu foncé la zone de plaie initiale B. Évolution temporelle de la migration des HUVECs après l'application de milieux conditionnés de substituts dermiques électroporés. N=1, n=3. Conditions contrôle (Ctrl ●), électrotransfert de gènes (GET ■) et électrochimiothérapie (ECT ▲). Analyses statistiques par Anova bidirectionnelles.

Les milieux conditionnés des feuillets dermiques électroporés n'ont pas d'effet sur la densité des réseaux vasculaires matures.

Pour aller plus loin dans l'évaluation des effets indirects du sécrétome de fibroblastes électroporés, nous avons utilisé un modèle 3D de substituts dermiques micro-vascularisés. Dans ce modèle précédemment caractérisé par Gibot et al., les cellules endothéliales HUVECs s'organisent spontanément en un réseau ramifié de capillaires fonctionnels. Les marquages réalisés sur les coupes de substituts microvascularisés montrent des lumières de capillaires bien définies et l'expression des composants de la membrane basale tels que la laminine et le collagène IV [93]. En bref, la préparation de ce modèle consiste à cultiver des feuillets dermiques comme décrit dans la partie précédente (IV.2) et de les implémenter avec des cellules endothéliales de manière à favoriser la formation spontanée de réseaux microvasculaires à la surface. L'utilisation d'HUVECs GFP+ nous a permis de visualiser le

réseau par vidéomicroscopie à fluorescence puis d'analyser la longueur et la densité de celui-ci. Des substituts dermiques micro-vascularisés âgés de 7 jours ont été cultivés dans un milieu composé pour moitié de milieu de culture conditionné pendant 24h par des feuillets de fibroblastes dermiques exposés aux champs de type GET et ECT et pour moitié de milieu de culture frais. Dans ce plan expérimental, les HUVECs n'ont jamais été soumises à un champ électrique. L'évolution du réseau vasculaire a ensuite été monitoré par vidéomicroscopie (Figure 49A,B) pendant 3 jours. Les analyses statistiques ont montré que les réseaux matures (J7) de feuillets micro-vascularisés n'étaient pas affectés par la présence de milieux conditionnés, ni en termes de longueur du réseau, ni en nombre de ramifications. Une tendance à la baisse du nombre de ramifications est observable en présence de milieux conditionnés de feuillets électroporés sans toutefois être significative (Figure 49B). On peut constater que les réseaux matures évoluent très peu au cours du temps, que ce soit en présence de milieu conditionné ou chez les témoins. Il serait donc pertinent de réitérer cette expérience sur des réseaux immatures en cours de formation (J3) car ceux-ci pourraient plus vraisemblablement être stimulés par les facteurs de croissance présents dans les milieux conditionnés.

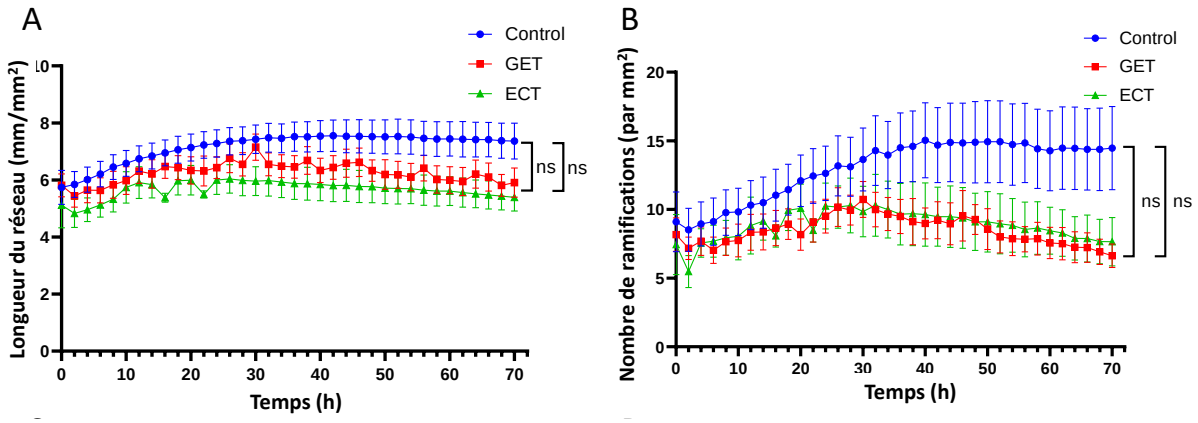


Figure 49 : Les milieux conditionnés des feuillets dermiques électroporés n'ont pas d'effet sur les réseaux vasculaires matures. A. Évolution dans le temps de la longueur du réseau mature (7j) après l'application de milieux conditionnés 24h de substituts dermiques électroporés. B. Évolution dans le temps du nombre de ramifications du réseau mature (7j) après l'application de milieux conditionnés 24h de substituts dermiques électroporés. N=1, n=8. Conditions contrôle (Ctrl ●), électrotransfert de gènes (GET ■) et électrochimiothérapie (ECT ▲). Analyses statistiques par Anova bidirectionnelles.

L'électroporation des substituts dermiques stimulent la formation des réseaux d'HUVECs.

Dans le chapitre précédent, nous avons démontré que l'électroporation modifie le comportement cellulaire des fibroblastes dermiques et induit le remodelage matriciel dans le modèle de substitut dermique. Afin de déterminer l'impact potentiel de ces phénomènes dans la formation de réseaux vasculaires, des cellules endothéliales ont été ensemencées sur des feuillets dermiques électroporés 24h auparavant. Dans ce plan expérimental, les HUVECs n'ont jamais été soumises à un champ

électrique. La formation des réseaux a ensuite été monitorée par vidéomicroscopie à fluorescence pendant 96h après l'ensemencement des HUVECs (Figure 50A et Vidéo 4). Comme le montre la Figure 50, les cellules endothéliales ensemencées sur des feuillets dermiques électroporés formaient des réseaux plus longs et plus ramifiés que celles ensemencées sur des feuillets non électroporés. Nous avons démontré dans le chapitre IV.2 qu'une semaine après les impulsions électriques, la quantité de collagènes était statistiquement diminuée dans le tissu. Il serait intéressant d'ensemencer les HUVECs sur des feuillets dermiques une semaine après l'électroporation afin d'observer l'effet du remaniement matriciel sur la formation des réseaux.

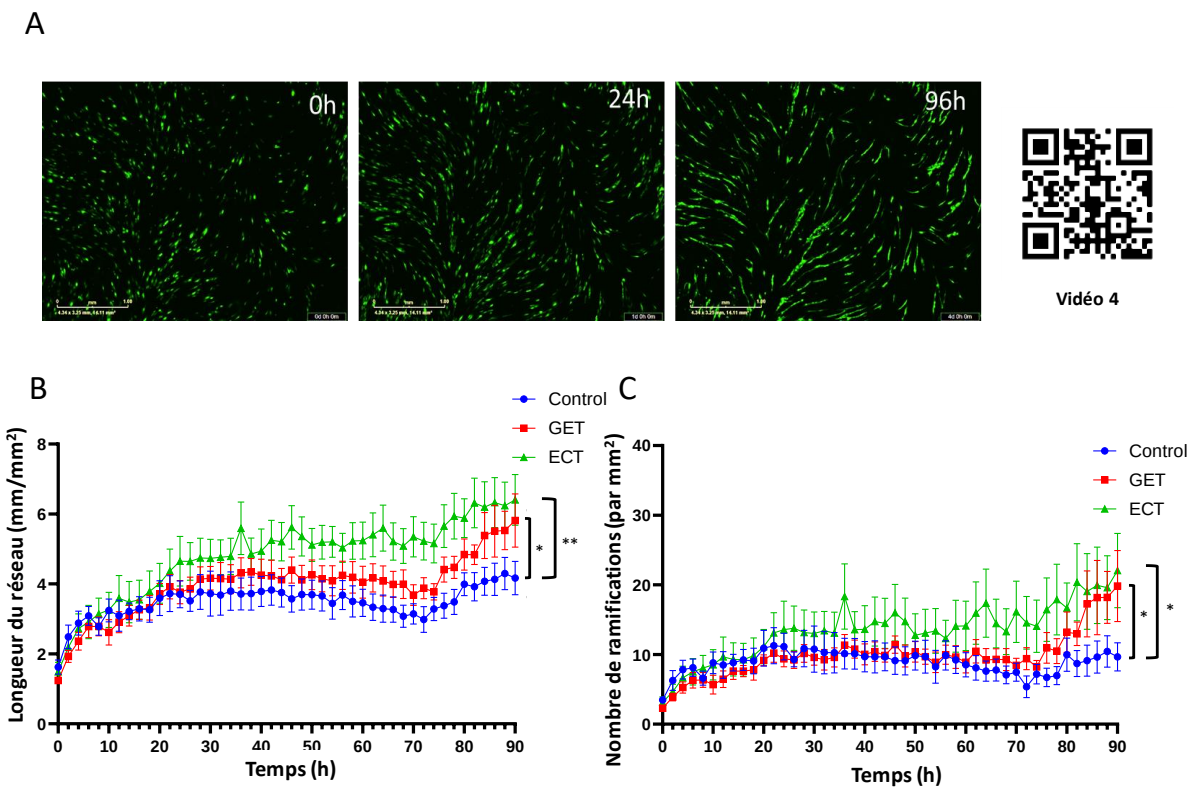


Figure 50 : L'électroporation des substituts dermiques stimulent la formation des réseaux d'HUVECs. A. Formation d'un réseau d'HUVEC (vert) détecté par vidéomicroscopie 0h, 24h et 96h après l'ensemencement des HUVECs sur des feuillets dermiques électroporés 24h auparavant. B. Évolution dans le temps de la longueur du réseau après ensemencement sur substituts dermiques électroporés 24h auparavant. C. Evolution dans le temps du nombre de ramifications du réseau après ensemencement sur substituts dermiques électroporés 24h auparavant. N=1, n=8. Conditions contrôle (Ctrl ●), électrotransfert de gènes (GET ■) et électrochimiothérapie (ECT ▲). Analyses statistiques par Anova bidirectionnelles.

Les deux protocoles d'électroporation induisent différents mécanismes de mort cellulaire des réseaux d'HUVECs.

L'effet des champs électriques pulsés en application directe a été étudié en soumettant des substituts dermiques micro-vascularisés âgés de 7 jours à des champs électriques de type GET et ECT. L'évolution de la longueur des réseaux et l'induction de l'apoptose ont été monitorés par vidéomicroscopie grâce à l'ajout d'un marqueur de l'Annexine V Red et par le suivi de l'expression du transgène GFP (Figure 51A). Afin de maintenir une cohérence avec les expériences précédentes, les paramètres utilisés étaient ceux conservant la viabilité des fibroblastes dermiques au sein du modèle. Dans ces conditions, l'électroporation directe des réseaux microvasculaires conduit à une apoptose précoce de cellules endothéliales corrélée à une chute drastique de la longueur du réseau pour les paramètres de type GET (Figure 51B,C,D). Au contraire, la longueur du réseau est conservée durant les 3 jours d'observation après l'application des champs de type ECT comme le montre le maintien du marquage GFP, et ce, malgré l'augmentation du marquage Annexine V (Figure 51B,C,D). Un marquage complémentaire à l'externalisation des phosphatidylsérines, par exemple l'activation des caspases, permettrait de déterminer s'il s'agit bel et bien de mort cellulaire dans le cas de l'ECT. La différence de réponse entre les deux types de protocoles montre que les paramètres utilisés en GET affectent plus les cellules que les paramètres ECT. Cela corrèle avec différentes observations faites au cours de cette thèse montrant notamment un plus fort impact des champs de type GET sur la modulation de l'expression des gènes (Figure 31) et des mécanismes plus complexes mis en jeu lors du remodelage matriciel (Figure 38).

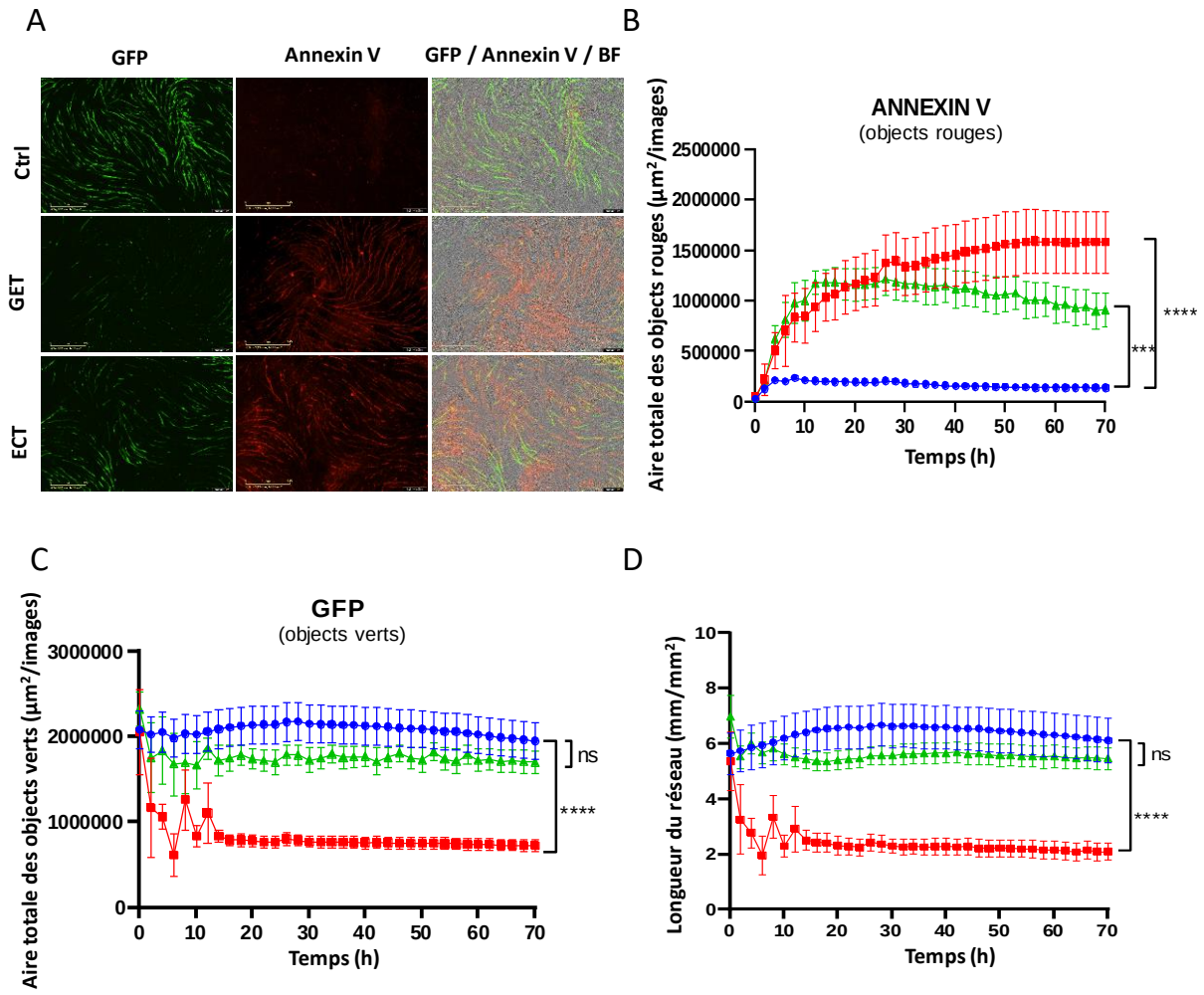


Figure 51 : Les deux protocoles d'électroporation induisent différents mécanismes de mort cellulaire des réseaux d'HUVECs. A. Réseaux HUVEC GFP+ (vert) et annexine V+ (rouge) détectés par vidéomicroscopie sur des substituts dermiques micro-vascularisés 40h après application de champs électriques de type GET et ECT. B. Évolution dans le temps de la surface totale d'image occupée par des objets rouges (annexine V+) après application de champs électriques de type GET et ECT. C. Évolution temporelle de la surface totale d'image occupée par des objets verts (GFP+) après application de champs électriques de type GET et ECT. D. Evolution temporelle de la longueur du réseau après application de champs électriques de type GET et ECT. N=1, n=6. Conditions contrôle (Ctrl ●), électrotransfert de gènes (GET ■) et électrochimiothérapie (ECT ▲). Analyses statistiques par Anova bidirectionnelles.

c. Discussion

Une des premières études suggérant un effet pro-angiogénique des champs électriques avait démontré que l'expression de l'ARNm VEGF était significativement augmentée dans les cellules musculaires squelettiques exposées à une stimulation électrique pulsée [51]. Plus tard, Zhao et al ont confirmé que l'application de champs électriques sur des cellules endothéliales HUVEC en culture stimulait la sécrétion de VEGF et induisait la réorientation, l'allongement et la migration des cellules endothéliales *via* l'activation des récepteurs du VEGF [52]. Les réponses pro-angiogéniques activées par les récepteurs VEGF seraient ensuite transmises *via* les voies PI3K-Akt et Rho-ROCK entraînant la réorganisation du cytosquelette d'actine [52]. Dans notre étude, les effets pro-migratoires du sécrétome de feuillets dermiques électroporés sur les HUVEC pourraient donc être attribués à la quantité accrue de facteurs pro-angiogéniques, tels que le VEGFA, comme nous l'avons quantifiée. Au contraire, la quantification des isoformes VEGFC et VEGFD par ELISA multiplex a révélé une tendance à la baisse pour le VEGFC après les impulsions et une absence de VEGFD détectable quelles que soient les conditions (Figure 47). L'effet pro-migratoire observé serait donc principalement le fait de l'isoforme VEGFA.

Nous avons également observé que l'électroporation de substituts dermiques stimule la formation des réseaux d'HUVEC lorsque les cellules endothéliales étaient ensemencées 24h après les impulsions. Nous pouvons émettre l'hypothèse que les facteurs libérés par les fibroblastes durant plusieurs jours et la réorganisation de la matrice à la suite des impulsions favorisent la formation des réseaux vasculaires et la création de ramifications. En effet, le remodelage de la matrice extracellulaire peut avoir des effets pro- et anti-angiogéniques. Le remodelage de la matrice extracellulaire par les métalloprotéases favorise par exemple la migration des cellules et la formation de nouveaux vaisseaux [149]. De plus, la libération de facteurs de croissance liés à la matrice et de fragments protéolytiques de molécules matricielles peuvent influencer positivement ou négativement la formation de tubes endothéliaux [149]. Par conséquent, les molécules de la matrice extracellulaire et les événements de remodelage jouent un rôle important dans la régulation de l'angiogenèse. Il serait intéressant de répéter cette expérience en ensemençant les HUVECs sur des feuillets dermiques une semaine après l'électroporation, au moment où les collagènes sont les plus dégradés, afin de savoir si une matrice moins dense influence la formation des réseaux microvasculaires.

Enfin, l'application directe des champs électriques sur les réseaux vasculaires induit une apoptose précoce des cellules endothéliales et une chute drastique de la longueur du réseau pour les paramètres de GET. Nous avons souhaité conserver les mêmes paramètres électriques que ceux utilisés pour la génération des sécrétomes, c'est-à-dire les paramètres permettant de conserver la viabilité des

fibroblastes dans le substitut dermique. Nous n'avons par ailleurs pas vérifié la perméabilisation des cellules endothéliales dans ce modèle micro-vascularisé. La pénétration d'iodure de propidium que nous utilisons généralement pour le faire, aurait été complexe dans ce cas, étant donné le grand nombre de cellules présentes dans le feuillet (environ 100 000 fibroblastes et quelques dizaines de milliers de cellules endothéliales). Cependant, la littérature nous apprend que la perméabilité des cellules endothéliales est fortement augmentée après l'électroporation [150]. Le remodelage des jonctions cellulaires (CD31 et VE-Cadherin) après électroporation a été observé *in vitro* et *in vivo* et était associé à une augmentation de la perméabilité des vaisseaux sanguins [151,152]. Dans notre cas, il est probable que les paramètres appliqués aient induit une perméabilisation irréversible des cellules endothéliales conduisant à leur mort par apoptose, au moins dans le cas des paramètres GET.

En conclusion, nous avons vu que l'application de champs électriques de type électroporation stimule la migration des cellules endothéliales en monocouche ainsi que la formation de réseaux microvasculaires dans un modèle de substitut dermique micro-vascularisé. Ces effets semblent médiés par le sécrétome des fibroblastes et pourraient être potentialisés par le remodelage matriciel qui a lieu après les impulsions électriques.

4. Étude de l'effet des champs de type électroporation sur un modèle de plaie dans un substitut cutané.

Les colorations histologiques et immunofluorescences présentées dans ce chapitre ont été réalisées par le laboratoire NOVOTEC (Lyon).

a. Résumé

L'objectif de ces travaux préliminaires était d'utiliser un modèle de plaie mis au point à partir de substituts cutanés générés par auto-assemblage afin d'étudier l'effet des champs électriques utilisés en électrochimiothérapie sur les processus de guérison des plaies. L'hypothèse que les champs électriques de type électroporation favoriseraient la cicatrisation des plaies cutanées est soutenue par la littérature et par les résultats obtenus pendant ce travail de thèse. D'une part, dans le cadre de l'utilisation clinique de l'électrochimiothérapie, les cliniciens observent couramment une cicatrisation esthétique et fonctionnelle des plaies sur les sites traités [95]. D'autre part, les travaux réalisés durant cette thèse nous ont permis de démontrer que les champs électriques appliqués en électroporation stimulent le remodelage matriciel par les MMPs, la libération de nombreux facteurs de croissances favorisant la migration des fibroblastes et des cellules endothéliales, et la formation de réseaux vasculaires *in vitro* [137,153].

La cicatrisation est un processus se déroulant en trois étapes[154] : l'inflammation, la prolifération et la maturation (Figure 52). La deuxième étape se caractérise par la prolifération et la migration de différents types cellulaires. Durant cette phase, les kératinocytes présents aux bordures de la plaie vont proliférer puis migrer pour recouvrir la plaie et ainsi rétablir la fonction barrière de la peau, c'est le phénomène de ré-épithélialisation. Le processus d'angiogenèse débute alors, et assure la mise en place de nouveaux capillaires. Les fibroblastes sécrètent des collagènes qui permettent la formation du tissu de granulation fournissant un support de migration pour les kératinocytes [154,155]. Pour finir, les fibroblastes présents aux marges de la plaie, stimulés par des facteurs de croissance sécrétés ainsi que par les tensions exercées par le tissu de granulation, sont activés et une partie d'entre eux se différentie en myofibroblastes. La troisième étape consiste en un remodelage du tissu cicatriciel, qui commence 2 à 3 semaines après la blessure et peut durer plusieurs mois. Les MMPs jouent un rôle crucial pendant toutes les phases de la cicatrisation cutanée [156].

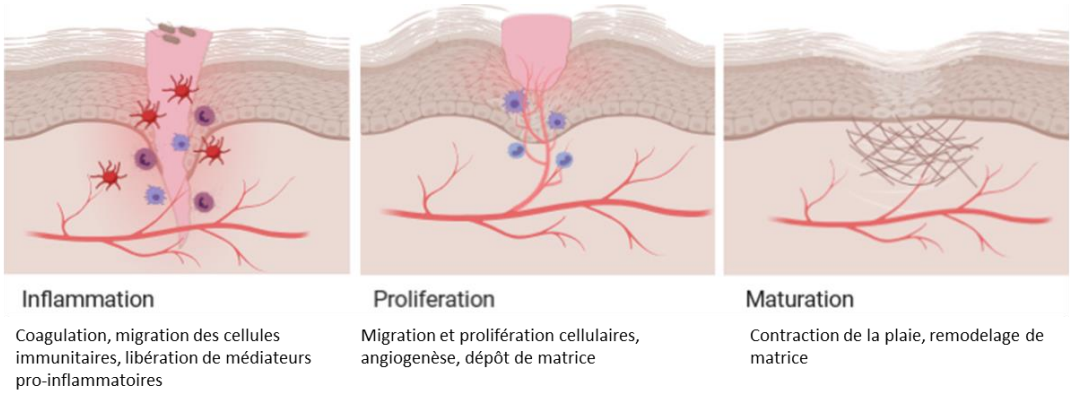


Figure 52 : Les grandes étapes de la cicatrisation. Réalisé grâce à la banque d'images Biorender

La première étape de ce travail a été de générer des substituts cutanés composés d'un derme et d'un épiderme correctement différencié. Les résultats obtenus après fixation et coloration des échantillons ont démontré que 12 jours semblaient être la période optimale pour l'obtention d'un épiderme de qualité avec la présence d'une belle couche cornée. Dans un deuxième temps, un modèle de plaie a été généré en réalisant des blessures de taille calibrée sur les substituts cutanés à l'aide de punchs à biopsie de 4 mm de diamètre. Les substituts blessés ont été soumis à des champs électriques de type électrochimiothérapie de l'ordre de 1300 V/cm (8 impulsions, 100 µs, 1Hz). L'intensité du champ électrique appliqué dans cette partie a été légèrement augmentée en comparaison avec celui utilisé dans les chapitres précédents (1000 V/cm) afin de tenir compte de l'effet isolant de la couche cornée et de la distribution non-homogène du champ électrique lorsqu'il est appliqué sur un tissu plus épais [103,104]. Il s'agit des paramètres préconisés en clinique [148]. Le processus de cicatrisation après les impulsions a été suivi grâce à la mesure de la perte en eau transépidermique (TEWL) et de l'évolution de la taille de la plaie au cours du temps.

Les données préliminaires obtenues sur ce modèle montrent que les champs électriques ne modifient pas la structure du tissu ni l'expression des marqueurs de différentiations de l'épiderme sur les parties non-blessées. Les résultats obtenus pour le moment au niveau de la blessure ne permettent pas de tirer de conclusion sur l'impact de l'électroporation de type ECT dans le processus de fermeture de la plaie.

b. Résultats

Caractérisation du modèle de substitut cutané généré par auto-assemblage

Pour produire des substituts cutanés, des substituts dermiques ont été générés comme décrit dans le matériels et méthodes. Ensuite, des kératinocytes primaires extraits d'une biopsie cutanée ont été ensemencés par-dessus un tiers des feuillets dermiques et cultivés pendant 48h dans du milieu de prolifération. Deux substituts dermiques et un substitut avec kératinocytes ont ensuite été empilés puis placés en culture à l'interface air-liquide (Figure 53). Dans un premier temps, les substituts cutanés ont été cultivés pendant 7 jours avant d'être fixés et colorés afin de caractériser ce modèle et de vérifier la bonne différenciation de l'épiderme.

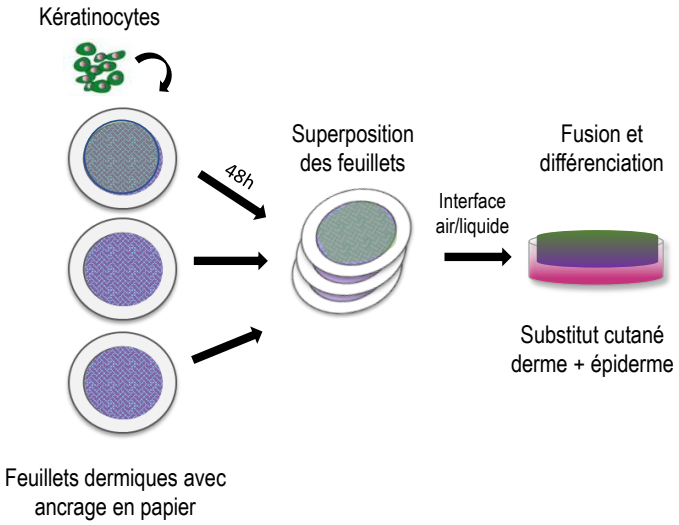


Figure 53 : Protocole de culture des substituts cutanés

Les marquages histologiques montrent que le substitut cutané se compose d'un épiderme différencié au-dessus d'un derme riche en fibroblastes et en fibres de collagènes. Les fibres de collagènes ont été visualisées par différents marquages histologiques, à savoir l'Hématoxyline-Eosine-Safran, le trichrome de Masson-Goldner et le Picrosirius Red, dans lesquels les fibres de collèges apparaissent respectivement en orange, bleu et rose (Figure 54A,B,C). Le substitut cutané est également riche en polysaccharides, notamment en GAGs dans le derme, comme le montre la coloration au Periodic Acid Schiff (Figure 54D). Le marquage de la fibronectine est principalement localisé dans les substituts dermiques les plus profonds (Figure 54E). De manière intéressante, cette distribution non-homogène de la fibronectine dans les substituts dermiques avait été relevée par Magnan et ses collaborateurs sur des substituts dermiques générés également par auto-assemblage [143]. Ces auteurs suggèrent que la fibronectine serait principalement déposée par les fibroblastes proliférants [143].

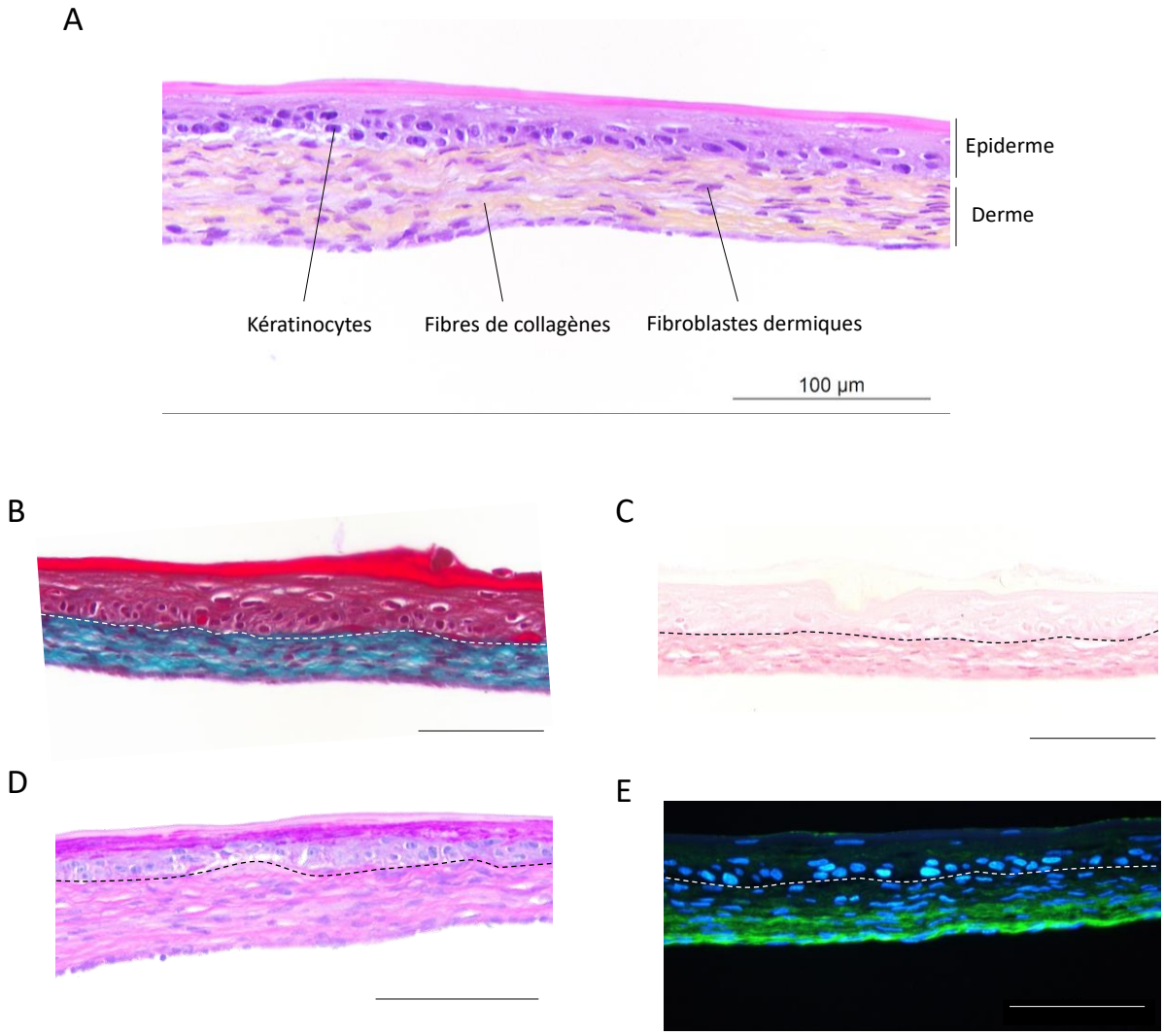


Figure 54 : Caractérisation histologique du modèle de substitut cutané reconstruit par auto-assemblage. A. Coloration Hématoxyline-Eosine-Safran. Les collagènes sont marqués en orange. B. Coloration au Trichrome de Masson-Goldner. Les collagènes sont en bleu. C. Coloration au Picrosirius Red. Les collagènes sont en rose. D. Coloration Periodic Acid Schiff. Les polysaccharides sont en fuchsia. E. Immuomarquage contre la fibronectine (vert). Barre d'échelle 100 µm

Le marquage du Ki67 montre de la prolifération dans la couche basale de l'épiderme (Figure 55A) identifiée par le marquage kératine 14 très important dans la couche basale et la couche épineuse (Figure 55B). Le marquage loricrine montre une distribution localisée dans la couche granuleuse (Figure 55C). La couche cornée est par ailleurs particulièrement mince (entre 5 et 6µm) ce qui démontre que 7 jours de culture à l'interface air/liquide ne sont pas suffisants pour la mise en place d'une couche cornée bien différenciée.

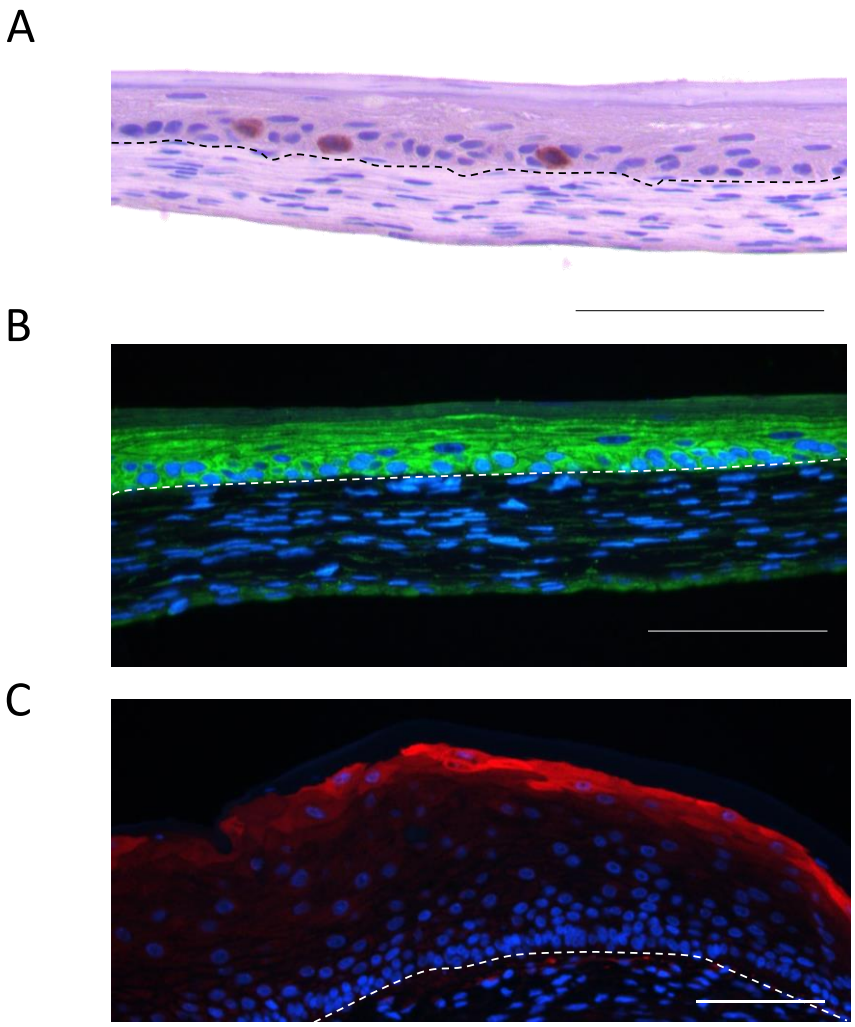


Figure 55 : Caractérisation histologique du modèle de substitut cutané reconstruit par auto-assemblage. A. Marquage des cellules positives Ki67 (marron). B. Marquage contre la kératine 14 (vert). C. Marquage contre la loricrine (rouge). Barre d'échelle 100 µm

Mise au point d'un modèle de cicatrisation

Dans le but d'étudier l'impact des champs électriques de type électrochimiothérapie (ECT) sur la cicatrisation, nous avons essayé de mettre au point un modèle de fermeture de plaie. Nous nous sommes inspirés de l'approche de Dubé et al [46] qui consiste à puncher une partie du modèle. Pour cela, des substituts cutanés ont été générés comme décrit ci-dessus et cultivés pendant 12 jours cette fois pour permettre la formation d'une couche cornée plus épaisse. Au bout de 12 jours, ces substituts ont été punchés à l'aide de punchs à biopsies de 4mm puis déposés sur 3 feuillets dermiques superposés âgés de 4 semaines (Figure 56A). Ces feuillets servent de support de migration aux kératinocytes pendant la fermeture de la plaie. Les échantillons issus des punchs ont été conservés et fixés le jour de la blessure pour être analysés. Les colorations HES et le trichrome de Masson montrent comme précédemment un épiderme différencié et un derme riche en collagènes. La couche cornée est

effectivement plus épaisse grâce aux 12 jours de différenciation à l'interface air/liquide. Il est à noter que les biopsies issues des punchs contractent, ce qui explique la densité du derme observé dans la figure 56 (Figure 56 B,C).

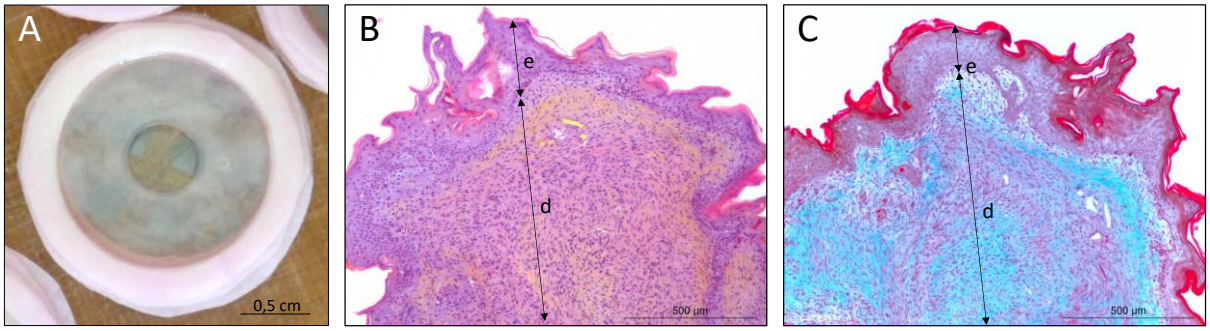


Figure 56 : Caractérisation du modèle de plaie A. Substitut cutané fraichement punché et déposé sur les feuillets de migration. B. Coloration Hématoxyline-Eosine-Safran des punchs. Les collagènes sont marqués en orange. C. Coloration au Trichrome de Masson-Goldner des punchs. Les collagènes sont en bleu. e= épiderme , d= derme

Le lendemain de la lésion les substituts blessés ont été électroporés par ECT (1300 V/cm) et conservés à l'interface air/liquide pendant une semaine supplémentaire. La fermeture de la plaie a été suivie par la prise de photographies chaque jour et par la mesure de la perte en eau transépidermique grâce à un appareil de mesure du TEWL appelé VapoMeter (Delfin Technologies). La mesure du TEWL a montré que la perte en eau augmentait significativement durant les premières 24h puis diminuait progressivement au cours du temps (Figure 57A). Aucune différence n'a été constatée entre les substituts contrôles et ceux électroporés. Cette diminution de la perte transépidermique en eau au fil des jours après la lésion doit correspondre à la réepithélialisation de la plaie et à la restauration de la fonction barrière de l'épiderme. Le suivi de la fermeture de la plaie n'a montré aucune différence entre les témoins et les substituts électroporés, même si la taille de la plaie diminuait au cours du temps et que cette diminution semblait plus rapide pour les témoins dans les 48h premières heures (Figure 57B).

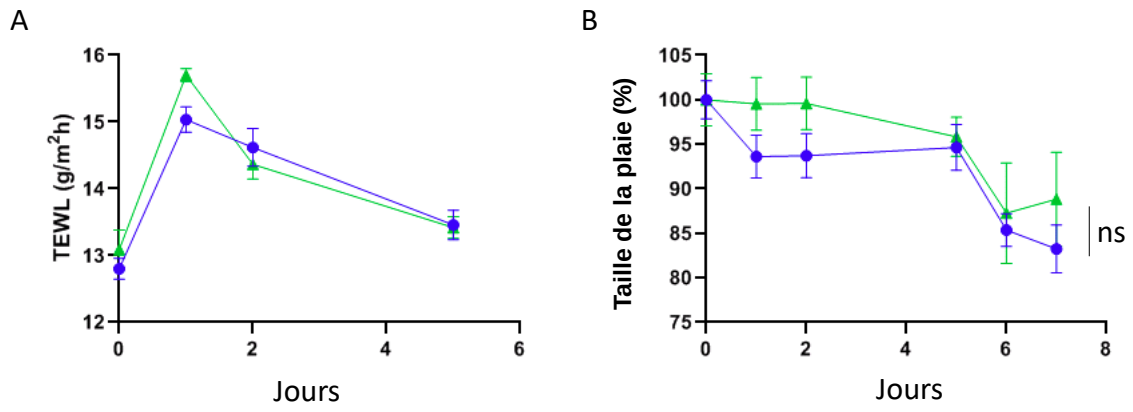


Figure 57 : A. Mesure de la perte d'eau transépidermique (TEWL) dans les substituts blessés soumis au non à un champ électrique de type ECT (1300V/cm). B. Calcul de la taille de la plaie au cours du temps dans les substituts blessés soumis ou non à un champ électrique de type ECT (1300V/cm). Analyse statistique par ANOVA bidirectionelle. Conditions contrôle (Ctrl ●) et électrochimiothérapie (ECT ▲).

Des substituts témoins et électroporés ont été prélevés aux jours 5 et 7 après l'électroporation pour être fixés puis colorés. Les marquages réalisés ont montré que l'application des champs électriques ne modifie pas la structure du substitut cutané ni l'expression des marqueurs étudiés : prolifération (Ki67), couche granuleuse (loricrine), membranes basales (Col IV). Il était surprenant de constater que le marquage collagène IV était retrouvé sur le dessus de chaque feuillet dermique individuel.

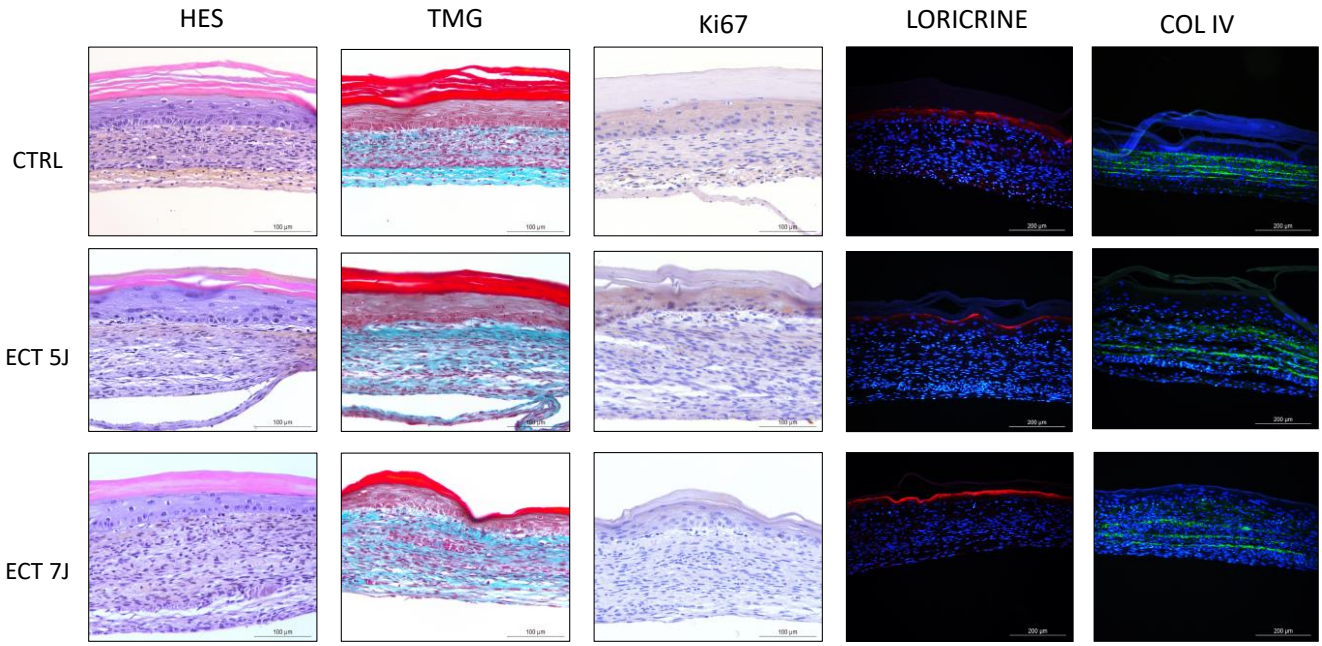


Figure 58 : Colorations histologiques Hématoxyline-Eosine-Safran (HES), Trichrome de Masson-Goldner (TMG), Ki67, et immunomarquages contre la Loricrine et le Collagène IV (Col IV) de la partie non lésée mais exposée aux champs électriques.

c. Discussion

L'idée initiale de cette expérience était d'utiliser les colorations pour suivre la fermeture de la plaie dans le modèle de substitut cutané blessé, notamment la migration puis la différenciation des kératinocytes sur les feuillets de migration. Cependant, la fragilité des substituts au centre de la plaie n'a pas permis de conserver le modèle dans les conditions optimales. Il était délicat de tirer des conclusions des colorations réalisées au niveau de la plaie. Beaucoup plus de jours serait nécessaire pour laisser le temps aux kératinocytes de recoloniser la totalité de la plaie. D'autre part, la taille de la blessure comparativement à celle du substitut ne semble pas optimale pour observer une fermeture dans les 7 jours. Finalement, la méthode de suivi de la fermeture de la plaie par la prise de photographies macroscopiques et le calcul manuel sur ImageJ est assez aléatoire car il est très difficile de visualiser la langue de migration des kératinocytes dans les premiers jours. Il s'agit donc là d'expériences très préliminaires qui nécessiteront encore du temps de mise au point.

L'intégrité de la barrière cutanée aurait pu être évaluée par analyse de la pénétration du colorant fluorescent Lucifer Yellow (LY) à travers la couche cornée et aurait permis de déterminer si les champs électriques affectent cette fonction dans le temps. Le Lucifer Yellow est un petit colorant fluorescent hydrophile qui sera retenu dans la couche cornée dans le cas d'une barrière cutanée normale et fonctionnelle. En revanche, il pénétrera beaucoup plus profondément si la perméabilité a été modifiée par l'altération de cette barrière.

En outre, la première phase de la cicatrisation qui implique une réponse immunitaire complexe n'a pas été abordée dans ce travail car il est au-delà du scope de cette étude. Toutefois, la complexification du modèle pourrait être envisagée par l'ajout de cytokines inflammatoires et de cellules immunitaires comme les macrophages dans le milieu de culture des substituts cutanés.

VI. Discussion générale

La peroxydation des lipides et la production de ROS, en particulier le H_2O_2, ont largement été démontrées suite à l'application de champs électriques pulsés [121–123]. La peroxydation des lipides membranaires et la concentration en ROS augmentent avec l'intensité du champ électrique, la durée des impulsions et le nombre d'impulsions. L'augmentation des ROS intracellulaires et de H_2O_2 dans les cellules exposées à des nanopulses (des impulsions d'une durée de l'ordre de la nanoseconde, c'est-à-dire beaucoup plus courtes que celles que nous utilisons dans cette étude) a également été démontrée *in vitro* [157]. Dans nos conditions expérimentales, le H_2O_2 généré était indétectable dans le milieu de pulsation ainsi que dans le milieu de culture des feuillets électroporés, probablement en raison de sa trop faible quantité (Annexe 3). Toutefois, nous avons démontré que l'exposition aux champs de type électroporation engendrait du stress oxydatif intracellulaire dans les fibroblastes dermiques en monocouche [137]. En effet, une apoptose légère à modérée est apparue dans une partie de la population de fibroblastes dermiques cultivés en 2D soumis aux champs de type GET les plus élevés, et ce, même si les paramètres électriques permettaient 100% d'électroperméabilisation réversible. Cette observation était corrélée avec la génération de stress oxydatif mitochondrial et la production d'anion superoxyde dès 4h après les pulses. Au sein des feuillets dermiques, nous avons montré que l'exposition aux champs de type électroporation induit un remodelage transitoire des collagènes dermiques *via* la suractivation ROS-dépendante des métalloprotéinases matricielles. Bien que les MMPs soient connues pour être activées par les ROS [71,72], leur origine dans nos conditions expérimentales restent à déterminer. En effet, les impulsions appliquées durent moins de 12 secondes et les substituts dermiques sont retirés du tampon de pulsation puis placés dans du milieu de culture frais immédiatement après. Sachant que la demi-vie des ROS est très courte [158], l'origine cellulaire semble la plus plausible. Une hypothèse qui pourrait être avancée est que les ROS produites en réponse aux impulsions électriques activent les MMPs *via* des cascades de signalisation. Les MMPs actives peuvent ensuite elles-mêmes activer d'autre MMPs, expliquant la suractivation prolongée des MMPs observée pendant au moins 48h. Les ROS sont capables d'utiliser une variété de voies intracellulaires pour réguler l'activité des MMPs. Ainsi, la dismutation du superoxyde intracellulaire en peroxyde d'hydrogène serait impliquée dans la régulation de l'activité et de l'expression des MMPs probablement *via* les voies de signalisations RTK-PI3K-NF-κB et Ras-Erk1/2-Ets, Rac-1-JNKAP-1 [159]. L'activation des MMPs par le peroxyde d'hydrogène a en effet été démontrée dans plusieurs types de tumeurs [159]. Il serait intéressant de pousser les investigations afin de déterminer l'origine et la composition des ROS générées au sein du tissu après l'électroporation puis de déterminer les voies de signalisation impliquées.

Dans le chapitre consacré à l'étude du remodelage matriciel, nous avons plus particulièrement étudié les collagènes, composant majoritaire de la matrice extracellulaire dermique. Une diminution

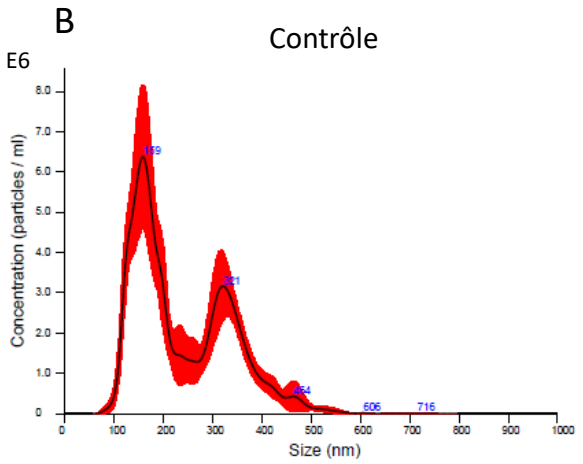
transitoire de la production du procollagène de type 1a1 a été démontrée dans les feuillets électroporés et une diminution transitoire de la teneur en hydroxyproline dans le tissu a été observée dans la semaine suivant l'électroporation. Comme expliqué ci-dessus, ce remodelage des collagènes s'est avéré être principalement dépendant des MMPs en raison de leur suractivation ROS-dépendante après les pulses. Cependant, les ROS pourraient également impacter d'autres composants tels que les glycosaminoglycanes, soit directement, soit par l'intermédiaire des hyaluronidases et héparinases [159]. La quantification des glycosaminoglycanes sulfatés dans les substituts dermiques n'a pas montré de modification après l'application des champs électriques (Figure 40). On pouvait toutefois constater une grande variabilité entre les réplicas ce qui ne permet pas de conclure avec certitude. Les autres composants tels que les glycosaminoglycanes non sulfatés, les protéoglycanes, et la fibrine par exemple, n'ont pas été étudiés mais ils sont susceptibles d'être dégradés par des protéases activées par les ROS au même titre que les collagènes [70].

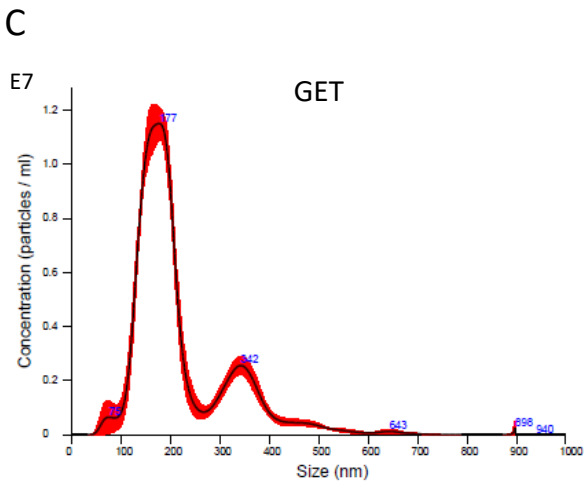
Nous avons par ailleurs montré que le sécrétome des cellules cutanées est modifié par les paramètres de champ électrique de type GET et ECT [137,153] et que la composition de ce sécrétome peut stimuler la migration de fibroblastes dermiques et de cellules endothéliales et promouvoir la formation de réseaux vasculaires *in vitro*. Outre les protéines solubles, ce sécrétome pourrait contenir des vésicules extracellulaires. Les vésicules extracellulaires sont des structures produites par les cellules que l'on retrouve dans l'espace extracellulaire. Selon leur origine, leur taille et leur composition biochimique, elles sont généralement classées en trois catégories : exosomes, microvésicules (MV) et corps apoptotiques [160]. Ces vésicules extracellulaires jouent un rôle important dans la communication intercellulaire en servant de véhicules pour le transport de molécules, protéines, lipides et acides nucléiques [160]. Prevc et ses collaborateurs ont d'ailleurs démontré que l'application de champs électriques pulsés de type électroporation sur des cellules de mélanome induisait la libération de microvésicules et que les quantités dépendaient des paramètres électriques appliqués [130]. De façon intéressante, il existe également un lien étroit entre les ROS et les vésicules extracellulaires. D'une part, les microvésicules pourraient modifier directement et/ou indirectement la teneur en ROS dans les compartiments extra et intracellulaires [161]. Et d'autre part, le nombre et le contenu des microvésicules produites par les cellules sont modifiés par le stress oxydatif [160]. Les conditions pro-oxydantes semblent ainsi stimuler la libération de vésicules extracellulaires [162]. L'analyse du sécrétome par NTA (Nanoparticle Tracking Analysis), 4h après l'électroporation des feuillets dermiques montre que la taille moyenne des particules est comprise entre 160 et 180 nm ce qui pourrait effectivement correspondre à des vésicules extracellulaires (Figure 59). On peut distinguer deux pics de taille majoritaires pour les particules, le plus important se trouvant entre 160 et 180nm, et le deuxième, plus faible, entre 320 et 350nm. Ce deuxième pic pourrait correspondre à la fusion de deux particules.

D'autre part, la concentration de ces particules dans le sécrétome était 50% plus élevée 4h après les impulsions de type GET que dans le contrôle alors que la différence de concentration n'était pas statistique 4h après les impulsions de type ECT (Figure 59). Cette analyse préliminaire du sécrétome confirme que les paramètres GET sont plus enclins à moduler le comportement cellulaire que les paramètres ECT. Une partie des vésicules extracellulaires ayant une origine membranaire, il n'est pas surprenant d'envisager que l'application de champs électriques qui déstabilisent fortement la membrane plasmique puisse augmenter la formation de vésicules extracellulaires. La caractérisation des vésicules extracellulaires sécrétées ainsi que de leur contenu pourrait faire l'objet d'une prochaine étude.

A

Conditions	Concentration (particules /ml)	
Contrôle	8,66e+08	+/- 7,76e+07
GET	1,33e+09	+/- 3,00e+07
ECT	6,98e+08	+/- 1,05e+08





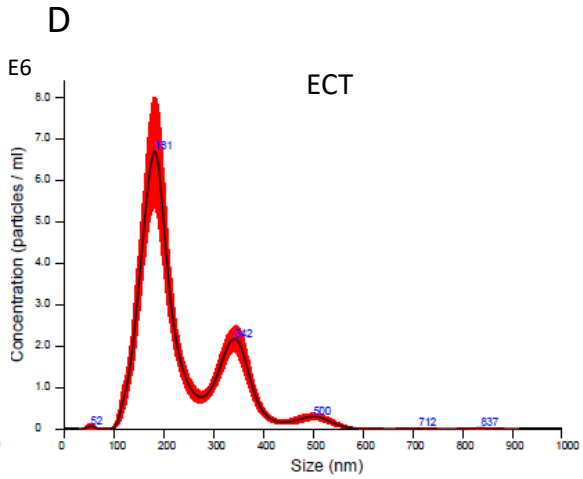


Figure 59 : Analyse du sécrétome par NTA. A. Concentration moyenne des particules dans le sécrétome des feuillets dermiques. Distribution de taille des particules dans le sécrétome des feuillets dermiques contrôles (0 V/cm) (B), et 4h après l'application des champs électriques de type GET (600V/cm) (C) et ECT (1000 V/cm) (D). La zone rouge représente l'erreur standard à la moyenne (SEM).

Ces travaux de thèse montrent que l'utilisation de méthodes physiques de modulation des ROS est une stratégie pertinente pour remodeler localement la matrice extracellulaire. Cette observation est soutenue par le nombre croissant de publications suggérant que les approches physiques connues pour générer une grande quantité de ROS, telle que le plasma froid atmosphérique et la photothérapie

dynamique, ont la capacité de modifier les propriétés vasculaires et la matrice extracellulaire dans un contexte tumoral [163]. Ce sujet fait l'objet d'une revue publiée au cours de cette thèse (Annexe 4). Quelques études ont évalué l'effet du plasma, une technique physique générant de nombreuses RONS à courte et longue durée de vie, sur les composants de la matrice extracellulaire [164] [165] [166] et ont également démontré un effet positif sur l'angiogenèse [167]. Cependant, les modèles utilisés ne comprennent généralement pas la dynamique structurelle et fonctionnelle entre les cellules et les composants de la matrice. Dans une courte étude menée parallèlement à cette thèse, nous avons donc proposé d'évaluer le potentiel de jet de plasma d'hélium à remodeler directement les collagènes, en utilisant le modèle de substitut dermique. Nous avons : 1) analysé le remodelage des collagènes après traitement par jet de plasma d'hélium, en quantifiant à la fois la sécrétion de pro-collagène I et la teneur globale en collagènes, 2) quantifié l'activité globale des métalloprotéases et le contenu en MMP1, principaux acteurs de la maintenance et du remodelage de la matrice extracellulaire dermique (Annexe 5). En quelques mots, bien qu'il génère une grande quantité de RONS, le jet de plasma d'hélium n'induit aucun remodelage des collagènes dans notre modèle, aussi bien en termes de sécrétion de pro-collagène I, de contenu en hydroxyproline, que d'activation des MMPs.

En conclusion, ces travaux mettent en lumière la pertinence de l'utilisation d'approches physiques comme stratégie de remodelage de l'environnement matriciel et vasculaire. Ces approches sont également particulièrement intéressantes pour contrôler et améliorer localement l'administration de médicaments et pourraient être un puissant adjuvant à la délivrance de nanomédecines [163]. En effet, le remodelage matriciel et l'augmentation de la perméabilité vasculaire par ces approches pourraient permettre d'optimiser la fenêtre thérapeutique en préparant l'environnement tumoral, par exemple, avant la délivrance de drogues anticancéreuses. En effet, dans le cas des tumeurs, l'efficacité de délivrance des nanomédecines est souvent compromise par la nature du micro-environnement tumoral, notamment par l'existence d'une matrice extracellulaire très dense autour de la tumeur qui limite leur diffusion [163]. Les approches physiques offrent en outre des avantages particuliers par rapport aux approches pharmacologiques ou chirurgicales car elles sont moins invasives et sont contrôlables dans le temps et dans l'espace, ce qui induit une plus grande efficacité thérapeutique tout en limitant drastiquement les effets secondaires des traitements systémiques [163]. Ceci ouvre de nombreuses perspectives pour l'application clinique de ces technologies.

VIII. Références

1. Neumann, E. & Rosenheck, K. Permeability changes induced by electric impulses in vesicular membranes. *J. Membr. Biol.* **10**, 279–290 (1972).
2. Teissié, J. *et al.* Recent biotechnological developments of electropulsation. A prospective review. *Bioelectrochemistry* **55**, 107–112 (2002).
3. Weaver, J. C. & Chizmadzhev, Yu. A. Theory of electroporation: A review. *Bioelectrochem. Bioenerg.* **41**, 135–160 (1996).
4. Kranjc, M. *et al.* Predicting irreversible electroporation-induced tissue damage by means of magnetic resonance electrical impedance tomography. *Sci. Rep.* **7**, 10323 (2017).
5. Valič, B., Pavlin, M. & Miklavčič, D. The effect of resting transmembrane voltage on cell electropermeabilization: a numerical analysis. *Bioelectrochemistry* **63**, 311–315 (2004).
6. Rols, M.-P., Golzio, M., Delteil, C. & Teissié, J. In Vitro Delivery of Drugs and Other Molecules to Cells. in *Electrochemotherapy, Electrogenetherapy, and Transdermal Drug Delivery: Electrically Mediated Delivery of Molecules to Cells* (eds. Jaroszeski, M. J., Heller, R. & Gilbert, R.) 83–97 (Humana Press, 2000). doi:10.1385/1-59259-080-2:83.
7. Teissié, J. & Rols, M. P. An experimental evaluation of the critical potential difference inducing cell membrane electropermeabilization. *Biophys. J.* **65**, 409–413 (1993).
8. Rols, M. P. & Teissié, J. Electropermeabilization of mammalian cells. Quantitative analysis of the phenomenon. *Biophys. J.* **58**, 1089–1098 (1990).
9. Schwan, H. P. Electrical Properties of Tissue and Cell Suspensions* *This work was supported in part by grants from the United States Public Health Service, H-1253(c2-4) and in part by the Office of Naval Research, 119–289. in *Advances in Biological and Medical Physics* (eds. Lawrence, J. H. & Tobias, C. A.) vol. 5 147–209 (Elsevier, 1957).

10. Kotnik, T. & Pucihar, G. ADVANCED ELECTROPORATION TECHNIQUES IN BIOLOGY AND MEDICINE. 20 (2010).

11. Thürk, M. & Porschke, D. Phase transition of dimyristoylphosphatidylglycerol bilayers induced by electric field pulses. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Biomembr.* **1067**, 153–158 (1991).

12. Cruzeiro-Hansson, L. & Mouritsen, O. G. Passive ion permeability of lipid membranes modelled via lipid-domain interfacial area. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Biomembr.* **944**, 63–72 (1988).

13. Cemazar, M., Kotnik, T., Sersa, G. & Miklavcic, D. Electroporation for Electrochemotherapy and Gene Therapy. in *Electromagnetic Fields in Biology and Medicine* (ed. Markov, M.) 395–414 (CRC Press, 2015). doi:10.1201/b18148-25.

14. Tarek, M. Membrane electroporation: a molecular dynamics simulation. *Biophys. J.* **88**, 4045–4053 (2005).

15. Rems, L., Viano, M., Kasimova, M. A., Miklavčič, D. & Tarek, M. The contribution of lipid peroxidation to membrane permeability in electropermeabilization: A molecular dynamics study. *Bioelectrochemistry* **125**, 46–57 (2019).

16. Marnett, L. J. Lipid peroxidation-DNA damage by malondialdehyde. *Mutat. Res.* **424**, 83–95 (1999).

17. Uchida, K. 4-Hydroxy-2-nonenal: a product and mediator of oxidative stress. *Prog. Lipid Res.* **42**, 318–343 (2003).

18. Mir, L. *et al.* First clinical trial of cat soft-tissue sarcomas treatment by electrochemotherapy. *Br. J. Cancer* **76**, 1617–1622 (1997).

19. Spugnini, E. P. *et al.* Patterns of tumor response in canine and feline cancer patients treated with electrochemotherapy: preclinical data for the standardization of this treatment in pets and humans. *J. Transl. Med.* **5**, 48 (2007).

20. Spugnini, E. P. *et al.* Electroporation Enhances Bleomycin Efficacy in Cats with Periocular Carcinoma and Advanced Squamous Cell Carcinoma of the Head. *J. Vet. Intern. Med.* **29**, 1368–1375 (2015).

21. Tamzali, Y. *et al.* Successful treatment of equine sarcoids with cisplatin electrochemotherapy: A retrospective study of 48 cases: Cisplatin electrochemotherapy of equine sarcoid. *Equine Vet. J.* **44**, 214–220 (2012).

22. Tozon, N., Kramaric, P., Kos Kadunc, V., Sersa, G. & Cemazar, M. Electrochemotherapy as a single treatment or adjuvant treatment to surgery of cutaneous sarcoid tumours in horses: a 31-case retrospective study. *Vet. Rec.* **179**, 627–627 (2016).

23. Mir, L. M. *et al.* [Electrochemotherapy, a new antitumor treatment: first clinical trial]. *C. R. Acad. Sci. III* **313**, 613–618 (1991).

24. Gehl, J. & Geertsen, P. F. Efficient palliation of haemorrhaging malignant melanoma skin metastases by electrochemotherapy. *Melanoma Res.* **10**, 585–589 (2000).

25. Heller, L. C. & Heller, R. In vivo electroporation for gene therapy. *Hum. Gene Ther.* **17**, 890–897 (2006).

26. Rols, M. P. *et al.* Electrochemotherapy of cutaneous metastases in malignant melanoma. *Melanoma Res.* **10**, 468–474 (2000).

27. Sersa, G., Stabuc, B., Cemazar, M., Miklavcic, D. & Rudolf, Z. Electrochemotherapy with cisplatin: clinical experience in malignant melanoma patients. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* **6**, 863–867 (2000).

28. Marty, M. *et al.* Electrochemotherapy – An easy, highly effective and safe treatment of cutaneous and subcutaneous metastases: Results of ESOPE (European Standard Operating Procedures of Electrochemotherapy) study. *Eur. J. Cancer Suppl.* **4**, 3–13 (2006).

29. Sersa, G., Cemazar, M. & Snoj, M. Electrochemotherapy of tumours. *Curr. Oncol. Tor. Ont* **16**, 34–35 (2009).

30. Seyed Jafari, S. M. *et al.* Application of electrochemotherapy in the management of primary and metastatic cutaneous malignant tumours: a systematic review and meta-analysis. *Eur. J. Dermatol. EJD* **28**, 287–313 (2018).

31. Kis, E. *et al.* Successful treatment of multiple basaliomas with bleomycin-based electrochemotherapy: A case series of three patients with gorlin-goltz syndrome. *Acta Derm Venereol* **92**, 648–651 (2012).

32. Lucas, M. L. & Heller, R. IL-12 Gene Therapy Using an Electrically Mediated Nonviral Approach Reduces Metastatic Growth of Melanoma. *DNA Cell Biol.* **22**, 755–763 (2003).

33. Lee, E. W., Thai, S. & Kee, S. T. Irreversible Electroporation: A Novel Image-Guided Cancer Therapy. *Gut Liver* **4**, S99–S104 (2010).

34. Maor, E., Ivorra, A., Leor, J. & Rubinsky, B. The effect of irreversible electroporation on blood vessels. *Technol. Cancer Res. Treat.* **6**, 307–312 (2007).

35. Golberg, A. *et al.* Skin regeneration with all accessory organs following ablation with irreversible electroporation. *J. Tissue Eng. Regen. Med.* **12**, 98–113 (2018).

36. Golberg, A. *et al.* Preventing Scars after Injury with Partial Irreversible Electroporation. *J. Invest. Dermatol.* **136**, 2297–2304 (2016).

37. Golberg, A. *et al.* Skin Rejuvenation with Non-Invasive Pulsed Electric Fields. *Sci. Rep.* **5**, 10187 (2015).

38. Lai-Cheong, J. E. & McGrath, J. A. Structure and function of skin, hair and nails. *Medicine (Baltimore)* **45**, 347–351 (2017).

39. Rawlings, A. V. & Matts, P. J. Stratum Corneum Moisturization at the Molecular Level: An Update in Relation to the Dry Skin Cycle. *J. Invest. Dermatol.* **124**, 1099–1110 (2005).

40. Madison, K. C. Barrier Function of the Skin: “La Raison d’Être” of the Epidermis. *J. Invest. Dermatol.* **121**, 231–241 (2003).

41. Kabashima, K., Honda, T., Ginhoux, F. & Egawa, G. The immunological anatomy of the skin. *Nat. Rev. Immunol.* (2018) doi:10.1038/s41577-018-0084-5.

42. Norris, D. A. Structure and Function of the Skin. in *Goldman’s Cecil Medicine* 2498–2503 (Elsevier, 2012). doi:10.1016/B978-1-4377-1604-7.00443-7.

43. Haake, A., Scott, G. A. & Holbrook, K. Structure and function of the skin: Overview of the epidermis and dermis. *Biol. Skin* 19–45 (2001).

44. Khavkin, J. & Ellis, D. A. F. Aging Skin: Histology, Physiology, and Pathology. *Facial Plast. Surg. Clin. N. Am.* **19**, 229–234 (2011).

45. Foulds, I. S. & Barker, A. T. Human skin battery potentials and their possible role in wound healing. *Br. J. Dermatol.* **109**, 515–522 (1983).

46. Dubé, J. *et al.* Restoration of the Transepithelial Potential Within Tissue-Engineered Human Skin and During the Wound Healing Process. *Tissue Eng. Part A* **16**, 3055–3063 (2010).

47. Dagenais, A., Boncoeur, É. & Berthiaume, Y. Transport du Na+ dans les poumons - Impact différentiel du canal ENaC dans les voies aériennes et les alvéoles. *médecine/sciences* **25**, 815–820 (2009).

48. Barker, A. T., Jaffe, L. F. & Vanable, J. W. The glabrous epidermis of cavies contains a powerful battery. *Am. J. Physiol.-Regul. Integr. Comp. Physiol.* **242**, R358–R366 (1982).

49. Nuccitelli, R. Endogenous ionic currents and DC electric fields in multicellular animal tissues. *Bioelectromagnetics* **13**, 147–157 (1992).

50. Zhao, M. *et al.* Electrical signals control wound healing through phosphatidylinositol-3-OH kinase-γ and PTEN. *Nature* **442**, 457–460 (2006).

51. Kanno, S. *et al.* Establishment of a Simple and Practical Procedure Applicable to Therapeutic Angiogenesis. *Circulation* **99**, 2682–2687 (1999).

52. Zhao, M., Bai, H., Wang, E., Forrester, J. V. & McCaig, C. D. Electrical stimulation directly induces pre-angiogenic responses in vascular endothelial cells by signaling through VEGF receptors. *J. Cell Sci.* **117**, (2004).

53. Tomasek, J. J., Gabbiani, G., Hinz, B., Chaponnier, C. & Brown, R. A. Myofibroblasts and mechano-regulation of connective tissue remodelling. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **3**, 349–363 (2002).

54. Hinz, B. Myofibroblasts. *Exp. Eye Res.* **142**, 56–70 (2016).

55. Pakshir, P. & Hinz, B. The big five in fibrosis: Macrophages, myofibroblasts, matrix, mechanics, and miscommunication. *Matrix Biol.* **68–69**, 81–93 (2018).

56. Bauer, S. M., Bauer, R. J. & Velazquez, O. C. Angiogenesis, Vasculogenesis, and Induction of Healing in Chronic Wounds. *Vasc. Endovascular Surg.* **39**, 293–306 (2005).

57. Braverman, I. M. The Cutaneous Microcirculation. *J. Investig. Dermatol. Symp. Proc.* **5**, 3–9 (2000).

58. Risau, W. & Flamme, I. Vasculogenesis. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **11**, 73–91 (1995).

59. Risau, W. Mechanisms of angiogenesis. *Nature* **386**, 671–674 (1997).

60. Vailhé, B., Vittet, D. & Feige, J.-J. In Vitro Models of Vasculogenesis and Angiogenesis. *Lab. Invest.* **81**, 439–452 (2001).

61. Lohela, M., Saaristo, A., Veikkola, T. & Alitalo, K. Lymphangiogenic growth factors, receptors and therapies. *Thromb. Haemost.* **90**, 167–184 (2003).

62. Mine, S., Fortunel, N. O., Pageon, H. & Asselineau, D. Aging Alters Functionally Human Dermal Papillary Fibroblasts but Not Reticular Fibroblasts: A New View of Skin Morphogenesis and Aging. *PLoS ONE* **3**, e4066 (2008).

63. Ricard-Blum, S. & Salza, R. Matricryptins and matrikines: biologically active fragments of the extracellular matrix. *Exp. Dermatol.* **23**, 457–463 (2014).

64. Davidson, J. M. & Berg, R. A. Chapter 9 Posttranslational Events in Collagen Biosynthesis. in *Methods in Cell Biology* (eds. Hand, A. R. & Oliver, C.) vol. 23 119–136 (Academic Press, 1981).

65. Yue, B. Biology of the Extracellular Matrix: An Overview. *J. Glaucoma* S20–S23 (2014) doi:10.1097/IJG.0000000000000108.

66. Collighan, R. J. & Griffin, M. Transglutaminase 2 cross-linking of matrix proteins: biological significance and medical applications. *Amino Acids* **36**, 659–670 (2009).

67. Lu, P., Takai, K., Weaver, V. M. & Werb, Z. Extracellular Matrix Degradation and Remodeling in Development and Disease. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **3**, (2011).

68. Paulhe, F. *et al.* Integrin function and signaling as pharmacological targets in cardiovascular diseases and in cancer. *Curr. Pharm. Des.* **11**, 2119–2134 (2005).

69. Wilgus, T. A. Growth Factor–Extracellular Matrix Interactions Regulate Wound Repair. *Adv. Wound Care* **1**, 249–254 (2012).

70. Stamenkovic, I. Extracellular matrix remodelling: the role of matrix metalloproteinases. *J. Pathol.* **200**, 448–464 (2003).

71. Kähäri, V.-M. & Saarialho-Kere, U. Matrix metalloproteinases in skin. *Exp. Dermatol.* **6**, 199–213 (1997).

72. Amălinei, C., Căruntu, I.-D. & Bălan, R. A. Biology of metalloproteinases. *Rom J Morphol Embryol* **48**, 323–334 (2007).

73. Berg, G., Barchuk, M. & Miksztowicz, V. Behavior of Metalloproteinases in Adipose Tissue, Liver and Arterial Wall: An Update of Extracellular Matrix Remodeling. 13 (2019).

74. Visse, R. & Nagase, H. Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases: structure, function, and biochemistry. *Circ. Res.* **92**, 827–839 (2003).

75. Nagase, H. Activation mechanisms of matrix metalloproteinases. *Biol. Chem.* **378**, 151–160 (1997).

76. Gerber, P. A. *et al.* The top skin-associated genes: a comparative analysis of human and mouse skin transcriptomes. *Biol. Chem.* **395**, (2014).

77. Khorshid, F. A. Comparative study of keloid formation in humans and laboratory animals. *Med Sci Monit* **11**, (2005).

78. Dellambra, E., Odorisio, T., D'Arcangelo, D., Failla, C. M. & Facchiano, A. Non-animal models in dermatological research. *ALTEX - Altern. Anim. Exp.* **36**, 177–202 (2019).

79. Debeer, S. *et al.* Comparative histology and immunohistochemistry of porcine versus human skin. *Eur. J. Dermatol. EJD* **23**, 456–466 (2013).

80. Balls, M. 19. Russell and Burch after 1959. *Altern. Lab. Anim.* **43**, P59–P60 (2015).

81. Eberlin, S. *et al.* The Ex Vivo Skin Model as an Alternative Tool for the Efficacy and Safety Evaluation of Topical Products. *Altern. Lab. Anim.* **48**, 10–22 (2020).

82. Ataç, B. *et al.* Skin and hair on-a-chip: in vitro skin models versus ex vivo tissue maintenance with dynamic perfusion. *Lab. Chip* **13**, 3555 (2013).

83. Langer, R. & Vacanti, J. P. Tissue engineering. *Science* **260**, 920–926 (1993).

84. Badylak, S., Freytes, D. & Gilbert, T. Extracellular matrix as a biological scaffold material: Structure and function. *Acta Biomater.* **5**, 1–13 (2009).

85. Ovsianikov, A., Khademhosseini, A. & Mironov, V. The Synergy of Scaffold-Based and Scaffold-Free Tissue Engineering Strategies. *Trends Biotechnol.* **36**, 348–357 (2018).

86. Abe, T., Abe, Y., Aida, Y., Hara, Y. & Maeda, K. Extracellular matrix regulates induction of alkaline phosphatase expression by ascorbic acid in human fibroblasts. *J. Cell. Physiol.* **189**, 144–151 (2001).

87. Dahl, S. L. M., Rucker, R. B. & Niklason, L. E. Effects of copper and cross-linking on the extracellular matrix of tissue-engineered arteries. *Cell Transplant.* **14**, 367–374 (2005).

88. Chabaud, S. *et al.* Lysophosphatidic acid enhances collagen deposition and matrix thickening in engineered tissue. *J. Tissue Eng. Regen. Med.* **9**, E65-75 (2015).

89. Athanasiou, K. A., Eswaramoorthy, R., Hadidi, P. & Hu, J. C. Self-organization and the self-assembling process in tissue engineering. *Annu. Rev. Biomed. Eng.* **15**, 115–136 (2013).

90. Auger, F. A., Lacroix, D. & Germain, L. Skin Substitutes and Wound Healing. *Skin Pharmacol. Physiol.* **22**, 94–102 (2009).

91. Michel, M. *et al.* Characterization of a new tissue-engineered human skin equivalent with hair. *In Vitro Cell. Dev. Biol. Anim.* **35**, 318–326 (1999).

92. Davidson, J. M., LuValle, P. A., Zoia, O., Quaglino, D. & Giro, M. Ascorbate differentially regulates elastin and collagen biosynthesis in vascular smooth muscle cells and skin fibroblasts by pretranslational mechanisms. *J. Biol. Chem.* **272**, 345–352 (1997).

93. Gibot, L., Galbraith, T., Huot, J. & Auger, F. A. A Preexisting Microvascular Network Benefits *In Vivo* Revascularization of a Microvascularized Tissue-Engineered Skin Substitute. *Tissue Eng. Part A* **16**, 3199–3206 (2010).

94. Alrubaiy, L. & Al-Rubaiy, K. K. Skin substitutes: a brief review of types and clinical applications. *Oman Med. J.* **24**, 4–6 (2009).

95. Campana, L. G. *et al.* Electrochemotherapy – Emerging applications technical advances, new indications, combined approaches, and multi-institutional collaboration. *Eur. J. Surg. Oncol.* **45**, 92–102 (2019).

96. Lee, P.-Y., Chesnoy, S. & Huang, L. Electroporatic Delivery of TGF-β1 Gene Works Synergistically with Electric Therapy to Enhance Diabetic Wound Healing in db/db Mice. *J. Invest. Dermatol.* **123**, 791–798 (2004).

97. Auger, F. A. *et al.* Multistep production of bioengineered skin substitutes: Sequential modulation of culture conditions. *Vitro Cell. Dev. Biol. - Anim.* **36**, 96–103 (2000).

98. Davis, P. K., Ho, A. & Dowdy, S. F. Biological Methods for Cell-Cycle Synchronization of Mammalian Cells. *BioTechniques* **30**, 1322–1331 (2001).

99. Edgar, R., Domrachev, M. & Lash, A. E. Gene Expression Omnibus: NCBI gene expression and hybridization array data repository. *Nucleic Acids Res.* **30**, 207–210 (2002).

100. Donovan, J., Shiwen, X., Norman, J. & Abraham, D. Platelet-derived growth factor alpha and beta receptors have overlapping functional activities towards fibroblasts. *Fibrogenesis Tissue Repair* **6**, (2013).

101. Wang, Q. *et al.* Infrared imaging of compositional changes in inflammatory cardiomyopathy. *Vib. Spectrosc.* **38**, 217–222 (2005).

102. Staniszewska, E., Malek, K. & Baranska, M. Rapid approach to analyze biochemical variation in rat organs by ATR FTIR spectroscopy. *Spectrochim. Acta - Part Mol. Biomol. Spectrosc.* **118**, 981–986 (2014).

103. Kranjc, M. & Miklavčič, D. Electric Field Distribution and Electroporation Threshold. in *Handbook of Electroporation* (ed. Miklavcic, D.) 1–17 (Springer International Publishing, 2016). doi:10.1007/978-3-319-26779-1_4-1.

104. Corovic, S. *et al.* Modeling of electric field distribution in tissues during electroporation. *Biomed. Eng. OnLine* **12**, 16 (2013).

105. Rems, L. *et al.* Cell electrofusion using nanosecond electric pulses. *Sci. Rep.* **3**, 3382 (2013).

106. Mekid, H. & Mir, L. M. In vivo cell electrofusion. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Gen. Subj.* **1524**, 118–130 (2000).

107. Madi, M., Rols, M.-P. & Gibot, L. Gene Electrotransfer in 3D Reconstructed Human Dermal Tissue. *Curr. Gene Ther.* **16**, 75–82 (2016).

108. Jonkman, J. E. N. *et al.* An introduction to the wound healing assay using live-cell microscopy. *Cell Adhes. Migr.* **8**, 440–451 (2014).

109. Phez, E., Gibot, L. & Rols, M.-P. How transient alterations of organelles in mammalian cells submitted to electric field may explain some aspects of gene electrotransfer process. *Bioelectrochemistry* **112**, 166–172 (2016).

110. Zorova, L. D. *et al.* Mitochondrial membrane potential. *Anal. Biochem.* **552**, 50–59 (2018).

111. Robinson, K. M., Janes, M. S. & Beckman, J. S. The selective detection of mitochondrial superoxide by live cell imaging. *Nat. Protoc.* **3**, 941–947 (2008).

112. Funk, R. H. W. Endogenous electric fields as guiding cue for cell migration. *Front. Physiol.* **6**, 143–143 (2015).

113. Zhao, M. *et al.* Electrical signals control wound healing through phosphatidylinositol-3-OH kinase-γ and PTEN. *Nature* **442**, 457 (2006).

114. Kim, M. S. *et al.* Golgi polarization plays a role in the directional migration of neonatal dermal fibroblasts induced by the direct current electric fields. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **460**, 255–260 (2015).

115. Guo, A. *et al.* Effects of Physiological Electric Fields on Migration of Human Dermal Fibroblasts. *J. Invest. Dermatol.* **130**, 2320–2327 (2010).

116. Fang, K. S., Ionides, E., Oster, G., Nuccitelli, R. & Isseroff, R. R. Epidermal growth factor receptor relocalization and kinase activity are necessary for directional migration of keratinocytes in DC electric fields. *J. Cell Sci.* **112 (Pt 12)**, 1967–1978 (1999).

117. Zhao, M., Pu, J., Forrester, J. V. & McCaig, C. D. Membrane lipids, EGF receptors, and intracellular signals co-localize and are polarized in epithelial cells moving directionally in a physiological electric field. *FASEB J* **16**, (2002).

118. Pullar, C. E. *et al.* beta4 integrin and epidermal growth factor coordinately regulate electric field-mediated directional migration via Rac1. *Mol. Biol. Cell* **17**, 4925–4935 (2006).

119. Bourguignon, G. J. & Bourguignon, L. Y. Electric stimulation of protein and DNA synthesis in human fibroblasts. *FASEB J.* **1**, 398–402 (1987).

120. Dunnill, C. *et al.* Reactive oxygen species (ROS) and wound healing: the functional role of ROS and emerging ROS-modulating technologies for augmentation of the healing process. *Int. Wound J.* **14**, 89–96 (2017).

121. Gabriel, B. & Teissié, J. Generation of reactive-oxygen species induced by electropermeabilization of Chinese hamster ovary cells and their consequence on cell viability. *Eur. J. Biochem.* **223**, 25–33 (1994).

122. Bonnafous, P., Vernhes, M., Teissié, J. & Gabriel, B. The generation of reactive-oxygen species associated with long-lasting pulse-induced electropermeabilisation of mammalian cells is based on a non-destructive alteration of the plasma membrane. *Biochim. Biophys. Acta* **1461**, 123–134 (1999).

123. Kotnik, T., Rems, L., Tarek, M. & Miklavčič, D. Membrane Electroporation and Electropermeabilization: Mechanisms and Models. *Annu. Rev. Biophys.* **48**, 63–91 (2019).

124. Maldaner, D. R. *et al.* In vitro effect of low-level laser therapy on the proliferative, apoptosis modulation, and oxi-inflammatory markers of premature-senescent hydrogen peroxide-induced dermal fibroblasts. *Lasers Med. Sci.* **34**, 1333–1343 (2019).

125. Calvet, C. Y., Famin, D., André, F. M. & Mir, L. M. Electrochemotherapy with bleomycin induces hallmarks of immunogenic cell death in murine colon cancer cells. *Oncoimmunology* **3**, e28131 (2014).

126. Kroemer, G., Galluzzi, L., Kepp, O. & Zitvogel, L. Immunogenic cell death in cancer therapy. *Annu. Rev. Immunol.* **31**, 51–72 (2013).

127. Nanney, L. B. *et al.* Calreticulin enhances porcine wound repair by diverse biological effects. *Am. J. Pathol.* **173**, 610–630 (2008).

128. Gendaszewska-Darmach, E. & Kucharska, M. Nucleotide receptors as targets in the pharmacological enhancement of dermal wound healing. *Purinergic Signal.* **7**, 193–206 (2011).

129. Iii, A. L. F. *et al.* Tunable activation of therapeutic platelet-rich plasma by pulse electric field: Differential effects on clot formation, growth factor release, and platelet morphology. *PLOS ONE* **13**, e0203557 (2018).

130. Prevc, A. *et al.* Bystander Effect Induced by Electroporation is Possibly Mediated by Microvesicles and Dependent on Pulse Amplitude, Repetition Frequency and Cell Type. *J. Membr. Biol.* **249**, 703–711 (2016).

131. Hynes, R. O. & Naba, A. Overview of the Matrisome—An Inventory of Extracellular Matrix Constituents and Functions. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **4**, a004903 (2012).

132. Tang, R. *et al.* Identification of ageing biomarkers in human dermis biopsies by thermal analysis (DSC) combined with Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR/ATR). *Skin Res. Technol.* **23**, 573–580 (2017).

133. Belbachir, K., Noreen, R., Gouspillou, G. & Petibois, C. Collagen types analysis and differentiation by FTIR spectroscopy. *Anal. Bioanal. Chem.* **395**, 829–837 (2009).

134. Wood, B. R. The importance of hydration and DNA conformation in interpreting infrared spectra of cells and tissues. **45**, 1980–1998 (2016).

135. Eden, E., Navon, R., Steinfeld, I., Lipson, D. & Yakhini, Z. GOrilla: a tool for discovery and visualization of enriched GO terms in ranked gene lists. *BMC Bioinformatics* **10**, 48 (2009).

136. Naba, A. *et al.* The extracellular matrix: Tools and insights for the “omics” era. *Matrix Biol.* **49**, 10–24 (2016).

137. Gouarderes, S. *et al.* Electroporation does not affect human dermal fibroblast proliferation and migration properties directly but indirectly via the secretome. *Bioelectrochemistry* **134**, 107531 (2020).

138. Badea, E., Della Gatta, G. & Budrugeac, P. Characterisation and evaluation of the environmental impact on historical parchments by differential scanning calorimetry. *J. Therm. Anal. Calorim.* **104**, 495–506 (2011).

139. Samouillan, V. *et al.* The Use of Thermal Techniques for the Characterization and Selection of Natural Biomaterials. *J. Funct. Biomater.* **2**, 230–248 (2011).

140. Ricard-Blum, S. The Collagen Family. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **3**, a004978 (2011).

141. Lijnen, H. R. Plasmin and matrix metalloproteinases in vascular remodeling. *Thromb. Haemost.* **86**, 324–333 (2001).

142. Zhitkovich, A. N-Acetylcysteine: Antioxidant, Aldehyde Scavenger, and More. *Chem. Res. Toxicol.* **32**, 1318–1319 (2019).

143. Magnan, L. *et al.* Characterization of a Cell-Assembled extracellular Matrix and the effect of the devitalization process. *Acta Biomater.* **82**, 56–67 (2018).

144. Meng, X., Nikolic-Paterson, D. J. & Lan, H. Y. TGF-β: the master regulator of fibrosis. *Nat. Rev. Nephrol.* **12**, 325–338 (2016).

145. Bell, E., Ivarsson, B. & Merrill, C. Production of a tissue-like structure by contraction of collagen lattices by human fibroblasts of different proliferative potential in vitro. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **76**, 1274–1278 (1979).

146. Jonas, O. & Duschl, C. Force propagation and force generation in cells. *Cytoskelet. Hoboken NJ* **67**, 555–563 (2010).

147. Rouabhia, M., Park, H., Meng, S., Derbali, H. & Zhang, Z. Electrical Stimulation Promotes Wound Healing by Enhancing Dermal Fibroblast Activity and Promoting Myofibroblast Transdifferentiation. *PLoS ONE* **8**, e71660 (2013).

148. 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 CliniporatorTM by means of invasive or non-invasive electrodes. *Eur. J. Cancer Suppl.* **4**, 14–25 (2006).

149. Sottile, J. Regulation of angiogenesis by extracellular matrix. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Rev. Cancer* **1654**, 13–22 (2004).

150. Markelc, B. *et al.* In Vivo Molecular Imaging and Histological Analysis of Changes Induced by Electric Pulses Used for Plasmid DNA Electrotransfer to the Skin: A Study in a Dorsal Window Chamber in Mice. *J. Membr. Biol.* **245**, 545–554 (2012).

151. Kanthou, C. *et al.* The endothelial cytoskeleton as a target of electroporation-based therapies. *Mol. Cancer Ther.* **5**, 3145–3152 (2006).

152. Markelc, B. *et al.* Increased permeability of blood vessels after reversible electroporation is facilitated by alterations in endothelial cell-to-cell junctions. *J. Controlled Release* **276**, 30–41 (2018).

153. Gouarderes, S. *et al.* Pulsed electric fields induce extracellular matrix remodeling through MMPs activation and decreased collagen production. *J. Invest. Dermatol.* (2021) doi:https://doi.org/10.1016/j..2021.09.025.

154. Gurtner, G. C., Werner, S., Barrandon, Y. & Longaker, M. T. Wound repair and regeneration. *Nature* **453**, 314–321 (2008).

155. Sorg, H., Tilkorn, D. J., Hager, S., Hauser, J. & Mirastschijski, U. Skin Wound Healing: An Update on the Current Knowledge and Concepts. *Eur. Surg. Res.* **58**, 81–94 (2017).

156. Sabino, F. & Keller, U. auf dem. Matrix metalloproteinases in impaired wound healing. *Metalloproteinases In Medicine* vol. 2 1–8 https://www.dovepress.com/matrix-metalloproteinases-in-impaired-wound-healing-peer-reviewed-fulltext-article-MNM (2015).

157. Pakhomova, O. N. *et al.* Oxidative effects of nanosecond pulsed electric field exposure in cells and cell-free media. *Arch. Biochem. Biophys.* **527**, 55–64 (2012).

158. Dickinson, B. C. & Chang, C. J. Chemistry and biology of reactive oxygen species in signaling or stress responses. *Nat. Chem. Biol.* **7**, 504–511 (2011).

159. Nikitovic, D., Corsini, E., Kouretas, D., Tsatsakis, A. & Tzanakakis, G. ROS-major mediators of extracellular matrix remodeling during tumor progression. *Food Chem. Toxicol.* **61**, 178–186 (2013).

160. Bodega, G., Alique, M., Puebla, L., Carracedo, J. & Ramírez, R. M. Microvesicles: ROS scavengers and ROS producers. *J. Extracell. Vesicles* **8**, 1626654 (2019).

161. Burger, D., Turner, M., Munkonda, M. N. & Touyz, R. M. Endothelial Microparticle-Derived Reactive Oxygen Species: Role in Endothelial Signaling and Vascular Function. *Oxid. Med. Cell. Longev.* **2016**, 5047954 (2016).

162. Benedikter, B. J. *et al.* Redox-dependent thiol modifications: implications for the release of extracellular vesicles. *Cell. Mol. Life Sci.* **75**, 2321–2337 (2018).

163. Gouarderes, S., Mingotaud, A.-F., Vicendo, P. & Gibot, L. Vascular and extracellular matrix remodeling by physical approaches to improve drug delivery at the tumor site. *Expert Opin. Drug Deliv.* 1–24 (2020) doi:10.1080/17425247.2020.1814735.

164. Dong, X., Chen, M., Wang, Y. & Yu, Q. A Mechanistic study of Plasma Treatment Effects on Demineralized Dentin Surfaces for Improved Adhesive/Dentin Interface Bonding. *Clin. Plasma Med.* **2**, 11–16 (2014).

165. Keyvani, A., Atyabi, M. & Madanchi, H. Effects of cold atmospheric plasma jet on collagen structure in different treatment times. *Basic Res. J. Med. Clin. Sci.* **6**, 84–90 (2017).

166. Shi, X. *et al.* Effect of Cold Plasma on Cell Viability and Collagen Synthesis in Cultured Murine Fibroblasts. *Plasma Sci. Technol.* **18**, 353–359 (2016).

167. Ring, A. *et al.* Enhanced neovascularization of dermis substitutes via low-pressure plasma-mediated surface activation. *Burns* **36**, 1222–1227 (2010).

IX. Annexes

Annexe 1: *Electroporation does not affect human dermal fibroblast proliferation and migration properties directly but indirectly via the secretome.* Gouarderes S, Doumard L, Vicendo P, Mingotaud AF, Rols MP, Gibot L. Bioelectrochemistry. 2020 doi: 10.1016/j.bioelechem.2020.107531

HAL
archives-ouvertes.fr

Electroporation does not affect human dermal fibroblast proliferation and migration properties directly but indirectly via the secretome

Sara Gouarderes, Layal Doumard, Patricia Vicendo, Anne-Françoise Mingotaud, Marie-Pierre Rols, Laure Gibot

To cite this version:

Sara Gouarderes, Layal Doumard, Patricia Vicendo, Anne-Françoise Mingotaud, Marie-Pierre Rols, et al.. Electroporation does not affect human dermal fibroblast proliferation and migration properties directly but indirectly via the secretome. Bioelectrochemistry, Elsevier, 2020, 134, pp.107531. 10.1016/j.bioelechem.2020.107531 . hal-02560967

HAL Id: hal-02560967

https://hal.archives-ouvertes.fr/hal-02560967

Submitted on 6 May 2020

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

Electroporation does not affect human dermal fibroblast proliferation and migration properties directly but indirectly via the secretome

Sara Gouardères[1], Layal Doumard[1,2], Patricia Vicendo[1], Anne-Françoise Mingotaud[1], Marie-Pierre Rols[2] and Laure Gibot[1,2]*

[1] Laboratoire des IMRCP, Université de Toulouse, CNRS UMR 5623, Université Toulouse III - Paul Sabatier, France

[2] Institut de Pharmacologie et de Biologie Structurale, Université de Toulouse, CNRS, UPS, Toulouse, France

* Correspondence: gibot@chimie.ups-tlse.fr ; Tel.: +33-561556272

Keywords

Electrochemotherapy, gene electrotransfer, wound healing, scratch wound, conditioned medium, bystander effect

Abstract

Aesthetic wound healing is often experienced by patients after electrochemotherapy. We hypothesized that pulsed electric fields applied during electrochemotherapy (ECT) or gene electrotransfer (GET) protocols could stimulate proliferation and migration of human cutaneous cells, as described in protocols for electrostimulation of wound healing. We used videomicroscopy to monitor and quantify in real time primary human dermal fibroblast behavior when exposed *in vitro* to ECT and GET electric parameters, in terms of survival, proliferation and migration in a calibrated scratch wound assay. Distinct electric field intensities were applied to allow gradient in cell electropermeabilization while maintaining reversible permeabilization conditions, in order to mimic *in vivo* heterogeneous electric field distribution of complex tissues. Neither galvanotaxis nor statistical modification of fibroblast migration were observed in a calibrated scratch wound assay after application of ECT and GET parameters. The only effect on proliferation was observed under the strongest GET conditions, which drastically reduced the number of fibroblasts through induction of mitochondrial stress and apoptosis. Finally, we found that 24h-conditioned cell culture medium by electrically stressed fibroblasts tended to increase the migration properties of cells that were not exposed to electric field. RT-qPCR array indicated that several growth factor transcripts were strongly modified after electroporation.

Introduction

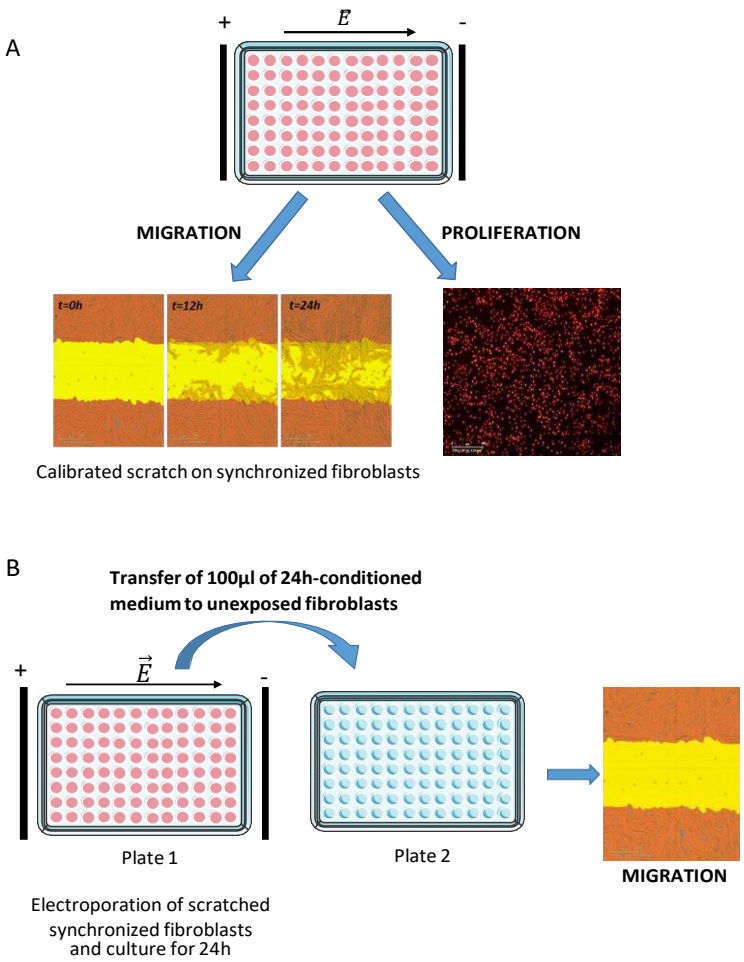
When a cell is exposed to an external pulsed electric field, the plasma membrane transiently becomes permeable for ions, hydrophilic drugs and molecules as large as plasmid DNA, which are otherwise unable to penetrate. This spatially and temporally localized physical phenomenon of cell electropermeabilization is named “electroporation” [1,2]. Electroporation has many medical applications [3]. Among them, electrochemotherapy (ECT) [4,5] has reached an established position in local cancer treatment and is the main clinical use of electroporation in human and veterinary medicine. It consists in combining the injection of poorly permeant antitumor drugs, mainly bleomycin or cisplatin, with local application of calibrated electric field pulses to the tumor site. Thus, transient plasma membrane electropermeabilization allows massive penetration of the cytotoxic drugs within the cell, potentiating its antitumor activities. Standardized protocols for ECT treatments have been published in the framework of the European Standard Operating Procedure on Electrochemotherapy (ESOPE) multicenter trial [6]. Interestingly, clinicians commonly observed aesthetic and functional wound healing of the tumor sites treated with electrochemotherapy [7–9]. This clinical outcome of ECT was confirmed by the patients themselves [10], as self-compiled questionnaires underlined an improvement in wound healing, bleeding, aesthetic impairment, and also in activities of daily life and social relations.

Another medical application of electroporation is gene electrotransfer (GET). Gene electrotransfer of plasmid encoding different growth factors is highly promising in cutaneous wound healing [11]. In an *in vivo* wound model, GET of plasmids encoding for example KGF-1 (keratinocyte growth factor) [12], VEGF (Vascular endothelial growth factor) [13], bFGF (fibroblast growth factor) [14] or antimicrobial peptide hCAP-18/LL-37 [15] led to an increased re-epithelialization rate of the wound, collagen synthesis, and angiogenesis. Other studies demonstrated a tendency [16] to a clear [17] beneficial effect of electroporation alone on wound

closure. While standard protocols for acute and chronic wound treatments are limited to antibiotic therapy and wound dressing, innovative therapies like electrostimulation have emerged as alternatives to conventional treatments [18]. Electrostimulation is based on a natural electric process that occurs after wounding. In an intact epidermis, there is an active segregation of Na+ ions owing to the Na+/K+ATPase action and the presence of ENac channels, leading to a sodium gradient from the basal layer of the epidermis to the upper layer [19]. This process creates a transepithelial potential (TEP) within the epidermis. Depending on the body part, this TEP ranges from -10 to -50mV, while its average potential over all sites is -23 mV [20]. After skin damaging, the relocalization of these Na+ ions leads to the creation of an endogenous local electric field of 100 to 200 mV/mm at the wound margins [21,22]. This field plays a major role in wound healing process, particularly through the activation of migration and proliferation of cutaneous cells, as well as the promotion of angiogenesis [23,24].

In this study, we hypothesized that ECT and GET electric parameters could stimulate cutaneous cell migration and proliferation and thus improve the quality of healing after ECT or GET treatment. To investigate this hypothesis, we worked with primary human dermal fibroblasts grown in monolayer. Firstly, classical hallmarks of cell electropermeabilization, viability and death were assessed after exposition to ECT and GET electric parameters. Secondly, we used videomicroscopy to monitor and quantify in real time cell proliferation and cell migration in a calibrated scratch wound assay, two properties that play a major role in cutaneous wound healing process. Because increases in electric conductivity due to electroporation and tissue heterogeneity (cell shape, extracellular matrix…) induce non-uniformity in the electric field distribution within the skin during electroporation, cells located in between the electrodes do not all experience the same field strength *in vivo* [25,26]. For that reason, in this study we decided to scan a wide range of electrical intensity, inducing various degrees of reversible cell electropermeabilization, and check dermal fibroblast proliferation and

migration properties. Finally, the indirect effect of electroporation on cell migration was investigated by cultivating unexposed dermal fibroblasts in 24h-conditioned cell culture medium. An overview of the experimental procedure is presented in schematic 1.



Schematic 1: Overview of the experimental plan to test direct (A) or indirect (B) effects of human dermal fibroblast electroporation on cell behaviour. A. Migration and proliferation properties of fibroblasts submitted to electroporation are followed by videomicroscopy. B. Assessment of indirect effect of electroporation through the secretome. For these experiments, fibroblasts that were not exposed to electric field are cultivated in cell culture medium conditioned for 24h by electroporated fibroblasts. Migration capabilities are then followed by videomicroscopy

Material and methods

Human cutaneous primary cell isolation and cell culture. Primary dermal fibroblasts were isolated from 3-year old foreskin commercially bought (Icelltis) after posthectomy as previously described [27–29]. Cells were tested negative for mycoplasma using MycoAlert mycoplasma detection kit (Lonza) throughout the experiments. Dermal fibroblasts were grown in Dulbecco's Modified Eagles Medium (Gibco-Invitrogen) containing 4.5 $g.L^{-1}$ glucose, Glutamax, and 1mM pyruvate, supplemented with 10 % (v/v) of heat inactivated fetal calf serum, 100 U/ml penicillin, and 100 $\mu g.mL^{-1}$ streptomycin. Cells were maintained at 37°C in a humidified atmosphere containing 5 % CO_2 and cell culture media were changed three times a week.

Electroporation application to cell monolayers. Cells were grown either on gelatin-coated round 1cm glass coverslip [30] or in 96-well plate 24h prior experiments. Cell culture medium was removed from the wells and replaced by 100 µL or 50 µL of pulsing buffer (10 mM K_2HPO_4/KH_2PO_4, 250 mM sucrose, and 1 mM $MgCl_2$ in sterile water, pH 7.4) [31] respectively for glass coverslip or 96-well. Two stainless, flat, parallel electrodes, 1 cm interval (Megastil, Ljubljana, Slovenia) for round coverslip or 0.35 cm interval (Megastil, Ljubljana, Slovenia) for 96-well plates were applied to the bottom of the well. Defined electric field for electrochemotherapy condition (ECT) (8 square-wave pulses of 100 µs, 1 Hz, ranging from 200 to 800 V/cm) and gene electrotransfer (GET) (10 square-wave pulses of 5 ms, 1 Hz, ranging from 50 to 300 V/cm) was delivered at room temperature by Electro cell S20 generator (LeroyBiotech, Saint Orens de Gameville, France). An electric field intensity range was applied in experiments in order to better mimic the heterogeneous distribution of electric field that occurs within vascularized and rich in extracellular matrix tissue such as skin when submitted to electroporation. After electric field application, pulsing buffer was aspired and 200 µL of

fresh cell culture medium were added before cells were placed in a humidified atmosphere at 37°C containing 5% CO_2 until analysis.

Determination of cell electropermeabilization. Plasma membrane electropermeabilization was first assessed through quantification by luminescence of ATP leakage within extracellular medium after cells were submitted to electroporation. For that purpose, cells were grown in 96-well plate and pulsed in 50 µL of pulsation buffer. 10 minutes after electric field application, 40 µL of supernatant was place in white-96-well plate and topped up with 40µl of CellTiterGlo reagent (Promega), incubated for 5 minutes at room temperature and luminescence signal was read on plate reader (Clariostar, BMGLabtech). Secondly, plasma membrane electropermeabilization was assessed by flow cytometry using propidium iodide penetration. Propidium iodide is a non-permeant probe whose fluorescent intensity increases upon non-covalent binding to nucleic acids. 100 µM propidium iodide was added to pulsing buffer during application of electric fields on cells grown on round coverslip. Cells were grown on a 1cm coverslip in order to be submitted to electric field with 1cm plate electrodes. Immediately afterwards, the cells were washed twice with 300 µL of PBS before being trypsinized, centrifuged and suspended in PBS, placed on ice and analyzed by flow cytometry (FACSCalibur cytometer, BD Bioscience). Finally, to discriminate between reversible and irreversible electroporation, 30 minutes after electroporation cells were removed from the incubator and were incubated for 5 minutes with 100µM propidium iodide, washed, trypsinized and analyzed by flow cytometry.

Cell viability and death measurement. A clonogenic assay was used to finely determine cell viability after application of electric field. Briefly, cells grown on round coverslip were

submitted to electric field in 100µL of pulsing buffer. After replacing it by complete culture medium, cells were incubated for 1h at 37°C to recover. After this time, cells were trypsinized, counted and 250 cells were plated into 6-well plates and placed into the incubator. 7 days after seeding, cells were washed and colored with crystal violet in order to visualize and manually count cell colonies. The percentage of dead cells through apoptosis was quantified by videomicroscopy using the IncuCyte® Caspase-3/7 Green Apoptosis Assay Reagent (Sartorius), coupled with the Nuclight Red reagent (Sartorius) to determine the total number of cells according to the manufacturer protocol. Briefly, after application of electroporation, cells were grown in culture medium containing a permeable viable DNA stain named NucLight Red Reagent (1/1000) and a caspase-3/7 recognition motif DEVD that labels cells undergoing apoptosis, i.e Caspase-3/7 green reagent (1/1000). Pictures were obtained at 10x with an IncuCyte ZOOM live cell analysis system (Sartorius), and analyzed by the MARS- associated software.

Cell synchronization. In order to assess only migration during the first 24h of the scratch wound assay, proliferation had to be inhibited. For this purpose, the overnight serum deprivation approach [32] was used as a biological way to synchronize primary dermal fibroblasts prior to scratch wound assay. Distribution of cells within cell cycle was checked by flow cytometry before the scratch experiments. Briefly, after being trypsinized and centrifuged, cells were suspended in PBS containing 5 $\mu g.mL^{-1}$ propidium iodide, 0.1% X100-Triton and 2.5% fetal bovine serum. Cells were incubated for 20 min at room temperature in the dark before flow cytometry analysis on a FACSCalibur cytometer (BD Bioscience). Cell cycle distribution was analyzed using Modfit software.

Calibrated scratch assay by videomicroscopy. In order to perform the scratch wound experiment, cells were grown at post-confluency so that when the scratch was applied, a clear and calibrated wound remained (700-800 µm wide). For this, 25 000 dermal fibroblasts were grown into ImageLock 96-well microplates (Sartorius). After 8 hours of culture, complete culture medium was removed and replaced by cell culture medium without fetal bovine serum in order to synchronize cells by serum deprivation overnight. The day of the experiment, a tool named WoundMaker (Sartorius) which is a 96-pin mechanical device designed to create homogeneous scratch wounds in cell monolayers was used. Floating scraped cells were removed and electroporation was performed in 50 µL pulsing buffer. Attention had been paid to placing electrodes parallel to the scratch wound, the cathode and anode still at the same side of the wound. After replacing pulsing buffer by 200 µL of complete cell culture medium, plates were then placed in IncuCyte ZOOM live cell analysis system (Sartorius) and pictures were taken at 10x every hour for 24h at least, and analyzed with the MARS- associated software, with the module dedicated to scratch wound assay. For galvanotaxis or electrotaxis measurements, the area colonized by fibroblasts in each wound side was quantified on Image J software (NIH) between the same picture at the moment of the scratch and 12h after. For experiments with conditioned media, 100 µL of conditioned cell culture medium were harvested 24h after electric field application on synchronized dermal fibroblast wounded monolayer and immediately placed onto a freshly synchronized dermal fibroblast wounded monolayer. Cell migration within the wound that had not been submitted to an electric field was quantified by videomicroscopy for 24h.

Cell proliferation quantification by videomicroscopy. In order to allow cell proliferation to occur over several days, 5 000 dermal fibroblasts were plated in wells of 96-well plates, a density which approximately corresponds to a confluence of 30%. After being submitted to

electric field in pulsing buffer, cells were grown in 200 µL of complete culture medium supplemented with 1/1000 Nuclight Red reagent (Sartorius) and placed within an IncuCyte ZOOM live cell analysis system (Sartorius). As a permeant DNA intercalant, it allows to clearly observe and quantify the number of nuclei over time. Pictures were taken at 10x every hour for at least 72h and analyzed with the MARS-associated software. Data obtained corresponded to the number of nuclei within the field of observation of the microscope.

Mitochondrial characterization. Mitochondrial membrane potential was assessed using MitoView 633 (Biotium) (λex = 622nm; λem = 648nm) which is a mitochondrial membrane potential-sensitive, fluorogenic dye that rapidly accumulates in mitochondria. Staining is dependent on mitochondrial membrane potential and is lost when mitochondria become depolarized [33]. Cells were labeled according to the manufacturer protocol. Briefly, cells grown in monolayer in 96-well plate were washed with PBS and then incubated for 20 minutes in the dark in a humidified atmosphere at 37°C containing 5% CO_2 with 50nM MitoView 633 in cell culture medium. Once charged with MitoView 633, cells were submitted to GET electroporation and 1h after treatment fluorescence was measured within Incucyte videomicroscope and analyzed with the MARS-associated software. Mitochondrial oxidative stress was assessed through MitoSOX Red Mitochondrial SuperOxide indicator (ThermoFisher scientific) which is a fluorogenic dye for a selective detection of superoxide in the mitochondria of living cells [34]. Once in the mitochondria, this non-fluorescent reagent is oxidized by mitochondrial superoxide when mitochondrial oxidative stress occurs to exhibit red fluorescence [35]. Cells were incubated in a 5µM of MitoSOX reagent solution and incubated 10 minutes at 37°C protected from light. MitoSOX fluorescence (λex = 510nm; λem = 580 nm) was observed by videomicroscopy on Incucyte for 12h after electroporation treatment. Pictures were analyzed with the MARS-associated software.

Genes expression analysis by PCR array. Three conditions were analyzed 4h after electric field application: control condition (n=3), ECT condition at 600V/cm (n=3) and GET condition at 200V/cm (n=2). Total RNAs of adherent dermal fibroblasts grown on 6 glass coverslips for each condition were isolated using RNeasy Micro Kit (Qiagen) strictly according to the manufacturer's instruction. The quality and quantity of isolated RNA were checked on a Nanodrop 2000 (ThermoFisher) and RNAs were then stocked at -80°C until rapid use. Reverse transcription was performed on 500ng of RNAs with the RT² HT First Strand Kit (Qiagen) according to the manufacturer's protocol. It allows an efficient first-strand cDNA synthesis and genomic DNA elimination in RNA samples. The Human Wound Healing RT² Profiler PCR Array profiles the expression of 84 key genes central to the wound healing response. For this study, we focused on growth factors sub-panel. Obtained cDNAs were directly subjected to qPCR using RT² SYBR Green qPCR Mastermix (Qiagen) and RT² Profiler PCR Array Human Wound Healing kit (Qiagen #PAHS-121Z) strictly according to the manufacturer's protocol. 96-well plate was processed into a CFX96 CFX Real-Time PCR Detection System (BioRad). Data were statistically analyzed with the associated-excel datasheet proposed by Qiagen for this gene panel. Actin, Beta-2-microglobulin, GAPDH, Hypoxanthine phosphoribosyltransferase 1 (HPRT1), ribosomal large protein P0 (RPLP0) transcripts were used for normalization. HeatMap was carried out on GraphPad Prism 8 to represent significantly up and down regulated transcripts.

Growth factor quantification by ELISA. Supernatants conditioned for 24h by dermal fibroblasts submitted to electroporation with ECT (600V/cm) and GET (200V/cm) electric parameters were stocked at -80°C until use, within a month. Vascular Endothelial Growth Factor A (VEGFA) was quantified in these supernatants using Human VEGF-A ELISA Kit

(Sigma # RAB0507, Merck KGaA, Darmstadt, Germany) according to manufacturer's protocol. Absorbance was read using a Synergy H1 (Biotek, Winooski, VT, USA) hybrid Multi-Mode Reader. Non-parametric Mann Whitney test was used to determine statistical differences between each Control, ECT, GET condition (n=5).

Statistical analyses. Data analysis was performed using GraphPad Prism 8 program (GraphPad Software, Inc., La Jolla, CA, USA) and data were expressed as mean ± SEM (standard error to the mean). Number of experiments are indicated in figure legends, where N indicates the number of independent experiments and n the total number of biological replicates. Multiple comparisons were performed using one-way analysis of variance (ANOVA) followed by Dunnett's post-test to compare every mean to the control (0V/cm) mean or two-way ANOVA followed by Bonferroni post-test to compare means within each time point. Statistics are expressed relative to the control condition (0V/cm). *$p < 0.05$, **$p < 0.01$, ***$p < 0.001$ and ****$p < 0.0001$.

Results

Distinct electric field intensities allow gradient of electropermeabilization of dermal fibroblasts. When electroporation is applied to skin tissue, the electric field distribution is heterogeneous, meaning that all the cells within the tissue do not experience the same electric field [26]. Therefore, one of the aims of this study was to submit dermal cells to distinct electric field intensities. For ECT condition, we applied a classical calibrated sequence of electric pulses (i.e 8 pulses lasting 100µs at a frequency of 1Hz) with increasing intensity, from 200V/cm to 800V/cm. For GET condition, 10 pulses lasting 5ms were applied at 1Hz frequency, with intensities ranging from 50V/cm to 300V/cm. By increasing the electric field intensity both for ECT and GET conditions, a gradual but significant increase in leakage of ATP was measured in the extracellular medium as soon as 10 minutes after electric field application (Figure 1A). To confirm that the observed ATP leakage was due to plasma membrane defaults caused by electroporation, a complementary experiment was performed by flow cytometry to quantify propidium iodide penetration within cells (Figure 1B). Both the percentage of electropermeabilized cells as well as the fluorescence intensity of these cells increased when increasing the electric field intensity in ECT and GET conditions. 100% of electropermeabilized cells were reached at 600V/cm in ECT condition and 200V/cm in GET condition. In order to be sure that the electric parameters applied induced solely a reversible and not an irreversible permeabilization, a plasma membrane resealing experiment was carried out. 30 minutes after electroporation, cells were incubated with 100µM propidium iodide and fluorescence signal was quantified by flow cytometry (Figure 1C). Less than 5% of cells were labelled with propidium iodide, regardless of the electric field intensity applied in ECT and GET condition. This means that the applied electric parameters did not induce irreversible permeabilization. The long-term cell viability after exposition to electroporation was assessed by clonogeny (Figure 1D). In the ECT condition, cell viability was not affected up to 600V/cm

but an approximately 25% loss of viability was observed at 800V/cm. The GET condition appeared to be more severe. Below 200V/cm cell viability was not affected but it fell to 50% at 300V/cm. It seems that even if irreversible electroporation was not induced by the chosen electric parameters, they still affected the long-term cell viability.

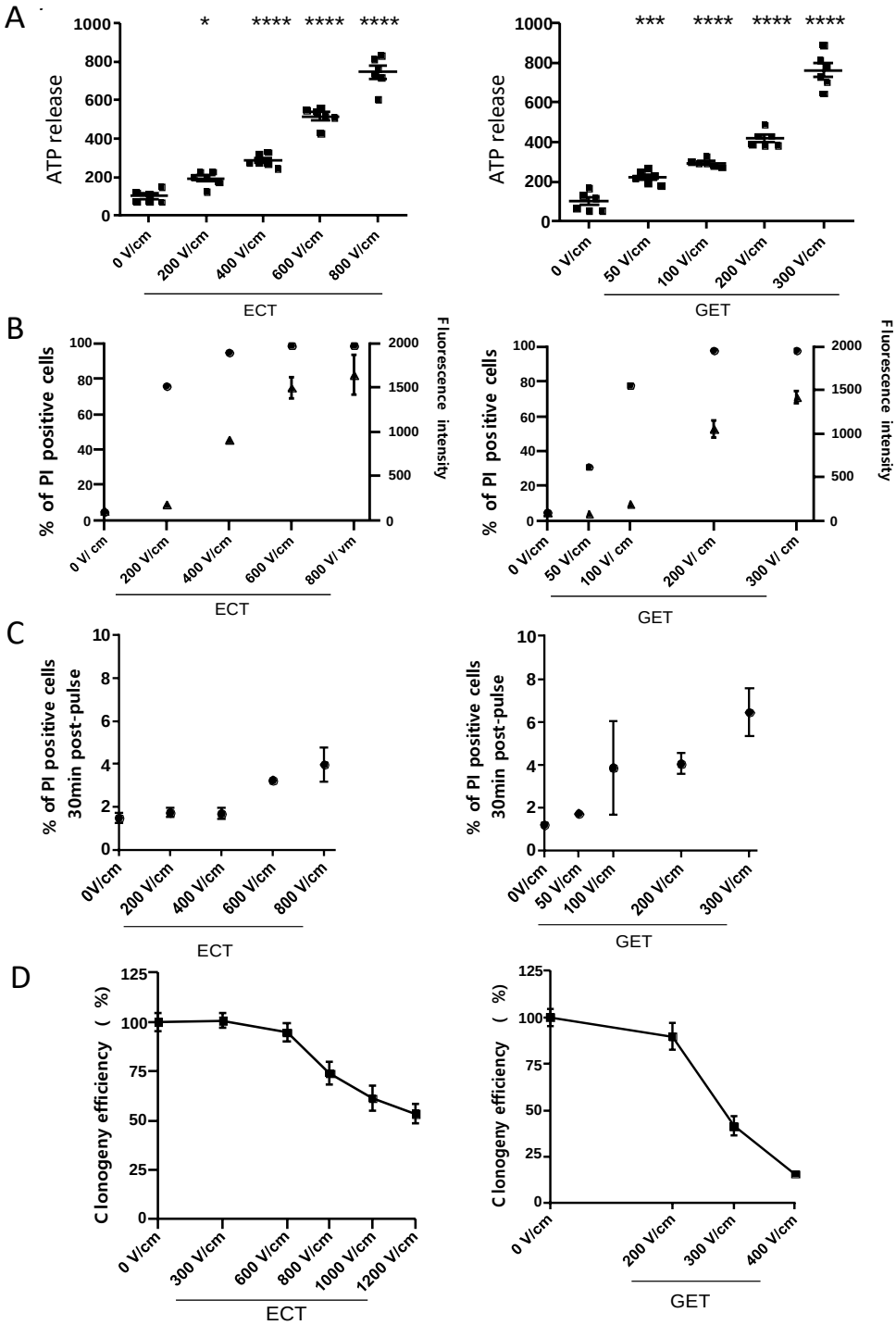


Figure 1: Determination of electric field intensity (V/cm) ensuring efficient transient cell electropermeabilization without affecting cell viability. A. Quantification of ATP release 10 min after the application of ECT and GET electrical parameters, expressed as % of control. N=2; n=6. Statistical analysis by One-way ANOVA *=p<.05; ***=p<.001; ****=p<.0001. B. Monitoring of cell electropermeabilization immediately after the application of ECT and GET electrical parameters. Left axis: % of propidium iodide (PI) positive cells (dot ●); Right axis: fluorescence intensity (triangle ▲). n=3. C. Monitoring of plasma membrane resealing 30min after the application of ECT and GET electrical parameters. n=3. D. Long term cell viability after the application of ECT and GET electrical parameters, N=3; n=9. Data are represented as the mean value ± SEM. ECT: electrochemotherapy; GET: gene electrotransfer.

Migratory properties of human primary dermal fibroblasts are not statistically affected by the application of ECT and GET electric parameters. In scratch wound assay, cells migrate and proliferate to fill the gap, thus, it is classically desired to suppress proliferation component in order to measure only cell migration during the first 24h [36]. The *in vitro* synchronization of dermal fibroblasts was achieved using overnight serum deprivation, a non-pharmaceutical method. Cellular DNA content was determined by staining cells with propidium iodide and measuring fluorescence by flow cytometry. The proportion of cells in the different phases of cell cycle were calculated depending on the cell's DNA content (n): G1 (2n), S (between 2n and 4n), and G2 (4n). As shown in Fig 2A, primary dermal fibroblasts were highly responsive to this method since approximately 90% of the cells were synchronized in the growing phase G1 using this method. With its scratch wound module, the IncuCyte ZOOM live cell analysis system allows to properly measure cell migration in calibrated scratch wound assay. Wound confluence was determined each hour after electric field application for 24h using image processing with masks (Figure 2B and Movie 1).,. Movie 2 showed that wound closure by dermal fibroblasts was a highly dynamic process. As previously explained, wound closure was analyzed only for the first 24h after application of electric field on synchronized cells in order to take into account solely the migration component. The absence of cell division events (rounding cell before splitting in two round cells) on the movie during the first 24h confirmed this assumption. After 24h, cell confluence within the wound was approximately 40%, whatever the ECT or GET condition (Figure 2C). It is noteworthy that cell migration occurred

immediately after wounding, and continued regularly over hours, with or without application of ECT or GET electric parameters. No statistical difference was observed on the time course of the migration depending on the electric parameters applied, but a linear regression was performed to obtain the speed of migration of each condition during the first 12h (Figure 2D). Even if no statistical difference was observed whatever the conditions were, taking account standard error to the mean, ECT 600V/cm and 800V/cm as well as GET 50V/cm and 100V/cm conditions presented a slight increase in speed of migration. Finally, the wound confluence 24h post-electric field application was finely analyzed (Figure 2E). GET conditions at 50V/cm and 100V/cm seemed to improve dermal fibroblast migration and thus wound healing, but despite numerous repetitions of the experiments and biological replicates (until 30) no statistical difference was observed, so it remained a trend.

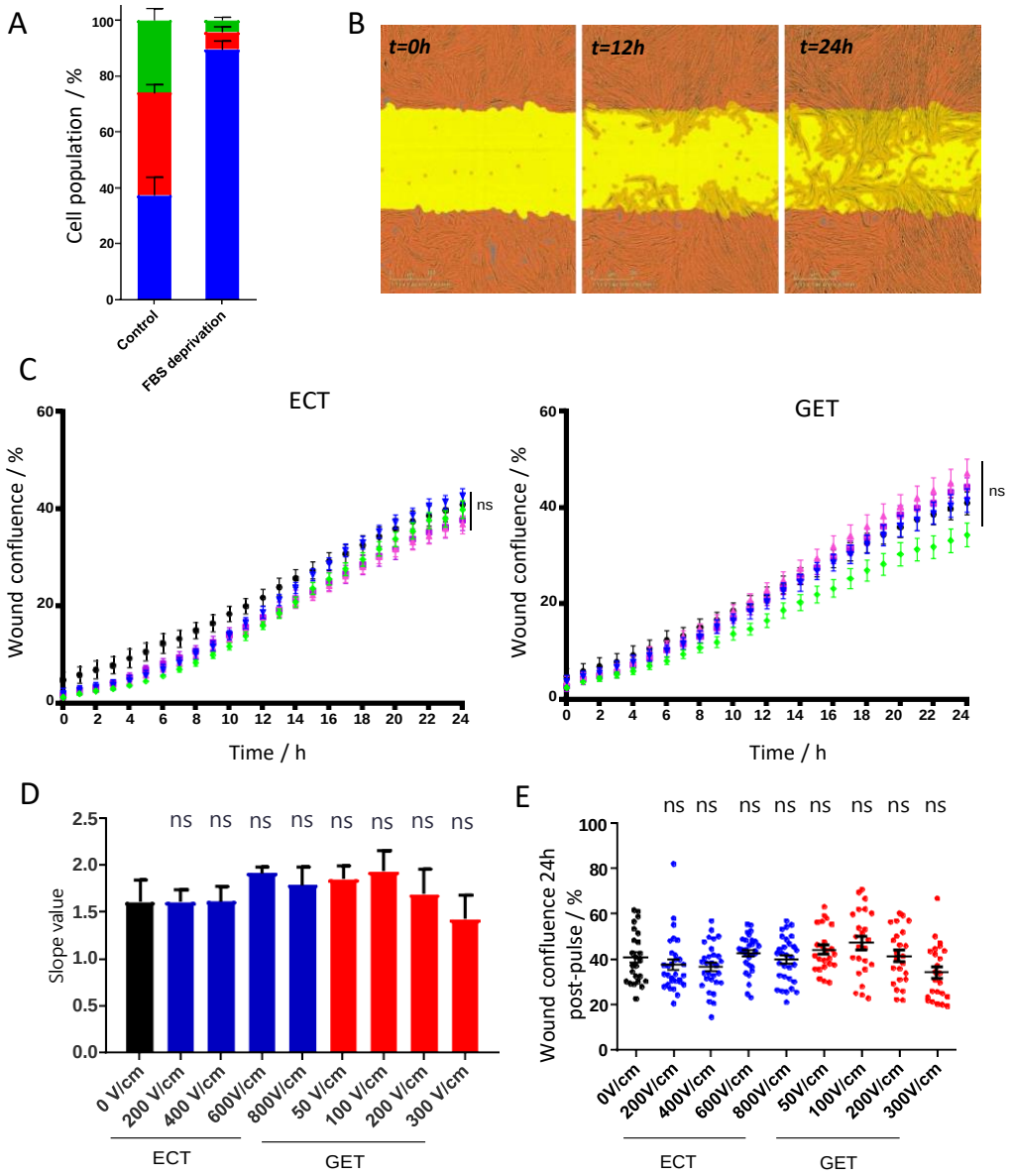


Figure 2: ECT and GET electrical parameters did not affect dermal fibroblast migration properties in scratch wound assay. A. Cell cycle synchronization after overnight fetal bovine serum (FBS) deprivation. Phases G1 in blue, S in red and G2 in green. N=3; n=8. B. Image processing with masks to quantify dermal fibroblasts migration in scratch wound assay.C. Time course of cell migration after the application of ECT (x8 pulses lasting 100µs, 1Hz frequency, at 0V/cm (●), 200V/cm (■), 400 V/cm (▲), 600V/cm (▼), 800V/cm (♦)) and GET (x10 pulses lasting 5ms, 1Hz frequency, at 0V/cm (●), 50V/cm (■), 100 V/cm (▲), 200V/cm (▼), 300V/cm (♦)) electrical parameters on synchronized fibroblasts wounded monolayer. N=5; n= 30 Statistical analyses by Two-Way ANOVA. D. Slope values calculated by linear regression during the first 24h. N=3, n=9. E. Wound confluence (%) 24h after the application of ECT and GET electrical parameters. N=5; n= 30. Statistical analysis by One-Way ANOVA. Data are represented as the mean value ± SEM. ECT: electrochemotherapy; GET: gene electrotransfer.

No galvanotaxis of dermal fibroblasts is induced by ECT and GET electric parameters.

The external electric field is a major physical cue of the microenvironment that guides

directional migration. This phenomenon is called galvanotaxis or electrotaxis. Since the plate electrodes were systemically placed parallel to the wound, anode on the top and cathode on the bottom, we were able to determine if fibroblasts at the margin of the wound displayed preferential directed migration (Figure 3). No statistical differences were observed, meaning that dermal fibroblasts migrated equally toward the cathode or anode side.

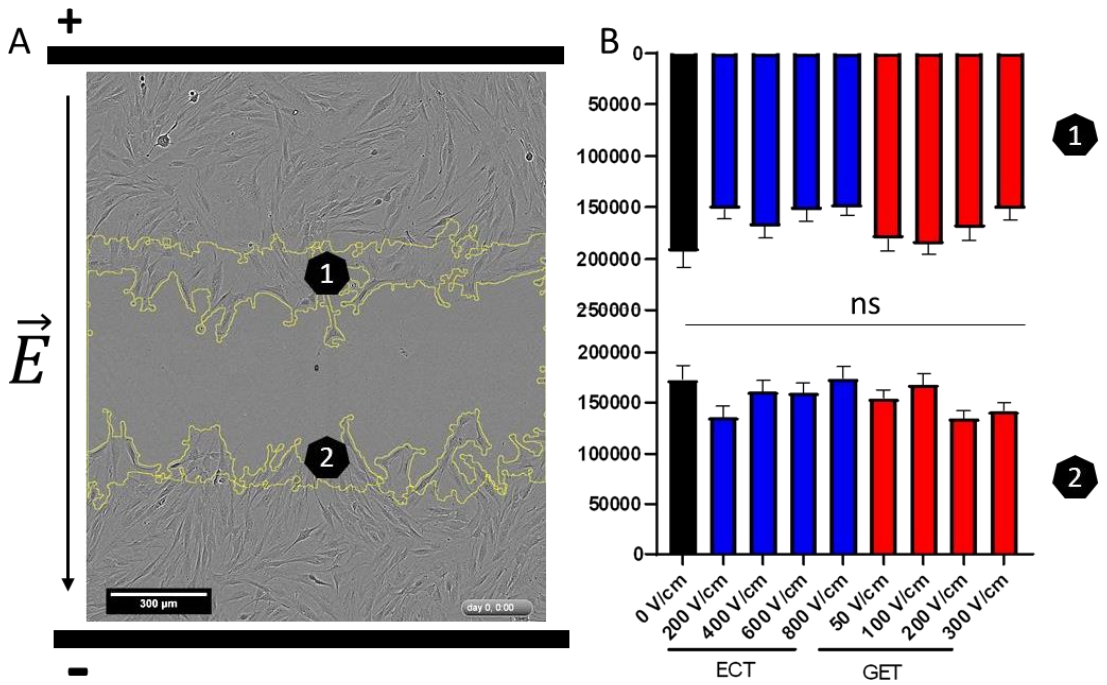


Figure 3: No electrotaxis was observed in dermal fibroblasts when submitted to ECT and GET electrical parameters. A. Schematic representation of electrodes position at the wound site. Yellow line delimits cell-occupied area in the anode panel (1) and cathode panel (2). B. Cell-occupied area (μm^2) either upper panel of the wound (1) or lower panel of the wound (2) 12h after electric field application. Data are represented as the mean ± SEM. Statistical analysis by One-Way Anova. N=3; n=18.

High GET electric parameters drastically reduce the number of dermal fibroblast . Evolution of cell number over 72h after ECT and GET application was followed by videomicroscopy (Movie 3) through automatically counting fluorescently labelled nuclei within the microscope field (Figure 4A). ECT electric parameters did not lead to statistical difference between the control condition and the distinct electric field intensity applied, even if 200V/cm

and 400V/cm growth curves tended to be higher than the control one (0V/cm) (Figure 4B). For GET conditions, three distinct behaviors had to be differentiated. Cells submitted to electric fields of 50 and 100V/cm behaved similarly to the control condition. On the other hand, from 200V/cm, the number of nuclei decreased with a significant delay, and this phenomenon was increased for higher electric field intensity (300V/cm). This observation was confirmed by analyzing the number of nuclei within the microscope field 70h after electric field application (Figure 4C). The delay in cell growth can be explained either by a stop in cell proliferation or by a dynamic equilibrium between dying cells and proliferative cells, as we observed by clonogenic assay that GET at 300V/cm altered long-term cell viability by 60% (Fig 1D).

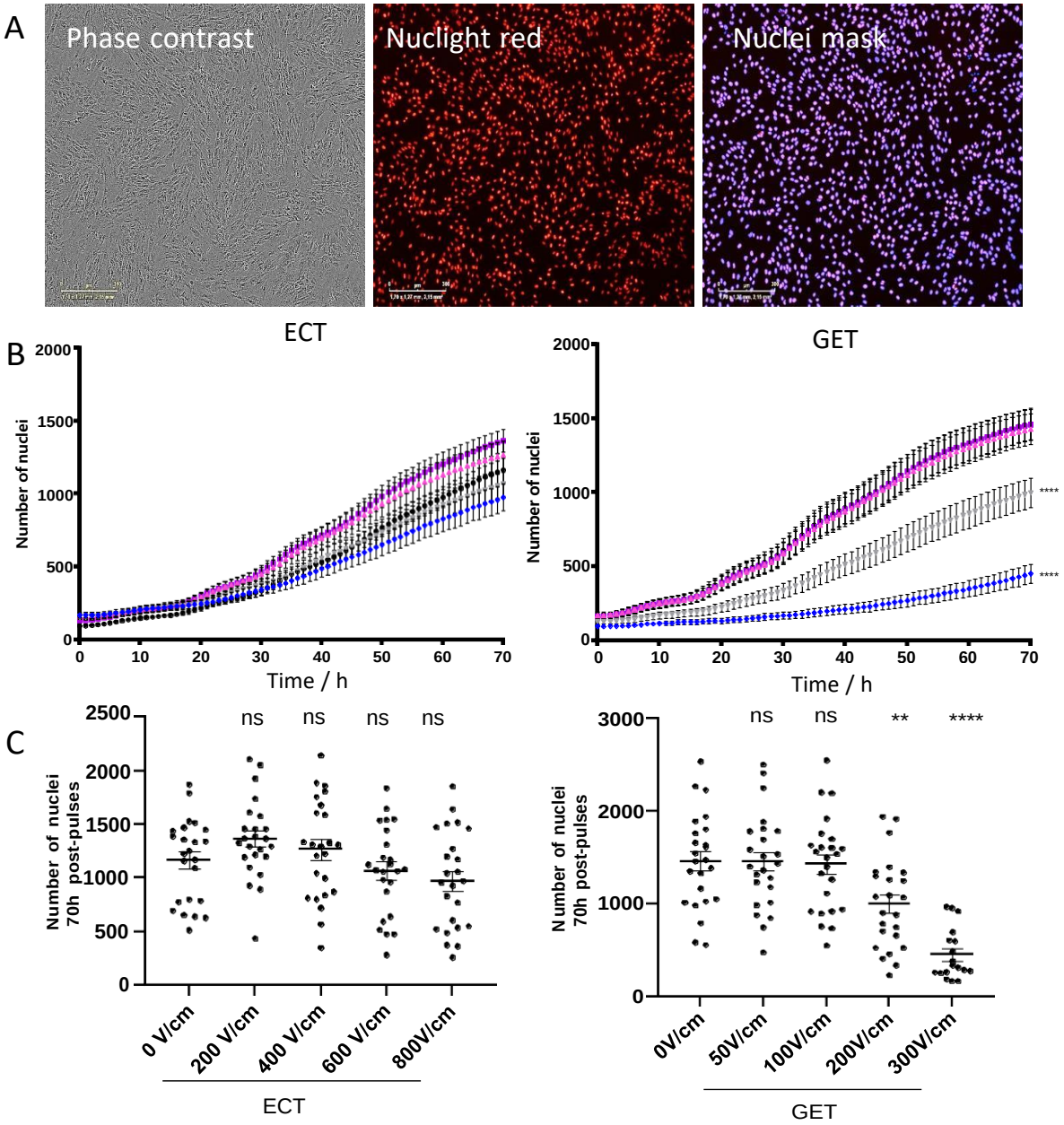


Figure 4: ECT electrical parameters did not affect dermal fibroblast proliferation while some GET parameters reduced cell number. A. Image processing with masks to quantify dermal fibroblasts proliferation. B. Dermal fibroblasts proliferation after application of ECT (x8 pulses lasting 100µs, 1Hz frequency, at 0V/cm (●), 200V/cm (■), 400 V/cm (▲), 600V/cm (▼), 800V/cm (♦)) and GET (x10 pulses lasting 5ms, 1Hz frequency, at 0V/cm (●), 50V/cm (■), 100 V/cm (▲), 200V/cm (▼), 300V/cm (♦)) electrical parameters. Statistical analysis by Two-Way ANOVA ****=p<.0001 C. Number of nuclei 70h after the application of ECT and GET electrical parameters. N=6; n=24. Statistical analysis by One-Way ANOVA *=p<.05; **=p<.01; ****=p<.0001. Data are represented as the mean value ± SEM.

High GET electric parameters induce dermal fibroblast apoptosis through mitochondrial stress. Only certain electric field intensities in GET conditions have shown anti-proliferative results on cell monolayers, thus we decided to focus on GET electric parameters for apoptosis and mitochondrial stress analysis. In order to explain the delay observed in cell growth after GET electric parameter application, apoptosis was investigated 24h after electroporation (figure 5A). The percentage of cells dying by apoptosis increased when the electric field intensity increased. At 200V/cm approximately 10% of the cells displayed activated caspases3/7 and this percentage reached 30% at 300V/cm 24h after electric field application. This 30% of apoptotic cells in 300V/cm condition differed from the one observed by clonogenic assay (loss of 60% of long-term cell viability, Fig 1D), meaning that other cell death mechanisms could be involved, such as necrosis. We previously showed that mitochondria ultrastructure was rapidly altered after cells were submitted to electroporation [37]. Consequently, we focused subsequent experiments on mitochondrial characterization. A MitoView fluorescent probe was used to follow the mitochondrial membrane potential after application of GET electric parameters (Figure 5B). The fluorescent staining depends on the mitochondrial membrane potential and is lost when mitochondria become depolarized [33]. A significant loss of staining was observed on live cells 1h after GET electric field application at 300V/cm, meaning that mitochondria underwent depolarization, which could lead to initiation of cell death processes, especially apoptosis [38]. We used videomicroscopy to follow mitochondrial oxidative stress in live cells after GET application using the MitoSOX reagent (Figure 5C). This probe selectively targets mitochondria and becomes highly fluorescent after oxidation specifically by mitochondrial superoxide [34]. No immediate mitochondrial oxidative stress was observed after GET electric parameters application, but a delayed effect was observed for 200V/cm and 300V/cm intensity from 4h after pulses, and became statistically significant 7h after pulses. This means that at

200V/cm and even more at 300V/cm, oxidant mitochondrial stress was generated as soon as 4h after electroporation, through generation of mitochondrial superoxide.

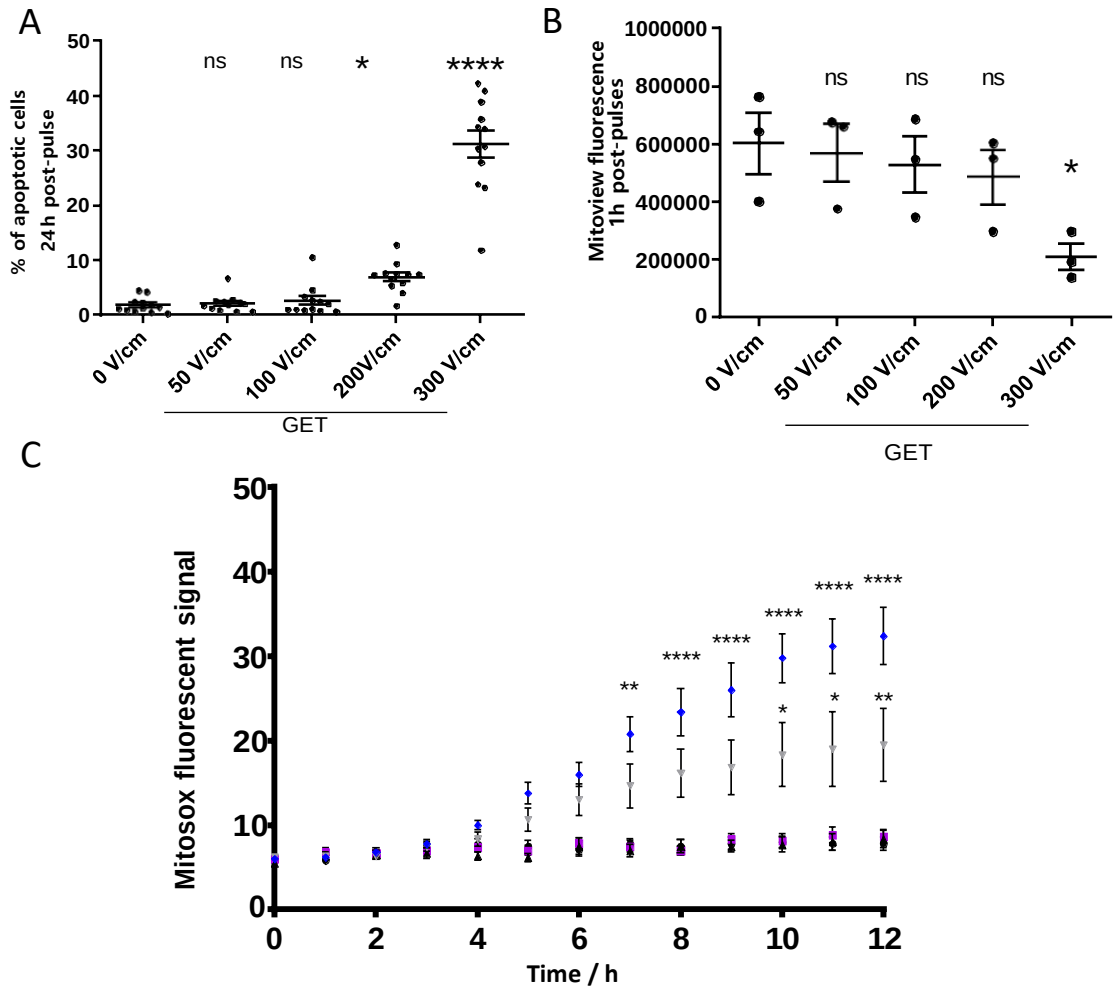


Figure 5: Some GET electrical parameters induced apoptosis through mitochondrial stress. A. Percentage of apoptotic cells. N=2; n=12. Statistical analysis by One-way and Two-way ANOVA *=p<.05; ****=p<.0001 B. Quantification of mitochondrial membrane potential loss 1h after electric field application. N=1; n=3. Statistical analysis by One-way ANOVA *=p<.05 C. Fluorescent detection of generation of mitochondrial superoxide anion O_2^- after application of GET (x10 pulses lasting 5ms, 1Hz frequency, at 0V/cm (●), 50V/cm (■), 100 V/cm (▲), 200V/cm (▼), 300V/cm (♦)) electrical parameters. N=2; n=12. Data are represented as the mean value ± SEM. Statistical analysis by Two-way ANOVA *=p<.05; **=p<.01; ****=p<.0001.

Unexposed fibroblast migration properties were stimulated by 24h-conditioned media. In order to assess the indirect effects of electric field application on the migration properties of dermal fibroblasts, scratch wound assays with cells cultured in conditioned media were performed (Figure 6). In this condition, analyzed dermal fibroblasts were never submitted to electric field, but only exposed to cell culture medium conditioned for 24h by dermal fibroblasts

that had themselves been exposed to different conditions of ECT and GET. Statistical analyses on a large number of replicates indicated that over the first 24h the conditioned media of GET 200V/cm condition improved wound closure compared to control condition. A trend emerged from 10h, which became statistically significant at 18h and then increased over the last 6 hours of the experiment. However, these analyses did not reveal statistical differences for the other GET conditions nor for the ECT conditions (figure 6A). Cell confluence within wound area after 24h of culture in conditioned media indicated a global trend for all conditioned-media conditions to stimulate cell migration (Figure 6B). However, only the conditioned media of GET 200V/cm condition statistically improved the wound healing in the scratch wound assay. It has to be underlined that the electric parameters applied in this condition were the ones leading to moderate apoptosis. We thus hypothesized that dermal fibroblasts exposed to pulsed electric fields and undergoing light apoptosis secreted several factors stimulating unexposed fibroblasts to migrate in the wound area.

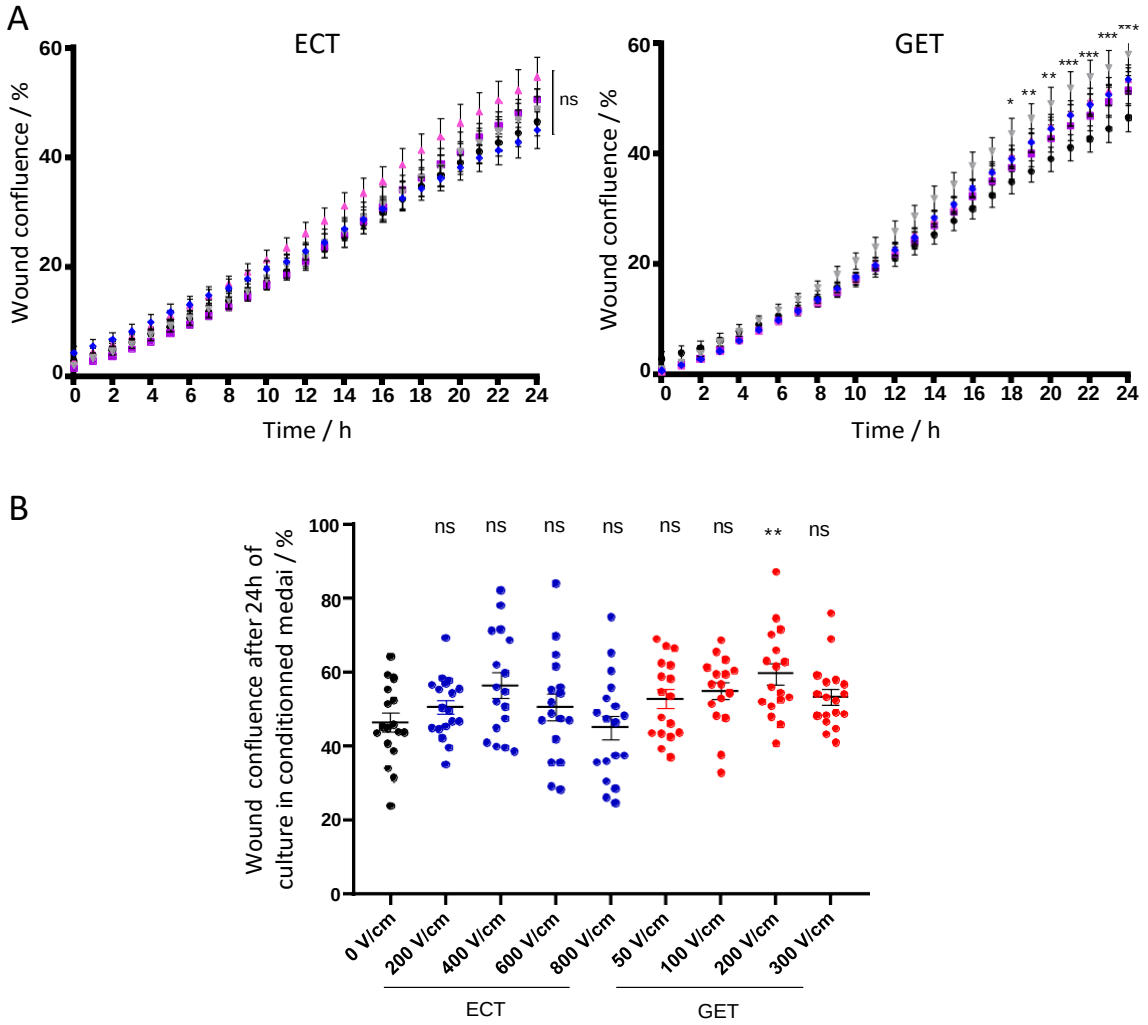


Figure 6: Conditioned media from electroporated-fibroblasts stimulated the migration of unexposed fibroblasts. A. Migration of dermal fibroblasts cultured in 24h ECT-(x8 pulses lasting 100µs, 1Hz frequency, at 0V/cm (●), 200V/cm (■), 400 V/cm (▲), 600V/cm (▼), 800V/cm (♦)) and and GET-(x10 pulses lasting 5ms, 1Hz frequency, at 0V/cm (●), 50V/cm (■), 100 V/cm (▲), 200V/cm (▼), 300V/cm (♦)) conditioned cell culture media. N=3; n= 18. Only the 200V/cm condition showed statistical difference with the control condition (0V/cm). Statistical analysis by Two Way ANOVA *=p<.05; **=p<.01; ***=p<.001 B. Wound confluence after 24h of culture in 24h ECT- or GET-conditioned media. N=3; n=18. Data are represented as the mean value ± SEM. Statistical analysis by One-way ANOVA **=p<.01.

ECT and GET electric parameters strongly modulate growth factor transcripts. In order to understand the above results, a commercially available qPCR array dedicated to wound healing was performed 4h after exposure to ECT and GET electric parameters. This analysis revealed significant variations in the number of growth factor transcripts (Figure 7A).

Overexpressed genes (in red in the figure) in both conditions include Connective Tissue Growth Factor (CTGF), Vascular Endothelial Growth Factor A (VEGFA), Platelet Derived Growth Factor Subunit A (PDGFA), and Transforming Growth Factor Alpha (TGFα) with 1.2- to 3.6-fold increases compared to non-electroporated controls. Several growth factors were also under-expressed (in green in the figure) 4h after exposure to ECT and GET electric parameters including TGF-β1 a well-known protagonist in dermal fibrosis. For GET parameters we also noted specific over-expressions of immunity-related factors like Colony stimulating factor 3 (CSF3), as well as angiogenic factors like Epidermal growth factor (EGF). This experiment confirmed that the expression of several growth factors transcripts was rapidly and strongly modulated after cell electroporation. To confirm that this modulation of growth factors transcripts was also observed at protein level, we quantified one using ELISA in cell culture medium 24h after electroporation of dermal fibroblasts (Figure 7B). We focused on Vascular Endothelial Growth Factor A (VEGFA) because it was the more over-expressed at the RNA level (2.4 times in ECT and 3.3 times in GET conditions). More VEGFA protein was indeed found in cell culture supernatant 24h after electroporation both in ECT condition (even if not statistically significant) and in GET condition (statistically significant). We thus confirmed at protein level that electroporation, especially GET condition, increases the expression of VEGFA growth factor, as observed at transcriptional level

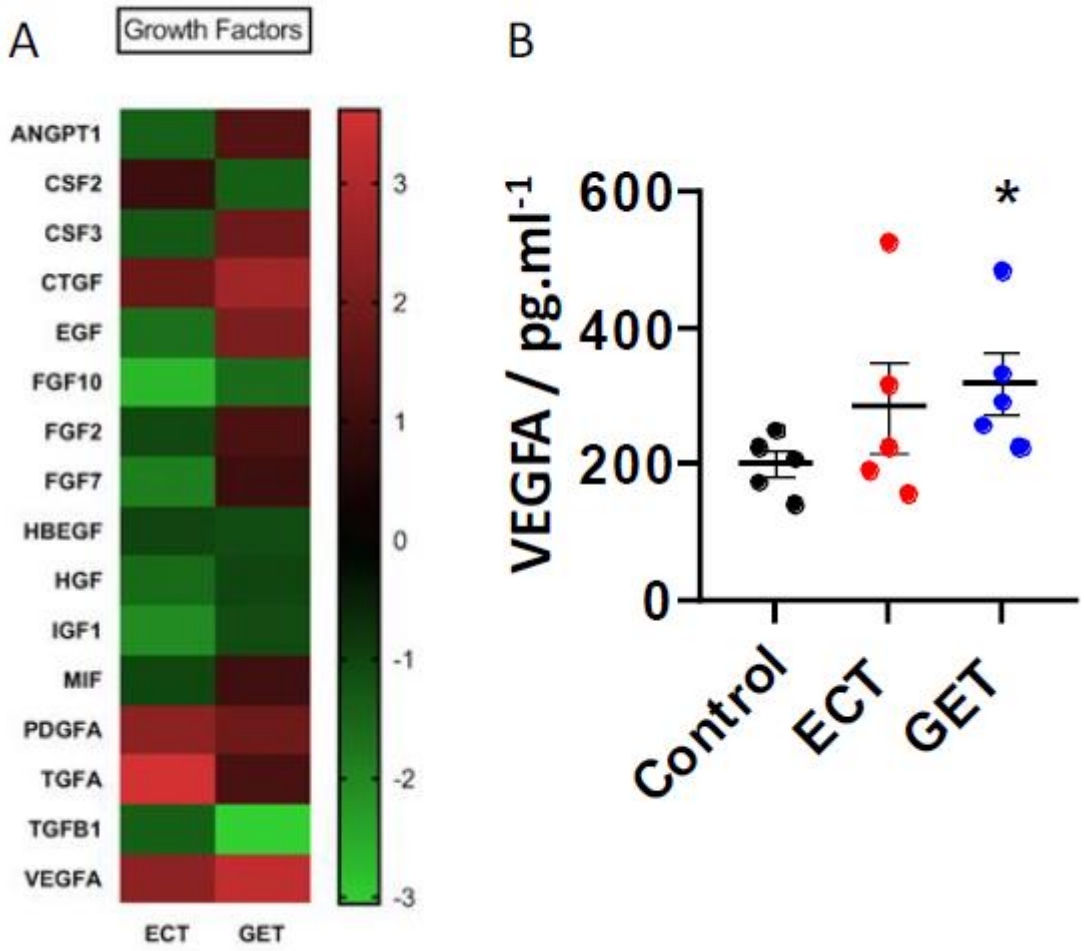


Figure 7: Gene expression analysis of growth factor related genes in dermal fibroblasts 4h after exposure to ECT and GET electric parameters. A. Gene expression was quantified by RT-qPCR array. Fold changes are expressed compared to the control condition. Control and ECT condition (600V/cm) n=3, GET condition (200V/cm) n=2. Angiopoietin 1 (ANGPT1); Colony stimulating factor 2,3 (CSF2,3); Connective Tissue Growth Factor (CTGF); Epidermal growth factor (EGF); Fibroblast growth factor 2,7,10 (FGF2,7,10); Heparin binding EGF like growth factor (HBEGF); Hepatocyte growth factor (HGF); Insulin like growth factor 1 (IGF1); Macrophage migration inhibitory factor (MIF); Platelet Derived Growth Factor Subunit A (PDGFA); Transforming Growth Factor Alpha (TGFα); Transforming Growth Factor Beta 1 (TGF-β1); Vascular Endothelial Growth Factor A (VEGFA). B. VEGFA protein expression quantified by ELISA in cell culture medium 24h after dermal fibroblasts electroporation with ECT (600V/cm) and GET (200V/cm) electric parameters N=1, n=5. Statistical analysis by Mann Whitney test *=p<.05.

Discussion

The existence of a physiological transepithelial electric potential within the skin makes skin cells a good target for testing modulation of behavior through electroporation application. Endogenous electric fields are important to guide cell migration and often predominate over chemical or topographic signals [39]. Directional migration along an electric field guiding cue has already been shown in fibroblast cells [24,40,41]. Human dermal fibroblasts submitted to an electric field of 50–200 mV mm^{-1} under direct current took more than 1 hour to exhibit measureable directional migration toward the anode [24,41]. Zhao *et al.* have identified Phosphatidyl-Inositol 3 Kinase (PI(3)K) and Phosphatase and tensin homolog (PTEN) as essential genes controlling the electrotaxis [24]. Indeed, the electric field directs cell migration by acting as the primary directional signal, triggering Tyrosine-protein Kinase Src and Inositol-phospholipid signalling pathways. The role of Phosphatidyl-Inositol 3 Kinase in electro-induced migration was confirmed by Guo and colleagues in 2010 [41]. Another suggested mechanism is the asymmetric redistribution of EGFR membrane receptors on the cell surface [42–44]. Nevertheless, these studies mainly applied long exposure direct currents, whereas in this study we used a pulsed electric field. The difference in the nature and intensity of the applied electric fields could explain the absence of significate results in migration and galvanotaxis experiments with electroporation.

High-voltage pulsed galvanic stimulation has been shown to have a proliferative effect on human foetal lung fibroblasts IMR-90 and to stimulate protein synthesis [45]. This study indicated an increase in protein synthesis rates 2h post stimulation and in DNA synthesis between 2 and 24h post stimulation. The maximum increases in protein and DNA synthesis occurred with electric parameters of 100 pulses/seconds and 50 and 75 V/cm respectively. In this study, electrical parameters were applied for at least 20 min, far from the pulsed electric

field applied in electroporation. Thus, the involved molecular mechanisms may differ and explain the absence of proliferation after ECT and GET application.

Reactive oxygen species (ROS) play a major role in wound healing response [46,47]. Interestingly, it has previously been shown that electroporation generates ROS such as H_2O_2 [48,49]. Studies on lipid peroxidation in cell membranes after electroporation have been reported [48–50]. Lipids peroxidation and ROS concentration increase with electric field intensity, pulse duration and number of pulses and is correlated to membrane electropermeabilization and to cell death when the amount of cellular damage is too high [51]. ROS can be involved in the recruitment of immune cells [52,53], in the regulation of angiogenesis processes [46,54] and they present bacteriostatic effects at wound sites [55]. However, high production of ROS may lead to impaired wound repair [56]. In these conditions ROS will give rise to the secretion of pro-inflammatory cytokines, of metalloproteases, and can impair the function of dermal fibroblasts and keratinocytes [57]. Moreover, ROS are generally associated with skin ageing, fibroblast senescence and autophagy [58]. In our experimental conditions, electroporation of dermal fibroblasts with the highest electric field intensities in GET condition (200V/cm and 300V/cm) blocked migration process and induced cell death. These results are in agreement with those reported in the literature showing the deleterious effects of H_2O_2 on dermal fibroblasts [59,60].

We demonstrated that modulating the intensity of the electric fields led to a gradient of cell electropermeabilization. We can hypothesize that cell responses to these different plasma membrane defaults will be different. Indeed, apoptotic cell death induction was observed for the most stressful GET electrical parameters (i.e 200V/cm and 300V/cm). The secretome in a culture medium that was conditioned in these electric conditions improved the ability of unexposed dermal fibroblasts to migrate. We can theorize that this bystander effect can occur *in vivo*, where dying cell would secrete specific factors modifying surrounding cells behavior.

It was previously demonstrated in electroporation that electric field alone induced the externalization of calreticulin [61] while calreticulin is usually an endoplasmic reticulum-resident protein. When externalized, it becomes a danger-associated molecular pattern molecule (DAMP) associated with the induction of immunogenic cell death [62]. Interestingly, studies showed that calreticulin externalization played a significant role in cutaneous wound healing by stimulating dermal fibroblast and keratinocyte proliferation, migration, and differentiation [63]. Several studies have already shown that nucleotides released from damaged tissues, such as extracellular ATP or purines and pyrimidines released following cell death and DNA fragmentation, regulate many important functions of skin cells (proliferation, migration, contraction) and can promote wound healing [64].

Further experiments would be needed to finely describe what kind of factors are secreted or released by the dying cells. We obtained encouraging results on the modulation of a number of growth factors transcripts by electroporation. One of them, VEGFA, was quantified at protein level by ELISA. In our experimental condition, we demonstrated that electroporated dermal fibroblasts released in cell culture a significant amount of VEGFA. However, comprehensive analyses of both growth factors and cytokines secreted as a result of electroporation should be exhaustively conducted at protein level (ELISA, proteomic, secretome profiling) and functional tests are essential to conclude in our experimental conditions. Interestingly, cues can be found in the literature to enrich the reflection on this bystander effect. Some authors used pulsed electric field to activate platelets. They showed that electroporation stimulates the release of growth factors such as PDGF-AA, TGF-β1 or EGF, contained in granules within the cells [65]. A modulation of pulsed electric field parameters led to a differential growth factors release [66].

Bystander effect induced by electroporation was previously investigated in the context of melanoma tumor cells [67]. In this context, a negative bystander effect leading to death of cells cultivated in conditioned medium was observed and could be due to release of microvesicles

(<500nm). Interestingly, the bystander effect and microvesicles amounts depended on electric parameters (pulse amplitude and repetition frequency), confirming that in tissue cell response will be different depending on electric field distribution. Since electroporation affects plasma membrane integrity, it would be of utmost importance to characterize well and screen the induced extracellular vesicles, which can contain proteins, RNA molecules and other agents, able to influence signaling pathways in distant cells.

In this line of thought on communication between cells, co-culture of cells would be a complementary approach to the one adopted in this study. In our case, a co-culture of dermal cells (primary fibroblasts) with epidermal cells (primary keratinocytes) would be relevant. To go forward, *in vitro* cell culture models should switch from 2D to 3D tissue models. Even if 2D cell cultures are easier to manage, it is now widely accepted that 3D models better mimic *in vivo* situations [68]. In skin context, some *in vitro* 3D tissue models such as spheroids [69], dermal cell sheets [29,70] or recellularized human skin biopsy [71] have been developed and used in electroporation study. The next step would be to use them for fundamental studies to better understand links between electroporation and wound healing.

Author Contributions. conceptualization, L.G.; investigation and formal analyses, S.G., A.D., L.G.; writing-original draft preparation, S.G. and L.G.; writing-review and editing, S.G., AF.M., P.V., MP.R., L.G.; scientific discussion, S.G., A.D., AF.M., P.V., MP.R., L.G.; supervision, L.G.; funding acquisition, MP.R., L.G.

Funding. This research was funded by the French Agence Nationale de la recherche, ANR-17-CE19-0013-01 and NUMEP Plan Cancer PC201615 grant.

Acknowledgments. We would like to thank the Imaging and flow cytometry Core Facility TRI-IPBS. We would like to warmly thank Dr Ahmed Amine Khamlichi and Audrey Dauba for their help in RT-qPCR array experiments. We kindly acknowledge Simon Harrisson, a native English scientist, for his careful proofreading of this manuscript.

Conflicts of Interest. The authors declare no conflict of interest. The funders had no role in the design of the study; in the collection, analyses, or interpretation of data; in the writing of the manuscript, or in the decision to publish the results.

References

[1] E. Neumann, K. Rosenheck, Permeability changes induced by electric impulses in vesicular membranes, J. Membr. Biol. 10 (1972) 279–290.

[2] J. Teissie, M. Golzio, M.P. Rols, Mechanisms of cell membrane electropermeabilization: a minireview of our present (lack of?) knowledge, Biochim. Biophys. Acta BBA-Gen. Subj. 1724 (2005) 270–280.

[3] M.L. Yarmush, A. Golberg, G. Serša, T. Kotnik, D. Miklavčič, Electroporation-Based Technologies for Medicine: Principles, Applications, and Challenges, Annu. Rev. Biomed. Eng. 16 (2014) 295–320. https://doi.org/10.1146/annurev-bioeng-071813-104622.

[4] L.G. Campana, I. Edhemovic, D. Soden, A.M. Perrone, M. Scarpa, L. Campanacci, M. Cemazar, S. Valpione, D. Miklavčič, S. Mocellin, E. Sieni, G. Sersa, Electrochemotherapy – Emerging applications technical advances, new indications, combined approaches, and multi-institutional collaboration, Eur. J. Surg. Oncol. 45 (2019) 92–102. https://doi.org/10.1016/j.ejso.2018.11.023.

[5] E.P. Spugnini, A. Baldi, Electrochemotherapy in Veterinary Oncology, Vet. Clin. North Am. Small Anim. Pract. 49 (2019) 967–979. https://doi.org/10.1016/j.cvsm.2019.04.006.

[6] J. Gehl, G. Sersa, L.W. Matthiessen, T. Muir, D. Soden, A. Occhini, P. Quaglino, P. Curatolo, L.G. Campana, C. Kunte, A.J.P. Clover, G. Bertino, V. Farricha, J. Odili, K. Dahlstrom, M. Benazzo, L.M. Mir, Updated standard operating procedures for electrochemotherapy of cutaneous tumours and skin metastases, Acta Oncol. 57 (2018) 874–882. https://doi.org/10.1080/0284186X.2018.1454602.

[7] E. Kis, E. Baltás, Á. Kinyó, E. Varga, N. Nagy, R. Gyulai, L. Kemény, J. Oláh, Successful Treatment of Multiple Basaliomas with Bleomycin-based Electrochemotherapy: A Case Series of Three Patients with Gorlin-Goltz Syndrome, Acta Derm Venereol. 92 (2012) 648–51. https://doi.org/10.2340/00015555-1361.

[8] L.F. Glass, M. Jaroszeski, R. Gilbert, D.S. Reintgen, R. Heller, Intralesional bleomycin-mediated electrochemotherapy in 20 patients with basal cell carcinoma, J. Am. Acad. Dermatol. 37 (1997) 596–599. https://doi.org/10.1016/S0190-9622(97)70178-6.

[9] M. Marty, G. Sersa, J.R. Garbay, J. Gehl, C.G. Collins, M. Snoj, V. Billard, P.F. Geertsen, J.O. Larkin, D. Miklavcic, I. Pavlovic, S.M. Paulin-Kosir, M. Cemazar, N. Morsli, D.M. Soden, Z. Rudolf, C.

Robert, G.C. O'Sullivan, L.M. Mir, Electrochemotherapy – An easy, highly effective and safe treatment of cutaneous and subcutaneous metastases: Results of ESOPE (European Standard Operating Procedures of Electrochemotherapy) study, Eur. J. Cancer Suppl. 4 (2006) 3–13. https://doi.org/10.1016/j.ejcsup.2006.08.002.

[10] L.G. Campana, S. Mocellin, M. Basso, O. Puccetti, G.L. De Salvo, V. Chiarion-Sileni, A. Vecchiato, L. Corti, C.R. Rossi, D. Nitti, Bleomycin-Based Electrochemotherapy: Clinical Outcome from a Single Institution's Experience with 52 Patients, Ann. Surg. Oncol. 16 (2009) 191–199. https://doi.org/10.1245/s10434-008-0204-8.

[11] L. Gibot, M.-P. Rols, Gene transfer by pulsed electric field is highly promising in cutaneous wound healing, Expert Opin. Biol. Ther. 16 (2016) 67–77. https://doi.org/10.1517/14712598.2016.1098615.

[12] M.P. Lin, G.P. Marti, R. Dieb, J. Wang, M. Ferguson, R. Qaiser, P. Bonde, M.D. Duncan, J.W. Harmon, Delivery of plasmid DNA expression vector for keratinocyte growth factor-1 using electroporation to improve cutaneous wound healing in a septic rat model, Wound Repair Regen. 14 (2006) 618–624.

[13] G. Basu, H. Downey, S. Guo, A. Israel, A. Asmar, B. Hargrave, R. Heller, Prevention of distal flap necrosis in a rat random skin flap model by gene electrotransfer delivering VEGF165 plasmid, J. Gene Med. 16 (2014) 55–65.

[14] B. Ferraro, Y.L. Cruz, M. Baldwin, D. Coppola, R. Heller, Increased perfusion and angiogenesis in a hindlimb ischemia model with plasmid FGF-2 delivered by noninvasive electroporation, Gene Ther. 17 (2010) 763.

[15] L. Steinstraesser, M.C. Lam, F. Jacobsen, P.E. Porporato, K.K. Chereddy, M. Becerikli, I. Stricker, R.E. Hancock, M. Lehnhardt, P. Sonveaux, Skin electroporation of a plasmid encoding hCAP-18/LL-37 host defense peptide promotes wound healing, Mol. Ther. 22 (2014) 734–742.

[16] G. Marti, M. Ferguson, J. Wang, C. Byrnes, R. Dieb, R. Qaiser, P. Bonde, M.D. Duncan, J.W. Harmon, Electroporative transfection with KGF-1 DNA improves wound healing in a diabetic mouse model, Gene Ther. 11 (2004) 1780–1785. https://doi.org/10.1038/sj.gt.3302383.

[17] P.-Y. Lee, S. Chesnoy, L. Huang, Electroporatic Delivery of TGF-β1 Gene Works Synergistically with Electric Therapy to Enhance Diabetic Wound Healing in db/db Mice, J. Invest. Dermatol. 123 (2004) 791–798. https://doi.org/10.1111/j.0022-202X.2004.23309.x.

[18] S. Ud-Din, A. Bayat, Electrical stimulation and cutaneous wound healing: a review of clinical evidence, in: Healthcare, Multidisciplinary Digital Publishing Institute, 2014: pp. 445–467.

[19] I.S. Foulds, A.T. Barker, Human skin battery potentials and their possible role in wound healing, Br. J. Dermatol. (1983). https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/j.1365-2133.1983.tb07673.x (accessed August 19, 2019).

[20] I.S. Foulds, A.T. Barker, Human skin battery potentials and their possible role in wound healing, Br. J. Dermatol. 109 (1983) 515–522. https://doi.org/10.1111/j.1365-2133.1983.tb07673.x.

[21] R. Nuccitelli, Endogenous ionic currents and DC electric fields in multicellular animal tissues, Bioelectromagnetics. 13 (1992) 147–157. https://doi.org/10.1002/bem.2250130714.

[22] A.T. Barker, L.F. Jaffe, J.W. Vanable, The glabrous epidermis of cavies contains a powerful battery, Am. J. Physiol.-Regul. Integr. Comp. Physiol. 242 (1982) R358–R366. https://doi.org/10.1152/ajpregu.1982.242.3.R358.

[23] B. Reid, M. Zhao, The electrical response to injury: molecular mechanisms and wound healing, Adv. Wound Care. 3 (2014) 184–201.

[24] M. Zhao, B. Song, J. Pu, T. Wada, B. Reid, G. Tai, F. Wang, A. Guo, P. Walczysko, Y. Gu, Electrical signals control wound healing through phosphatidylinositol-3-OH kinase-γ and PTEN, Nature. 442 (2006) 457.

[25] M. Kranjc, D. Miklavčič, Electric Field Distribution and Electroporation Threshold, in: D. Miklavcic (Ed.), Handb. Electroporation, Springer International Publishing, Cham, 2016: pp. 1–17. https://doi.org/10.1007/978-3-319-26779-1_4-1.

[26] S. Corovic, I. Lackovic, P. Sustaric, T. Sustar, T. Rodic, D. Miklavcic, Modeling of electric field distribution in tissues during electroporation, Biomed. Eng. OnLine. 12 (2013) 16. https://doi.org/10.1186/1475-925X-12-16.
[27] L. Gibot, T. Galbraith, J. Huot, F.A. Auger, A Preexisting Microvascular Network Benefits In Vivo Revascularization of a Microvascularized Tissue-Engineered Skin Substitute, Tissue Eng. Part A. 16 (2010) 3199–3206. https://doi.org/10.1089/ten.tea.2010.0189.
[28] L. Gibot, T. Galbraith, J. Huot, F.A. Auger, Development of a tridimensional microvascularized human skin substitute to study melanoma biology, Clin. Exp. Metastasis. 30 (2013) 83–90. https://doi.org/10.1007/s10585-012-9511-3.
[29] M. Madi, M.-P. Rols, L. Gibot, Efficient In Vitro Electropermeabilization of Reconstructed Human Dermal Tissue, J. Membr. Biol. 248 (2015) 903–908. https://doi.org/10.1007/s00232-015-9791-z.
[30] A. Figarol, L. Gibot, M. Golzio, B. Lonetti, A.-F. Mingotaud, M.-P. Rols, A journey from the endothelium to the tumor tissue: distinct behavior between PEO-PCL micelles and polymersomes nanocarriers, Drug Deliv. 25 (2018) 1766–1778. https://doi.org/10.1080/10717544.2018.1510064.
[31] L. Gibot, L. Wasungu, J. Teissié, M.-P. Rols, Antitumor drug delivery in multicellular spheroids by electropermeabilization, J. Controlled Release. 167 (2013) 138–147. https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2013.01.021.
[32] P.K. Davis, A. Ho, S.F. Dowdy, Biological Methods for Cell-Cycle Synchronization of Mammalian Cells, BioTechniques. 30 (2001) 1322–1331. https://doi.org/10.2144/01306rv01.
[33] L.D. Zorova, V.A. Popkov, E.Y. Plotnikov, D.N. Silachev, I.B. Pevzner, S.S. Jankauskas, V.A. Babenko, S.D. Zorov, A.V. Balakireva, M. Juhaszova, S.J. Sollott, D.B. Zorov, Mitochondrial membrane potential, Anal. Biochem. 552 (2018) 50–59. https://doi.org/10.1016/j.ab.2017.07.009.
[34] K.M. Robinson, M.S. Janes, J.S. Beckman, The selective detection of mitochondrial superoxide by live cell imaging, Nat. Protoc. 3 (2008) 941–947. https://doi.org/10.1038/nprot.2008.56.
[35] J. Zielonka, J. Vasquez-Vivar, B. Kalyanaraman, Detection of 2-hydroxyethidium in cellular systems: a unique marker product of superoxide and hydroethidine, Nat. Protoc. 3 (2008) 8–21. https://doi.org/10.1038/nprot.2007.473.
[36] J.E.N. Jonkman, J.A. Cathcart, F. Xu, M.E. Bartolini, J.E. Amon, K.M. Stevens, P. Colarusso, An introduction to the wound healing assay using live-cell microscopy, Cell Adhes. Migr. 8 (2014) 440–451. https://doi.org/10.4161/cam.36224.
[37] E. Phez, L. Gibot, M.-P. Rols, How transient alterations of organelles in mammalian cells submitted to electric field may explain some aspects of gene electrotransfer process, Bioelectrochemistry. 112 (2016) 166–172. https://doi.org/10.1016/j.bioelechem.2016.02.004.
[38] L.D. Zorova, V.A. Popkov, E.Y. Plotnikov, D.N. Silachev, I.B. Pevzner, S.S. Jankauskas, V.A. Babenko, S.D. Zorov, A.V. Balakireva, M. Juhaszova, S.J. Sollott, D.B. Zorov, Mitochondrial membrane potential, Mitochondrial Biochem. Bioenergenetics. 552 (2018) 50–59. https://doi.org/10.1016/j.ab.2017.07.009.
[39] R.H.W. Funk, Endogenous electric fields as guiding cue for cell migration, Front. Physiol. 6 (2015) 143–143. https://doi.org/10.3389/fphys.2015.00143.
[40] M.S. Kim, M.H. Lee, B.-J. Kwon, M.-A. Koo, G.M. Seon, J.-C. Park, Golgi polarization plays a role in the directional migration of neonatal dermal fibroblasts induced by the direct current electric fields, Biochem. Biophys. Res. Commun. 460 (2015) 255–260. https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2015.03.021.
[41] A. Guo, B. Song, B. Reid, Y. Gu, J.V. Forrester, C.A.B. Jahoda, M. Zhao, Effects of Physiological Electric Fields on Migration of Human Dermal Fibroblasts, J. Invest. Dermatol. 130 (2010) 2320–2327. https://doi.org/10.1038/jid.2010.96.
[42] K.S. Fang, E. Ionides, G. Oster, R. Nuccitelli, R.R. Isseroff, Epidermal growth factor receptor relocalization and kinase activity are necessary for directional migration of keratinocytes in DC electric fields, J. Cell Sci. 112 (Pt 12) (1999) 1967–1978.

[43] M. Zhao, J. Pu, J.V. Forrester, C.D. McCaig, Membrane lipids, EGF receptors, and intracellular signals co-localize and are polarized in epithelial cells moving directionally in a physiological electric field, FASEB J. 16 (2002). https://doi.org/10.1096/fj.01-0811fje.
[44] C.E. Pullar, B.S. Baier, Y. Kariya, A.J. Russell, B.A.J. Horst, M.P. Marinkovich, R.R. Isseroff, beta4 integrin and epidermal growth factor coordinately regulate electric field-mediated directional migration via Rac1, Mol. Biol. Cell. 17 (2006) 4925–4935. https://doi.org/10.1091/mbc.e06-05-0433.
[45] G.J. Bourguignon, L.Y. Bourguignon, Electric stimulation of protein and DNA synthesis in human fibroblasts., FASEB J. 1 (1987) 398–402. https://doi.org/10.1096/fasebj.1.5.3678699.
[46] C. Dunnill, T. Patton, J. Brennan, J. Barrett, M. Dryden, J. Cooke, D. Leaper, N.T. Georgopoulos, Reactive oxygen species (ROS) and wound healing: the functional role of ROS and emerging ROS-modulating technologies for augmentation of the healing process, Int. Wound J. 14 (2017) 89–96. https://doi.org/10.1111/iwj.12557.
[47] J. Kanta, The role of hydrogen peroxide and other reactive oxygen species in wound healing, Acta Medica (Hradec Kralove). 54 (2011) 97–101.
[48] B. Gabriel, J. Teissie, Generation of reactive-oxygen species induced by electropermeabilization of Chinese hamster ovary cells and their consequence on cell viability, Eur. J. Biochem. 223 (1994) 25–33.
[49] P. Bonnafous, M.-C. Vernhes, J. Teissié, B. Gabriel, The generation of reactive-oxygen species associated with long-lasting pulse-induced electropermeabilisation of mammalian cells is based on a non-destructive alteration of the plasma membrane, Biochim. Biophys. Acta BBA-Biomembr. 1461 (1999) 123–134.
[50] M. Breton, L.M. Mir, Investigation of the chemical mechanisms involved in the electropulsation of membranes at the molecular level, Bioelectrochemistry. 119 (2018) 76–83.
[51] T. Kotnik, L. Rems, M. Tarek, D. Miklavčič, Membrane Electroporation and Electropermeabilization: Mechanisms and Models, Annu. Rev. Biophys. 48 (2019) 63–91. https://doi.org/10.1146/annurev-biophys-052118-115451.
[52] I.V. Klyubin, K.M. Kirpichnikova, I.A. Gamaley, Hydrogen peroxide-induced chemotaxis of mouse peritonecul neutrophils, (1996).
[53] M.M. Shi, J.J. Godleski, J.D. Paulauskis, Regulation of macrophage inflammatory protein-1 mRNA by oxidative stress, J. Biol. Chem. 271 (1996) 5878–5883.
[54] J.R. Stone, T. Collins, The role of hydrogen peroxide in endothelial proliferative responses, Endothelium. 9 (2002) 231–238.
[55] P.A. Hyslop, D.B. Hinshaw, I.U. Scraufstatter, C.G. Cochrane, S. Kunz, K. Vosbeck, Hydrogen peroxide as a potent bacteriostatic antibiotic: implications for host defense, Free Radic. Biol. Med. 19 (1995) 31–37.
[56] M. Schäfer, S. Werner, Oxidative stress in normal and impaired wound repair, Pharmacol. Res. 58 (2008) 165–171.
[57] R. Moseley, J.E. Stewart, P. Stephens, R.J. Waddington, D.W. Thomas, Extracellular matrix metabolites as potential biomarkers of disease activity in wound fluid: lessons learned from other inflammatory diseases?, Br. J. Dermatol. 150 (2004) 401–413.
[58] Y. Gu, J. Han, C. Jiang, Y. Zhang, Biomarkers, oxidative stress and autophagy in skin aging, Ageing Res. Rev. (2020) 101036.
[59] S. Yoshimoto, N. Kohara, N. Sato, H. Ando, M. Ichihashi, Riboflavin Plays a Pivotal Role in the UVA-Induced Cytotoxicity of Fibroblasts as a Key Molecule in the Production of H2O2 by UVA Radiation in Collaboration with Amino Acids and Vitamins, Int. J. Mol. Sci. 21 (2020) 554.
[60] D.R. Maldaner, V.F. Azzolin, F. Barbisan, M.H. Mastela, C.F. Teixeira, A. Dihel, T. Duarte, N.L. Pellenz, L.F.C. Lemos, C.M.U. Negretto, In vitro effect of low-level laser therapy on the proliferative, apoptosis modulation, and oxi-inflammatory markers of premature-senescent hydrogen peroxide-induced dermal fibroblasts, Lasers Med. Sci. 34 (2019) 1333–1343.

[61] C.Y. Calvet, D. Famin, F.M. André, L.M. Mir, Electrochemotherapy with bleomycin induces hallmarks of immunogenic cell death in murine colon cancer cells, Oncoimmunology. 3 (2014) e28131.
[62] G. Kroemer, L. Galluzzi, O. Kepp, L. Zitvogel, Immunogenic Cell Death in Cancer Therapy, Annu. Rev. Immunol. 31 (2013) 51–72. https://doi.org/10.1146/annurev-immunol-032712-100008.
[63] L.B. Nanney, C.D. Woodrell, M.R. Greives, N.L. Cardwell, A.C. Pollins, T.A. Bancroft, A. Chesser, M. Michalak, M. Rahman, J.W. Siebert, Calreticulin enhances porcine wound repair by diverse biological effects, Am. J. Pathol. 173 (2008) 610–630.
[64] E. Gendaszewska-Darmach, M. Kucharska, Nucleotide receptors as targets in the pharmacological enhancement of dermal wound healing, Purinergic Signal. 7 (2011) 193. https://doi.org/10.1007/s11302-011-9233-z.
[65] A.S. Torres, A. Caiafa, A.L. Garner, S. Klopman, N. LaPlante, C. Morton, K. Conway, A.D. Michelson, A.L.I. Frelinger, V.B. Neculaes, Platelet activation using electric pulse stimulation: Growth factor profile and clinical implications, J. Trauma Acute Care Surg. 77 (2014) S94. https://doi.org/10.1097/TA.0000000000000322.
[66] A.L. Frelinger 3rd, A.J. Gerrits, V.B. Neculaes, T. Gremmel, A.S. Torres, A. Caiafa, S.L. Carmichael, A.D. Michelson, Tunable activation of therapeutic platelet-rich plasma by pulse electric field: Differential effects on clot formation, growth factor release, and platelet morphology, PloS One. 13 (2018) e0203557–e0203557. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0203557.
[67] A. Prevc, A. Bedina Zavec, M. Cemazar, V. Kloboves-Prevodnik, M. Stimac, V. Todorovic, P. Strojan, G. Sersa, Bystander Effect Induced by Electroporation is Possibly Mediated by Microvesicles and Dependent on Pulse Amplitude, Repetition Frequency and Cell Type, J. Membr. Biol. 249 (2016) 703–711. https://doi.org/10.1007/s00232-016-9915-0.
[68] F. Pampaloni, E.G. Reynaud, E.H.K. Stelzer, The third dimension bridges the gap between cell culture and live tissue, Nat. Rev. Mol. Cell Biol. 8 (2007) 839.
[69] B. Marrero, R. Heller, The use of an in vitro 3D melanoma model to predict in vivo plasmid transfection using electroporation, Biomaterials. 33 (2012) 3036–3046. https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2011.12.049.
[70] M. Madi, M.-P. Rols, L. Gibot, Gene Electrotransfer in 3D Reconstructed Human Dermal Tissue, Curr Gene Ther. 16 (2016) 75–82. https://doi.org/10.2174/1566523216666160331125052.
[71] A.A. Bulysheva, N. Burcus, C. Lundberg, C.M. Edelblute, M.P. Francis, R. Heller, Recellularized human dermis for testing gene electrotransfer ex vivo, Biomed. Mater. 11 (2016) 035002.

Annexe 2: *Pulsed electric fields induce extracellular matrix remodeling through MMPs activation and decreased collagen production,* Gouarderes S, Ober C., Doumard L., Dandurand J., Vicendo P., Fourquaux I., Goldberg A., Samouillan V., Gibot L.*, The Journal of Investigative Dermatology (2021), doi: https://doi.org/10.1016/j.jid.2021.09.025.*

Pulsed electric fields induce extracellular matrix remodeling through MMPs activation and decreased collagen production

Sara Gouarderes[1], Camille Ober[2], Layal Doumard[1], Jany Dandurand[2], Patricia Vicendo[1], Isabelle Fourquaux[3], Alexander Golberg[4], Valérie Samouillan[2], Laure Gibot[1]

[1] Laboratoire des IMRCP, Université de Toulouse, CNRS UMR 5623, Université Toulouse III - Paul Sabatier, France.

[2] CIRIMAT UMR 5085, Université de Toulouse, Université Toulouse III – Paul Sabatier, France

[3] Centre de Microscopie Électronique Appliquée à la Biologie, CMEAB, 133 route de Narbonne, 31062 Toulouse, France

[4] Porter School of Environment and Earth Sciences Studies, Tel Aviv University, Tel Aviv, Israel

SHORT TITLE Electroporation to remodel matrix

CORRESPONDING AUTHOR Dr Laure Gibot, Laboratoire des IMRCP, Université Toulouse III - Paul Sabatier, 118 route de Narbonne, 31066 Toulouse, France. +33561556272 gibot@chimie.ups-tlse.fr

KEYWORDS reversible electroporation, electrochemotherapy (ECT), gene electrotransfer (GET), metalloproteinases (MMPs), skin, tissue engineering

ABBREVIATIONS ECM: extracellular matrix; LP: long pulses protocol; MMPs: metalloproteinases; PEFs: pulsed electric fields; SP: short pulses protocol; ROS: reactive oxygen species

ABSTRACT. Impairment of extracellular matrix (ECM) remodeling is observed in the tumor microenvironment or fibrosis and results in excessive collagen production and/or decreased degradation by metalloproteinases MMPs. Thanks to their local application and transient effects, physical stimuli appear as attractive tools to remodel ECM. We assessed the potential of pulsed electric field technology, classically applied to drug delivery, to induce collagen remodeling at the tissue scale. A sophisticated *in vitro* tissue-engineered human dermal substitute was used to demonstrate that microsecond and millisecond pulsed electric fields induced 1) a rapid modulation (4h after electrostimulation) of mRNA's genes composing the matrisome, particularly a down-regulation of pro-collagens and ECM maturation's enzymes such as transglutaminase TG2 and LOX-like; 2) a transient decrease in pro-collagens production and hydroxyproline tissue content within a week after electrostimulation; 3) a long-lasting ROS-dependent over-activation of MMPs for at least 48h and 4) a down-regulation of TGF-β. These observations underpin that pulsed electric fields, a technology already approved for clinical use combined with anti-cancer agents, are particularly promising to provide local and effective treatment of abnormal ECM.

INTRODUCTION. The extracellular matrix (ECM) is a dynamic and complex mesh of structural proteins and carbohydrates that are essential for tissue development, structure, and functionality (Frantz et al. 2010). Impairment in its regulation, composition, biophysical properties and remodeling is observed in diseases such as cancers or fibrosis (Winkler et al. 2020). ECM components and the proteins that regulate ECM remodeling appear as promising therapeutic targets for human healthcare (Ivey et al. 2016). Physical strategies such as radiotherapy, hyperthermia, photodynamic therapy or emerging ones (plasma, sonoporation) appear to be a relevant strategic solution to induce ECM remodeling (Gouarderes et al.

2020b). Their local effect and space-time control application resonate with the ongoing quest to alleviate patients' adverse side effects from systemic pharmacological approaches.

In this study, we applied external pulsed electric fields (PEFs) that increase the cell membrane permeability, a phenomenon known as electroporation, presenting a wide variety of biomedical applications (Geboers et al. 2020). Electroporation can be either reversible or irreversible. While irreversible electroporation (IRE) and partial IRE lead to cell death and preservation of the structural integrity of surrounding tissue (Davalos et al. 2005; Golberg et al. 2016; Golberg et al. 2018), on the contrary, reversible electroporation transiently increase membrane permeability, enhancing concomitant delivery of therapeutics in drug delivery strategy, while preserving cell viability. In our work, we focused on reversible electroporation and applied similar electrical conditions to those applied in clinics for drug delivery. Thus, two distinct calibrated electric protocols already used in routine in human and veterinarian clinics for drug delivery to cure superficial and deep tumors were applied (Nuccitelli 2019; Yarmush et al. 2014). They consist of millisecond length "long pulses protocol" (LP) which is used for nucleic acids delivery in DNA vaccination gene therapy, and microsecond length "short pulses protocol" (SP) used for anti-tumor drug delivery in electrochemotherapy (Marty et al. 2006; Gehl et al. 2018). Our strategy lay on applying solely physical electrical stimuli, without the addition of any drugs, to modulate cell behavior. These calibrated electric parameters were applied to a sophisticated *in vitro* tissue-engineered human dermal substitute, produced through the self-assembly approach in which cells produce their own extracellular matrix (Athanasiou et al. 2013). Thus, the final tissue substitutes are rich in endogenous ECM proteins, as demonstrated by proteomic analyses (Magnan et al. 2018), demonstrating its complex composition and similarity to the native dermis.

Our findings indicate that applying a calibrated train of electric pulses as a purely physical stimulus tends to be a relevant therapeutic tool with a broad potential that can extend far

beyond its actual clinical application in electrochemotherapy. A good understanding of the cell mechanisms induced by the electric field itself (no need for external molecules addition) will increase its applicability in a context where ECM is abnormal such as in fibrosis.

RESULTS AND DISCUSSION

Human dermal substitutes present a unique biological architecture rich in collagens. Nowadays, researchers have the most benefit of hindsight with PEFs treatment of skin cancers. To demonstrate the high potential of PEFs in ECM remodeling, we turned to a model of human dermis substitute we have engineered. Scanning electron microscopy showed a polarization of the tissue model, with more cells on its top (culture medium side) and more ECM fibers on its bottom (Petri side) (Fig1A, B). Transmission electron microscopy of a whole transversal section confirmed this vertical gradient of cells and ECM (Fig1C). A zoom performed on the ECM part allowed to detect the characteristic banding pattern of collagens fibrils (Fig1D). Of note, fibril-forming collagens types I, III, and V, characterized by their ability to assemble into highly orientated supramolecular fibrils, are the main components of the human dermal extracellular matrix (Gelse 2003) and of the human dermal substitutes as assessed by proteomics (Magnan et al. 2018). This result correlated with the second-harmonic generation (SHG) signal, detected by two-photon microscopy, which confirms the proper organization of these fibrillar collagens within our tissue model (Fig1E). Fourier Transform Infrared-Attenuated Total Reflectance (FTIR-ATR) (Sanden et al. 2019) corroborated the polarization of the tissue model (Fig1F, Figure S1, Table S1).

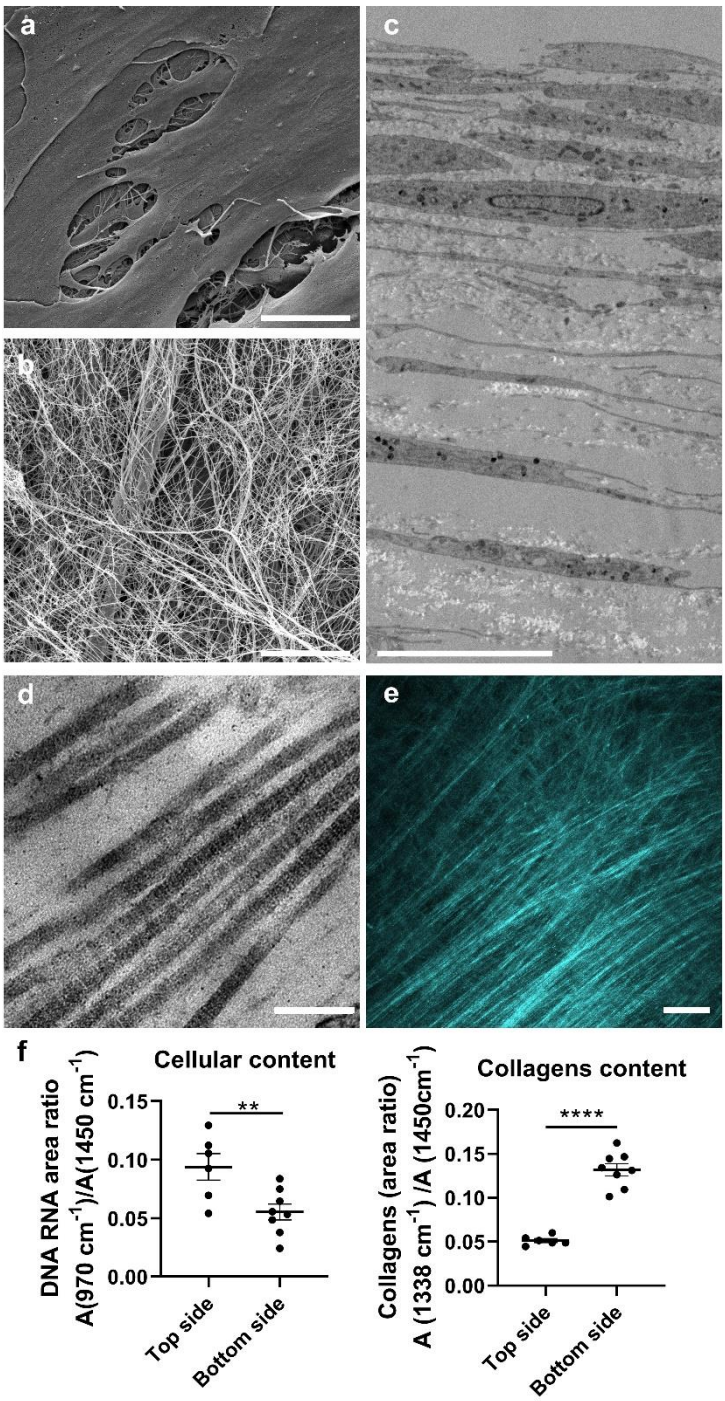


Figure 1. Human tissue-engineered 3D dermal substitutes are rich in collagens and present a top/bottom polarisation. A. Top surface (cell culture medium side) of dermal cell sheet observed by scanning electron microscopy (SEM). Scale bar = 5 µm. **B**. Bottom surface (Petri side) of dermal cell sheet observed by SEM. Scale bar = 5 µm. **C**. Transversal section of dermal substitute observed by transmission electron microscopy (TEM). Scale bar = 10 µm **D**. Striated collagens fibrils observed by TEM. Scale bar = 200 nm. **E**. Second Harmonic Generation (SHG, in cyan) signal detected in the top view of substitute by two-photon microscopy. Scale bar = 50 µm. **F**. Nucleic acids and collagens repartition between the medium side (top side) and Petri side (bottom side) measured by FTIR-ATR. n>6.

PEFs induce a differential expression of matrisome's genes. Mean FTIR spectra pointed out that electrostimulation did not cause significant alteration of the global spectral signature of the different biological components but changes in bands intensities (Figure S2). Interestingly, a focus on RNA 990 cm^{-1} band (Fig2A) evidenced a significant transient increase in RNA content of each side of the substitute 24h after electrostimulation. Transcriptomic analysis of differentially expressed genes in the whole tissue was led 4h after electrostimulation, within a time frame close to the stress, in order to not lose the dynamics following the application of PEFs. Results showed that among the 20,000 genes analyzed, 606 genes were differentially (±2 fold-changes and p-value $p < 0.01$) expressed 4h after long pulses (LP) protocol (350 up-regulated and 256 down-regulated) and 351 after short pulses SP protocol (258 up-regulated and 93 down-regulated) (Fig2B). All the genes modulated by SP protocol were also regulated in LP protocol, meaning that common pathways are activated independently of the pulse protocol applied. Gene ontology analysis was led using GOrilla tool (Eden et al. 2009) in order to visualize the most significantly enriched biological processes following electrostimulation (table S2). It appeared that metabolic pathway processes at large were mainly affected. In the context of our study, we focused on genes involved in the composition of the matrisome defined as the list of all the genes coding for proteins entering in the composition of matrices, grouping the "core matrisome" and "matrisome associated proteins" (Hynes and Naba 2012; Naba et al. 2016). Exhaustive transcriptomic results are dispatched in tables S3 (core matrisome) and S4 (matrisome-associated proteins). Presented volcano plots indicated that most of the genes impacted by PEFs were assigned to matrisome-associated proteins sub-panel and consisted principally in secreted proteins such as growth factors, regulatory factors such as metalloproteases MMPs and their inhibitors, and enzymes responsible for ECM cross-linking (Fig2C). Previous *in*

vitro studies confirmed the ability of PEFs to favor growth factors and the release of cytokines from different cell types at protein level (Garner et al. 2020; Gouarderes et al. 2020a).

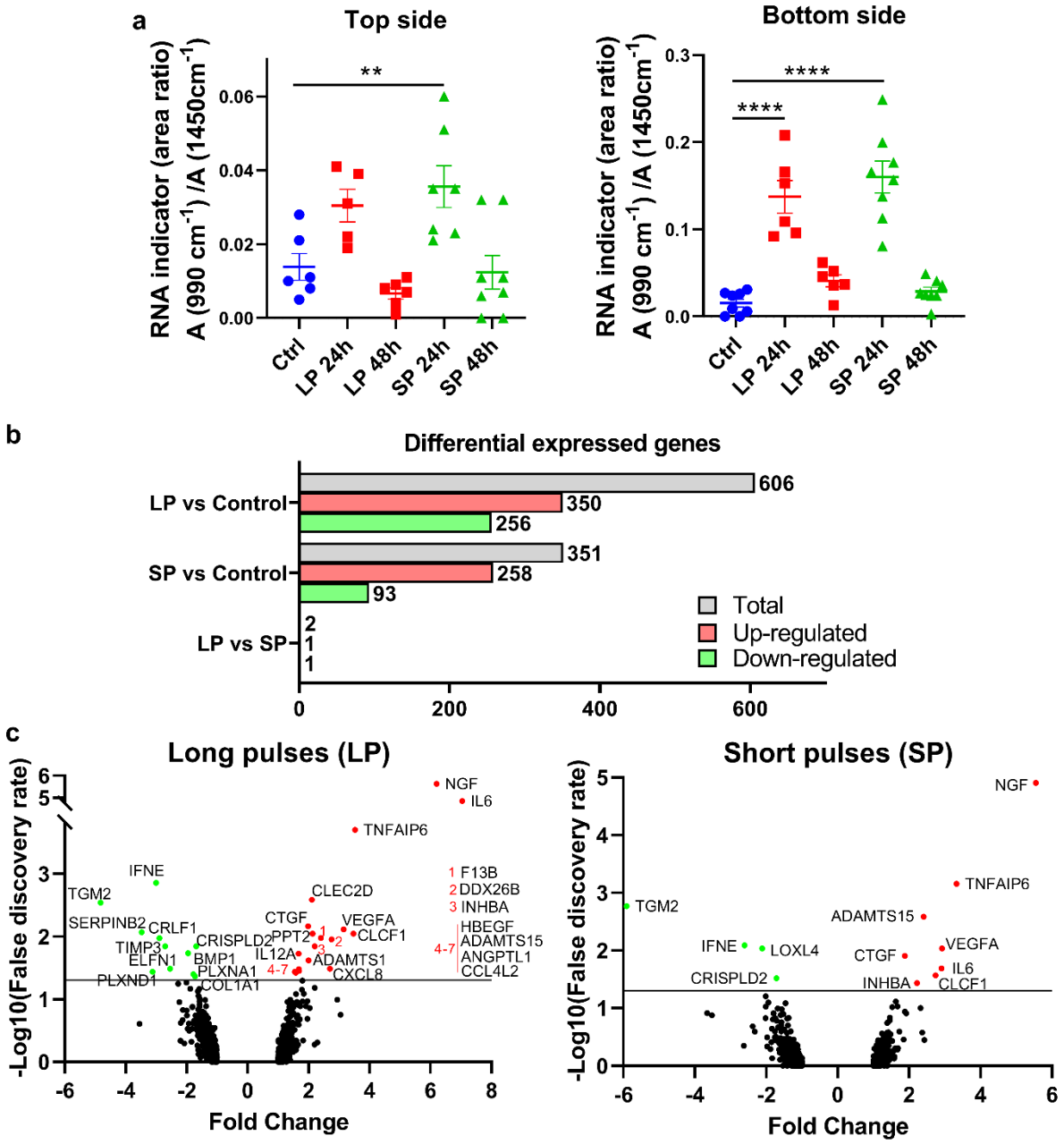


Figure 2. RNA content is modulated in dermal substitutes after electrostimulation. A. RNA indicators in the top (enriched in cells) and bottom (enriched in ECM) sides of the dermal substitute measured by FTIR-ATR 24h and 48h after electrostimulation. n>6. Control condition (Ctrl ●), long pulses (LP ■), and short pulses (SP ▲) protocols. **B**. Differentially expressed genes 4h after electrostimulation in control (Ctrl) condition, long pulses (LP) and short pulses (SP) protocols among the 20,000 genes analyzed by transcriptomic analysis using Clariom S Affymetrix array. n=4. **C.** Volcano plots showing the significant impact on differentially expressed matrisome's genes 4h after pulsed electric field stimulation with LP, and SP protocols. ADAMTS1: ADAM metallopeptidase with thrombospondin type 1 motif 1; ADAMTS15: ADAM metallopeptidase with thrombospondin type 1 motif 15; ANGPTL1:

angiopoietin like 1; BMP1: bone morphogenetic protein 1; CCL4L2: chemokine (C-C motif) ligand 4-like 2; CLCF1: cardiotrophin-like cytokine factor 1; CLEC2D: C-type lectin domain family 2, member D; COL1A1: collagen 1A1; CRISPLD2: cysteine-rich secretory protein LCCL domain containing 2; CRLF1: cytokine receptor-like factor 1; CTGF: connective tissue growth factor; CXCL8: chemokine (C-X-C motif) ligand 8; DDX26B: (Asp-Glu-Ala-Asp/His) box polypeptide 26B; ELFN1: extracellular leucine-rich repeat and fibronectin type III domain containing 1; F13B: coagulation factor XIII, B polypeptide; HBEGF: heparin-binding EGF-like growth factor; IFNE: interferon epsilon; IL12A: interleukin 12A; IL6: interleukin 6; INHBA: inhibin beta A; LOXL4: lysyl oxidase-like 4; NGF: nerve growth factor; PLXNA1: plexin A1; PLXND1: plexin D1; PPT2: palmitoyl-protein thioesterase 2; SERPINB2: serpin peptidase inhibitor member 2; TGM2: transglutaminase 2; TIMP3: TIMP metallopeptidase inhibitor 3; TNFAIP6: tumor necrosis factor, alpha-induced protein 6; VEGFA: vascular endothelial growth factor A.

PEFs induce a transient decrease in collagens production. mRNA modulation of the whole collagen family members 4h after the dermal tissue has been electrostimulated indicated a general trend towards a decrease in the expression of collagens (Table S3 and Figure S3A). FTIR-ATR analyses of dermal substitutes 24h and 48h after electrostimulation indicated that the collagens 1338 cm^{-1} band was not altered on the top side, rich in cells, but decreased in the bottom side, rich in ECM, solely for SP protocol conditions (Fig3A). Because FTIR-ATR is a superficial probe (up to 3.6 µm depth), we performed differential scanning calorimetry (DSC) analyses in order to evaluate collagens integrity in the whole tissue (Figure S4). No significant differences were observed for denaturation enthalpy ΔH_d and denaturation temperature T_{MID} after electrostimulation, indicating no major variation in collagens integrity after PEFs application. In parallel, we performed a whole tissue hydroxyproline quantification to estimate global collagen content, 48h, one week, and four weeks after the electrostimulation (Fig3B). Regardless of the electric protocol applied, a significant decrease ranging from 35% to 50% in tissue collagen's content was observed 1 week after electrostimulation. We verified that this decrease in hydroxyproline content one week after electrostimulation was not due to a decrease in the number of living cells capable of synthesizing collagens. No statistical difference between the control condition (110,000 cells ± 10,300) and the LP (116,000 cells ±

8,600) and SP (130,000 cells ± 6,600) conditions was observed. This decrease in tissue collagen's content was totally reversed after a long-term culture (4 weeks), demonstrating the character transient of the electrostimulation effects in an irrefutable way. To determine if this drop in global collagens content arises from a decrease in collagens production, the abundance of major dermal collagen (Ricard-Blum 2011), namely collagen I, was quantified in the supernatant (Fig3C). The analyses showed a significant decrease in pro-collagen Iα1 abundance in the supernatant of about 25% compared to the control condition as soon as 24h consecutively to electrostimulation, which lasted at least 48h.

During their maturation phase, collagen fibrils and other ECM components are strengthened by covalent cross-linking by lysyl oxidases (LOXs), lysyl hydroxylases, and tissue transglutaminases (TGs) (Griffin et al. 2002; Gelse 2003; Scott et al. 2012). In our experiments, analyses of LOXs mRNA family indicated a significant decrease for LOXL4 mRNA (Fig3D), and a major down-regulation (by -5 and -6-fold changes for LP and SP, respectively) of TG2 expression in transglutaminases mRNA family (Fig3E). TG2 is the most widely distributed and expressed member of the transglutaminase enzyme family (Collighan and Griffin 2009). Our results on LOX and TG mRNA down-regulation are significant but would deserve further investigation, by quantifying not only the protein level of these enzymes (ELISA) but also their activity (functional assays). A better definition of the effect of PEFs on the effective modulation of their activities, whose deregulation is implicated in many diseases (Trackman 2016; Szondy et al. 2017), would allow envisaging new therapeutic applications for this physical technology.

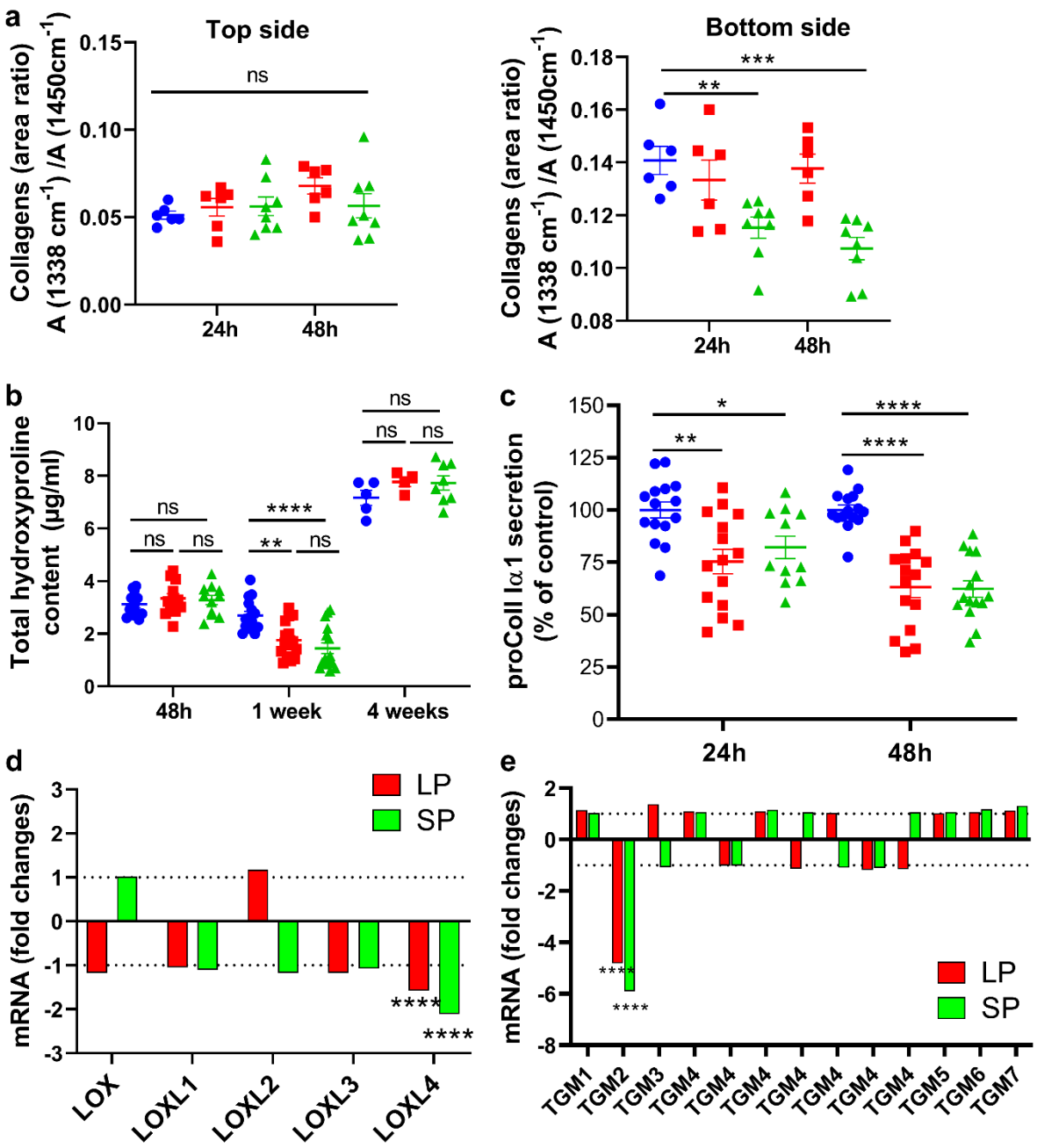


Figure 3. Collagens content transiently decreased in dermal substitute after electrostimulation. A. Collagens indicator in the top (enriched in cells) and bottom (enriched in ECM) sides of the dermal substitute measured by FTIR-ATR 24h and 48h after electrostimulation. **B.** Hydroxyproline content in the whole dermal substitute measured over the time after electrostimulation. **C.** Dosage by ELISA of pro-collagen Iα1 in supernatants. **D.** Modulation of lysyl-oxidases (LOX) family's mRNA 4h after electrostimulation. **E.** Modulation of transglutaminase (TGM) family's mRNA 4h after electrostimulation. Control condition (Ctrl ●), long pulses (LP ■), and short pulses (SP ▲) protocols.

PEFs induce sustained activation of MMPs without overexpression of the proteins. In order to understand the origin of collagen decrease after electrostimulation, we analyzed the mRNA modulation of the whole MMPs family members (FigS3B). 4h after electrostimulation, mRNAs of MMP-1 (-3.5-fold changes), and to a lesser extent MMP-2, -14, -16 were significantly down-regulated while MMP-19 mRNA was up-regulated. We then moved to the protein level, to quantify the main major cutaneous MMPs by ELISA, namely MMP-1, -2, -3, -9 (Amălinei et al. 2007; Kähäri and Saarialho-Kere 1997) (Fig4A). ELISA analyses showed that MMP-1 and MMP-2 protein expression slightly and transiently decreased in the 6 first hours after electrostimulation, while no difference in protein quantity was observed for MMP-3 over 48h after treatment. By contrast, MMP-9 was significantly higher in abundance at both 24h and 48h after LP protocol was applied, but not after SP protocol.

The cleavage of inactive zymogen (pro-MMPs) is a key step for their proteinase functions. In order to quantify the global amount of MMPs in the supernatant, we took advantage of the ability of organomercurial compounds to *in vitro* cleave pro-MMPs into their active form (Fig4B). Interestingly, no difference of global signal was observed 6h and 24h after electrostimulation, meaning that the quantity of MMPs in the supernatant is similar between control and electrostimulated conditions. However, a clear overexpression of global MMPs was noted in LP protocol 48h post-electrostimulation, which follows the same trends observed previously in the ELISA results for MMP-9 (Fig4A). To go further and be more realistic of the process involved in our experimental conditions, the activity of the solely endogenously active MMPs was quantified, reflecting the actual activity rate of MMPs in the model (Fig4C). A clear increase in MMPs activity was observed as soon as 6 hours after electrostimulation and maintained for at least 48 hours. Since this increase was not due to an overproduction of MMPs as quantified at the protein level (Fig4A and B), we hypothesized

that its endogenous inhibitors, the TIMPs family, were down-regulated. The transcriptomic analysis of mRNA modulation of the TIMPs family members 4h after electrostimulation indicated that only TIMP3 was statistically down-regulated in LP protocol (Fig4D), an observation not confirmed at protein levels by ELISA (Fig4E).

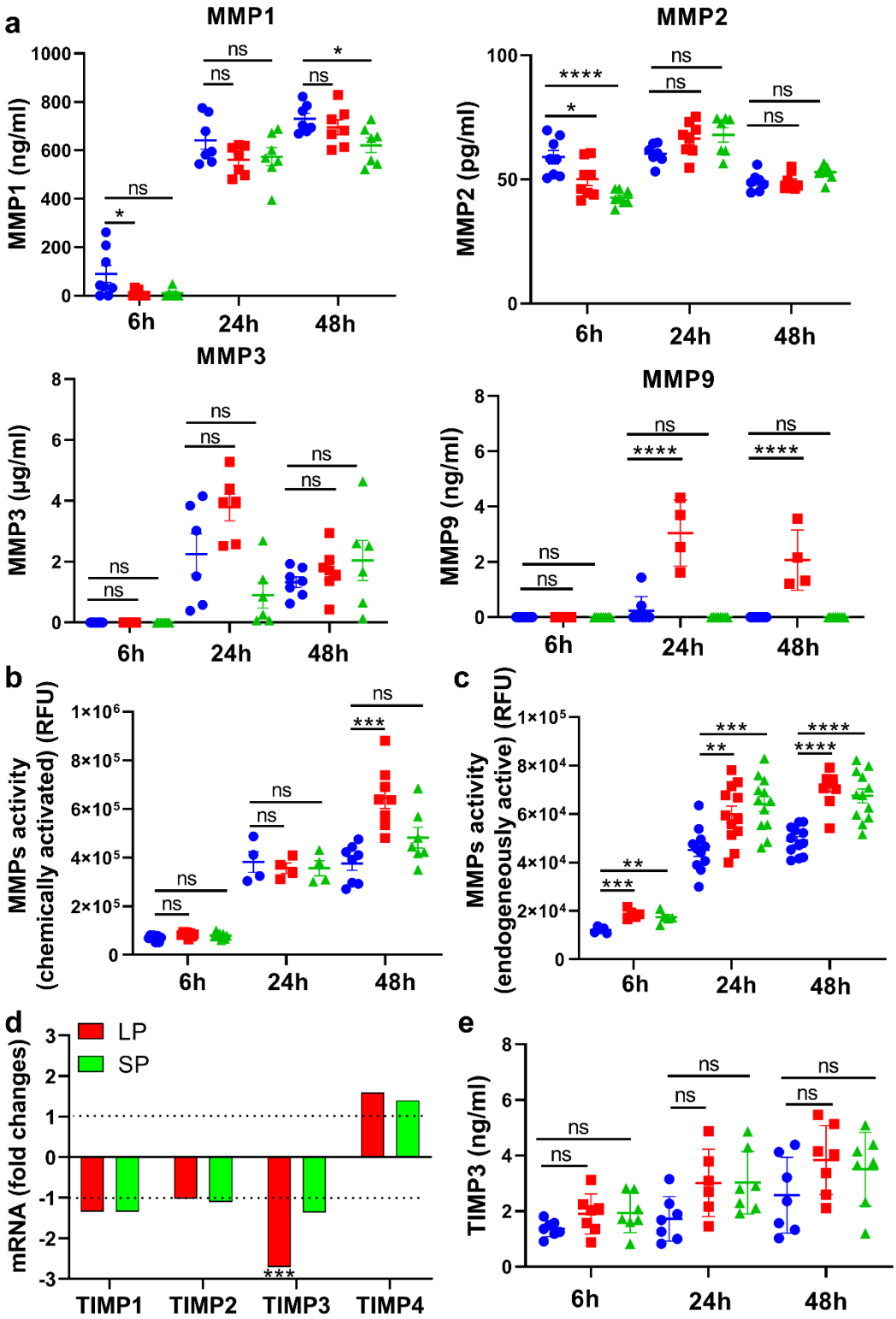


Figure 4. MMPs activity but not expression is increased after electrostimulation. A. Expression of MMP-1, -2, -3, and -9, quantified in the supernatant by ELISA. **B**. Global MMPs activity quantified by fluorimetry after chemical activation of all pro-MMPs present in the supernatant. **C**. Quantification by fluorimetry of endogenously active MMPs in the supernatant. **D**. Modulation of TIMPs family mRNA 4h after electrostimulation. **E**. TIMP-3 expression quantified in the supernatant by ELISA. Control condition (Ctrl ●), long pulses (LP ■), and short pulses (SP ▲) protocols.

Pharmacological MMPs' inhibitor partly restores collagens content. In order to estimate the degree of causality between MMP over-activity and the decrease in collagens content observed in tissues after the application of both LP and SP protocols, we added a broad-spectrum pharmacological inhibitor, namely GM6001 or Ilomastat, to the cultures. As expected, after 48h of culture, MMPs activity was non-significantly different between conditions in the presence of the inhibitor (Fig5A). Moreover, total hydroxyproline content in tissues one week after electrostimulation was statistically restored when MMPs activity was inhibited with GM6001 (Fig5B). While inhibition of MMPs activity after SP protocol clearly normalizes whole tissue collagen content, it was less efficient after LP protocol. FTIR-ATR analyses performed on the bottom side (richer in ECM) of the dermal substitutes 24h and 48h after electrostimulation confirmed that collagens content was restored in the presence of GM6001 after SP protocol, while no effect was detectable for LP protocol (Fig5C). ECM remodeling is a subtle balance between synthesis/maturation/degradation which seems more complex for LP than SP protocol. Since pulses last longer in LP protocol, it seems reasonable to hypothesize that cells within the tissue are more affected and develop a more complex response to this stress. A key element to support this hypothesis is the higher number of modulated genes in the LP protocol compared to the SP protocols (606 versus 351 respectively) as determined by transcriptomic analyses.

Inactive zymogen pro-MMPs are known to be proteolytically activated in the extracellular space by endogenous proteases and other active MMPs or to be activated in response to

exogenous signals such as low pH, heat, reactive oxygen species (ROS) (Amălinei et al. 2007; Kähäri and Saarialho-Kere 1997). Low pH can reasonably be ruled out because of the buffering of both pulsing and cell culture medium. Heat is a parameter that can also be excluded as the pulsing buffer and electric parameters are designed to remain in athermal conditions (Kotnik et al. 2019). In contrast, lipids peroxidation and ROS production have been shown to occur with PEFs (Kotnik et al. 2019). Increasing concentrations (1mM and 5mM) of *N*-acetyl-L-cysteine (NAC), a potent ROS inhibitor that increases cellular pools of free radical scavengers (Zhitkovich 2019), were added to both pulsing buffer (during the application of PEFs) and in cell culture medium (Fig5D). Increasing concentration of the ROS scavenger led to a statistical decrease of MMPs over-activation. This observed dose-response clearly establishes the link between the over-activation of MMPs and the presence of ROS in the environment. At this stage of the investigations, no clear response can be provided concerning the origin and maintenance of these ROS. Given electrostimulation is a brief event (less than 12 seconds), abolished upon transfer of the dermal substitutes from the pulsation buffer to the fresh culture medium a few seconds after electrostimulation, and that ROS half-life is very short due to their inherent instability and high reactivity (Dickinson and Chang 2011), the cellular origin of these ROS is more likely to explain the sustained ROS-dependent over-activation of MMPs observed for at least 48h. In order to better discriminate the role of specific MMPs in ROS-dependant over-activation, we performed experiments with MMP-specific substrates (Fig5E, F). We demonstrated that gelatinase MMP-2 and -9 as well as stromelysin MMP-3 and -10 were not activated by electrostimulation, even if MMP-3 was undoubtedly the most abundant MMP at protein level (µg range compared to ng for MMP-1 and -9 and pg for MMP-2) (Fig 4A). It thus appears that the observed over-activation of ROS-dependent MMPs was due to the activity of one or more of the following MMPs, namely MMP-1, -7, -8, -12, -13, -14, -15, -16, without being able to experimentally identify more

precisely the responsible ones. Interestingly, the over-activity of the collagenases MMP-1, -8 and -13 can be linked with the observed decrease in tissue collagen's content (Fig 3A, B).

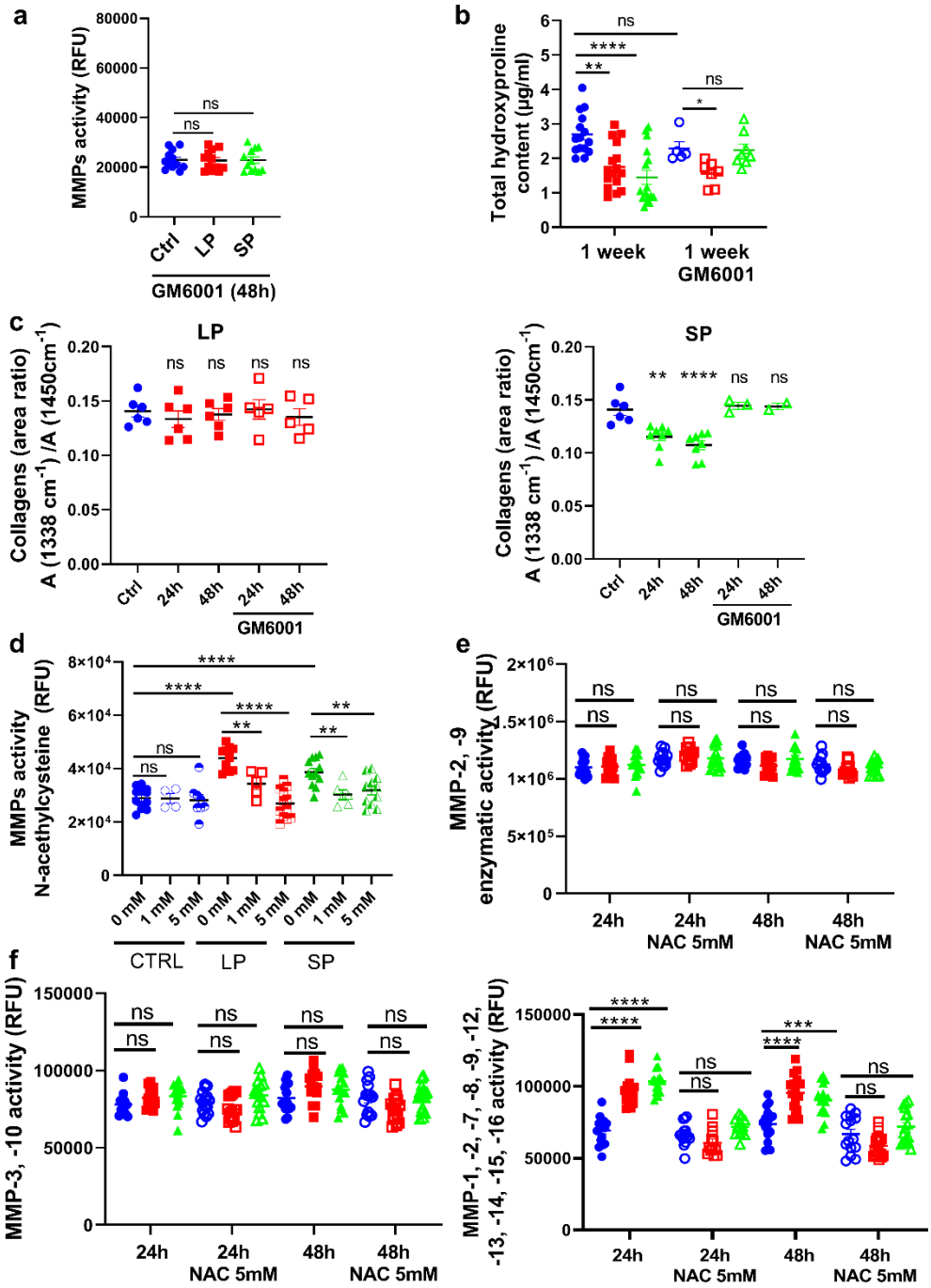


Figure 5. Pharmacological MMPs inhibitor GM6001 partly restores dermal substitute collagens content altered by ROS-dependent MMPs over-activation. A. Quantification by fluorimetry of endogenously active MMPs in supernatant 48h after electrostimulation in the presence of GM6001. **B.** Hydroxyproline content in the whole dermal substitute 1 week after electrostimulation, cultured in the presence (blank symbols) or absence of GM6001 (full symbols). Statistical analysis between the two controls was analyzed with Unpaired t-test. **C.** Collagen indicator in the bottom side (enriched in ECM) of dermal substitutes measured by FTIR-ATR 24h and 48h after LP and SP electrostimulation in the presence (blank symbols) or absence of GM6001 (full symbols). **D.** Quantification by fluorimetry of endogenously active

MMPs in supernatant 24h after electrostimulation and culture in the presence of 1mM and 5mM ROS inhibitor *N*-acetyl-L-cysteine (NAC). **E.** MMP-2 and -9 gelatinase activity was quantified by fluorimetry in presence or absence of 5mM NAC. **F.** MMPs activity against specific substrates was quantified by fluorimetry in presence or absence of 5mM NAC. Control condition (Ctrl ●), long pulses (LP ■), and short pulses (SP ▲) protocols.

Pulsed electric fields down-regulated pro-fibrosis inducer TGF-β1. Fibrosis results from changes in collagen expression, biosynthesis, enzymatic cross-linking, and degradation by MMPs (Ricard-Blum et al. 2018). These molecular modifications leading to a fibrotic signature are primarily regulated by TGF-β1, considered the major pro-fibrogenic inducer (Meng et al. 2016). Interestingly, our experiments show that PEFs significantly down-regulated TGF-β1 both at mRNA and protein levels (Fig6A, B). To go further, we analyzed other factors known to be pro-fibrogenic and associated with fibrotic diseases, namely interleukin IL-4 and IL-13 (Wynn 2004), but no change was observed at protein levels (Fig6C, D). To enrich the discussion on the therapeutic potential of PEFs in the context of fibrosis, it is essential to emphasize that they induced a drastic decrease in the gene expression of LOXL4 and transglutaminase TG2 (Fig 3D, E), which are known to play an important role in the fibrotic process when overexpressed (Grenard et al. 2001; Benn et al. 2019; Chen et al. 2020).

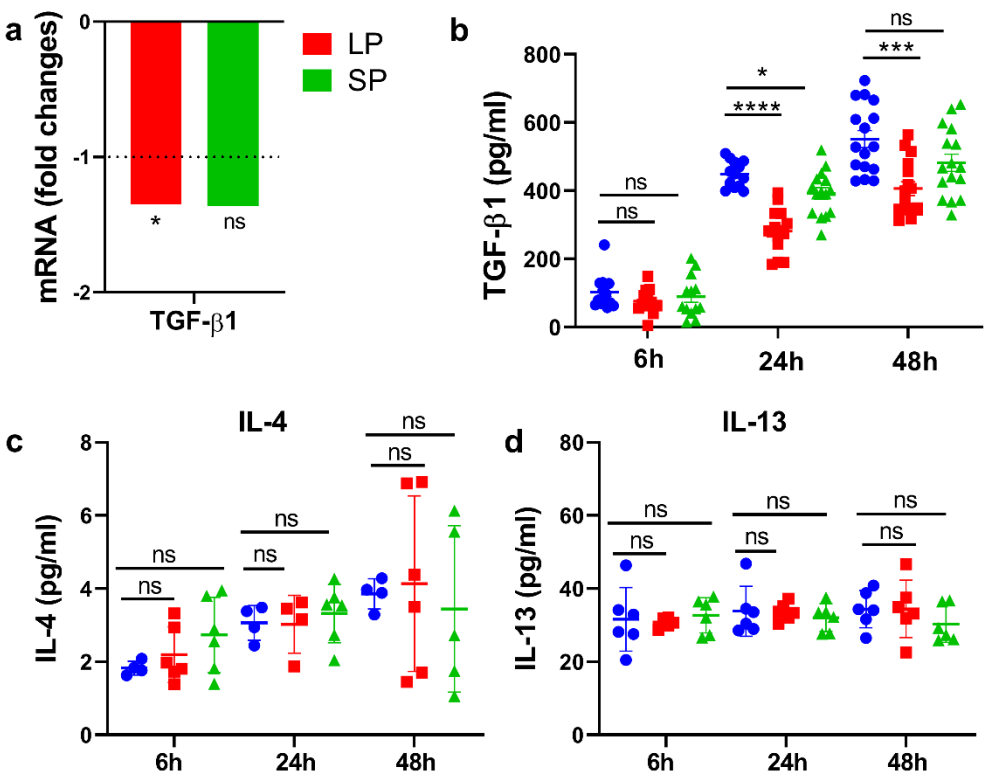


Figure 6. Pulsed electric fields down-regulate pro-fibrosis inducer TGF-β1. A. Modulation of TGF-β 1 mRNA 4h after electrostimulation. **E**. TGF-β 1 expression quantified in the supernatant by ELISA. C. IL-4 expression quantified in the supernatant by ELISA. **D**. IL-13 expression quantified in the supernatant by ELISA. Control condition (Ctrl ●), long pulses (LP ■), and short pulses (SP ▲) protocols.

CONCLUSION. Our results indicate that PEFs are prompt to favor collagens remodeling through both a transient decrease in its production and an increase in its degradation through MMPs sustained activation depending on ROS. The determination of the origin of these ROS is beyond the scope of this work but would clearly open an outlook for further studies. Furthermore, our experimental data prove the ability of the pulsed electric field to down-regulate at both mRNA and protein level the TGF-β, the master regulator of fibrosis, together with a drastic decrease in the gene expression of major enzymes involved in ECM cross-linking (LOXs and transglutaminases). Taken together, these results open up realistic and relevant prospects for PEF technology, without any drug, in the context of fibrosis treatment. All these findings can be excitingly correlated with observations realized by clinicians using

short pulse (SP) protocol to deliver anti-tumor drugs, whom commonly observed aesthetic and functional healing of sites treated with electrochemotherapy (Glass et al. 1997; Marty et al. 2006; Kis et al. 2012), and by patients themselves, who underlined an improvement in wound healing, and aesthetic impairment (Campana et al. 2009). To conclude, PEFs application to locally and transiently remodel the extracellular matrix present a high and easy translational potential. Indeed, these types of electrical parameters are nowadays used in clinics as an anti-cancer treatment, meaning that validated apparatus (pulsed electric field generator, electrodes, dosimetry…) are available and clinicians are used to, and well-trained to apply this kind of protocol.

MATERIAL & METHODS

Human primary cell culture. Primary human dermal fibroblasts were isolated from 4-years old foreskin biopsy commercially available (Icelltis, France) (Gibot et al. 2010). Ethical approval has been obtained by the supplier from the French Ministry of Higher Education, Research and Innovation (#AC-2019-3444) and written, informed consents from the guardians of the children were obtained. Cells were grown in DMEM GlutaMAX (Gibco #10569010) supplemented with 10% of heat-inactivated fetal calf serum (Gibco #10270106), 100 U/ml penicillin, and 100 µg/ml streptomycin (Gibco #15140122), at 37 °C in a humidified atmosphere at 5% CO_2. Cells were regularly tested negative for mycoplasma (MycoAlert detection kit, Lonza #LT07-318).

Reconstruction of human 3D dermal substitutes. Human dermal tissues were generated by tissue-engineering as previously described (Gibot et al. 2017). 30,000 cells/cm² primary human dermal fibroblasts were seeded in 24-well plates containing anchoring paper

(Whatman #1004150). Cells were cultivated for 4 weeks in medium supplemented with 50 µg/ml ascorbic acid (Sigma #A4034, Merck KGaA, Darmstadt, Germany).

Pulsed electric field application to dermal substitutes to induce reversible electroporation. Two stainless steel, flat, parallel electrodes (0.8 cm between electrodes, 1 cm long) (Megastil, Ljubljana, Slovenia) were placed on the top of dermal tissue, covering all the cell area, and immersed in pulsing buffer (10 mM K_2HPO_4/KH_2PO_4, 1 mM $MgCl_2$, 250 mM sucrose, pH 7.4 in sterile water) (Madi et al. 2015; Madi et al. 2016) (Figure S5A). A βtech electro-cell S20 generator (LeroyBiotech, France) was used to deliver square-wave electric pulses at room temperature. Electric parameters applied were for the long-pulses protocol (LP): 10 pulses of 5 ms long, 1 Hz, 600 V/cm and for the short-pulses protocol (SP): 8 pulses of 100 µs long, 1 Hz, 1000 V/cm (Figure S5B). Millisecond pulses (LP protocols) are classically used to improve nucleic acids delivery thanks to electrophoretic force, while microsecond pulses (SP protocol) are used for small antitumor drugs delivery. These electrical conditions were similar to those applied in clinics for drug delivery (Gehl et al. 2018; Nuccitelli 2019) and well-characterized to induce transient and reversible cell electroporation not inducing cell death. They induced cell permeabilization in the entire depth of the tissue (Figure S5C, D) (Madi et al. 2016), while preserving cell viability (Figure S5E).

Electron microscopy. For transmission and scanning electron microscopy characterization of 4-weeks old control (non-electrostimulated) tissues, dermal substitutes were fixed in 2% glutaraldehyde diluted in 0.1 M Sorensen phosphate buffer (pH 7.4) for 24 h at 4° C and processed as classically described in the literature for tissues. Observations were carried out using Hitachi HT7700 transmission electron microscope and FEG scanning electron microscope FEI Quanta 250.

Second-harmonic generation (SHG). Organized fibrillar collagens bundles were imaged by SHG using a multi-photon microscope LSM 7MP (Carl Zeiss SAS, Jena, Germany). The total thickness of the dermal substitute (approximately 50 µm) was imaged.

Fourier-Transform Infrared-Attenuated Total Reflectance (FTIR-ATR). FTIR-ATR spectra were performed using a Nicolet 5700 (ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, USA) equipped with ATR accessory (Smart Orbit with a type IIA diamond crystal, refractive index 2.4) with a KBr beam splitter and a MCT/B detector. The penetration depth of the evanescent wave into biological tissue was estimated between 0.4 and 3.6 µm. Hydrated dermal substitutes were laid on the ATR device and dried for 20 min at ambient temperature before spectral acquisition. The top side and the bottom side were successively placed onto the crystal. Spectra were recorded over the region of 4000-450 cm^{-1} with a spectral resolution of 2 cm^{-1} and 32 accumulations. A background spectrum was recorded before each experiment and subtracted from the sample spectrum. Data were collected using Omnic 8.0 (ThermoFisher Scientific). Then spectra were baseline corrected, smoothed (11 points Savitzky Golay) and normalized to the amide II (1540–1550 cm^{-1}). The spectra presented per group of samples were calculated by averaging the spectra of all samples within each group. To quantify the different biological components, the areas of the specific absorption bands were computed from the individual spectrum of each sample, and the appropriate ratio of areas was used according to literature data (Staniszewska et al. 2014; Wang et al. 2005).

Transcriptomic analysis of electrostimulated dermal substitutes. RNAs were extracted 4 h after dermal substitutes electrostimulation using RNeasy Mini kit (Qiagen #74104). The yield and integrity of the extracted RNAs were confirmed on Bioanalyzer 2100 Expert (Agilent). Differential gene expression was studied by transcriptomic using Clariom S Affymetrix chips on Genome and Transcriptome (GeT) platform of Genotoul (Toulouse, France). Data analysis

was performed with TAC software, and expression analysis settings were: Gene-Level Fold Change <-2 or> 2; Gene-Level FDR <0,05; Anova Method: ebayes.

Quantification of hydroxyproline content. Total hydroxyproline content of whole dermal substitutes was measured using the Hydroxyproline Assay Kit (Sigma #MAK008). A specific set of experiments was led in the presence of 100µM of pan-MMPs pharmacological inhibitor GM6001 (Sigma #CC1010). GM6001 was added to the culture medium immediately after electric field applications, and renewed at each cell culture medium change.

Quantification of metalloproteinases (MMPs) activity. Quantification of global MMPs activity in the supernatant was carried out using SensoLyte520 Generic MMP Assay Kit (Anaspec #AS-71158) allowing detecting simultaneously the activity of MMP-1, 2, 3, 7, 8, 9, 12, 13, and 14. Two distinct strategies were led: 1) quantification of the total MMPs activity after chemical activation with 4-aminophenylmercuric acetate (APMA) for 4h at 37° according to manufacturer pieces of advices permits to quantify the total amount of (pro-)MMPs in supernatant, and 2) quantification of endogenously active MMPs in the supernatant. A set of experiments was carried out in the presence of 100 µM GM6001 in cell culture medium or in the presence of *N*-acetyl-L-cysteine (NAC, Sigma #A7250) in both pulsing buffer and cell culture medium. Specific MMPs activity was analyzed using commercial substrates according to manufacturer's instructions: MMP-2, -9 (Gelatin Degradation Assay Kit (#ab234057)), MMP-3, -10 (R&D systems #ES002) and other MMPs (R&D systems #ES001).

ELISA quantifications. Supernatants were harvested at 6h, 24h, 48h after electrostimulation and stocked at -80 °C to be used within a month. Following ELISA kits were used strictly according to manufacturer's protocols: Pro-Collagen I alpha 1 DuoSet ELISA kit (R&D systems, #DY008), TGF-β 1 DuoSet ELISA kit (R&D systems, #DY007), TIMP-3 (Elabscience, #E-EL-H1454), MMP-1 (ELISA Genie, #HUFI00205), MMP-2 (ELISA Genie,

#HUFI00017), MMP-3 (ELISA Genie, # HUFI00208), MMP-9 (ELISA Genie, # HUFI00211), IL-4 and IL-13 (V-PLEX Proinflammatory Panel 1 Human Kit, MSD, # K15049D).

Statistical analyses. Data analysis was performed using GraphPad Prism 8 Software (La Jolla, CA, USA), and independent biological replicates were plotted and expressed as mean ± SEM (standard error to the mean). Data have been statistically analyzed using one-way ANOVA followed by Dunnett's post-test to compare every condition (LP, SP) to the control one (0 V/cm). Statistics are expressed relative to the control condition (0 V/cm). ns: non-significant, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ and **** $p < 0.0001$.

DATA AVAILABILITY. The transcriptomic data discussed in this publication have been deposited in NCBI's Gene Expression Omnibus (Edgar et al. 2002) and are accessible through GEO Series accession number GSE180644 (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/query/acc.cgi?acc=GSE180644).

ORCID Gouarderes S (0000-0001-9080-7876); Doumard L (0000-0001-9407-7989); Dandurand J (0000-0001-7287-2973); Vicendo P (0000-0001-5874-1547); Golberg A (0000-0001-8782-8879); Samouillan V (0000-0003-0571-3985); Gibot L (0000-0001-7255-4123)

CONFLICT OF INTEREST. The authors state no conflict of interest.

ACKNOWLEDGEMENTS. This research was funded by the French Agence Nationale de la recherche (ANR-17-CE19-0013-01) and performed in the scope of HAPPYBIO GDR. Multiplex ELISAs were read with the technological support of Genoskin company (Toulouse). We want to acknowledge the GeT Genotoul technological platform that realized the transcriptomic analyses, especially Nathalie Marsaud for her help in optimizing nucleic acids extraction from the substitutes, and Dr Elisabeth Bellard for her valuable help for the

SHG imaging on TRI-Genotoul platform. We would like to warmly thanks Jean-Michel Martin (ICT) and Loïck Royant (Leroy Biotech) for data extractions from the electropulsator, and Dr Mingotaud for her helpful scientific discussions. Lab2screen is acknowledged for English proofreading and editing.

AUTHOR'S CONTRIBUTIONS STATEMENT. Investigation: SG, CO, LD, JD, IF; Formal Analysis: SG, CO, VS; Visualization: SG, CO, LG; Validation: SG; Writing – original draft: SG, CO, AG, VS, LG; Writing – review and editing: SG, AG, VS, LG; Conceptualization: PV, AG, VS, LG; Methodology: LG; Funding acquisition: LG; Supervision: LG.

REFERENCES

Amălinei C, Căruntu I-D, Bălan RA. Biology of metalloproteinases. Rom J Morphol Embryol. 2007;48(4):323–34

Athanasiou KA, Eswaramoorthy R, Hadidi P, Hu JC. Self-organization and the self-assembling process in tissue engineering. Annu. Rev. Biomed. Eng. 2013;15:115–36

Benn MC, Weber W, Klotzsch E, Vogel V, Pot SA. Tissue transglutaminase in fibrosis — more than an extracellular matrix cross-linker. Curr. Opin. Biomed. Eng. 2019;10:156–64

Campana LG, Mocellin S, Basso M, Puccetti O, De Salvo GL, Chiarion-Sileni V, et al. Bleomycin-Based Electrochemotherapy: Clinical Outcome from a Single Institution's Experience with 52 Patients. Ann. Surg. Oncol. 2009;16(1):191–9

Chen W, Yang A, Jia J, Popov YV, Schuppan D, You H. Lysyl Oxidase (LOX) Family Members: Rationale and Their Potential as Therapeutic Targets for Liver Fibrosis. Hepatology. John Wiley & Sons, Ltd; 2020;72(2):729–41

Collighan RJ, Griffin M. Transglutaminase 2 cross-linking of matrix proteins: biological significance and medical applications. Amino Acids. Springer; 2009;36(4):659–70

Davalos RV, Mir LM, Rubinsky B. Tissue Ablation with Irreversible Electroporation. Ann. Biomed. Eng. 2005;33(2):223

Dickinson BC, Chang CJ. Chemistry and biology of reactive oxygen species in signaling or stress responses. Nat. Chem. Biol. 2011;7(8):504–11

Eden E, Navon R, Steinfeld I, Lipson D, Yakhini Z. GOrilla: a tool for discovery and visualization of enriched GO terms in ranked gene lists. BMC Bioinformatics. BioMed Central; 2009;10(1):1–7

Edgar R, Domrachev M, Lash AE. Gene Expression Omnibus: NCBI gene expression and hybridization array data repository. Nucleic Acids Res. 2002;30(1):207–10

Frantz C, Stewart KM, Weaver VM. The extracellular matrix at a glance. J. Cell Sci. The Company of Biologists Ltd; 2010;123(24):4195–200

Garner AL, Torres AS, Klopman S, Neculaes B. Electrical stimulation of whole blood for growth factor release and potential clinical implications. Med. Hypotheses. 2020;143:110105

Geboers B, Scheffer HJ, Graybill PM, Ruarus AH, Nieuwenhuizen S, Puijk RS, et al. High-Voltage Electrical Pulses in Oncology: Irreversible Electroporation, Electrochemotherapy, Gene Electrotransfer, Electrofusion, and Electroimmunotherapy. Radiology. Radiological Society of North America; 2020;295(2):254–72

Gehl J, Sersa G, Matthiessen LW, Muir T, Soden D, Occhini A, et al. Updated standard operating procedures for electrochemotherapy of cutaneous tumours and skin metastases. Acta Oncol. 2018;57(7):874–82

Gelse K. Collagens—structure, function, and biosynthesis. Adv. Drug Deliv. Rev. 2003;55(12):1531–46

Gibot L, Galbraith T, Bourland J, Rogic A, Skobe M, Auger FA. Tissue-engineered 3D human lymphatic microvascular network for in vitro studies of lymphangiogenesis. Nat. Protoc. 2017;12:1077

Gibot L, Galbraith T, Huot J, Auger FA. A Preexisting Microvascular Network Benefits *In Vivo* Revascularization of a Microvascularized Tissue-Engineered Skin Substitute. Tissue Eng. Part A. 2010;16(10):3199–206

Glass LF, Jaroszeski M, Gilbert R, Reintgen DS, Heller R. Intralesional bleomycin-mediated electrochemotherapy in 20 patients with basal cell carcinoma. J. Am. Acad. Dermatol. 1997;37(4):596–9

Golberg A, Villiger M, Broelsch GF, Quinn KP, Albadawi H, Khan S, et al. Skin regeneration with all accessory organs following ablation with irreversible electroporation. J. Tissue Eng. Regen. Med. 2018;12(1):98–113

Golberg A, Villiger M, Khan S, Quinn KP, Lo WCY, Bouma BE, et al. Preventing Scars after Injury with Partial Irreversible Electroporation. J. Invest. Dermatol. 2016;136(11):2297–304

Gouarderes S, Doumard L, Vicendo P, Mingotaud A-F, Rols M-P, Gibot L. Electroporation does not affect human dermal fibroblast proliferation and migration properties directly but indirectly via the secretome. Bioelectrochemistry. 2020a;134:107531

Gouarderes S, Mingotaud A-F, Vicendo P, Gibot L. Vascular and extracellular matrix remodeling by physical approaches to improve drug delivery at the tumor site. Expert Opin. Drug Deliv. Taylor & Francis; 2020b;0(0):1–24

Grenard P, Bresson-Hadni S, El Alaoui S, Chevallier M, Vuitton DA, Ricard-Blum S. Transglutaminase-mediated cross-linking is involved in the stabilization of extracellular matrix in human liver fibrosis. J. Hepatol. 2001;35(3):367–75

Griffin M, Casadio R, Bergamini CM. Transglutaminases: Nature's biological glues. Biochem. J. 2002;368(2):377–96

Hynes RO, Naba A. Overview of the Matrisome—An Inventory of Extracellular Matrix Constituents and Functions. Cold Spring Harb. Perspect. Biol. 2012;4(1):a004903

Ivey JW, Bonakdar M, Kanitkar A, Davalos RV, Verbridge SS. Improving cancer therapies by targeting the physical and chemical hallmarks of the tumor microenvironment. Cancer Lett. 2015/12/24 ed. 2016;380(1):330–9

Kähäri V-M, Saarialho-Kere U. Matrix metalloproteinases in skin. Exp. Dermatol. 1997;6(5):199–213

Kis E, Baltás E, Kinyó Á, Varga E, Nagy N, Gyulai R, et al. Successful Treatment of Multiple Basaliomas with Bleomycin-based Electrochemotherapy: A Case Series of Three Patients with Gorlin-Goltz Syndrome. Acta Derm Venereol. 2012;92(6):648–51

Kotnik T, Rems L, Tarek M, Miklavčič D. Membrane Electroporation and Electropermeabilization: Mechanisms and Models. Annu. Rev. Biophys. 2019;48(1):63–91

Madi M, Rols M-P, Gibot L. Efficient In Vitro Electropermeabilization of Reconstructed Human Dermal Tissue. J. Membr. Biol. 2015;248(5):903–8

Madi M, Rols M-P, Gibot L. Gene Electrotransfer in 3D Reconstructed Human Dermal Tissue. Curr Gene Ther. 2016;16(2):75–82

Magnan L, Labrunie G, Marais S, Rey S, Dusserre N, Bonneu M, et al. Characterization of a Cell-Assembled extracellular Matrix and the effect of the devitalization process. Acta Biomater. 2018;82:56–67

Marty M, Sersa G, Garbay JR, Gehl J, Collins CG, Snoj M, et al. Electrochemotherapy – An easy, highly effective and safe treatment of cutaneous and subcutaneous metastases: Results of ESOPE (European Standard Operating Procedures of Electrochemotherapy) study. Eur. J. Cancer Suppl. 2006;4(11):3–13

Meng X, Nikolic-Paterson DJ, Lan HY. TGF-β: the master regulator of fibrosis. Nat. Rev. Nephrol. Nature Publishing Group; 2016;12(6):325

Naba A, Clauser KR, Ding H, Whittaker CA, Carr SA, Hynes RO. The extracellular matrix: Tools and insights for the "omics" era. Matrix Biol. 2016;49:10–24

Nuccitelli R. Application of pulsed electric fields to cancer therapy. Bioelectricity. Mary Ann Liebert, Inc., publishers 140 Huguenot Street, 3rd Floor New …; 2019;1(1):30–4

Ricard-Blum S. The Collagen Family. Cold Spring Harb. Perspect. Biol. 2011;3(1):a004978

Ricard-Blum S, Baffet G, Théret N. Molecular and tissue alterations of collagens in fibrosis. Matrix Biol. 2018;68–69:122–49

Sanden KW, Kohler A, Afseth NK, Böcker U, Rønning SB, Liland KH, et al. The use of Fourier-transform infrared spectroscopy to characterize connective tissue components in skeletal muscle of Atlantic cod (Gadus morhua L.). J. Biophotonics. Wiley Online Library; 2019;12(9):e201800436

Scott I, Yamauchi M, Sricholpech M. Lysine post-translational modifications of collagen. Essays Biochem. Portland press; 2012;52:113–33

Staniszewska E, Malek K, Baranska M. Rapid approach to analyze biochemical variation in rat organs by ATR FTIR spectroscopy. Spectrochim. Acta - Part Mol. Biomol. Spectrosc. Elsevier B.V.; 2014;118:981–6

Szondy Z, Korponay-Szabó I, Király R, Sarang Z, Tsay GJ. Transglutaminase 2 in human diseases. BioMedicine. 2017/08/25 ed. EDP Sciences; 2017;7(3):15–15

Trackman PC. Lysyl oxidase isoforms and potential therapeutic opportunities for fibrosis and cancer. Expert Opin. Ther. Targets. Taylor & Francis; 2016;20(8):935–45

Wang Q, Sanad W, Miller LM, Voigt A, Klingel K, Kandolf R, et al. Infrared imaging of compositional changes in inflammatory cardiomyopathy. Vib. Spectrosc. 2005;38(1–2):217–22

Winkler J, Abisoye-Ogunniyan A, Metcalf KJ, Werb Z. Concepts of extracellular matrix remodelling in tumour progression and metastasis. Nat. Commun. Nature Publishing Group; 2020;11(1):1–19

Wynn TA. Fibrotic disease and the TH 1/TH 2 paradigm. Nat. Rev. Immunol. Nature Publishing Group; 2004;4(8):583–94

Yarmush ML, Golberg A, Serša G, Kotnik T, Miklavčič D. Electroporation-Based Technologies for Medicine: Principles, Applications, and Challenges. Annu. Rev. Biomed. Eng. 2014;16(1):295–320

Zhitkovich A. N-Acetylcysteine: Antioxidant, Aldehyde Scavenger, and More. Chem. Res. Toxicol. American Chemical Society; 2019;32(7):1318–9

Supplementary text S1: Vibrational signature of human dermal substitutes

The FTIR-ATR spectra of the top and bottom sides of dermal substitute in control condition, in the [3800-1300 cm^{-1}] range is shown in Fig S1a. Main absorption bands detected from the spectrum of both the bottom and/or top sides, and their respective assignment are summarised in Table S1. Those were interpreted according to values reported in literature.

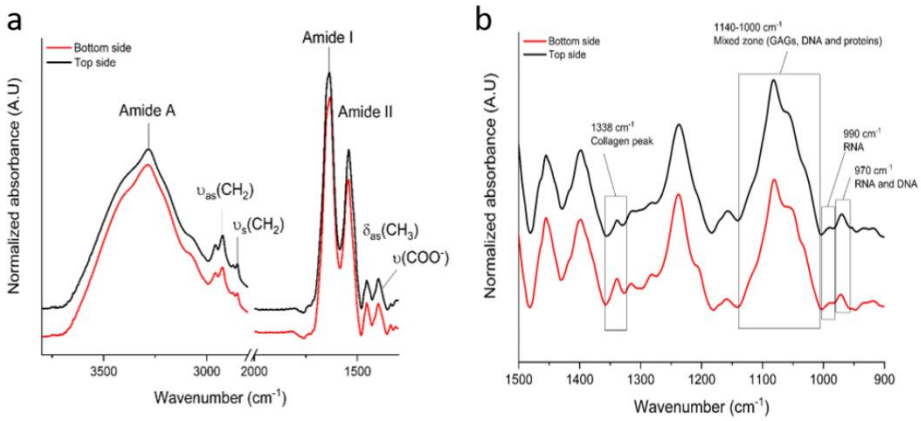


Figure S1. Mean FTIR-ATR spectra of dermal substitute in control condition in the [3800-1300 cm^{-1}] range (a) and in the [1500-900 cm^{-1}] range (b).

In the [3000-2800 cm^{-1}] range, asymmetric and symmetric stretching absorption modes of methylene group $\nu_{as}(CH_2)$ and $\nu_s(CH_2)$ located at 2927 cm^{-1} and 2850 cm^{-1} respectively, are mainly associated with lipids and widely used to quantify them. In the [1800-1500 cm^{-1} spectral region, protein absorption is represented by Amide I and Amide II bands. The amide I band, mainly arising from C=O stretching, is very sensitive to secondary structures in proteins. It must be underlined that O-H bending vibration of water is superimposed to the Amide I vibration in hydrated samples. In contrast with Amide I, Amide II, that mostly combines N-H bending coupled to C-N stretching, is not sensitive to water and largely used as a normalisation peak to compare whole spectra. Another absorption mainly attributed to proteins is the methyl bending $\delta_{as}(CH_3)$ visible at 1452 cm^{-1}, whose area is used in further ratio indicators. The enlargement of the [1500-900 cm^{-1}] range (Fig S1b), generally known as the fingerprint region, can reveal subtler molecular differences in biological tissues.

The 1338 cm^{-1} band (wagging of proline side chain) is thus referenced in literature as a specific absorption of collagen and can be used to quantify this major ECM protein (Tang et al, 2017; Belbachir et al, 2009). The area ratio A(1338 cm^{-1})/A(1452 cm^{-1}) is thus computed to determine collagen content from tissue side.

As referenced in Table S1, the 1082 cm^{-1} band absorption is mainly assigned to the $\nu_s(PO_2^-)$ of DNA and phospholipids of cell membranes (Wood et al, 2016), with the contribution of the C-O of collagen and glycosaminoglycans. In addition, the 1060 and 1032 cm^{-1} are mainly assigned to the C-O stretching vibration of ribose and other carbohydrates residues (Sanden et al, 2019). This area ratio A(1140-1000 cm^{-1})/A(1452 cm^{-1}) zone is thus assigned to a “mixed” zone, peculiar sensitive to cellular material and GAGs.

Finally, the 990 band is specifically assigned to uracil ring motions of RNA while the 970 cm^{-1} is assigned to DNA (mainly) and RNA ribose-phosphate skeletal motions (Wood et al, 2016). The area ratio A(970 cm^{-1})/A(1452 cm^{-1}) is used to determine the presence of cellular materiel in each side.

Table S1: FTIR assignment of bottom and/or top side control condition dermal substitute

Band position /cm^{-1}	Assignment
3600-3000	Amide A : Mainly ν(N-H) of protein + ν(O-H) of water (largely dependent on hydration)
2958,2925,2870,2850	ν_{as} (CH_3), ν_s (CH_3) of proteins, ν_{as} (CH_2), ν_s (CH_2) of lipids
1744-1735	ν(C=O) of triglycerides, cholesterol esters, phospholipids
1694-1630	Amide I : ν(C=O) of proteins and δ(O-H) of water
1558-1542	Amide II : ν(C-N), δ (N-H) of proteins
1452	δ_{as}(CH_3) of proteins
1401-1393	ν_s(COO^-) of proteins and lipids
1338	δ(CH_2) wagging of proline chains (specific collagen band)
1320-1200	Amide III : several modes of vibration of proteins including ν(C-N), δ (N-H), δ (N-H), ν(C-C) and δ(C-H)
1246-1200	1238 cm^{-1}: δ(CH_3) specific of ECM (mainly collagen) 1205 cm^{-1}: δ(C-OH) specific of ECM (mainly collagen)
1200-1180	ν(C-O) of proteins and ν(C-OH) of nucleic acids
1180-1000	1171 cm^{-1}: ν_{as} (CO-O-C) of cholesterol esters, phospholipids 1115 cm^{-1}: ν_{as} (C-O) of carbohydrates 1081 cm^{-1}: ν(C-O-C) of collagen, glycolipids, proteoglycans and ν_s(PO_2^-) of phospholipids and nucleic acids (DNA) 1061 cm^{-1}: ν_{as} (C-O) of carbohydrates 1032 cm^{-1}: ν_s (CO-O-C) of carbohydrates residues in collagen and (GAG)s
990	RNA uracile ring motions
970	DNA/ RNA ribose-phosphate skeletal motions

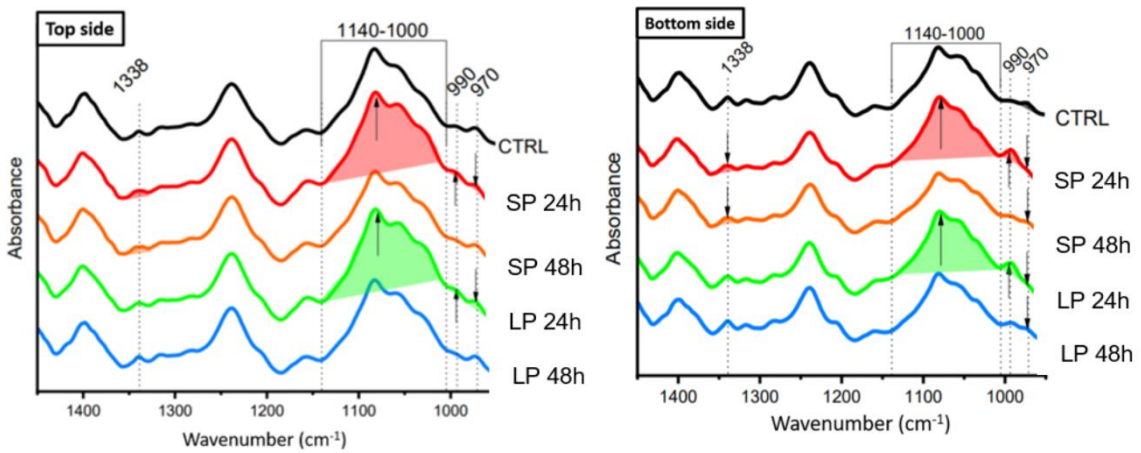


Figure S2. Mean FTIR-ATR spectra in the [1450-950 cm^{-1}] range. Top (rich in cells) and bottom (rich in ECM) sides of dermal substitutes in control (Ctrl) condition, and 24h and 48h after long pulses (LP) and short pulses (SP) protocols.

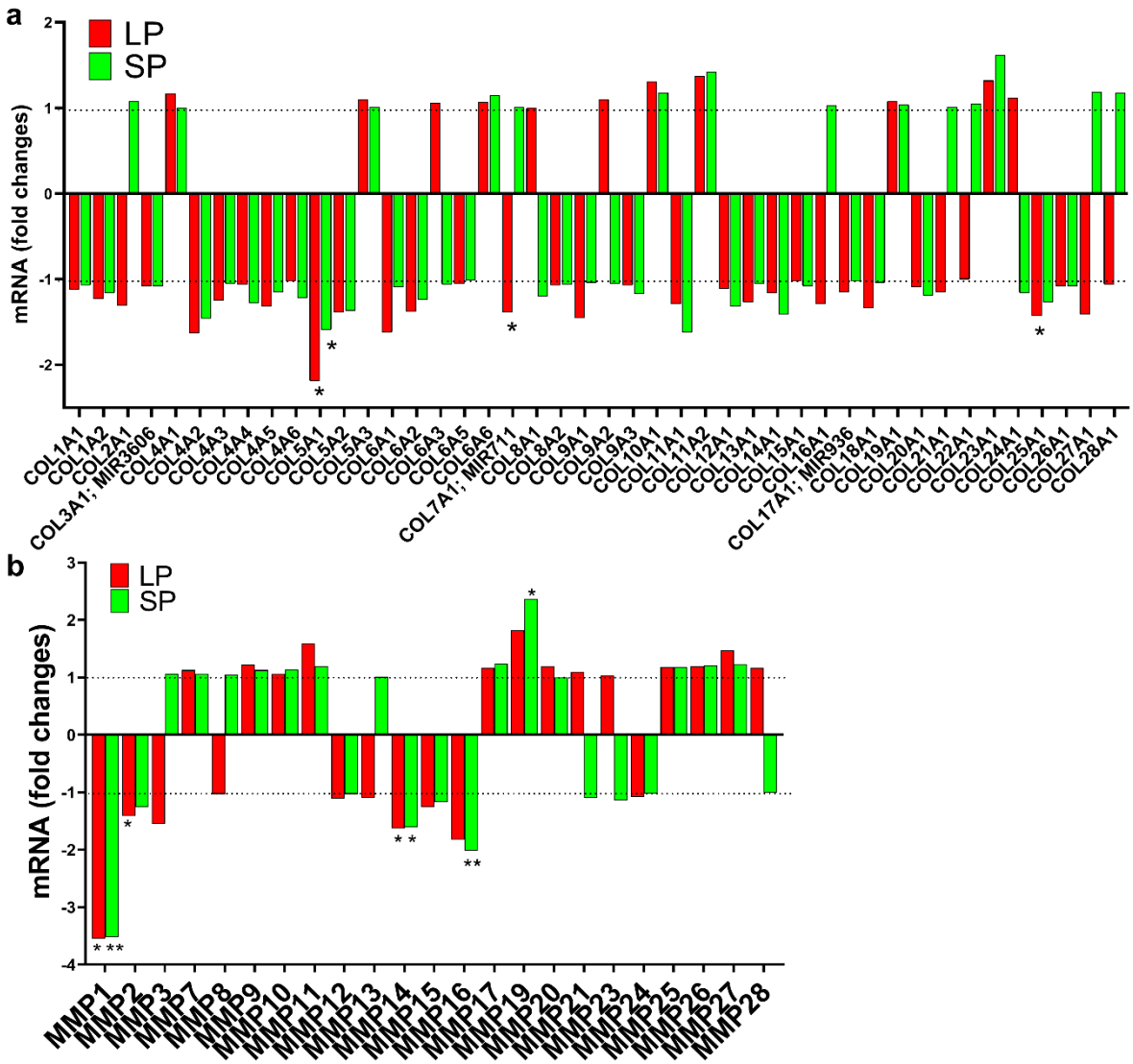


Figure S3. Modulation of (a) collagens and (b) matrix metalloproteinases (MMPs) family's mRNA 4h after electrostimulation. Transcriptomic analyse using Clariom S Affymetrix array. n=4. Long pulses (LP ■): 10 pulses lasting 5ms, 600V/cm at 1Hz frequency; Short pulses (SP ■): 8 pulses lasting 100 µs, 1000V/cm at 1Hz frequency.

Supplementary text S4: DSC characterization of whole dermal substitutes after electrostimulation

Method. DSC measurements on hydrated dermal samples were performed with a DSC Pyris calorimeter (PERKIN ELMER, Waltham, MA) using an empty pan as reference. Samples (10-30 mg by mass) were sealed in hermetic aluminium pans and then submitted to a temperature program under helium atmosphere: a first cooling scan was performed from 20 to -100 °C at -10 °C min^{-1} followed by a heating scan from -100 to 85 °C at 10 °C min^{-1}. After completing the DSC measurements, pans were reweighted to check that they had been correctly sealed. The sample pans were pierced and dried to constant mass at 105 °C for 14 h to determine the sample dry mass and by difference the total amount of water in defrosted samples.

Results. As previously observed in collagen-rich tissues (Badea et al, 2011; Samouillan et al, 2011; Tang et al, 2017), the endothermic phenomenon detected in the [55-70°] range is attributed to the irreversible thermal denaturation of fibrillar collagens. This denaturation is a thermally activated process implying the rupture of hydrogen bonds coupling the three α-chains and a rearrangement of the triple helix into a random chain configuration named gelatin. The denaturation is characterised by *ΔH*, the area under the endotherm (Fig S4a). Once normalised to the dry mass, it gives a measure of the specific enthalpy of denaturation ΔH_d. Despite a trend in increasing of the enthalpy of denaturation, no statistical difference was observed after electrostimulation (Fig S4b). Collagen's denaturation can be assessed using the denaturation temperature T_{MID}, corresponding to the temperature at which 50% of collagens is denatured, determined from the integral of the endotherm. Since T_{MID} takes into account the distribution of the denaturation endotherm, it is a reliable indicator of collagen thermal stability. No significant difference was observed in T_{MID} between control and electrostimulated conditions, indicating no variation in collagens integrity after external electric field applications (Fig S4c).

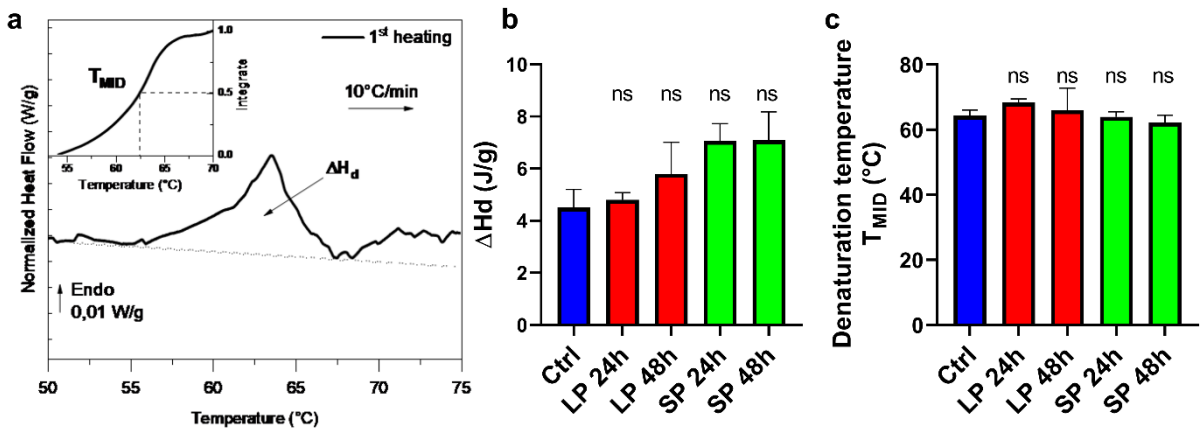


Figure S4. DSC analysis of dermal substitutes. a. Representative DSC curve of thermal denaturation of collagens in the [50-75°C] window. **b**. Specific enthalpy of denaturation ΔH_d measured by DSC on the whole tissue. **c**. Determination of collagens integrity thanks to denaturation temperature T_{MID}.

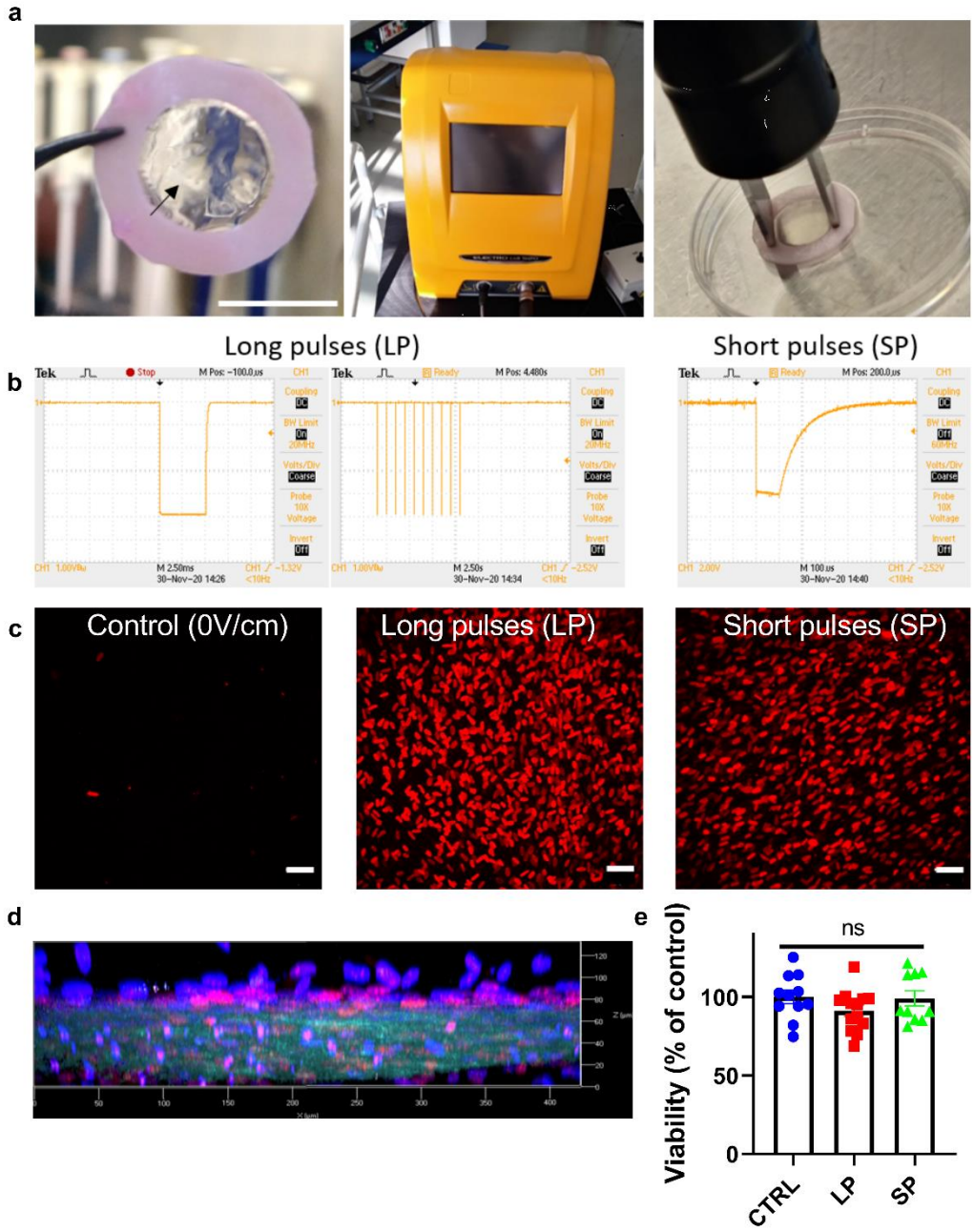


Figure S5. Long pulses (LP) and short pulses (SP) electric parameters induce transient and reversible fibroblasts electropermeabilization in human dermal substitute. a. Macroscopic aspect of dermal substitute (arrow), electropulsator and electrodes stimulating the whole substitute. **b.** Applied electric parameters profiles, extracted with an oscilloscope. Scale bar = 0.8 cm. **c.** Plasma membrane integrity assessed with propidium iodide (red) penetration, observed by two-photon microscopy. Scale bar = 50µm. **d.** Optical transversal section of SP electrostimulated dermal substitute observed by two-photon microscopy. Nuclei are labelled with Hoechst (blue), electropermeabilized cells with propidium iodide (pink) and collagens are observed by second harmonic generation (cyan). **e.** Cell viability determined with PrestoBlue assays 24h after electric field applications (n=12) indicates that these electrical parameters induce a reversible electroporation not leading to cell death. Data are represented as the mean value ± SEM. ns: non-significant. Long pulses (LP): 10 pulses 5 ms long, 600 V/cm at 1 Hz frequency; Short pulses (SP): 8 pulses 100 µs long, 1000 V/cm at 1 Hz frequency.

Table S2: Visualization of GO (gene ontology) terms by processes in the target gene list using Gorilla tool. We performed enrichment analysis using the GOrilla platform in the transcriptomic dataset (Eden et al, 2009). This analysis allowed to identify GO terms that are significantly overrepresented in the list of differentially expressed genes (the target set) compared to the totality of genes contained on the Affymetrix chip (background set) using the standard Hyper Geometric statistics. Analysis of gene ontology terms by processes show biological processes that were mainly affected by electrostimulation. The 10 most affected processes are presented, ranked by statistical significance.

GO Term	Description	P-value	FDR q-value	Enrichment
	LP protocol			
GO:0031323	regulation of cellular metabolic process	6.67E-29	1.02E-24	1.68
GO:0019222	regulation of metabolic process	3.16E-28	2.42E-24	1.63
GO:0080090	regulation of primary metabolic process	1.97E-25	1.01E-21	1.65
GO:0051171	regulation of nitrogen compound metabolic process	3.81E-25	1.46E-21	1.66
GO:0060255	regulation of macromolecule metabolic process	2.71E-24	8.31E-21	1.63
GO:0048523	negative regulation of cellular process	2.14E-22	5.47E-19	1.74
GO:0048519	negative regulation of biological process	2.55E-21	5.58E-18	1.66
GO:0009889	regulation of biosynthetic process	3.99E-21	7.63E-18	1.78
GO:0031326	regulation of cellular biosynthetic process	6.39E-20	1.09E-16	1.76
GO:0031324	negative regulation of cellular metabolic process	1.36E-19	2.09E-16	2.05
	SP protocol			
GO:0019222	regulation of metabolic process	6.36E-14	9.74E-10	1.56
GO:0065009	regulation of molecular function	1.18E-12	9,00E-09	1.95
GO:0031323	regulation of cellular metabolic process	1.94E-12	9.89E-9	1.56
GO:0010033	response to organic substance	2.33E-12	8.92E-9	2.21
GO:0048522	positive regulation of cellular process	4.38E-12	1.34E-8	1.62
GO:0048523	negative regulation of cellular process	5.41E-12	1.38E-8	1.68
GO:0048519	negative regulation of biological process	1.82E-11	3.98E-8	1.61
GO:0060255	regulation of macromolecule metabolic process	2.07E-11	3.96E-8	1.54
GO:0048518	positive regulation of biological process	2.23E-11	3.8E-8	1.54
GO:0042221	response to chemical	2.36E-11	3.61E-8	1.99

Table S3. Transcriptomic analyses of differentially expressed genes in "core matrisome" sub-panel. Annotation according to (Naba et al, 2016). The extracellular matrix: Tools and insights for the "omics" era. Matrix Biol. 49, 10–24 (2016)). Genes in bold are modulated after electrostimulation and described in columns "LP" and "SP": fold changes are indicated in brackets after gene symbols, down-regulated genes (green), up-regulated genes (red). Col = Collagens; PG = Proteoglycans. p-value < 0.05. n=4.

	Gene symbol	LP	SP
Glycoproteins	ABI3BP; ADIPOQ; "ADIRF-AS1; RP11-96C23.15; MMRN2"; "**AEBP1; MIR4649**"; AGRN; AMBN; AMELX; AMELY; BMPER; BSPH1; CDCP2; CILP; CILP2; COCH; COLQ; **COMP**; CRELD1; CRELD2; CRIM1; CRISPLD1; **CRISPLD2**; **CTGF**; CTHRC1; CYR61; **DDX26B**; DMBT1; DMP1; DPT; DSPP; ECM1; ECM2; **EDIL3**; EFEMP1; EFEMP2; EGFLAM; ELN; ELSPBP1; EMID1; EMILIN1; EMILIN2; EMILIN3; EYS; FBLN1; FBLN2; FBLN5; FBLN7; FBN1; FBN2; FBN3; "FBN3; mumari"; FGA; FGB; FGG; FGL1; FGL2; FN1; **FNDC1**; FNDC7; FNDC8; FRAS1; GAS6; GLDN; **HMCN1**; HMCN2; IBSP; IGFALS; IGFBP1; **IGFBP2**; IGFBP3; **IGFBP4**; **IGFBP5**; IGFBP6; IGFBP7; IGFBPL1; IGSF10; KCP; LAMA1; LAMA2; LAMA2; **LAMA3**; LAMA4; "LAMA5; MIR4758"; **LAMB1**; LAMB2; "LAMB3; MIR4260"; LAMB4; LAMC1; LAMC2; LAMC3; LGI1; LGI2; LGI3; LGI4; "LOC101929319; TNFAIP6"; LRG1; **LTBP1**; **LTBP2**; LTBP3; LTBP4; MATN1; MATN2; MATN3; MATN4; MEPE; **MFAP1**; MFAP2; MFAP3; MFAP3; **MFAP4**; MFAP5; MFGE8; MGP; MMRN1; MMRN2; MXRA5; NDNF; NELL1; NELL2; NID1; NID2; NOV; **NPNT**; NTN1; NTN3; NTN4; NTN5; NTNG1; NTNG2; OIT3; OTOG; OTOL1; PAPLN; PCOLCE; PCOLCE2; "PMF1; PMF1-BGLAP; BGLAP"; POMZP3; POSTN; PXDN; PXDN; PXDNL; RELN; RSPO1; RSPO2; **RSPO3**; RSPO4; SBSPON; "SLIT1; ARHGAP19 SLIT1"; **SLIT2**; SLIT3; SMOC1; SMOC2; SNED1; SNED1; SPARC; SPARCL1; SPON1; SPON2; SPP1; SRPX; SRPX2; SSPO; SVEP1; TECTA; TECTB; TGFBI; THBS1; THBS2; THBS3; THBS4; THSD4; TINAG; TINAGL1; **TNC**; **TNFAIP6**; TNN; TNR; TNXB; TSKU; TSPEAR; VIT; VTN; VWA1; VWA2; VWA3A; VWA3B; VWA5A; VWA5B1; VWA5B2; VWA7; VWA9; VWCE; VWDE; VWF; WISP1; WISP2; WISP3; ZP1; ZP2; ZP3; ZP4; ZPLD1; ZPLD1	AEBP1; MIR4649 (-1,76) CRISPLD2 (-1,69) CTGF (1,98) DDX26B (2,75) FNDC1 (-1,79) IGFBP2 (-1,57) IGFBP5 (-1,54) LAMA3 (-1,55) LTBP1 (-1,58) LTBP2 (-1,88) MFAP1 (-1,55) MFAP4 (-2,01) RSPO3 (1,59) SLIT2 (1,8) TNC (-1,51) TNFAIP6 (3,52)	COMP (-1,76) CRISPLD2 (-1,71) CTGF (1,88) EDIL3 (-1,72) HMCN1 (-2,32) IGFBP2 (-1,6) IGFBP4 (-1,52) LAMB1 (-1,57) LTBP1 (-2,01) LTBP2 (-1,74) MFAP4 (-1,59) NPNT (-1,5) TNC (-1,79) TNFAIP6 (3,33)
Col	**COL1A1**; COL1A2; COL2A1; "COL3A1; MIR3606"; COL4A1; COL4A2; COL4A3; COL4A4; COL4A5; COL4A6; **COL5A1**; COL5A2; COL5A3; COL6A1; COL6A2; COL6A2; COL6A2; COL6A3; COL6A5; COL6A6; "COL7A1; MIR711"; COL8A1; COL8A2; COL9A1; COL9A2; COL9A3; COL10A1; COL11A1; COL11A2; COL12A1; COL13A1; COL14A1; COL15A1; COL16A1; "COL17A1; MIR936"; COL18A1; COL19A1; COL20A1; COL21A1; COL22A1; COL23A1; COL24A1; COL25A1; COL26A1; COL27A1; COL28A1; COL4A3	COL1A1 (-1,73) COL5A1 (-2,19)	COL5A1 (-1,59)
PG	**ACAN**; ASPN; BCAN; **BGN**; CHAD; CHADL; DCN; EPYC; ESM1; **FMOD**; HAPLN1; HAPLN2; **HAPLN3**; HAPLN4; HSPG2; IMPG1; IMPG2; KERA; LUM; NCAN; NYX; OGN; OMD; OPTC; **PODN**; PODN; PODNL1; **PRELP**; PRG2; PRG3; PRG4; SPOCK1; SPOCK2; SPOCK3; **SRGN**; VCAN	BGN (-1,81) FMOD (-1,51) PODN (-1,93) PRELP (-1,71) SRGN (1,96)	ACAN (-1,52) BGN (-2,01) HAPLN3 (-1,53)

<u>Table S4. Transcriptomic analyses of differentially expressed genes in “matrix-associated proteins” sub-panel.</u> Annotation according to (Naba et al, 2016). Genes in bold are modulated after electrostimulation and described in columns “LP” and “SP”: fold changes are indicated in brackets after gene symbols, down-regulated genes (green), up-regulated genes (red). p-value < 0.05. n=4.

	Gene symbol	GET	ECT
Proteines affiliées à la MEC	ANXA1; ANXA10; ANXA11; ANXA13; ANXA2; ANXA3; ANXA4; ANXA4; ANXA5; ANXA6; ANXA7; ANXA8; ANXA8; "ANXA8L1; ANXA8"; ANXA9; **C1QA**; C1QB; C1QC; C1QL1; C1QL2; C1QL3; C1QL4; C1QTNF1; C1QTNF2; C1QTNF3; C1QTNF4; "C1QTNF5; MFRP"; C1QTNF6; C1QTNF6; C1QTNF7; C1QTNF8; CD209; CLC; CLEC10A; CLEC11A; CLEC12A; **CLEC12B**; CLEC14A; CLEC17A; CLEC18A; CLEC18B; CLEC18C; CLEC19A; CLEC1A; CLEC1B; CLEC2A; CLEC2B; **CLEC2D**; CLEC2L; CLEC3A; CLEC3B; CLEC4A; CLEC4C; CLEC4D; CLEC4E; CLEC4F; CLEC4G; CLEC4M; CLEC5A; CLEC6A; CLEC7A; CLEC9A; COLEC10; COLEC11; COLEC12; **CSPG4**; CSPG5; **ELFN1**; ELFN2; ELFN2; EMCN; FCN1; FCN2; FCN3; FREM1; FREM2; FREM3; GPC1; GPC2; GPC3; GPC4; GPC5; **GPC6**; GPC6; GREM1; GREM1; GREM1; GREM1; GRIFIN; "HNRNPA1P33; LINC00842; ANXA8L1"; HPX; ITLN1; ITLN2; LGALS1; LGALS12; LGALS13; LGALS14; LGALS16; LGALS2; LGALS3; LGALS4; "LGALS7; LGALS7B"; LGALS8; LGALS9; LGALS9B; "LGALS9C; LGALS9B"; LMAN1; LMAN1L; MBL2; MUC1; **MUC12**; MUC13; MUC15; MUC16; MUC17; MUC19; MUC2; "MUC20; SDHAP2; MIR570; LINC00969"; MUC21; MUC22; MUC3A; MUC4; MUC5AC; MUC5B; MUC6; MUC7; MUCL1; OVGP1; PARM1; PLXDC1; PLXDC2; **PLXNA1**; PLXNA2; PLXNA3; PLXNA4; PLXNB1; **PLXNB2**; PLXNB3; **PLXNC1**; **PLXND1**; PROL1; REG1A; REG1B; REG3A; REG3G; REG4; SDC1; SDC2; **SDC3**; **SDC4**; **SEMA3A**; SEMA3A; SEMA3A; "SEMA3B; MIR6872"; SEMA3C; SEMA3D; SEMA3E; SEMA3F; SEMA3G; SEMA4A; SEMA4B; SEMA4C; SEMA4D; SEMA4D; SEMA4F; **SEMA4G**; SEMA5A; SEMA5B; SEMA6A; SEMA6B; SEMA6C; SEMA6D; **SEMA7A**; SFTA2; SFTA3; SFTPA1; "SFTPA2; SFTPA1"; SFTPB; SFTPC; SFTPC; SFTPD; "SPATA13; C1QTNF9	C1QA (1,51) CLEC12B (1,51) CLEC2D (2,11) CSPG4 (-1,58) ELFN1 (-2,54) MUC12 (1,73) PLXNA1 (-1,78) PLXNB2 (-1,5) PLXNC1 (-1,81) PLXND1 (-3,12) SDC4 (1,5) SEMA3A (1,62) SEMA7A (-1,71)	GPC6 (-1,58) MUC12 (1,73) PLXND1 (-1,97) SDC3 (-1,58) SDC4 (1,63) SEMA4G (1,53)
Régulateurs de la MEC	A2M; A2ML1; ADAM10; ADAM11; ADAM12; ADAM15; ADAM17; **ADAM18**; **ADAM19**; ADAM2; ADAM20; ADAM21; ADAM22; ADAM23; **ADAM28**; ADAM29; ADAM29; ADAM30; ADAM32; ADAM33; ADAM7; ADAM8; ADAM8; ADAM9; ADAMDEC1; **ADAMTS1**; ADAMTS10; **ADAMTS12**; ADAMTS13; ADAMTS13; ADAMTS13; ADAMTS13; ADAMTS13; ADAMTS13; ADAMTS13; ADAMTS13; ADAMTS13; ADAMTS13; ADAMTS14; **ADAMTS15**; ADAMTS16; ADAMTS17; ADAMTS17; ADAMTS18; ADAMTS19; ADAMTS2; ADAMTS20; **ADAMTS3**; ADAMTS4; **ADAMTS5**; ADAMTS6; ADAMTS7; **ADAMTS8**; ADAMTS9; ADAMTSL1; ADAMTSL2; ADAMTSL3; ADAMTSL4; ADAMTSL5; AGT; AMBP; ASTL; **BMP1**; **C17orf58**; CD109; CELA1; CELA2A; CELA2B; CELA3A; CELA3B; "CEP295NL; TIMP2"; CPAMD8; CPN2; CST1; CST11; CST2; CST3; **CST4**; CST5; CST6; CST7; CST8; CST9; CST9L; CSTA; CSTB; CSTL1; CTSA; CTSB; CTSB; CTSC; CTSD; CTSE; CTSF; CTSG; CTSH; CTSK; CTSL; CTSO; CTSS; CTSV; CTSW; CTSZ; **EGLN1**; EGLN2; EGLN3; EGLN3; EGLN3; ELANE; "ENTPD4; LOXL2"; F10; F10; F10; F12; F13A1; **F13B**; F2; F7; F9; FAM20A; FAM20B; **FAM20C**; HABP2; HMSD; HPSE; HPSE2; HRG; **HTRA1**; HTRA3; HTRA3; HTRA4; **HYAL1**; HYAL2; HYAL3; HYAL4; ITIH1; ITIH2; ITIH3; ITIH4; ITIH5; ITIH6; KAZALD1; KAZALD1; KNG1; KY; LOX; LOXL1; LOXL3; **LOXL4**; LPA; MASP1; MASP2; MEP1A; MEP1B; MMP1; MMP10; MMP11; MMP12; MMP13; **MMP14**; MMP15; **MMP16**; MMP17; **MMP19**; MMP2; MMP20; MMP21; "MMP23B; MMP23A"; MMP24; MMP25; MMP26; MMP27; MMP28; MMP3; MMP7; MMP8; MMP9; NGLY1; OGFOD1; OGFOD2; P4HA1; P4HA2; P4HA2; P4HA3; P4HTM; PAMR1; **PAPPA**; PAPPA2; PCSK5; PCSK6; PI3; **PLAT**; PLAU; PLG; PLOD1; PLOD2; PLOD3; PRSS1; PRSS12; PRSS2; PRSS3; PZP; SERPINA1; SERPINA10; SERPINA11; SERPINA12; SERPINA2; SERPINA3; SERPINA4; SERPINA5; SERPINA6; SERPINA7; SERPINA9; **SERPINB1**; SERPINB10; SERPINB11; SERPINB12; SERPINB13; **SERPINB2**; SERPINB3; SERPINB4; SERPINB5; SERPINB6; **SERPINB7**; **SERPINB8**; SERPINB9; SERPINC1; SERPIND1; SERPINE1; SERPINE2; SERPINE3; SERPINF1; SERPINF2; SERPING1; SERPINH1; SERPINH1; **SERPINI1**; SERPINI2; SLPI; SPAM1; ST14; **SULF1**; SULF2; SULF2; TGM1; **TGM2**; TGM3; TGM4; TGM4; TGM4; TGM4; TGM4; TGM4; TGM5; TGM6; TGM7; TIMP1; **TIMP3**; TIMP4; TLL1; TLL2; TMPRSS15	ADAM18 (1,67) ADAM19 (-1,5) ADAMTS1 (2) ADAMTS15 (1,69) ADAMTS5 (2,04) BMP1 (-1,95) C17orf58 (1,71) CST4 (-1,63) EGLN1 (1,78) F13B (2,4) F2 (1,64) HTRA1 (-1,69) HYAL1 (1,61) LOXL4 (-1,58) MMP1 (-3,55) MMP14 (-1,63) PAPPA (-2,28) PLAT (-1,68) SERPINB1 (1,84) SERPINB2 (-3,48) SERPINB8 (-1,66) SERPINI1 (2,2) TGM2 (-4,82) TIMP3 (-2,71)	ADAM28 (-1,85) ADAMTS12 (-1,94) ADAMTS15 (2,41) ADAMTS3 (-1,63) ADAMTS8 (-1,7) FAM20C (-1,68) HTRA1 (-1,66) LOXL4 (-2,11) MMP1 (-3,52) MMP14 (-1,61) MMP16 (-2,02) MMP19 (2,37) PAPPA (-1,69) SERPINB7 (-1,7) SERPINI1 (1,92) SULF1 (-1,56) TGM2 (-5,9)
Facteurs sécrétés	AMH; MIR4321"; ANGPT1; ANGPT2; ANGPT4; **ANGPTL1**; ANGPTL2; ANGPTL3; ANGPTL4; ANGPTL5; ANGPTL6; ANGPTL7; AREG; ARTN; BDNF; BMP10; BMP15; BMP2; BMP3; BMP4; BMP5; BMP6; BMP7; BMP8A; BMP8B; BRINP2; BRINP3; BTC; **C1QTNF9B**; CBLN1; CBLN2; CBLN2; CBLN3; CBLN4; CCBE1; CCBE1; CCL1; CCL11; CCL13; "CCL14; CCL15; CCL15-CCL14"; CCL16; CCL17; CCL18; CCL19; **CCL2**; **CCL20**; CCL21; CCL22; CCL23; CCL24; CCL25; CCL26; CCL27; CCL28; CCL3; "CCL3L3; CCL3L1"; "**CCL4L2; CCL4; CCL4L1**"; "CCL4L2; CCL4L1"; CCL5; CCL7; CCL8; "CERS1; GDF1"; CFC1; "CFC1B; CFC1"; CHRD; CHRDL1; CHRDL2; CLCF1; CNTF; CRHBP; **CRLF1**; CRLF3; CRLF3; CRLF3; CRNN; **CSF1**; CSF2; CSF3; CSH1; CSH2; CSHL1; CTF1; CX3CL1; CXCL1; CXCL10; CXCL11; CXCL12; CXCL13; CXCL14; CXCL2; **CXCL3**; CXCL5; **CXCL6**; **CXCL8**; CXCL9; DHH; EBI3; EDA; EGF; EGFL6; EGFL7; EPGN; EPO; EREG; FASLG; **FGF1**; FGF10; FGF11; FGF12; "FGF13; LINC00889"; "FGF14; FGF14-IT1"; FGF16; FGF17; FGF18; FGF19; FGF2; FGF20; FGF21; FGF22; FGF23; FGF3; FGF4; FGF5; FGF6; FGF7; FGF8; FGF9; FGFBP1; **FGFBP2**; FGFBP3; FIGF; FLG; FLG2; FLT3LG; FRZB; FST; "FSTL1; MIR198"; FSTL3; GDF10; GDF11; GDF15; GDF2; GDF3; GDF5; GDF6; GDF7; GDF9; GDNF; GH1; GH2; **HBEGF**; HCFC1; **HCFC2**; HGF; HGF; HGFAC; **HHIP**; HRNR; IFNA1; IFNA10; IFNA13; IFNA14; IFNA16; IFNA17; IFNA2; **IFNA21**; IFNA4; IFNA5; IFNA6; IFNA7; IFNA8; IFNB1; "**IFNE; MIR31HG**"; IFNG; IFNK; IFNW1; **IGF1**; **IGF2**; "IGF2; INS-IGF2"; IHH; IL10; IL11; **IL12A**; IL12B; IL13; **IL15**; IL16; IL16; IL17A; IL17B; IL17C; IL17D; IL17F; IL18; IL19; IL1A; IL1B; IL1F10; **IL1RN**; IL2; IL20; IL22; IL23A; IL24; **IL25**; IL26; IL3; IL34; IL4; IL5; **IL6**; IL7; IL9; INHA; **INHBA**; INHBB; INHBC; INHBE; "INS; INS-IGF2"; INSL3; INSL5; INSL6; ISM1; ISM2; KITLG; LEFTY1; LEFTY2; LEP; LIF; "LOC101928034; S100A3"; LTA; LTB; MDK; MEGF10; **MEGF11**; MEGF6; **MEGF8**; MEGF9; MST1; MST1L; MSTN; **NGF**; NODAL; **NRG1**; NRG2; NRG3; NRG4; NRTN; NTF3; NTF3; NTF4; OSM; **PDGFA**; PDGFB; PDGFC; PDGFD; PF4; PF4V1; **PGF**; PIK3IP1; PPBP; "**PPT2; EGFL8** "; PRL; PSPN; PTN; RPTN; S100A1; S100A10; S100A11; S100A12; S100A13; S100A14; S100A16; S100A2; S100A3; S100A4; S100A5; S100A6; S100A7; S100A7A; S100A7L2; S100A8; S100A9; S100B; S100G; S100P; S100Z; SCUBE1; SCUBE1; SCUBE2; **SCUBE3**; SFRP1; SFRP2; **SFRP4**; SFRP5; SHH; TCHH; TCHHL1; TDGF1; TDGF1; TGFA; TGFB1; "TGFB2; TGFB2-OT1"; **TGFB3**; THPO; TNF; TNFSF10; TNFSF11; TNFSF12; TNFSF13; TNFSF13B; TNFSF13B; TNFSF14; TNFSF15; TNFSF18; **TNFSF4**; TNFSF8; TNFSF9; TPO; **VEGFA**; VEGFB; VEGFC; VWC2; VWC2L; WFIKKN1; WFIKKN2; WIF1; WNT1; WNT10A; WNT10B; WNT11; WNT16; WNT2; WNT2B; WNT3; WNT3; WNT3A; WNT4; WNT5A; WNT5A; WNT5B; WNT6; WNT7A; WNT7B; WNT8A; WNT8B; WNT9A; WNT9B; WNT9B; XCL1; XCL2; **ZFP91**	ANGPTL1 (1,68) C1QTNF9B (-1,65) CCL2 (-2,12) CCL20 (1,69) “CCL4L2; CCL4L1” (1,58) CLCF1 (3,47) CRLF1 (-2,89) CXCL3 (1,65) CXCL6 (-2) CXCL8 (2,7) FGF1 (-1,52) FGFBP2 (-2,24) HBEGF (1,55) HCFC2 (-1,99) HHIP (2,94) IFNA21 (1,64) IFNE; MIR31HG (-3) IGF2 (-1,65) IL12A (1,67) IL15 (1,96) IL1RN (3,05) IL25 (1,8) IL6 (7,04) INHBA (2,2) MEGF11 (-1,62) MEGF8 (-1,61) NGF (6,2) NRG1 (-1,58) PDGFA (1,91) PGF (-1,63) PPT2 (2,13) SFRP4 (-2,13) TGFB3 (-1,58) TNFSF4 (1,58) VEGFA (3,15) ZFP91 (-1,59)	CLCF1 (2,74) CRLF1 (-1,84) CSF1 (1,88) CXCL6 (-1,76) CXCL8 (2,43) ”IFNE; MIR31HG” (-2,6) IGF1 (-1,59) IL12A (1,5) IL6 (2,91) INHBA (2,22) MEGF8 (-1,81) NGF (5,55) PDGFA (2,32) PPT2 (1,68) SCUBE3 (-3,65) SFRP4 (-2,38) TGFB3 (-1,8) TNFSF4 (1,85) VEGFA (2,92)

Supplementary references

Badea, E., Della Gatta, G. & Budrugeac, P. Characterisation and evaluation of the environmental impact on historical parchments by differential scanning calorimetry. J. Therm. Anal. Calorim. 104, 495–506 (2011).

Belbachir, K., Noreen, R., Gouspillou, G. & Petibois, C. Collagen types analysis and differentiation by FTIR spectroscopy. Anal. Bioanal. Chem. 395, 829–837 (2009).

Eden E, Navon R, Steinfeld I, Lipson D, Yakhini Z. GOrilla: a tool for discovery and visualization of enriched GO terms in ranked gene lists. BMC Bioinformatics. BioMed Central; 2009;10(1):1–7

Naba A, Clauser KR, Ding H, Whittaker CA, Carr SA, Hynes RO. The extracellular matrix: Tools and insights for the “omics” era. Matrix Biol. 2016;49:10–24

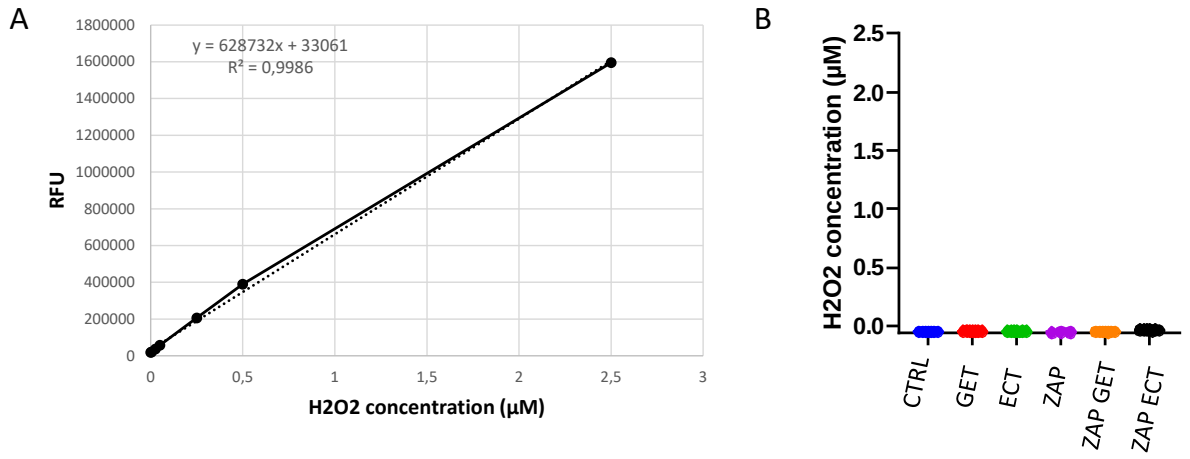
Samouillan, V. et al. The Use of Thermal Techniques for the Characterization and Selection of Natural Biomaterials. J. Funct. Biomater. 2, 230–248 (2011).

Sanden, K. W. et al. The use of Fourier-transform infrared spectroscopy to characterize connective tissue components in skeletal muscle of Atlantic cod (Gadus morhua L.). J. Biophotonics 1–9 (2019) doi:10.1002/jbio.201800436.

Tang, R. et al. Identification of ageing biomarkers in human dermis biopsies by thermal analysis (DSC) combined with Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR/ATR). Skin Res. Technol. 23, 573–580 (2017).

Wood, B. R. The importance of hydration and DNA conformation in interpreting infrared spectra of cells and tissues. 45, 1980–1998 (2016)

Annexe 3 : La concentration de peroxyde d'hydrogène a été quantifiée par fluorimétrie à l'aide du kit de dosage Amplex® Red Hydrogen Peroxyde/Peroxydase (Invitrogen, #A22188, ThermoFisher Scientific, MA, USA).



Annexe 3 : A.Courbes d'étalonnage de la concentration en peroxyde d'hydrogène. B. Concentration de peroxyde d'hydrogène dans des milieux frais conditionnés à partir de substituts cutanés électrostimulés 24h après l'application d'impulsions de type GET et ECT, ou dans le tampon de pulsation (ZAP) avant et après l'application d'impulsions de type GET et ECT

Annexe 4: *Vascular and extracellular matrix remodelling by physical approaches to improve drug delivery at tumour site.* Gouarderes S, Mingotaud AF, Vicendo P, Gibot L. Expert Opin Drug Deliv 1-24. 2020 Aug 24. Doi:10.1080/17425247.2020.1814735

HAL
archives-ouvertes.fr

Vascular and extracellular matrix remodeling by physical approaches to improve drug delivery at the tumor site

Sara Gouarderes, Anne-Françoise Mingotaud, Patricia Vicendo, Laure Gibot

To cite this version:

Sara Gouarderes, Anne-Françoise Mingotaud, Patricia Vicendo, Laure Gibot. Vascular and extracellular matrix remodeling by physical approaches to improve drug delivery at the tumor site. Expert Opinion on Drug Delivery, Taylor & Francis, 2020, 17 (12), pp.1703-1726. 10.1080/17425247.2020.1814735 . hal-02927112

HAL Id: hal-02927112

https://hal.archives-ouvertes.fr/hal-02927112

Submitted on 3 Sep 2020

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

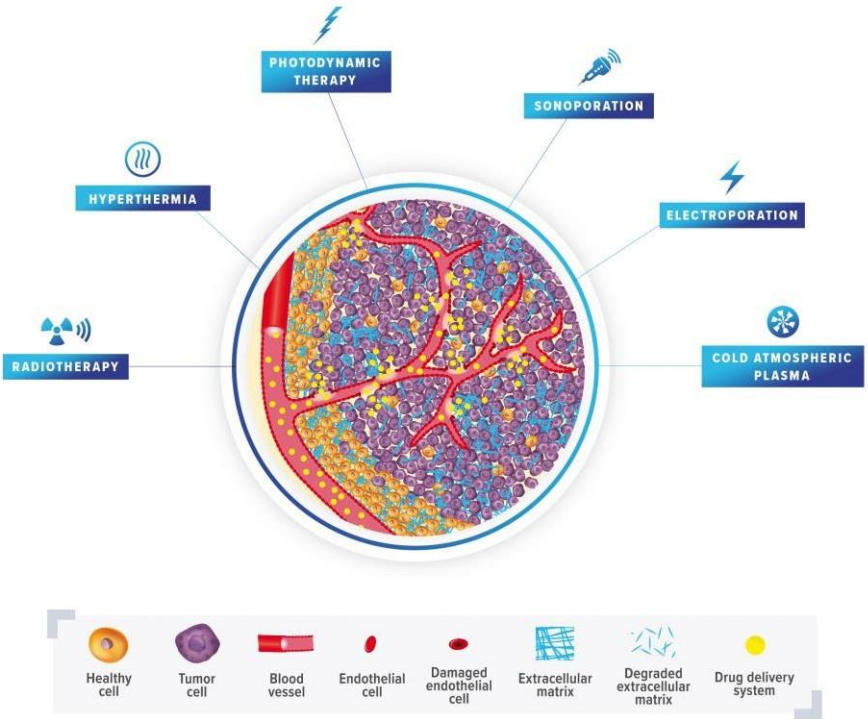
Vascular and extracellular matrix remodelling by physical approaches to improve drug delivery at the tumour site

Sara Gouarderes[1], Anne-Françoise Mingotaud[1], Patricia Vicendo[1], Laure Gibot[1,*]

[1] Laboratoire des IMRCP, Université de Toulouse, CNRS UMR 5623, Université Toulouse III - Paul Sabatier, France

* Author for correspondence: Laure Gibot, +335 61 55 62 72, gibot@chimie.ups-tlse.fr

Graphical abstract



Abstract

Introduction: Modern comprehensive studies of tumour microenvironment changes allowed scientists to develop new and more efficient strategies that will improve anticancer drug delivery on site. The tumour microenvironment, especially the dense extracellular matrix, has a recognised capability to hamper the penetration of conventional drugs. Development and co-applications of strategies aiming at remodelling the tumour microenvironment are highly demanded to improve drug delivery at the

tumour site in a therapeutic prospect. **Areas covered:** Increasing indications suggest that classical physical approaches such as exposure to ionising radiation, hyperthermia or light irradiation, and emerging ones as sonoporation, electric field or cold plasma technology can be applied as standalone or associated strategies to remodel the tumour microenvironment. The impacts on vasculature and extracellular matrix remodelling of these physical approaches will be discussed with the goal to improve nanotherapeutics delivery at the tumour site. **Expert opinion:** Physical approaches to modulate vascular properties and remodel the extracellular matrix are of particular interest to locally control and improve drug delivery and thus increase its therapeutic index. They are particularly powerful as adjuvant to nanomedicine delivery; the development of these technologies could have extremely widespread implications for cancer treatment.

Key words

Collagens, ECM, tumour microenvironment, radiotherapy, hyperthermia, photodynamic therapy (PDT), electroporation, sonoporation, cold atmospheric plasma, vascular permeability

Article highlights

- As opposed to pharmacological strategies, physical approaches allow a spatial and temporal treatment of the target tissue.
- Radiotherapy (RT), by damaging tumour vasculature and ECM, enhance nanotherapeutics drug delivery and subsequent increase of RT activity at the tumour site leading to significant reduction of both resistance processes and tumour hypoxia.
- Hyperthermia therapy, focused ultrasounds or alternative magnetic fields, are three approaches that prime the tumour by disrupting extracellular matrix and tumour vasculature, enhancing on-site drug delivery.

- Chemophototherapy, the combination of phototherapy and chemotherapy, is an efficient strategy to induce tumour vascular permeability and ensuing drug delivery to tumours.
- Standalone or co-applied physical strategies to disrupt the dense tumour extracellular matrix or to mediate vascular permeability may be of major interest to improve drug delivery at the tumour site in a therapeutic prospect.

Introduction

In the field of oncology, intensive works carried out by researchers have highlighted many behaviours specific to cancer, so that invasive therapies are being replaced by approaches refined by the knowledge accumulated over the years. The tumour microenvironment (TME) plays a key role in the effective delivery of anti-cancer drugs on the tumour. Indeed, TME has a recognised capability to hamper the penetration of conventional drugs and drug delivery systems because of the tumour growth process itself [1,2]. To overcome that specific barrier to anti-cancer drugs, researchers have explored new challenging strategies they have adapted from a deep understanding of cancer growth process. Actually, to obtain nutrients supply to fuel their growth and to facilitate their dissemination to other organs, cancer cells promote the birth of new blood vessels from existing ones, through a process known as tumour angiogenesis. Tumour blood vessels are tortuous, dilated and leaky. These structural and functional defects [3] make the immature vascular walls within the tumour microenvironment more permeable, especially to macromolecules as proven in 1986 by Matsumura *et al.* They found that high molecular weight anticancer agents can passively accumulate in solid tumours due to the enhanced permeability and retention (EPR) effect [4] and non-functional lymphatics . This passive accumulation of drug delivery systems in tumour tissue increases the efficacy of the transported drugs. However, despite promising initial preclinical results of passively targeted chemotherapeutic drug delivery through the EPR effect, serious questions have been raised about the existence and clinical application of the EPR effect in human tumours [5]. Indeed, drug trafficking within a solid tumour is dramatically slowed down because of significant impediments such as high

tumour interstitial fluid pressure related to defective lymphatic microvasculature [6], and chaotic microvasculature of most solid tumours. Besides, vascular permeability based on EPR effect may differ greatly between different types of tumours and even within one tumour. Thus, several pharmacological and physical strategies that can improve the EPR effect to facilitate nanomedicine delivery in viable tumour cells in relevant concentrations are of high importance and they have been assessed and nicely described in other reviews dedicated on these topics [7–11].

Another important physical barrier to drug and drug delivery systems is the densification of the extracellular matrix (ECM) in the tumour microenvironment (Figure 1) [12]. Indeed, the tumorous ECM is the most abundant component in tumour environment and it regulates cancer development by eliciting various biochemical and biophysical signalling [13]. For example, type I and III collagen production are enhanced and associated with the formation of aberrant collagen bundles during tumour progression [14]. Densification of tumour ECM renders it stiffer compared to the healthy matrix [15,16]. As a negative consequence, total collagen content negatively affects vascular macromolecule transport, possibly by binding and stabilising the glycosaminoglycan component of the ECM [17]. The interest in promoting the degradation of the extracellular matrix is double [18]. Firstly, the lower matrix density facilitates the diffusion of drugs and drug delivery systems within the tissue. Secondly, less matrix means lower interstitial fluid pressure (IFP) within the tumour, less compression of blood vessels and thus improved drug distribution.

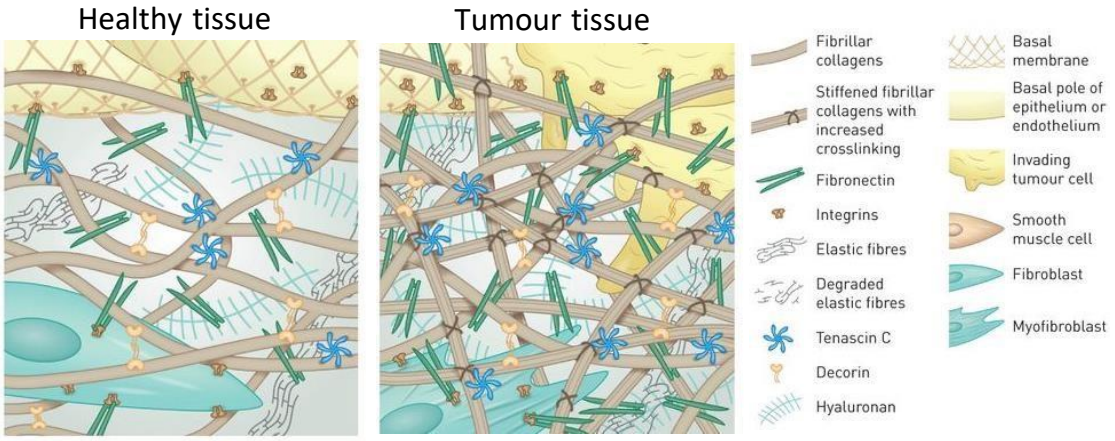


Figure 1: Changes observed within the extracellular matrix in the tumour tissue. In healthy tissue ECM is remodelled by the activity of fibroblasts and presents a loose meshwork of collagen, elastin and

fibronectin. In cancer, tumours are surrounded by a dense and stiff ECM containing highly crosslinked collagen, and high levels of fibronectin, tenascin C and hyaluronan. Adapted from [19], reproduced with permission of the © ERS 2020: European Respiratory Journal 50 (1) 1601805; DOI: 10.1183/13993003.01805-2016 Published 5 July 2017.

In a nutshell, distances between blood vessels in tumour cells, composition and architecture of the extracellular matrix, intercellular junctions, high interstitial fluid pressure, lack of convection, drug metabolism and binding all contribute to various extents to limited drug distribution [20]. Consequently, any strategy enabling anticancer drugs and/or nanomedicine distribution improvement in tumours will thereby increase their therapeutic index.

Matrix remodelling is one of the most valuable approaches to improve the delivery of therapeutic agents as evidenced *in vivo* with single or chronic injection of pharmacological agents able to degrade tumour ECM proteins. Among them, let's cite hormones like relaxin [21], enzymes like collagenases [22], angiotensin inhibitor called losartan [23], the antibody simtuzumab to inhibit the lysyl oxidase-like 2 (LOXL2) [24]. Unfortunately, metalloproteinases (MMP) inhibitors (such as marimastat and prinomastat) have not been clinically proven to be effective against cancer, due to their lack of specificity and poor tolerability [25]. One of the flagship studies combining pharmacological ECM matrix remodelling and concomitant treatment with anticancer nanoparticles was published in 2010 by Jain's team. The authors showed that the repetitive injection of losartan decreased collagen amounts in several mouse tumour models, which in turn favour a higher penetration of doxorubicin-loaded liposomes (Doxil) into the tumour, particularly in the interstitial space, thus improving its therapeutic efficacy [26].

The most traditional strategies to improve drug delivery at the tumour site through vascular or extracellular matrix remodelling or lay on pharmacological modulation of the tumour microenvironment But interestingly, increasing publications suggest that well-known physical approaches such as ionising radiations, hyperthermia, light irradiation or emerging ones like sonoporation, electroporation or exposure to cold atmospheric plasma (Figure 2) can be applied as a

standalone strategy to 'prime the tumour' [27] or to end up with 'superenhanced permeability and retention' (SUPR) effect [28]. Both results in an enhanced drug delivery and increased anticancer efficacy which is practitioners' quest. Physical approaches offer particular advantages over pharmacological or surgical approaches. They are less invasive than surgical intervention but their major advantage is undoubtedly the targeting in time and space, which induces greater therapeutic efficacy while drastically limiting the deleterious side effects that can be found with systemic pharmacological treatments. This targeting in time and space presents two important consequences: 1) the impossibility of treating metastases because only tumours physically targeted by the treatment are affected and 2) the existence of a therapeutic window which need to be precisely determined during multimodal treatment with co-administration of nanotherapeutics. Other advantages/disadvantages specific to the physical approaches described in this review are detailed in Table 1.

This review will, thus, focus especially on these physical approaches (ionising radiations, hyperthermia, light irradiation, sonoporation, electroporation or exposure to cold atmospheric plasma) and how they modulate vascular properties and degrade the extracellular matrix in order to improve the delivery of therapeutic molecules at the tumour tissue level. Wherever possible, examples demonstrating an improvement of drug delivery and efficacy through nanomedicine such as liposomes or polymeric nanoparticles will be developed.

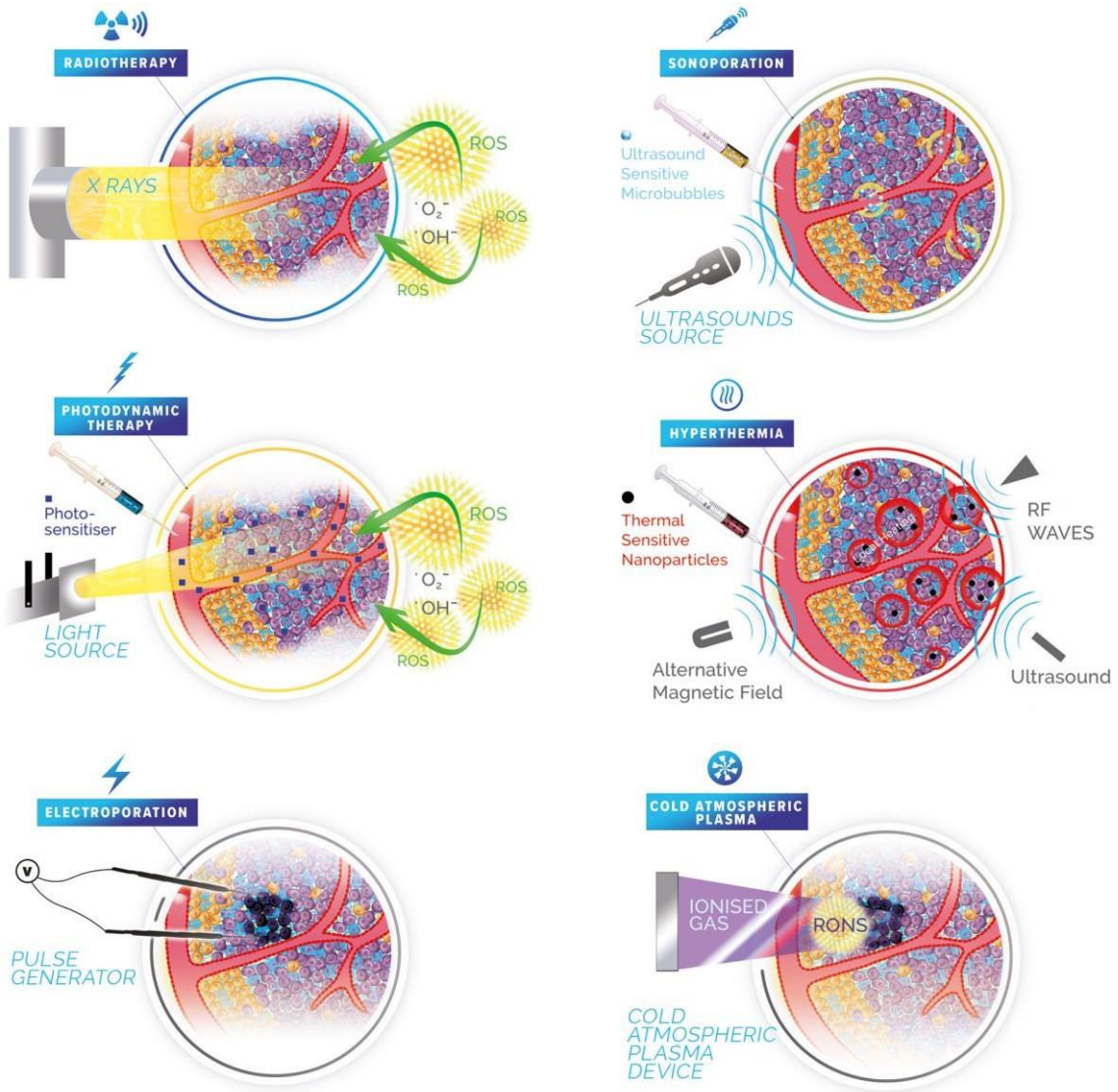


Figure 2: Remodelling the tumour microenvironment through physical pretreatments as emerging approaches in modern cancer therapy. Radiotherapy: water ionisation induced by X-ray leads to the production of reactive oxygen species (ROS) reknown genotoxicity and cytotoxicity on various cancerous cells types. Hyperthermia treatment: different types of HT source combined with responsive nanoparticles allow focusing the heat release into targeted areas while limiting adverse outcomes on the surrounding tissues. Photodynamic therapy: focused light irradiation excites a photosensitiser that promotes ROS production in the presence of oxygen, provoking cell death. Sonoporation: focused ultrasound associated causes microbubbles cavitation, a mechanical effect that improves ROS generation, membrane permeability and drug uptake. Electroporation: calibrated pulsed electric fields allow a local and transient permeabilisation of the cell membrane, leading to an enhanced drug uptake. Cold atmospheric plasma: interactions between low temperature plasma and liquids induce the production of short and long-lasting reactive oxygen/nitrogen species (RONS) responsible for its genotoxicity and cytotoxicity on various cancerous cells types.

1 Table 1: Pros and cons of the physical approaches described in this review.

	Advantages	***Drawbacks***
All of them	• spatial and timed control release • decreased side effects compared to systemic pharmacological treatments • less invasive than surgical procedures • Outpatient treatments	• local treatment therefore does not reach metastases • therapeutic window needs to be precisely determined during multimodal therapeutic strategy
Radiotherapy	• highly focused, thus minimizing damage or toxicity to adjacent tissues • multiple sites treated in a single session • patient satisfaction • large clinical experience (over 30 years)	• side effects: burns, fatigue, temporary hair loss, sexual and fertility problems, dermatological disorders, nausea and vomiting, headache, trouble swallowing, urinary issues… • women are more sensitive to radiation than men, but this is not considered in international guidelines for radiation dosages.
Hyperthermia	• highly focused, thus minimizing damage or toxicity to adjacent tissues • superficial and deep-seated tumors can be treated	• side effects: burns, blisters, discomfort, or pain • difficulty to keep the area to be treated within a precise and homogeneous temperature range for whole treatment duration • Lack of standardization depending on kinds of energy used
Photodynamic therapy	• short treatment time • possibility of repetitive treatments • Selectivity (on the area receiving both the photosensitizer + light irradiation will be treated) • aesthetic and functional healing • cost-effective treatment • great patient satisfaction	• side effects: transient skin photosensitivity, oedema, redness or blisters formation • correct oxygenation of the tissue is essential • accessibility for light delivery device can be complicated depending on body site to be treated • limited light penetration • Lack of standardization
Sonoporation	• highly focused, thus minimizing damage or toxicity to adjacent tissues • enhanced drug penetration effectively • great patient satisfaction	• side effects: irritation, burning • Potentially time-consuming to administer and expensive • Lack of standardization
Electroporation	• highly focused (between electrodes), thus minimizing damage or toxicity to adjacent tissues • enhanced drug penetration effectively • possibility of repetitive treatments • aesthetic and functional healing • great patient satisfaction	• side effects: muscle contraction, pain • potentially time-consuming (electrodes placement) • expensive (disposable electrodes)
Cold atmospheric plasma	• short treatment time • cost-effective treatment	• multiple parameters to control to ensure desired plasma composition (loaded gas, flow rate, voltage, exposure time…) need for a constant distance to the treatment site, limiting the treatment to small areas • depth of plasma penetration • Lack of standardization

1. Radiotherapy

Nowadays, more than fifty percent of patients are treated routinely with radiotherapy (RT), associated or not with chemotherapy or other therapeutic modalities. The principle behind this technology developed in 1896 is based on a water ionisation process, leading to the production of reactive oxygen species (ROS). These tumoricidal doses of ROS provoke oxidative damages to DNA and to other cellular components in the tumour. As an additional positive consequence, RT modifies the tumour microenvironment by affecting endothelial cells and vasculature and remodelling extracellular matrix (ECM), but also counts negative impacts as it affects immune cells, and activates a number of pathways involved in tumour growth, dissemination and radioresistance [29,30].

1.1. Radiotherapy-Mediated Vascular Permeability Enhances Drug Delivery

Precise radiation technology and their safer application has been made possible thanks to the progress made in the fields of radiation physics and computer technology. Mapping the tumour to deliver local ionising radiation with a radiation beam that matches the tumour shape has proven to be strongly impactful on the tumour vascularisation, the vessel permeability and the interstitial fluid pressure (IFP). The response of endothelial cells to radiation is accompanied by changes in transcriptional, translational processes and pro-angiogenic growth factor secretion. The observed effects on tumour blood vessels partly result from both a decrease in tumour volume and endothelial cells death by apoptosis. This causes vascular collapse and hypoxia at the tumour level as well as endothelial destabilisation. These effects can be observed both after RT treatment at low fractionated doses between 2–3 Gy [31,32] or for single high doses of radiation > 10 Gy [33]. It was observed that single radiation dose of 5 Gy or more induced, in a dose-dependent manner, a decrease of the vascular volume [34]. Moreover, in single-dose delivery protocols of moderate to high intensities, vascular damages resulted in an improvement of vascular permeability [34]. In order to demonstrate a radio-induced increase in vascular permeability, Schwickert *et al.* treated Fischer rats bearing R3230

mammary adenocarcinoma xenografts with Gd-labelled albumin and a unique RT dose (15 Gy to 5 Gy) [35]. Thanks to MRI exploration, they demonstrated a dose-dependent increase in albumin accumulation in tumour tissue attributed to an increase of vessel permeability. However, contrary to high-dose radiation, a fractionated RT treatment led to an accumulation of macromolecules without visible vascular alterations [36]. Another additional positive impact was the observation of the increased vessel permeability and the increased secretion of cytokines as VEGF right after RT. As expected, this was followed by a decrease of VEGF blood concentration due to vessels regression [37]. Radiation-induced vessel permeability will partly depend on total dose radiation, fractionation schedules, the tumour type and the tumour vasculature level before RT.

Tumour reduction subsequently to radiation exposure leads to a resistance decrease to vascular flow and to a blood perfusion increase. High single-dose radiation between 10 Gy and 20 Gy increased blood flow by a factor of two and reduce the spatial variability of blood flow throughout the tumour volume [38]. The influence of IFP on the tumour microenvironment is closely related to tumour vascularisation because of hyperpermeability of blood vessels together with non-functional lymphatics. Although results may be inconsistent from one patient to another [39], RT may decrease IFP in the tumour as reported by several studies [40,41]. A high single-dose radiation of 15 Gy increased vascular permeability by 60% over three days and reduced IFP by 40% [41]. In response to radiation-induced cellular damages, survival mechanisms can be activated to compensate their cytotoxic effects. As described by Moeller *et al.*, fractionated RT induced tumour cells death leading to an increase of the tumour perfusion and a burst of ROS due to waves of hypoxia and reoxygenation [42]. However, it was also reported that the hypoxia-inducible factor-1 (HIF-1), transcription factor regulating the responses to changes in tissue oxygenation, will be activated [42]. HIF-1 will mediate the release of endothelial pro-angiogenic factors such as VEGF to protect tumour endothelium against radio-induced vascular damage and to promote new vessels growth [31,43,44]. Activation of survival mechanisms to escape from the deleterious effects of RT as well as HIF-1 upregulation will contribute to the tumour radioresistance.

1.2. Radiotherapy Induces Extracellular Matrix Remodelling

The dense extracellular matrix is an important component of the tumour tissue and is produced by stromal cells such as tumour associated fibroblasts, the main ECM producers. However normal fibroblasts are resistant to high doses of radiation up to 50 Gy [45]. Matrix metalloproteinase (MMPs) contribute to the turnover and modelling of the ECM. However, their activity may also be affected by RT as well as that of their inhibitors. Several *in vitro* studies have shown that radiotherapy increased MMPs activity and ECM proteolysis leading to an enhancement of tumour cells migration and angiogenesis. Many research groups have observed MMP-2 upregulation after different RT protocols and for various tumour types such as pancreatic [46], colon cancer (25 Gy in 5 fractions overs 5 days) [47,48], lung cancer [49], breast cancer [50]. It has been suggested that MMP-2 may contribute to tumour cells dissemination [47,51,52]. *In vitro* studies performed on breast cancer cells [50] and rectal cancer cells [47,51] support this hypothesis as they highlighted a higher concentration of MMP-2 after the application of RT which in turn led to an increase of the invasive properties of the tumour cells. Moreover, the inhibition of MMP-2 enhances tumour radiosensitivity in murine lung cancer (2 × 5 Gy) [49] while that of MMP-14 in murine breast cancer (3 x 6 Gy) [53] even enhanced the response to RT *via* an increased tumour perfusion. Some studies on rectal cancers showed an increase of MMP-1, MMP-3, MMP-9 mRNA concentrations after RT [47,54,55] and of PAI-I protein involved in radiation induced fibrosis [54,48,56].

Lysyl oxidase (LOX), an enzyme involved in the crosslinks formation between collagens and elastin fibres, also plays a key role in cancer cell invasion through ECM remodelling [57,58]. LOX-activity inhibition has proven to be a relevant strategy to successfully prevent ECM stiffening and remodelling [59]. Unfortunately, RT promote, in a dose-dependent manner, an increase of the LOX secretion in several *in vitro* cancer cell lines and *in vivo* in a lung adenocarcinoma xenograft model [60]. Notably, knockdown of LOX in prostate cancer cells both *in vitro* and *in vivo* enhanced their radiosensitivity [61].

Even though radiotherapy is part of effective standard treatment, and is administered to 50–60 percent of cancer patients routinely, radio-resistance still occurs. However, radiobiologists are now considering seriously the importance of ECM remodelling and tumour microenvironment in general to achieve the expected outcomes of the treatments and overcome resistance and/or recurrence in different cancers [62].

1.3. Radiotherapy Promotes Nanotherapeutics Delivery

As explained here above, the tortuous nature of newborn blood vessels in the solid tumours together with the dense structure of the tumour ECM present significant impediments to blood-borne delivery of anti-cancer nanotherapeutics. The advantage of nanotherapeutics compared to traditional anti-cancer drugs rely on their small size which in practice favours the drug systemic pharmacokinetic. Indeed, due to their ability to escape from the mononuclear phagocyte system and to solubilise lipophilic drugs, researchers were expecting an increase of nanotherapeutic accumulation *via* the EPR effect. But clinical observations performed on three FDA approved nano-drugs clearly indicate modest benefits of nanotherapeutics compared to the standard drugs. Though their nano-size allows overcoming pharmacokinetic barriers, the complexity of the tumour microenvironment, the heterogeneous blood flow in the tumour, the dense collagen network of ECM and a high IFP in the tumour hamper their penetration on the battle field. Instead, therapeutics accumulate in the perivascular area. In this context, RT may achieve success in varying degrees by remodelling tumour microenvironment, and therefore, annihilate the posed obstacles. RT may also take advantage of nanomedicine design to overcome tumour resistance mechanisms and hypoxia [63]. Several studies on rat bearing Dunning AT1 prostate tumour have shown that single dose RT [64] or fractionated radiotherapy treatment (Figure 3) [65] before administration of HPMA copolymer-based nanovector loaded with doxorubicin (DOX) or gentamicin increased tumorous accumulation of nanotherapeutics and their therapeutic activity.

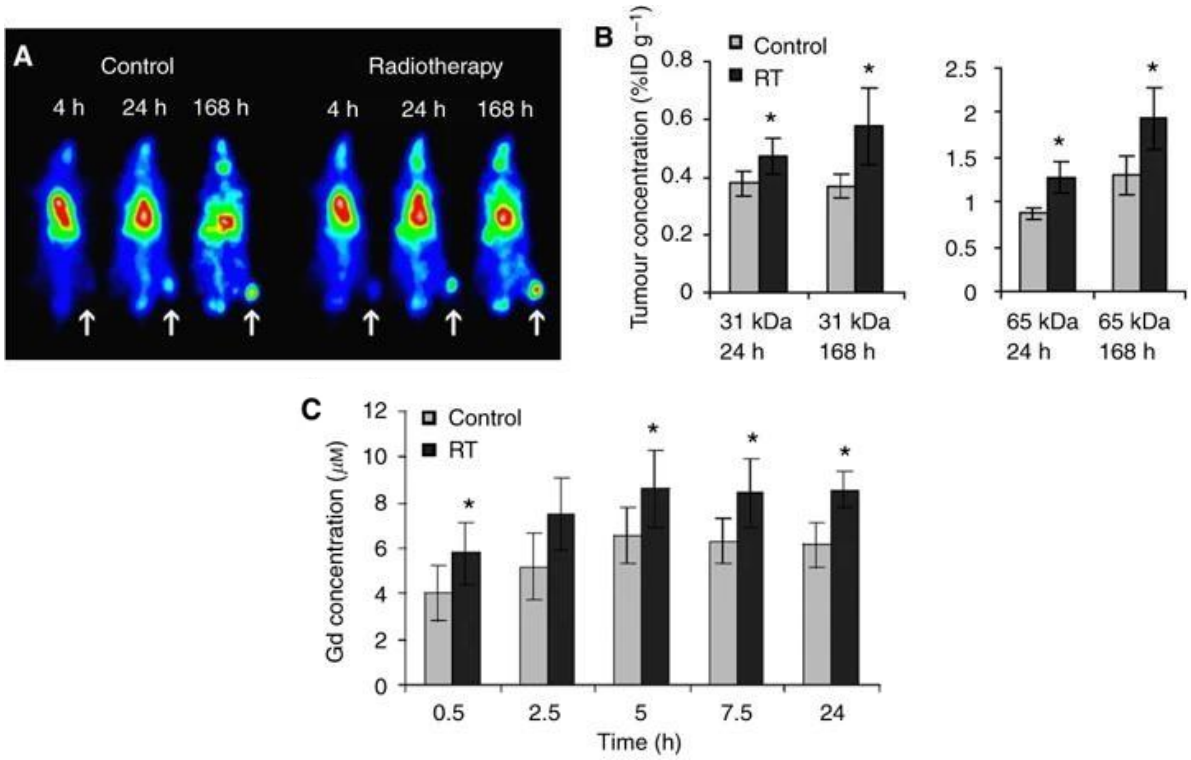


Figure 3: Radiotherapy (RT) improves tumor drug accumulation. (A) Scintigraphic analysis of the effect of 20 Gy of local tumour RT on the tumour accumulation of an iodine-131-labelled 31 kDa N-(2-hydroxypropyl)methacrylamide (HPMA) copolymers, demonstrating that RT beneficially affects tumour targeting. (B) Quantification of the effect of RT on the tumour concentrations of the 31 kDa (left panel) and 65 kDa (right panel) copolymer at 24 and 168 h post intravenous injection. (C) Quantification of the effect of RT on the tumour accumulation of the 25 kDa gadolinium-labelled copolymer. Adapted from *[65]* under the Attribution-NonCommercial-ShareAlike 3.0 Unported (CC BY-NC-SA 3.0).

Similar effects were observed with PEGylated liposomal doxorubicin (Caelyx) when athymic mice bearing human osteosarcoma xenografts were previously exposed to a single dose of 8 Gy or fractionated radiotherapy (3 x 3.6 Gy) [66]. Giustini *et al.* showed an increased accumulation of iron oxide nanoparticles in the tumour after a single 15 Gy irradiation in a syngeneic mouse breast cancer model [41]. For each example, authors demonstrated that this increase in nanotherapeutics accumulation was correlated to a decrease of the IFP and an enhancement of vascular permeability. Recently, Stapleton *et al.* clearly demonstrated how IFP may modulate accumulation of nanotherapeutics in a tumour previously exposed to RT [67]. In a preclinical tumour model with high IFP, the MDA-MB-231 metastatic breast adenocarcinoma model, a single dose of radiation (15 Gy) promoted a decrease of the IFP by 50% 24h after RT. Tumour microenvironment modifications induced by RT disinhibit interstitial transport of larger carriers such as liposomes, mostly in the central area,

allowing an improved cellular uptake of the liposomal doxorubicin (Doxil) and an enhancement of the doxorubicin therapeutic efficacy. This study pointed out that RT causes spatiotemporal fluctuations in fluid transport, mediating the decrease of the IFP and subsequent nanoparticles accumulation in tumours.

Interestingly, RT was also proved to improve nanotherapeutics (PLGA-PEG nanoparticles, Doxil or Onivyde) accumulation within tumor indirectly through the recruitment of tumor-associated macrophages (TAM) acting as nanoparticles carriers [68]. Thus, TAM recruited on site by RT elicited dynamic bursts of extravasation, and subsequently enhance drug uptake in neighboring tumor cells.

All these results support the clinical investigations combining RT pretreatment with nanotherapeutics administration for the treatment of cancers. Phase I/II clinical trials testing liposomal doxorubicin, cisplatin or oxaplatin formulation in combination with radiotherapy have shown better patient's response and increased patients' survival while they were affected by lung cancer, bladder cancer, breast cancer, and head and neck cancers associated [69,70]. In a phase I study using poly (L-glutamic acid)-paclitaxel anti-cancer drug combined with 6 weeks RT exposure at 50.4 Gy, a complete clinical response for four out of 12 patients (33%) affected with loco-regional disease was observed [71]. Meaning that no tumour was visible as assessed during follow-up endoscopy and post-treatment biopsy. These promising clinical results pave the way for the development of new multimodal therapies combining both pretreatment of the tumour microenvironment and the delivery of nano-sized chemotherapeutic agents.

Structure and nature of the tumour microenvironment will influence the tumour response to RT. The many examples described above and in the literature demonstrate the great potential of RT to impact tumour vasculature, decrease IFP and degrade collagen proteins from the ECM. Therefore, one can understand that patient's recovery as well as RT resistance and tumour recurrence will depend on this interplay between tumour response to RT and ability of RT to denature the tumour microenvironment. In case that prove to be effective, RT may be a powerful tool for nanotherapeutics delivery and their intratumoral accumulation. While the multimodal strategy combining RT and nano-

drugs appears promising clinically, the next challenging steps would be to evaluate the influence of the sequence and timing of nanotherapeutic and RT administration, the specific fractionation schedule, the total radiation dose and dose per fraction on the tumour response.

2. Hyperthermia

The principle of hyperthermia (HT) treatment grounds on the regio-local elevation of temperature in the tumour tissue to be treated to induce either reversible or irreversible damages. Currently, accepted temperature to be reached by this technique is ranging from 39 to 43 °C [72]. Today this topic is well documented and, for thorough description, we invite the reader to go through the following reviews and references [8,73–75]. Historically, the local increase of temperature in the tumour was assessed by physicians as being the best way to cure cancer. However, they quickly realised that temperatures higher than 43 °C led to irreversible side effects such as haemorrhage and stasis. That is the reason why most studies currently refer to what is called mild hyperthermia, aiming at a moderate elevation of temperature (39–43 °C). In a bid to unravel the biological mechanisms behind the thermal cytotoxicity, intense investigations were carried out from the last mid-20th century. Better understanding of molecular interaction pathways on ECM proteins, DNA damages repair as well as its role in immunomodulation allowed to refine HT protocols. In addition, thanks to the significant development of technologies and software enabling online thermometry and treatment planning, safer application of HT was made possible to be used as a potent cure technique. To control locally the temperature, different physical means have been developed e.g. high-intensity focused ultrasounds (HIFU), microwaves, light irradiation of photo-responsive nanoparticles (mainly composed of gold), oscillating magnetic field on metal nanoparticles and various radiofrequencies. The use of external electromagnetic fields presents the strong advantage to have a better control on heating localisation. It implies that sensitive nanoparticles that can be activated at a distance are distributed onto the site to be treated. This is the case for plasmonic photothermal therapy and magnetic hyperthermia. In such cases, the sensitive nanoparticles are used as physical tools that trigger the stimulus while the EPR

effect promote their accumulation in the tumour surroundings. In a complementary manner, hyperthermia has been intensely used jointly with thermosensitive liposomes carrying regular anti-cancer drugs. In this case, the liposomes [73] do not generate hyperthermia but they react to it and subsequently deliver the drug. Such tandem application is so effective that it is currently evaluated in several clinical trials [8], some of them at phase III. In the following paragraphs, hyperthermia effects emphasis will be done first on the vascular system and secondly on ECM remodelling.

2.1. Vascular Effects of Hyperthermia are Numerous

Loco-regional vascularity change is the direct consequence of HT applications. Regardless of which cells are being treated, gradual rise of temperature above 39 °C induced increase blood flow. However, if an increase of blood flow by a factor of 15, at least, is measured for healthy tissue, this effect is reduced to a factor of 2 for tumour tissue because temperature distribution inhomogeneity within the tumour and the tumour type [76]. Nevertheless, the very first important effect observed when HT is applied near a tumour is the increase of extravasation of different molecules or nanoparticles, linked to an improved permeability of the endothelial wall [77–79]. For instance, Ferrari *et al.* described the transport of Evans blue and different dextrans in pancreatic subcutaneous tumours and observed an increased perfusion with a mild hyperthermia persisting at least 5 hours but coming back to normal 24 hours later. A similar transient effect was observed by Koning on melanoma and sarcoma [80]. In an elegant work, Hu *et al.* developed nanoplatforms including nanoparticles based on carbon nanotubes, chitosan and nanogels composed of the thermoresponsive poly (N-isopropyl acrylamide) (PNIPAM). PNIPAM exhibits a tunable water solubility transition with temperature called Lower Critical Solubility temperature (LCST) and around 32° C. Below this threshold, the polymer remains soluble while it precipitates above this value. When employed to design nanovector, PNIPAM enables to tunable nanovector size with temperature. In this case, the nanoplatform transported doxorubicin (DOX). Upon local heating, the nanoplatform shrank due to the LCST and collapsed nanostructure benefited in an even stronger way of the increased permeability of the blood vessel. Interestingly, the system was also

pH-sensitive and typical acidic environment in the tumour led to its protonation, which has for consequence to provoke their adhesion onto cancer cells [81].

However, and as underlined here-above, moderate increase of blood flow in tumours was observed, as described more than 20 years ago by Baronzio *et al.* [82], and recently confirmed by Dynamic Contrast Enhanced MRI characterising the delivery of doxorubicin from thermosensitive liposomes to mammary carcinoma. No increase of blood flow rate was observed even though an increased drug delivery could be seen [83]. Recent investigations highlighted that longer exposure to temperature above 42.5 °C could result in impairment of blood flow since fragile and chaotic neoangiogenic tumour microcirculation is severely damaged [76,84]. In some extent, a complete shutdown of the vasculature can be observed, proving the thermal toxicity of HT on tumour cells.

Upon increasing temperature over 44 °C, various studies repetitively described predictable deformation of the vessels, stiffening of red and white blood cells, leading to their sticking to the wall, coagulation [85] and haemorrhage [83,86,87].

Regarding vascular effects of hyperthermia, a point is still under debate. Different studies have described the development of a thermoresistance process, upon which hyperthermia effects are lost in a second treatment [88,8]. However, Raucher's group consistently used four cycles of hyperthermia on pancreatic tumours and showed an increase of penetration of elastin-like peptides [89]. Gazeau *et al.* also described the treatment of epidermal carcinoma thanks to heat-generating iron oxide nanocubes following a protocol of 3 cycles of exposure to oscillating magnetic field [90].

Considering heterogeneity of temperature distribution within the tumour, this point is almost never examined in the recent literature. Realistic therapeutic strategies should thus be elaborated for HT translational clinical applications, taking this point into account.

2.2. Hyperthermia Based on Nanoparticles Is an Efficient Way to Remodel ECM

As discussed in the introduction of this review, ECM is an essential element to consider for the development of oncologic approaches as tumour stiffness and ECM density impair anti-cancer drug

delivery seriously. Even if the current therapies still underestimate this target in their therapeutic armamentarium development, its role in limiting drug delivery to tumours has been recognised for a long time and strategies to overcome the resulting impairments have been proposed, based on either chemical or physical approaches [87,91]. Penetration of ECM is an even more challenging barrier from the view point of nanotherapeutics as their convection-based transport is restricted by the dense protein entanglement of the ECM and tumour stiffening. The use of hyperthermia to alleviate this problem is still not magic, as demonstrated by Koning in 2017 who compared hyperthermia treatment on two different breast cancers [92]. The therapeutic response of thermosensitive liposomes loaded with DOX was better for the cell type which presented a higher blood vessel density and a poorly organized ECM.

Increasing information has been presented on existing links between matrix stiffness and cancer prognosis [86]. Indeed, the aberrant production of ECM leading to tumour stiffening has been recognised as a predictive marker of tumour malignancy. In an on-demand tunable ECM model composed of collagen gel, several studies have examined the influence of temperature on such a simple system. For instance, Chan *et al.* used a microfluidic set up to evaluate the penetration of 50 nm and 120 nm gold nanoparticles inside a collagen gel incorporating gold nanorods [93]. They observed the denaturation of type I collagen fibrils at 45–55 °C and an increased diffusivity of both types of nanoparticles. Collagen is known to exhibit several phase transitions upon heating, a minor transition existing at ca. 31–37°C and a stronger and irreversible one in the 37–55 °C range [90]. Mild hyperthermia thus inevitably leads to denaturation of collagen gels and, in turn, allow ECM remodelling. This has repeatedly been described in the literature when people precisely examine this point. For instance, Hilger *et al.* studied the evolution of collagen fibres in mixed spheroids of Panc-1 pancreatic cancer cells and WI-38 fibroblasts [94]. They demonstrated a marked evolution of collagen fibres above 39 °C and a decrease of collagen content inside spheroids. A further increase of temperature to 40 °C led to a decrease of the spheroid size and even to their disintegration at 55 °C. Similarly, another study described that hyperthermia performed on tissue-engineered human dermal

substitutes loaded with magnetic iron oxide nanochains provoked cell death and collagen melting [95]. The nanochains were either found in endo-lysosomes or in extracellular vesicles.

In order to demonstrate the added value of hyperthermia for doxorubicin (DOX) delivery, Ta *et al.* compared the therapeutic efficiency of either free DOX, DOX encapsulated in thermosensitive liposomes and DOX in thermosensitive liposomes modified by the already mentioned thermosensitive polymer PNIPAM [96]. Interestingly, the best results on adenocarcinoma were obtained for the thermosensitive system modified by the PNIPAM polymer and these were associated with a more important remodelling of ECM.

In an original work, Guttierez *et al.* compared two *in vitro* models of magnetic hyperthermia [97]. The first one contained iron oxide nanoparticles only inside phagocyte cells (macrophages or monocytes) whereas in the second one, nanoparticles were present both inside and outside these cells located in the collagen matrix. When nanoparticles were present both inside and outside the cells, an ECM disruption was observed which enabled a faster homogeneous distribution and a deeper penetration of the nanoparticles in the 3D culture. Furthermore, both models exhibited different cell death processes, necrosis being mostly observed when nanoparticles were located only inside the cells whereas apoptosis was predominant for the other model.

Notably, Gazeau *et al.* showed that upon illumination a transient stiffness increase was observed *in vivo* during photothermal therapy on epidermoid mouse carcinoma. Right after the treatment, a neat decrease of the stiff areas as well as a volume reduction of the tumours, either under mild hyperthermia or photoablation conditions were detected [86].

Recently, degrading ECM not only with heat-generating nanotherapeutics but also with enzymes that can cleave collagen has been proposed as a potent synergetic approach for ECM digestion. Pu proposed to encapsulate bromelain in photoresponsive particles [98]. Bromelain is a protease enzyme which becomes active around 45 °C, therefore, only upon heating. This has the enormous asset to avoid possible danger of destroying ECM in healthy tissues. Another similar study was presented by Städler in 2019, in which, microswimmers with adsorbed collagenase had the property to move

towards low calcium concentration areas [99]. That assembly enabled them to penetrate more deeply towards the center of tumour spheroids which is an important breakthrough considering the intrinsic difficulty to penetrate in the core of a solid tumour.

High-intensity focused ultrasounds (HIFU) is a novel therapeutic strategy based on acoustic energy for the thermal ablation of deep-seated tumours. While still under development, proof of concept studies demonstrated that this HIFU-based moderate HT allows higher temperature uniformity within the tumour [100]. In mice skeletal muscle, pulsed-HIFU were found to enhance the delivery of systemically administered fluorescently labelled nanospheres (100 nm or 200 nm). These observations correlated with transient (reversed within 72h) structural histologic alterations such as enlarged gaps between muscle fibre bundles and a disruption of the connective tissue [101]. Lee *et al.* demonstrated that using pulsed-HIFU in mice bearing human tumour xenografts rich in ECM resulted in an increased blood flow, an ECM remodelling with decreased collagen contents and a 2.5 times higher enhanced penetration of glycol chitosan nanoparticles than in untreated tumours [102]. According to the authors, the ECM disruption may be attributed to the acoustic cavitation and radiation forces generated during exposure to focused ultrasounds. This demonstrates the relevance of pulsed-HIFU to enhance tumour targeting of nanomedicines *via* ECM remodelling. This subject will be dealt with in more details in the sonoporation section.

2.3 Hyperthermia is Increasingly Used Jointly with Another Therapeutic Method in 2-step Protocols

Hyperthermia is a multi-action therapeutic modality whose positive effects are the vascular permeability increase, moderate blood flow augmentation, remodelling of ECM, partly through disruption of collagen fibrils network. However, the necessity of limiting the temperature below 43 °C to avoid severe irreversible damages as haemorrhage and stasis has impeded the development of hyperthermia as a standalone technique. Since the all-above-mentioned benefits prime the tumour

environment, novel approach in contemporary oncology practice is to combine HT with other tumour care as radiotherapy or chemotherapy (CT) for a subsequent and improved tumour eradication [88]. Examining the recent literature proves that this is the current path followed. The strategy aims to destabilise ECM in a first step followed by adequate treatment to promote cancer cell death. In such protocols, hyperthermia can either be used as the first or the second step. In a study reported by Pang *et al.*, the anti-cancer drug cyclopamine was administered to mice bearing pancreatic ductal adenocarcinoma for 3 weeks before injecting gold nanorods [103]. Cyclopamine led to ECM destructuration, improving the outcomes of the subsequent photothermal therapy.

In another outstanding research example, Li *et al.* described the development of two bioinspired lipoproteins systems (bLP) (Figure 4). The first one (D-bLP) bore a photoresponsive group enabling photothermal treatment remodelling ECM and modulating stromal cells. The second lipoprotein system was based on encapsulated mertansine (M-bLP), an anti-cancer drug. Upon consecutive treatment, a 27-fold increase of accessibility of mertansine to the cancer cells was observed. Interestingly, migration of cancer cells was strongly limited, as well as cancer stem cells, limiting therefore self-renewal capacity. Even more importantly, this protocol led to a 97.4% inhibition of lung metastasis [104].

From a general standpoint, hyperthermia has evolved in the years from a possible standalone technique to a powerful method when used jointly with another therapy. These approaches together with realistic clinic amendments aim at restricting temperature increase to reach a range tolerable for the patients without side effects. Even if we are still far from the 'bench-to-bedside' application, the multifaceted actions of HT, including increased vascular permeability, ECM remodelling and interaction with a wide range of anticancer drugs, is now recognised as a powerful tool with huge potential to improve cancer patients cure without significantly late or acute tissue morbidity.

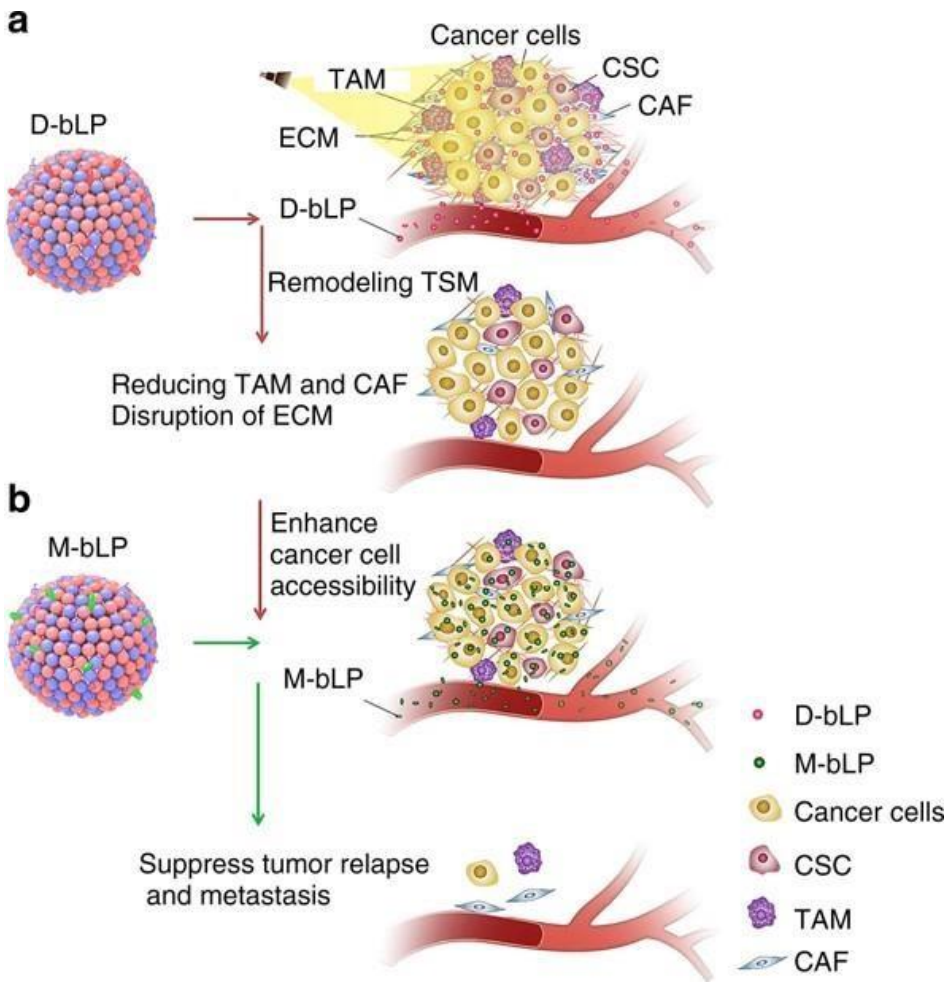


Figure 4: Schematic illustration of D-bLP-mediated photothermal remodelling of tumour stroma to enhance second M-bLP accessibility to cancer cells. A. D-bLP-mediated photothermal effects cause drastic elimination of stromal cells (e.g., CAF and TAM) and ECM components (e.g. collagen I, fibronectin). b D-bLP-mediated tumor stroma microenvironment remodelling enhances the accumulation and penetration of second M-bLP in tumours, promotes their extravasation from tumour vasculature and accessibility to cancer cells, thus resulting in efficient suppression of tumour relapse and metastasis. bLP bio-inspired lipoprotein; M mertansine; CSC cancer stem cells. From *[104]* under the Creative Commons Attribution License (CC BY 4.0).

3. Photodynamic therapy (PDT)

In this section we will focus on photodynamic therapy instead of light irradiation broadly speaking. Indeed, light irradiation with lasers and light-emitting diode (LED) sources are classically used in perspective of skin rejuvenation, aiming at reducing wrinkles by stimulating a deposition of substantial amounts of collagens, which defeats the goal of improving nanotherapeutics delivery in the frame of cancer therapy. Photodynamic therapy (PDT) is a nonthermal therapeutic modality based on nontoxic

photoactive photosensitiser molecules that spatiotemporally produce reactive molecular species such as reactive oxygen species (ROS) at the site of light irradiation [105]. The tumoricidal dose of ROS is only delivered after activation or 'turned on' when a certain kind of light irradiates the site of treatment and provoke tumour cell death by apoptosis or necrosis. To be effective, PDT requires three essential components, the photosensitiser, the corresponding light source and oxygen. PDT is now commonly used in the clinic stage for dermatological, ophthalmologic and oncologic applications. PDT using short time interval between photosensitiser injection and light irradiation, called short *drug-to-light interval*, mainly destroys tumour vasculature by confining photosensitiser localisation within blood vessels, whereas long interval between photosensitiser injection and light irradiation can induce more damages to tumour cells, because the photosensitiser has then been distributed into the extravascular compartment. Since its efficiency is strongly related to areas light can reach, PDT is particularly adapted to superficial cancer, located right under the skin or in the linings of organs that can be reached with light. Despite this Achilles' heel, this outpatient procedure can be applied as a pretreatment in combination with other anti-cancer therapies to increase outcomes for patients. PDT is becoming increasingly successful as it is minimally or not invasive, fast and with light side effects, with the possibility of focusing the light beam on the area to be treated with a superior level of precision. Thus, next sections will describe how PDT can affect vascular compartment and ECM remodelling, in the perspective to move drug delivery at the tumour site up a notch.

3.1. PDT-Mediated Vascular Permeabilisation Enhances Drug Delivery

Beyond its tumoricidal activity, this light-activated therapy leads to significant vascular damages since the endothelial cells lining blood vessels are in the front line against the photosensitisers, most commonly injected intravenously.

PDT-induced damages to the endothelium trigger a cascade of physiological events including platelet aggregation, the release of vasoactive molecules, localised inflammation, adhesion of

leukocytes, increased vascular permeability (which has significant potential to increase the diffusion of drug molecules to the tumour) and constriction of vessels [106]. The mechanisms leading to endothelial damages are photosensitiser-dependent [107]. Using *in vivo* photofrin-based PDT on rat cremaster muscle, Fingar *et al.* demonstrated a dose-related constriction of arterioles, observed within the first minutes of 630 nm illumination, associated with an increase in venule permeability to albumin occurring shortly after the start of light treatment and was progressive with time [108]. Fluid leakage from vessels is also observed after PDT as demonstrated by oedema formation and the increase in tumour interstitial pressure [109].

In vitro transmission electron microscopy experiments in light-irradiated bovine endothelial cells treated with 25 mmol.L^{-1} haematoporphyrin revealed endosomal and lysosomal membrane disruption, endoplasmic reticulum swelling and nuclear membrane swelling associated with chromatin degradation [110]. Leunig *et al.* demonstrated that as early as 15 minutes after being subjected *in vitro* to PDT with photofrin, HUVECs showed a 140% increase in volume [111]. One hour after PDT, blebs appeared on their surface, accompanied by a 20% decrease in the number of viable cells. Sporn *et al.* demonstrated on HUVECs that photofrin (1 µg/mL) induced a light dose-dependent depolymerisation of the microtubules as early as 15 minutes after light irradiation while the actin microfilaments were not affected [112]. It is conceivable that the increase in vascular permeability observed *in vivo* after PDT correlates with cytoskeletal remodelling and endothelial cell swelling.

As PDT targets the tumour vasculature, inducing among other effects vascular permeabilization, it has been proposed to use PDT to enhance delivery of nanoscale therapeutics. For instance, PDT based on chlorin-based 2-[1-hexyloxyethyl-]-2-devinyl pyropheophorbide-a (HPPH) was used as a method to improve the delivery and efficacy of oncolytic vaccinia virus to primary and metastatic tumours in mice [113]. PDT-induced vascular disruption resulted in an over 10-fold increase intra-tumoral viral titres compared with the untreated tumours. However, depending on the light dose, PDT was more or less effective, underlining the need of optimisation when using PDT to increase intra-

tumoral accumulation of therapeutics. A study by Snyder *et al.* confirmed the ability of PDT to permeabilize vessels in order to facilitate the delivery of macromolecular agents as observed with fluorescent microspheres with diameters ranging from 0.1 to 2 µm and liposomal formulation of doxorubicin (Doxil) (0.1 µm) [114]. Using a murine colon cancer model, they showed that low fluence rate PDT prior to Doxil administration significantly increased DOX content in tumours, as well as ensured up to 80% long-term tumour control without concomitant enhancement of systemic or local toxicity. In their study they also underlined the importance of time interval between PDT treatment and Doxil administration. Thus, the maximum Doxil uptakes were found when the injection occurs immediately after the application of the PDT. Tumour vessel modulation by low-dose photodynamic therapy was shown to enhance the extravasation of macromolecular compounds such as liposomal doxorubicin (Liporubicin) into tumours [115]. It was also demonstrated on a lung sarcoma metastasis model that low-dose photodynamic therapy significantly decreased tumour interstitial fluid pressure without affecting tumour blood flow, thus promoting liposomal doxorubicin (Liporubicin) distribution into tumour (Figure 5) [116].

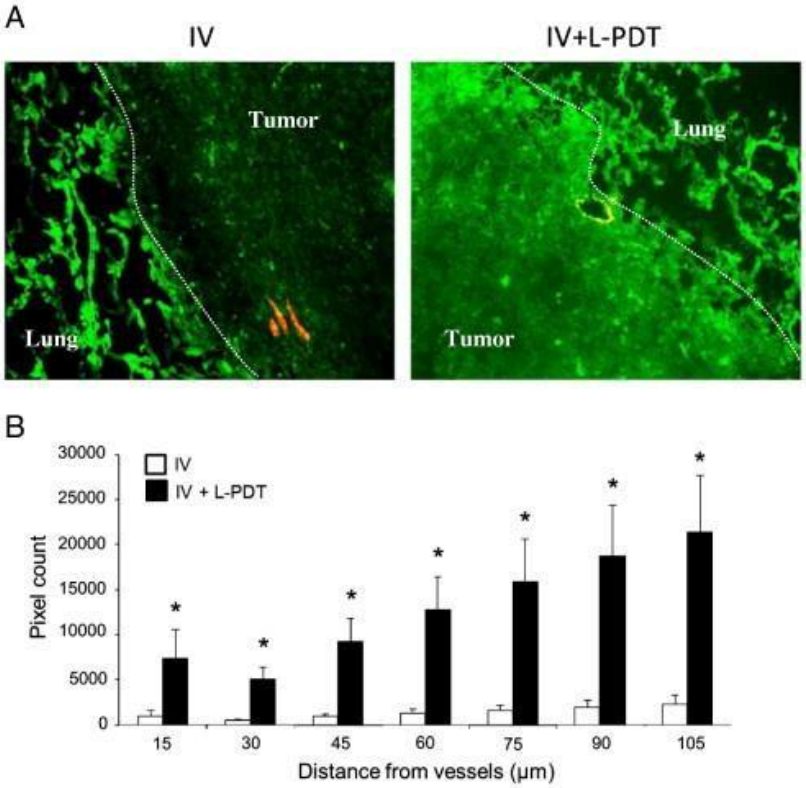


Figure 5: (A) Liporubicin fluorescence reconstruction images in tumors after intravenous (IV) administration of 400 µg of Liporubicin with and without low dose photodynamic therapy (L-PDT) pretreatment (original magnification, × 40). The green pseudocolor represents Liporubicin signaling, and the red pseudocolor represents tumor blood vessels. L-PDT pretreatment enhanced the distribution of Liporubicin in the tumor interstitium but not in lung tissues. (B) Liporubicin signaling quantification in the tumor at increasing distances (µm) from the tumor vessels with and without L-PDT pretreatment is shown. From *[116],* Copyright (2020), with permission from Elsevier.

Similarly, photoimmunotherapy induced *in vivo* a large increase in tumour vascular permeability, allowing a 5-fold increase in the accumulation of a liposomal daunorubicin (DaunoXome) and resulted in more effective therapy than either photoimmunotherapy or liposomal daunorubicin alone [117].

In conclusion, PDT is commonly used in clinics for its direct and well-known cytotoxic effects on tumour cells but it is also evolving as a new modality to improve the extravasation of nanomedicine through the permeabilized vascular compartment. As with radiotherapy, excessive PDT-induced damages to the vessels risk to shut down blood flow, negatively affecting drug delivery. Even if optimisations in terms of concentrations and delay between PDT treatment and nanoparticles administration have to be carried out, the PDT-mediated vascular permeabilization has clearly been demonstrated to enhance the accumulation of nanomedicine into tumours for enhanced efficacy. These evidences pave the way for an emerging combined therapeutic approach named nanoparticle-mediated chemophototherapy [118].

3.2. PDT Induces Extracellular Matrix Remodelling

The dense and abnormal stiffness of the tumour ECM are responsible for blood vessels squeezing, reducing oxygen supply and drug delivery to solid tumours and oxygen diffusion hindering further limiting the therapeutic efficacy of PDT. Nevertheless, dermatological studies indicated improved wound healing and scar remodelling when repetitively treating skin wounds and scars using low dose PDT. Lv *et al.* analysed the effect of multi-session (once a week for a total of 12 times) of topical 5-aminolevulinic acid (ALA)-based PDT on modulation of collagen components and structure in a hairless mouse model by second-harmonic generation [119]. Their results indicated that 12 sessions of PDT led

to skin rejuvenation by improving dermal collagen density and its arrangement in skin. Mills *et al.* reported on 27 healthy donors that methyl aminolaevulinate-based PDT following excisional wounding (three treatments over 5 days) resulted in increased MMP1, MMP9, and TGF-β 3 production after 3 weeks, as well as a greater, more ordered deposition of collagen I, collagen III and elastin 9 months after wounding [120]. In the same line, it was demonstrated *in vitro* on human keratinocytes HaCaT cells that chlorin e6-based PDT promoted collagen production and suppresses MMP-1,-2,-9 expression [121].

Since hypericin exhibits a stronger affinity to collagen than chlorin e6 [122], it was proposed as a more effective photosensitiser in collagen-rich tissues, such as skin or tumours. Using fluorescence spectroscopy and multiphoton microscopy, Hovhannisyan *et al.* demonstrated *in vitro* in collagen gels [123] and in native tissues such as chicken tendons and skin [124] that hypericin – based PDT induced photosensitised irreversible destruction of collagen-based tissues.

Ferrario *et al.* demonstrated on extracts from photofrin-based PDT-treated tumours a strong expression of MMPs and extracellular MMP inducer (EMMPRIN) along with a concomitant decrease in expression of tissue inhibitor of metalloproteinase-1 (TIMP-1), suggesting that MMP-9 released by endothelial and inflammatory cells plays an active role in regulating the tumour microenvironment [125]. The sublethal doses of ALA and 580–740 nm light irradiation on human dermal fibroblasts was shown to *in vitro* induce matrix metalloproteinase 1 and matrix metalloproteinase 3 expression in a singlet oxygen-dependent way while reducing collagen type I mRNA expression [126]. *In vitro* treatment of primary human vocal fold fibroblasts with sublethal (200µM) ALA-based PDT was shown to significantly alter the expression of genes related to ECM remodelling [127]. Thus, the expressions of TGF-b1, COL1A2, COL3A1, fibronectin and elastin were reduced, while the expression of MMP1 was increased. The migratory capacities of fibroblasts were reduced, as well as the percentage of contractile αSMA-positive myofibroblasts in the population. Interestingly, a meta-analysis on early oral and laryngeal cancers clinically treated with photodynamic therapy confirmed that PDT results in no glottic

scarring as compared to conventional lasers or surgical excision or vocal cord stripping [128], indicating that ECM remodelling correctly occurred after PDT.

In conclusion, the ability of PDT to efficiently remodel ECM through direct photosensitisation of collagens by the photosensitiser or the modulation of both collagens production by cells and MMPs activity may confer benefits to the drug delivery to the tumour. However, the proper therapeutic window (in terms of photosensitiser dose and timing of administration) must be identified since sublethal doses seem likely to be used. Furthermore, the necessary presence of a photosensitiser in this strategy is not without risk for the patient, particularly in terms of side effects such as skin sensitivity to bright light and sunlight, redness or even blisters formation. Besides this collateral effects, combination of PDT with other therapies offers many benefits compared to PDT monotherapy itself to eradicate tumour cells. Enhancement of drug delivery of the targeted site can also bring further enhancement of the PDT itself since physiological barriers arising from a tumour microenvironment can be raised during combined treatment to supply enough oxygen and photosensitiser on the right place to produce high enough dose of tumoricidal ROS. Recently, Ihsanullah et al. combined chemotherapy with PDT to design acidic activatable and externally induced hypoxia carriers to effectively eradicate tumour cells [129].

4. Emerging physical techniques in cancer research promoting drug delivery

4.1. Sonoporation

Contrary to high-intensity focused ultrasound (HIFU) therapy that uses focused ultrasound waves to thermally ablate a portion of tissue as described in the hyperthermia section, sonoporation induces the transient and reversible cell membrane permeabilization produced by local ultrasound exposure associated or not with microbubbles [130]. This phenomenon is used to facilitate the transport of drugs, nucleic acids and proteins into the cytoplasm [131]. Microbubbles, popular as ultrasound contrast agents, may also be employed as therapeutic carriers for localised, targeted drug or gene

delivery by sonoporation [132,133]. These microbubbles are gas-filled structures stabilised or not by a shell composed of lipids, proteins or polymers. While for imaging applications low intensity of ultrasound is required in order to preserve microbubbles integrity, when applied for drug delivery purposes the ultrasounds are used to locally disrupt microbubbles according to the cavitation process, thus releasing their content when triggered [121]. Several studies have reported vascular and extracellular matrix modulation after sonoporation applications.

Cavitation of microbubbles following exposure to ultrasounds was shown to alter vascular integrity, allowing the release of circulating molecules. This observation underpinned the extension of sonoporation to be applicable as an anti-cancer treatment. The mechanism is not precisely known but it is hypothesised that the oscillations of cavitating microbubbles generate mechanical forces on the vessel wall and a concomitant permeability and molecule transport improvements [135]. When applied *in vivo*, microbubbles exposed to low-frequency ultrasound have been shown to cause rupture of microvessels accompanied with extravasation of red blood cells [136]. Stable cavitation temporarily increases the gap-junction distance between vascular endothelial cells, cause vessel distention and invagination [137], as well as separation of the endothelium from the vessel wall [138]. All these events lead to loss of vascular integrity and increase the permeability to circulating drugs or nanotherapeutics.

In vitro studies have reported an increased endothelial cells permeability following exposure to ultrasounds and microbubbles. This was demonstrated using propidium iodide [139], DiI [140], plasmid DNA [141], fluorescently labelled siRNA [142] and FITC-dextrans with different molecular weight [143]. This latter study reports that endothelial endocytosis, for large molecules, as well as pores formations, for low molecular weight dextrans, were implied in the uptake mechanism. The increased intracellular H_2O_2 level quantified in primary endothelial cells after exposure to ultrasounds associated with microbubbles was shown to be involved in the transient increased membrane permeability to ions such as Ca^{2+} [144].

In vivo, it was demonstrated in hepatomas models that Evans blue injection followed by ultrasound-targeted microbubble destruction resulted in about fivefold higher Evans blue amount in the target tumours compared with the control ones, underlining an increased capillary permeability [145]. A 13-fold augmentation of endothelial uptake of vascular endothelial growth factor (VEGF) in the myocardium was demonstrated with ultrasounds associated with microbubbles, while ultrasounds alone led to an 8-fold increase, indicating an advantage in associating ultrasound and microbubbles for drug delivery [146].

Several animals' studies using ultrasound and microbubbles to deliver drugs for cancer therapy have demonstrated excellent results. A study using rat liver cancer model examined the biodistribution and tumour delivery of doxorubicin-loaded microbubbles sensitive to ultrasounds and found a significantly higher doxorubicin concentration in the tumours (7-fold) in doxorubicin-loaded microbubbles compared to the administration of free doxorubicin [147]. In a mice breast cancer model, paclitaxel-loaded liposome microbubbles were used to increase drug accumulation in tumours. The drug concentration was up to 4.31-fold higher in tumours compared to the groups without liposomes – microbubble or ultrasounds [148]. Many other types of cancer have been successfully treated *in vivo* with ultrasound exposure combine to drug-loaded microbubbles [149].

With respect to the topic at hand, which is the delivery of nanotherapeutics favoured with physical approaches, it has to be noted that drug-loaded nanoparticles attached to microbubbles or simultaneously injected have been explored in sonoporation-mediated drug delivery in cancer. Thus, biodegradable poly (lactic-co-glycolic acid) (PLGA) nanoparticles containing miRNAs administered together with microbubbles in mice bearing human hepatocellular carcinoma xenografts showed a significant therapeutic effect after single treatment since sonoporation significantly increased miRNA delivery by 5–9 fold compared to control conditions [150]. Indeed, sonoporation caused leakage of miRNA-loaded PLGA nanoparticles into the extravascular compartment. Once they crossed the blood

vessel, PLGA nanoparticles were then endocytosed by tumour cells to release their loading over 15 days [151].

Recently Han *et al.* proposed to design a nanocomplex responsive to ultrasounds composed of siRNA nanoparticles and paclitaxel-loaded microbubbles [152]. With this two-in-one nanocomplex, focused ultrasound-enabled microbubbles to induce vascular permeability *via* sonoporation effect, enhancing penetration/accumulation of nanotherapeutics at tumour sites, but also loosening the dense ECM structure. Indeed, the strong acoustic energy subsequently delivered on-site by focused ultrasounds led to protein breakdown [102].

In conclusion, sonoporation which consists in acoustical driven gas microbubbles is a non-invasive and cost-effective strategy that permits a controlled and localised release of nanomedicine to the treated areas, a higher drug accumulation in the tumour while it minimises systemic doses and toxicity. However, it is advisable to remain careful since little is known about consecutive hyperthermia and cellular/tissue response in aftermath of sonoporation.

4.2. Electroporation

In a medical point of view, external electric fields present numerous applications and notably in cancer treatment [153]. They can be applied as a standalone therapy to ablate tumours in areas where surgical resection is impossible, to promote cell fusion, or to increase the intracellular penetration of therapeutic molecules such as plasmid DNA of cytotoxic drugs by creating defects in cell membranes. When associated with electro-responsive drug delivery systems, they can also trigger a controlled drug release. In this section, a focus will be made on electric field application leading to electropermeabilization of cells, also named electroporation. Depending on the electric parameters applied, cells can undergo irreversible electroporation (IRE) which is a non-thermal local ablative method for tumours particularly for those close to large blood vessels, or reversible electroporation, widely used for drugs and nucleic acids delivery [154]. In the case of reversible electroporation, plasma

membrane regains its integrity few minutes after the end of the electric pulse's application but during the permeabilised state, therapeutic molecules can massively enter within the cells. Electrochemotherapy (ECT) is an emergent anti-tumour strategy which consists in associating cytotoxic drug injection with the application of calibrated electric field pulses delivered locally at the tumour site [155]. ECT, which potentiates the cytotoxic effect of drugs by application of external electric field, is currently used in more than 150 clinics throughout Europe.

It has been shown *in vivo* in normal tissue and tumours that the electrical component of electroporation drastically and transiently reduced the blood flow of treated tissue, this phenomenon is called 'vascular lock' [156–159]. These experimental observations are supported by clinical studies demonstrating the rapid cessation of haemorrhagic melanoma nodule bleeding immediately after electroporation [160]. The first study, using albumin-(Gd-DTPA) contrast-enhanced MRI, has demonstrated 30 min after application of electric pulses that tumour blood volume was reduced from 20±8% in control condition (non-exposed to electric field) to 0±3% in electroporated ones [157]. This disturbance of the blood flow in the vessels irrigating the tumour is instantaneous after the application of the electric field but reversible. Indeed, blood perfusion restarts about 15 minutes later and its recovery takes place within 48 hours [159]. Besides, mathematical model has demonstrated that endothelial cells lining tumour blood vessels were exposed to the electric field, increasing their permeability. Changes in the shape of endothelial cells were observed 1 hour after the application of electric pulses. The endothelial cells were rounded and swollen, and lumens of blood vessels were narrowed. In addition, within an hour of electroporation, red blood cells accumulated in the treated area and vascular changes contributed to increased infiltration of immune cells [161]. Remodelling of cell junctions (CD31 or PECAM) following electroporation has been confirmed *in vivo* and associated with permeability of blood vessels to dextran 70 kDa [162]. Indeed, this disturbance of the blood flow induced by electroporation is associated with an increase in tumour vascular permeability *in vivo* [163–165]. In addition, *in vitro* electroporation of endothelial cells (HUVECs) monolayer has shown the induction of cytoskeleton disturbances (actin filaments and microtubules) as well as an immediate loss

of intercellular junctions such as VE-Cadherin, increasing the permeability of a model of endothelium [166]. The effects observed with electroporation alone are less dramatic than in the presence of an anticancer agent in electrochemotherapy [167].

All these preclinical and clinical data indicate that electric field applied in electrochemotherapy significantly affects vascular permeability, which suggests that this physical approach could be beneficial to improve nanotherapeutic delivery. To confirm the benefit of electroporation in nanotherapeutics delivery, we can cite a recent article that states that electroporation increased the transport of sorafenib nanoparticles stabilised by a dye (SFB-IR783) through the vascular system, extracellular space and cell membrane [168]. According to the authors, *in vitro* electroporation increased the permeability of endothelial cell monolayers to these nanoparticles and improved their diffusion through the extracellular space of spheroids. In an HCT-116 *in vivo* tumour model, increased penetration of nanoparticles into the tumour was linked to the electropermeabilisation of tumour cells but was mediated mainly by changes in vascular permeability and extracellular diffusion. The increased accumulation of nanotherapeutics within the tumor after electroporation resulted in a more efficient antitumor effect than the nanotherapeutics or electroporation alone (Figure 6).

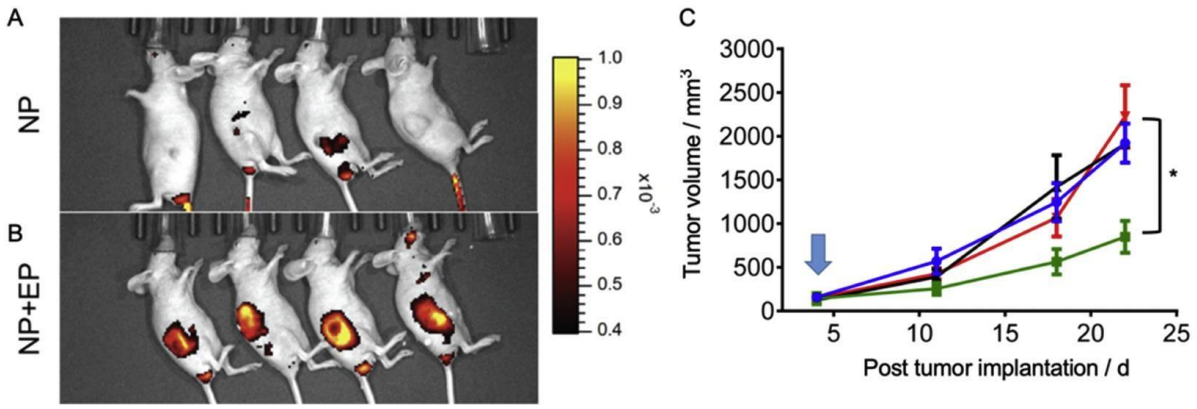


Figure 6: Anti-tumor effect of combined therapy with electroporation (EP) and SFB-IR783. Treatment with EP increased the uptake of SFB-IR783 (B) when compared with mice given the nanoparticle without EP (A). The combined treatment with EP and SFB-IR783 retarded tumor volume in comparison with treatment with EP alone, treatment with SFB-IR783 alone, or control (C). ■ EP + NP, ▲ Control, ▼ EP, ● NP. Adapted from *[168]*, Copyright (2020), with permission from Elsevier.

Interestingly, clinicians and patients reported a scar-free functional healing of the sites treated by electrochemotherapy [169,170], suggesting that electric components of electroporation are involved in the matrix remodelling. However, no study has yet elucidated the effects of reversible electroporation on extracellular matrix components and remodelling enzymes. The only evidence available comes from experiments with irreversible electroporation, reporting the complete recovery of extracellular matrix architecture after treatment [171,172]. However, the extracellular matrix analyses were usually carried out several weeks or months after the end of the treatment, so, early effects of electric fields on ECM are still lacking.

In conclusion, electroporation presents an important potential to increase nanotherapeutics diffusion towards the tumour by simultaneously inducing cells permeabilization (including endothelial, stromal and tumour cells), vascular permeability and probably matrix remodelling.

4.3. Cold Atmospheric Plasma

Plasma, known as the fourth state of matter, can be generated by coupling energy to a gas chamber to induce gas ionisation and generate ionised nonthermal gas mixture composed of various ROS, reactive nitrogen species (RNS) and UV photons. Cold atmospheric plasma (CAP) raises an interest in medicine [173], especially in cancer therapy due to the cytotoxic effects arising from the high ROS levels. As plasma medicine is an emerging field, little is known about the effects of plasma on tumour microenvironment. A recent review discusses the effects of cold atmospheric plasma on cells and ECM in tumour context environment [174].

Although several studies show the interest of cold plasma in promoting angiogenesis, particularly in the context of wound healing [175,176], as far as we know there is no study on vascular effects of plasma exposure, particularly in terms of vascular permeability or blood flow modulation.

It is known that ROS induce ECM remodelling by different mechanisms as an increased expression of MMP-2,-7,-9 and degradation of glycosaminoglycans by hyaluronidase and heparinase [177]. Because cold plasma generates a wide variety of ROS and RNS, it is of prime important to study ECM remodelling after exposure to plasma. Using circular dichroism on bovine type I collagen exposed to cold helium-plasma, Keyvani *et al.* revealed alterations in the helical structure of dissolved collagen over time, such as oxidation of many structural residues and denaturation although the secondary structure was not damaged [178]. Thus, they demonstrated that the structure of collagen treated with cold atmospheric plasma undergoes oxidation and denaturation. Circular dichroism spectra indicated that 68% of bovine type I collagen helix structures were denatured after a 30 s nonthermal argon plasma treatment, which revealed to be very effective in loosening collagen structures [179]. On the contrary, another study analysing the physical structure of the bovine type I collagen by differential scanning calorimetry (DSC) and Fourier transform infrared spectroscopy to check the integrity of the triple helical domain revealed that corona ambient air plasma jet stabilised the collagen structure without altering the triple helical structure [180]. As for many therapeutic strategies, cold atmospheric plasma effects revealed to be dose-dependent [181,182]. For example, Shi *et al.* suggested that low doses of plasma enhance fibroblasts viability and collagen synthesis while high doses can inhibit them [183]. It seems therefore that plasma has dual effects. Thus, it makes it possible to tune cell fate through modulating the plasma dose for both research and therapeutic purposes but it also appears critical to first tune the parameters according to the desired therapeutic outcome before the application in order to prevent deleterious side effects.

Some rare authors proposed to apply plasma in order to enhance drug delivery. Thus, Vijayarangan *et al.* demonstrated *in vitro* on HeLa cells that exposure to a helium plasma jet induced a plasma membrane permeabilization which appeared to be dependent on endocytosis [184]. Using propidium iodide and fluorescent dextrans as permeabilization probes, they proved that plasma was efficient in improving drug delivery at cell scale. Plasma gene transfection also appeared to be efficient as demonstrated by Jinno's work [185]. Zhu *et al.* demonstrated that 5-FU loaded poly (lactic-co-

glycolic acid) nanoparticles together with cold atmospheric plasma presented a synergistic inhibition of metastatic breast cancer cells (MDA-MB-231) growth when compared to each treatment separately [186]. More interestingly, in this study plasma was found to facilitate drug-loaded nanoparticles uptake by tumour cells, as well as down-regulation of MMP-2 and-9 gene expression. Kim *et al.* showed *in vitro* that plasma associated with antibody-conjugated gold nanoparticles led to a near five-fold increase in G361 melanoma cell death when compared to plasma alone [187]. It appears from all these studies that a combined effect between plasma components and reactive species generated is necessary to ensure plasma drug delivery.

Finally, it is curious and interesting to note that cold atmospheric plasma has been employed together with nanotherapeutics (protoporphyrin IX-loaded polymersomes) as an alternative light source in order to kill melanoma cells by photodynamic therapy [188].

Perspectives

In this review, we have gathered evidence showing that physical approaches, namely radiotherapy, hyperthermia, photodynamic therapy, sonoporation, electroporation and exposure to cold atmospheric plasma, can efficiently remodel tumour microenvironment through modulation of vascular permeability and remodelling of the extracellular matrix, thus enabling an improved delivery of nanotherapeutics to the tumour (Figure 7), (Table 2).

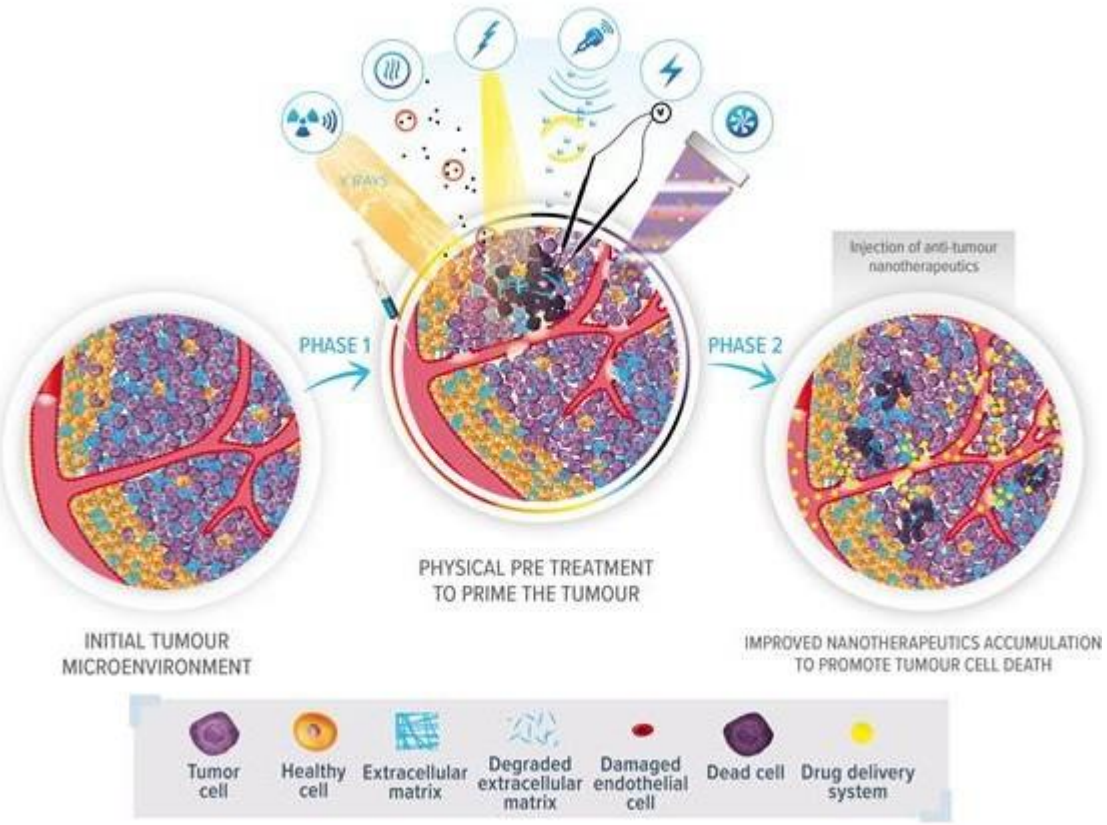


Figure 7: Schematic view of the effects on vasculature and extracellular matrix degradation by different physical approaches in perspective of multimodal anticancer therapy. Priming the tumor thanks to physical approaches offers a therapeutic window to improve nanotherapeutics antitumor efficiency.

Table 2. Summary of the effects (described in the text) of the different physical approaches on vascular and matrix remodeling for improved delivery of nanotherapeutics. Reviews are not included in this table, only original articles. ECM: extracellular matrix. MB: microbubbles.

	Vascular remodelling	*Extracellular Matrix remodelling*	*Nanotherapeutics delivery*
Radiotherapy	Endothelial damages and vascular permeability increase [32,33,35,41] (*in vivo*) Decreased interstitial fluid pressure [39–41,67] (*in vivo*/ clinics)	MMPs mRNA: upregulation of MMP-2,-3,-9,14 [54] (*in vivo*), MMP-9 [47] (clinics), MMP-1,-2,-9 [55](clinics) MMPs activity: increased production of MMP-2 [46,49,50] (*in vitro*), [47,48] (clinics), PAI-I [56] (clinics) Increased LOX secretion [60] (*in vitro*/ *in vivo*)	Increased delivery/cell uptake of iron oxide nanoparticles [41], Dox/or gemcitabine -HPMA nanoparticles [65], liposomal doxorubicin (Caelyx) [66], liposomal doxorubicin (Doxil) [67] (*in vivo*)
Hyperthermia	Modulation of blood flow rate: Increase [80], no increase [83], impairment [76,84] (*in vivo*) Deformation of blood vessels leading to coagulation [85] and haemorrhage [83,86,87] (*in vivo*) Increased vascular permeability to different molecules or nanotherapeutics [77–81] (*in vivo*)	Decrease of ECM stiffness [86] (*in vivo*) Denaturation/melting of collagens [96,101,104] (*in vivo*), [93–95,97] (*in vitro*)	Increased delivery/cell uptake of doxorubicin loaded in thermosensitive liposomes [83], elastin-like peptides [89], iron oxide nanocubes [90], nanospheres [101], DOX-loaded in thermoresponsive PNIPAM liposomes [96] or mertansine-lipoproteins [104] (*in vivo*), iron oxide nanoparticles [97] (*in vitro*)
Photodynamic therapy	Endothelial damages and vascular permeability increase [108] (*in vivo*) Increase of tumor interstitial fluid pressure [109] (*in vivo*) Decreased tumour interstitial fluid pressure [116] (*in vivo*) Endothelial cell alterations [110–112] (*in vitro*)	MMPs mRNA: upregulation of MMP-1,-3 [126] (*in vitro*), MMP-1 [128] (*in vitro*) MMPs proteins: Increased expression of MMP-1, MMP-9, and TGF-β 3 production [120] (clinics), MMPs and EMMPRIN [125] (*in vivo*), MMP-1,-3 [126] (*in vitro*). Decreased expression of MMP-1,-2,-9 [121] (*in vitro*) and TIMP-1 [125] (*in vivo*) Hypericin photosensitizer presents affinity to collagen [122] (*in vitro*) ECM mRNA: downregulation of type I collagen [126], TGF-b1, COL1A2, COL3A1 [128] (*in vitro*) ECM proteins: Increased production of collagen I, collagen III and elastin [120] (clinics), [119] (*in vivo*), [121] (*in vitro*). Degradation of collagens [123] (*in vitro*) and [124] (ex vivo)	Improved delivery and efficacy of oncolytic vaccinia after HPPH-PDT [113] (*in vivo*) Increased tumor uptake of liposomal doxorubicin (Doxil) [114], liposomal doxorubicin (Liporubicin) [115,116] or liposomal daunorubicin (DaunoXome) [117] and antitumor activity (*in vivo*)

Sonoporation	Loss of vascular integrity and increased permeability [136–138,145] (*in vivo*) Increased endothelial cells permeability to propidium iodide [139], DiI [140], plasmid DNA [141], fluorescently labelled siRNA [142] and FITC-dextrans [143] (*in vitro*) Increased intracellular H_2O_2 level in endothelial cells [144] (*in vitro*)	Loosening of dense ECM structure [102] (*in vivo*)	Increased tumor uptake of glycol chitosan nanoparticles [102], doxorubicin-loaded MB [147], paclitaxel-loaded liposome MB [148] and others drug-loaded MB [149] (*in vivo*) Improved therapeutic effect when associated with miRNA-loaded PLGA nanoparticles [150] through sustained intratumoral release [151] (*in vivo*)
Electroporation	Drastically and transient reduction in the blood flow of treated tissue 'vascular lock' and vascular permeability [156–160] (*in vivo*/ clinics) Endothelial cell alterations [161–165] (*in vivo*) and [166,167] (*in vitro*)	Recovery of extracellular matrix architecture after irreversible electroporation treatment [171,172] (*in vivo*)	Increased transport and accumulation of sorafenib nanoparticles stabilised by a dye (SFB-IR783) [168] (*in vitro*/*in vivo*)
Cold atmospheric plasma	Promotes angiogenesis [175,176] (*in vitro*/*in vivo*)	Alteration of type I collagen [178] [179] (*in vitro*) Stabilisation of type I collagen structure [180] (*in vitro*) Affect collagen synthesis by fibroblasts depending on doses [183] (*in vitro*) Down-regulation of MMP-2 and-9 gene expression in breast cancer cells [186] (*in vitro*)	Plasma membrane permeabilization to propidium iodide and fluorescent dextrans [184] (*in vitro*) Efficient plasma gene transfection [185] (*in vitro*) Increase uptake of 5-FU loaded poly (lactic-co-glycolic acid) nanoparticles [186] or antibody-conjugated gold nanoparticles [187] (*in vitro*)

However, some points were not addressed and have to be mentioned. For instance, an innovative approach based on nanomedicine aims to directly target the tumour microenvironment rather than cancer cells, e.g. the extracellular matrix itself [189] (Figure 8), cancer-associated cells such as cancer-associated fibroblasts (CAF) [190] or the physiological microenvironment (hypoxia, acidic environment…) [91]. The main advantage of this approach is that it has the potential to eliminate all types of cells from the tumour microenvironment (cancer cells, cancer-associated fibroblasts and macrophages, etc.). The review published by Raavé *et al.* provides an interesting overview of drug delivery strategies targeting the tumour extracellular matrix [189]. The current challenge is to trigger the release of the drug once the nanovector is bound to the tumour extracellular matrix. This involves the design of smart vectors sensitive to, for example, certain types of enzymes, pH, heat, light or ultrasound.

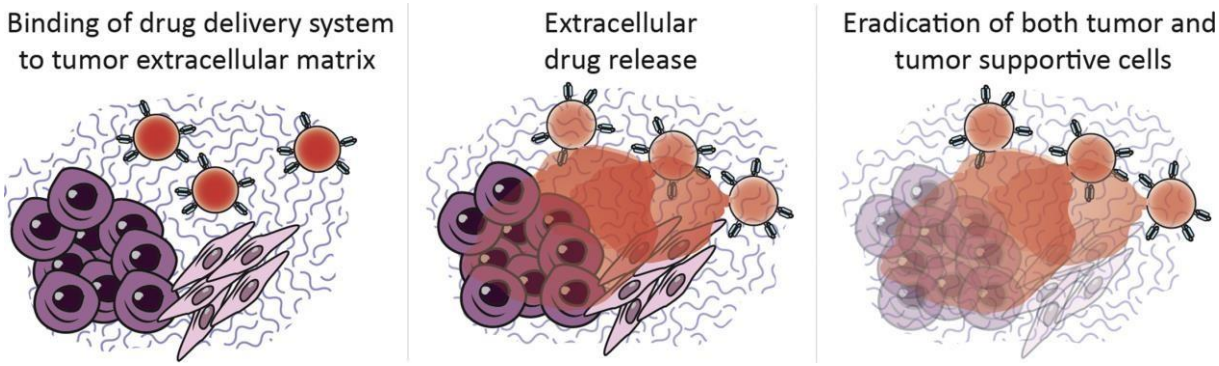


Figure 8: Overview of tumour extracellular matrix targeting by drug delivery systems. Nanotherapeutics target a specific molecule abundantly present in the tumour extracellular matrix. Once bound, the drug is released and diffuses into neighbouring cells (tumour cells, cancer-associated fibroblasts, cancer-associated macrophages, etc.). From *[189,191]* under the Creative Commons Attribution License (CC BY 4.0).

Targeting cancer-associated fibroblasts (CAF) in order to decrease collagen content within the tumour microenvironment is another strategy to explore, as in this war against cancer, the enhancement of nanomedicine delivery at the tumour site is the goal to be achieved. Thus, Li *et al.* encapsulated ZnF16Pc, a photosensitiser, into ferritin nanocages decorated on their surface with a single chain viable fragment (scFv) sequence (scFv-Z@FRT) specific to fibroblast activation protein (FAP), upregulated in CAF [192]. Significantly reduced levels of collagens were observed together with tumour accumulation of serum albumin, 10 nm and 50 nm quantum dots, increased respectively by 2-

, 3.5-, and 18-fold after scFv-Z@FRT mediated PDT. These results suggest that targeting CAF is an efficient and safe method to enhance the delivery of nanoparticles to tumours by breaking down the ECM barrier with minimal side effects.

The potential of these physical strategies to activate the immune system to fight against the tumour is out of the scope of this review but deserves to be mentioned because increasing evidence shows their interest in this field.

Besides, it should be noted that the physicochemical properties of free or formulated drugs (molecular weight, form, charge and aqueous solubility) determine their capacity/rate of diffusion through the tissue [20]. Therefore, water-soluble drugs are more easily distributed within the extracellular matrix, in particular thanks to highly hydrated glycosaminoglycans while hydrophobic drugs penetrate lipid membranes and can therefore be transported through cells. Thus, an optimised formulation can increase drug penetration within tumour tissue and aid the development of more effective anticancer drugs by improving their therapeutic index. For instance, doxorubicin encapsulated in liposomes effectively alter the pharmacokinetics of the free drug and take advantage of the permeability of tumour blood vessels to liposomal particles [193]. Dreher *et al.* have shown that using dextran covalently linked to a fluorophore as a model macromolecular drug carrier led to a shallower penetration into the tumour interstitium with increasing molecular weight [194]. Even if nano-sized drug delivery systems generally have low molecular weight, many of them show significant binding to plasma proteins, which leads them to behave, functionally, like macromolecules [195]. This protein corona forming on most nanoparticles confers to them a new biological identity [196] that affects their interactions with the biological environment and determines biological events such as immune response, biodistribution, cellular uptake… Thus, the protein corona has to be taken into consideration when designing drug delivery anti-tumour strategies.

Finally, in a promising way, these physical approaches (focused ultrasound, magnetic heating of nanoparticles, radiation therapy, electric fields, laser therapy) were shown to be efficient to disrupt

blood – brain barrier (BBB) and improve nanoparticle delivery at cerebral site [197]. For example, transient (for hours) BBB disruption has been accomplished using focused ultrasound exposure combined with microbubbles, allowing extravasation of therapeutic agents such as liposomal doxorubicin while causing little or no damage to brain tissue [198]. High-frequency electroporation was demonstrated to be efficient in disrupting BBB for less than 96h, with minimal muscle contractions and minimal cell death attributed to the electric field [199]. However, clinical devices and methods need to be developed further and the bench-to-bedside translation demonstrated.

Expert Opinion

The advances in physical treatments of tumour microenvironment we have described here above have underpinned the extension of local and specific treatments towards cancer cells. Full exploitation of these advancements allows to maximize chance of selectively kill tumour cells, while minimising effects on normal tissue in and around the targeted area. Their concomitant use with chemotherapeutic agents increases therapy performances while reducing severe side effects of these therapeutics. The possible use of an external technique to control in space and time the treatment is a great response to practitioners and patients. The ultimate goal to reach in cancer treatment would be one therapy relying only on external triggering. A great step forward as, historically, only invasive techniques like excision, ablation and then toxic therapeutics where employed, affecting, sometimes dramatically, patients' compliance. This review, thus, focuses on recent progress achieved in physical methods whose trigger has proven their effectiveness in cancer care performance. However and retrospectively, this plethora of available physical technic led to the same consequences: external treatment has very often a strong impact on the tumour but irreversible effects are only obtained when high intensity parameters are used, causing to inevitable deleterious side effects. In this particular context, maximising tumour cells destruction may need to be sacrificed in favour of less deleterious strategies. It goes without saying that it is quite natural that the world of research has

moved towards the joint use of chemo- and physico-therapy in a multimodal therapy in order to improve clinical outcomes for patients affected by cancer as well as their quality of life.

Combining physical strategies with drug-loaded nanotherapeutics in patients present a high translational impact since it may allow for both chemical and physical dose reductions enabling further sparing of healthy tissues. However, some limitations may occasionally appear in the use of these physical approaches, in particular due to tumour architecture or location. For example, deep-seated tumors can be hard to treat due to low tissue penetration of visible light.

One of the major strengths of physical approaches to improve the delivery of nanotherapeutics is the local and transient aspect of their effects. A typical example is the membrane permeabilization that occurs when electroporation is used as a drug delivery tool. This permeabilization is transient and fades within minutes after ending external electric field application. This transient aspect illustrates the existence of a therapeutic window, underling the major importance of time interval between completion of physical triggering and administration of nanotherapeutics. Of course, for each clinical application envisaged, the co-administration protocol must be clearly validated experimentally. However, most of the experimental data obtained with hyperthermia, PDT, electroporation or sonoporation indicate that since the physical conditions applied are mild, the injection of nanotherapeutics should be considered within minutes.

Notably, the physical therapies presented in this review (radiotherapy, hyperthermia, photodynamic therapy, sonoporation, electroporation and cold atmospheric plasma) are already clinically approved, ensuring, thus, potentially fast clinical translation when combined with FDA nanotherapeutics. We emphasise here the importance of using physical therapies as a neoadjuvant to enhance the delivery of nanotherapeutics to the tumour and to adapt therapeutic protocols according to the patient/tumour specificity. Thus, this review illustrates that for each type of cancer, different chem/physical therapies can be proposed jointly, delivering a fully personalised therapy.

The juvenile nature of this care strategy opens the way to new and attractive therapeutic perspectives, not only to reduce/destroy the tumour, but also to restrict its resistance to therapies, activate the immune response and reduce the risk of recurrence. The clinical evidence obtained for years has proven the effectiveness of the combination of radiotherapy with drugs and/or nanotherapeutics. These examples, abundantly described in the literature, allow us to view emerging physical stimuli optimistically in the fight against cancer.

To achieve applicable clinical protocols, cellular and tissue biological mechanisms impacted in multimodal therapies must first be widely studied and understood from a pre-clinical point of view before considering their translation to the clinical level. In addition, to ensure their broad and correct use in the clinic, oncologists and other practitioners need to become familiar with these physical techniques, which is typically the case for PDT. Indeed, efficient PDT implies the control of appropriate parameters regarding the choice of the photosensitiser, the wavelength needed, the light intensity, pulses duration… if not well controlled, early and late onset side effects may arise (pain, burns, oedema, itching, desquamation). Thus, the complexity and multi-parametric aspects of multimodal therapies are highlighted in the different parts of the article. The multidisciplinary coordination of professional profiles such as physicists, physicians, chemists and biologists is necessary for treatment optimisation and use. This observation led to a new vision of health care organised around a team of specialists at the service of each patient similar to what is done in the research sector.

From our opinion, except for RT which is already widely used in clinics, all other physical methods presented in this review will be increasingly translated into clinical treatments in the coming years if systematically combined to chemotherapy. Indeed, their ability to increase vascular permeability and ECM degradation was proven. Subsequent penetration of drugs, especially for nanotherapeutics in tumour sites can be expected while increasing increases the chances of success of the therapy as well as patient compliance. In addition, these physical approaches have the invaluable advantage of acting locally, i.e. only on the desired site, as opposed to more aggressive chemotherapy.

Funding details

This work was supported by the French Agence Nationale de la recherche under Grant ANR-17-CE19-0013-01.

Financial and competing interests disclosure

The authors report no conflicts of interest.

Acknowledgments

Lab2screen is acknowledged for English proofreading and editing as well as design creations for graphical abstract, figures 2 and 7.

References

Papers of special note have been highlighted as either of interest (•) or of considerable interest (••) to readers.

[1] Li Y, Wang J, Wientjes MG, et al. Delivery of nanomedicines to extracellular and intracellular compartments of a solid tumor. Adv Drug Deliv Rev. 2012;64:29–39.

[2] Marcucci F, Corti A. How to improve exposure of tumor cells to drugs — Promoter drugs increase tumor uptake and penetration of effector drugs. Adv Drug Deliv Rev. 2012;64:53–68.

[3] Carmeliet P, Jain RK. Angiogenesis in cancer and other diseases. nature. 2000;407:249.

[4] Matsumura Y, Maeda H. A New Concept for Macromolecular Therapeutics in Cancer Chemotherapy: Mechanism of Tumoritropic Accumulation of Proteins and the Antitumor Agent Smancs. Cancer Res. 1986;46:6387–6392.

[5] Nichols JW, Bae YH. EPR: Evidence and fallacy. J Controlled Release. 2014;190:451–464.

[6] Heldin C-H, Rubin K, Pietras K, et al. High interstitial fluid pressure - an obstacle in cancer therapy. Nat Rev Cancer. 2004;4:806–813.

[7] Ariffin AB, Forde PF, Jahangeer S, et al. Releasing Pressure in Tumors: What Do We Know So Far and Where Do We Go from Here? A Review. Cancer Res. 2014;74:2655–2662.

[8] • Ojha T, Pathak V, Shi Y, et al. Pharmacological and physical vessel modulation strategies to improve EPR-mediated drug targeting to tumors. Adv Drug Deliv Rev. 2017;119:44–60.

Overview of pharmacological and physical strategies to normalize, permeabilize, disrupt or promote tumour blood vessels in order to improve drug delivery systems accumulation within tumor.

[9] Dhaliwal A, Zheng G. Improving accessibility of EPR-insensitive tumor phenotypes using EPR-adaptive strategies: Designing a new perspective in nanomedicine delivery. Theranostics. 2019;9:8091.

[10] Yang S, Gao H. Nanoparticles for modulating tumor microenvironment to improve drug delivery and tumor therapy. Pharmacol Res. 2017;126:97–108.

[11] Zhou Y, Chen X, Cao J, et al. Overcoming the biological barriers in the tumor microenvironment for improving drug delivery and efficacy. J Mater Chem B. 2020;8:6765–6781.

[12] Henke E, Nandigama R, Ergün S. Extracellular Matrix in the Tumor Microenvironment and Its Impact on Cancer Therapy. Front Mol Biosci. 2020;6:160.

[13] Paszek MJ, Zahir N, Johnson KR, et al. Tensional homeostasis and the malignant phenotype. Cancer Cell. 2005;8:241–254.

[14] Kauppila S, Stenbäck F, Risteli J, et al. Aberrant type I and type III collagen gene expression in human breast cancer in vivo. J Pathol J Pathol Soc G B Irel. 1998;186:262–268.

[15] Theocharis AD, Skandalis SS, Gialeli C, et al. Extracellular matrix structure. Adv Drug Deliv Rev. 2016;97:4–27.

[16] Lu P, Weaver VM, Werb Z. The extracellular matrix: A dynamic niche in cancer progression. J Cell Biol. 2012;196:395–406.

[17] Netti PA, Berk DA, Swartz MA, et al. Role of extracellular matrix assembly in interstitial transport in solid tumors. Cancer Res. 2000;60:2497–2503.

[18] Jain RK. Normalizing Tumor Microenvironment to Treat Cancer: Bench to Bedside to Biomarkers. J Clin Oncol. 2013;31:2205–2218.

[19] Burgstaller G, Oehrle B, Gerckens M, et al. The instructive extracellular matrix of the lung: basic composition and alterations in chronic lung disease. Eur Respir J. 2017;50:1601805.

[20] •• Minchinton AI, Tannock IF. Drug penetration in solid tumours. Nat Rev Cancer. 2006;6:583–592.

Focus on drug distribution visualization within tumours from in vitro to in vivo studies and proposes strategies that might be used to improve drug penetration in order to increase its therapeutic index.

[21] Brown E, McKee T, diTomaso E, et al. Dynamic imaging of collagen and its modulation in tumors in vivo using second-harmonic generation. Nat Med. 2003;9:796–800.

[22] Dolor A, Szoka FC. Digesting a Path Forward: The Utility of Collagenase Tumor Treatment for Improved Drug Delivery. Mol Pharm. 2018;15:2069–2083.

[23] Chauhan VP, Martin JD, Liu H, et al. Angiotensin inhibition enhances drug delivery and potentiates chemotherapy by decompressing tumour blood vessels. Nat Commun. 2013;4:1–11.

[24] Barry-Hamilton V, Spangler R, Marshall D, et al. Allosteric inhibition of lysyl oxidase–like-2 impedes the development of a pathologic microenvironment. Nat Med. 2010;16:1009.

[25] Coussens LM, Fingleton B, Matrisian LM. Matrix metalloproteinase inhibitors and cancer—trials and tribulations. Science. 2002;295:2387–2392.

[26] Diop-Frimpong B, Chauhan VP, Krane S, et al. Losartan inhibits collagen I synthesis and improves the distribution and efficacy of nanotherapeutics in tumors. Proc Natl Acad Sci. 2011;108:2909–2914.

[27] Khawar IA, Kim JH, Kuh H-J. Improving drug delivery to solid tumors: Priming the tumor microenvironment. J Controlled Release. 2015;201:78–89.

[28] Nakamura Y, Mochida A, Choyke PL, et al. Nanodrug Delivery: Is the Enhanced Permeability and Retention Effect Sufficient for Curing Cancer? Bioconjug Chem. 2016;27:2225–2238.

[29] Wang Y, Gan G, Wang B, et al. Cancer-associated Fibroblasts Promote Irradiated Cancer Cell Recovery Through Autophagy. EBioMedicine. 2017;17:45–56.

[30] Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of Cancer: The Next Generation. Cell. 2011;144:646–674.

[31] Fuks Z, Kolesnick R. Engaging the vascular component of the tumor response. Cancer Cell. 2005;8:89–91.

[32] Potiron VA, Abderrahmani R, Clément-Colmou K, et al. Improved functionality of the vasculature during conventionally fractionated radiation therapy of prostate cancer. PloS One. 2013;8:e84076.

[33] Garcia-Barros M, Paris F, Cordon-Cardo C, et al. Tumor response to radiotherapy regulated by endothelial cell apoptosis. Science. 2003;300:1155–1159.

[34] •• DuRoss AN, Neufeld MJ, Rana S, et al. Integrating nanomedicine into clinical radiotherapy regimens. Adv Drug Deliv Rev. 2019;144:35–56.

A review summarizing how nanomedicine and radiotherapy can participate to multimodal strategies

[35] Schwickert HC, Stiskal M, Roberts TP, et al. Contrast-enhanced MR imaging assessment of tumor capillary permeability: Effect of irradiation on delivery of chemotherapy. Radiology. 1996;198:893–898.

[36] Moding EJ, Kastan MB, Kirsch DG. Strategies for optimizing the response of cancer and normal tissues to radiation. Nat Rev Drug Discov. 2013;12:526–542.

[37] Stapleton S, Jaffray D, Milosevic M. Radiation effects on the tumor microenvironment: Implications for nanomedicine delivery. Adv Drug Deliv Rev. 2017;109:119–130.

[38] Shi J, Kantoff PW, Wooster R, et al. Cancer nanomedicine: progress, challenges and opportunities. Nat Rev Cancer. 2017;17:20.

[39] Roh HD, Boucher Y, Kalnicki S, et al. Interstitial hypertension in carcinoma of uterine cervix in patients: possible correlation with tumor oxygenation and radiation response. Cancer Res. 1991;51:6695–6698.

[40] Znati CA, Rosenstein M, Boucher Y, et al. Effect of radiation on interstitial fluid pressure and oxygenation in a human tumor xenograft. Cancer Res. 1996;56:964–968.

[41] Giustini AJ, Petryk AA, Hoopes PJ. Ionizing radiation increases systemic nanoparticle tumor accumulation. Nanomedicine Nanotechnol Biol Med. 2012;8:818–821.

[42] Moeller BJ, Cao Y, Li CY, et al. Radiation activates HIF-1 to regulate vascular radiosensitivity in tumors: Role of reoxygenation, free radicals, and stress granules. Cancer Cell. 2004;5:429–441.

[43] Dewhirst MW, Cao Y, Moeller B. Cycling hypoxia and free radicals regulate angiogenesis and radiotherapy response. Nat Rev Cancer. 2008;8:425–437.

[44] Lee C-G, Heijn M, di Tomaso E, et al. Anti-vascular endothelial growth factor treatment augments tumor radiation response under normoxic or hypoxic conditions. Cancer Res. 2000;60:5565–5570.

[45] Tachiiri S, Katagiri T, Tsunoda T, et al. Analysis of gene-expression profiles after gamma irradiation of normal human fibroblasts. Int J Radiat Oncol Biol Phys. 2006;64:272–279.

[46] Qian L-W, Mizumoto K, Urashima T, et al. Radiation-induced increase in invasive potential of human pancreatic cancer cells and its blockade by a matrix metalloproteinase inhibitor, CGS27023. Clin Cancer Res. 2002;8:1223–1227.

[47] Kumar A, Collins HM, Scholefield JH, et al. Increased type-IV collagenase (MMP-2 and MMP-9) activity following preoperative radiotherapy in rectal cancer. Br J Cancer. 2000;82:960–965.

[48] Angenete E, Öresland T, Falk P, et al. Preoperative radiotherapy and extracellular matrix remodeling in rectal mucosa and tumour matrix metalloproteinases and plasminogen components. Acta Oncol. 2009;48:1144–1151.

[49] Chetty C, Bhoopathi P, Rao JS, et al. Inhibition of matrix metalloproteinase-2 enhances radiosensitivity by abrogating radiation-induced FoxM1-mediated G2/M arrest in A549 lung cancer cells. Int J Cancer. 2009;124:2468–2477.

[50] Paquette B, Baptiste C, Therriault H, et al. In vitro irradiation of basement membrane enhances the invasiveness of breast cancer cells. Br J Cancer. 2007;97:1505–1512.

[51] Speake WJ, Dean RA, Kumar A, et al. Radiation induced MMP expression from rectal cancer is short lived but contributes to in vitro invasion. Eur J Surg Oncol EJSO. 2005;31:869–874.

[52] Shankar A, Kumar S, Iskander A, et al. Subcurative radiation significantly increases cell proliferation, invasion, and migration of primary glioblastoma multiforme in vivo. Chin J Cancer. 2014;33:148.

[53] Ager EI, Kozin SV, Kirkpatrick ND, et al. Blockade of MMP14 activity in murine breast carcinomas: implications for macrophages, vessels, and radiotherapy. JNCI J Natl Cancer Inst. 2015;107.

[54] Strup-Perrot C, Vozenin-Brotons M-C, Vandamme M, et al. Expression and activation of MMP -2, -3, -9, -14 are induced in rat colon after abdominal X-irradiation. Scand J Gastroenterol. 2006;41:60–70.

[55] Angenete E, Langenskiöld M, Falk P, et al. Matrix metalloproteinases in rectal mucosa, tumour and plasma: response after preoperative irradiation. Int J Colorectal Dis. 2007;22:667–674.

[56] Angenete E, Langenskiöld M, Palmgren I, et al. uPA and PAI-1 in rectal cancer—relationship to radiotherapy and clinical outcome. J Surg Res. 2009;153:46–53.

[57] Kagan HM, Li W. Lysyl oxidase: properties, specificity, and biological roles inside and outside of the cell. J Cell Biochem. 2003;88:660–672.

[58] Erler JT, Giaccia AJ. Lysyl Oxidase Mediates Hypoxic Control of Metastasis. Cancer Res. 2006;66:10238–10241.

[59] Egeblad M, Rasch MG, Weaver VM. Dynamic interplay between the collagen scaffold and tumor evolution. Curr Opin Cell Biol. 2010;22:697–706.

[60] Shen CJ, Sharma A, Vuong D-V, et al. Ionizing radiation induces tumor cell lysyl oxidase secretion. BMC Cancer. 2014;14:532.

[61] Xie P, Yu H, Wang F, et al. Inhibition of LOXL2 Enhances the Radiosensitivity of Castration-Resistant Prostate Cancer Cells Associated with the Reversal of the EMT Process. Catalá A, editor. BioMed Res Int. 2019;2019:4012590.

[62] Chen HH, Kuo MT. Improving radiotherapy in cancer treatment: promises and challenges. Oncotarget. 2017;8:62742.

[63] Li J, Shang W, Li Y, et al. Advanced nanomaterials targeting hypoxia to enhance radiotherapy. Int J Nanomedicine. 2018;13:5925.

[64] Lammers T, Peschke P, Kühnlein R, et al. Effect of radiotherapy and hyperthermia on the tumor accumulation of HPMA copolymer-based drug delivery systems. J Controlled Release. 2007;117:333–341.

[65] Lammers T, Subr V, Peschke P, et al. Image-guided and passively tumour-targeted polymeric nanomedicines for radiochemotherapy. Br J Cancer. 2008;99:900–910.

[66] Davies C de L, Lundstrøm LM, Frengen J, et al. Radiation improves the distribution and uptake of liposomal doxorubicin (caelyx) in human osteosarcoma xenografts. Cancer Res. 2004;64:547–553.

[67] •• Stapleton S, Dunne M, Milosevic M, et al. Radiation and heat improve the delivery and efficacy of Nanotherapeutics by modulating Intratumoral fluid dynamics. ACS Nano. 2018;12:7583–7600.

Effect of the IFP on the tumor response to RT

[68] Miller MA, Chandra R, Cuccarese MF, et al. Radiation therapy primes tumors for nanotherapeutic delivery via macrophage-mediated vascular bursts. Sci Transl Med. 2017;9.

[69] Koukourakis MI, Koukouraki S, Giatromanolaki A, et al. Liposomal doxorubicin and conventionally fractionated radiotherapy in the treatment of locally advanced non-small-cell lung cancer and head and neck cancer. J Clin Oncol. 1999;17:3512–3521.

[70] Rosenthal DI, Yom SS, Liu L, et al. A Phase I study of SPI-077 (Stealth® liposomal cisplatin) concurrent with radiation therapy for locally advanced head and neck cancer. Invest New Drugs. 2002;20:343–349.

[71] Dipetrillo T, Milas L, Evans D, et al. Paclitaxel poliglumex (PPX-Xyotax) and concurrent radiation for esophageal and gastric cancer: a phase I study. Am J Clin Oncol. 2006;29:376–379.

[72] Zee J van der, Vujaskovic Z, Kondo M, et al. The Kadota Fund International Forum 2004–Clinical group consensus*. Int J Hyperthermia. 2008;24:111–122.

[73] Koning GA, Eggermont AMM, Lindner LH, et al. Hyperthermia and Thermosensitive Liposomes for Improved Delivery of Chemotherapeutic Drugs to Solid Tumors. Pharm Res. 2010;27:1750–1754.

[74] Hu Q, Huang Z, Duan Y, et al. Reprogramming Tumor Microenvironment with Photothermal Therapy. Bioconjug Chem. 2020;31:1268–1278.

[75] Datta NR, Kok HP, Crezee H, et al. Integrating Loco-Regional Hyperthermia Into the Current Oncology Practice: SWOT and TOWS Analyses. Front Oncol. 2020;10:819.

[76] Vaupel PW, Kelleher DK. Pathophysiological and vascular characteristics of tumours and their importance for hyperthermia: heterogeneity is the key issue. Int J Hyperthermia. 2010;26:211–223.

[77] Kirui DK, Koay EJ, Guo X, et al. Tumor vascular permeabilization using localized mild hyperthermia to improve macromolecule transport. Nanomedicine Nanotechnol Biol Med. 2014;10:1487–1496.

[78] Melancon MP, Elliott AM, Shetty A, et al. Near-infrared light modulated photothermal effect increases vascular perfusion and enhances polymeric drug delivery. J Controlled Release. 2011;156:265–272.

[79] Lapin NA, Krzykawska-Serda M, Dilliard S, et al. The effects of non-invasive radiofrequency electric field hyperthermia on biotransport and biodistribution of fluorescent [60]fullerene derivative in a murine orthotopic model of breast adenocarcinoma. J Controlled Release. 2017;260:92–99.

[80] Li L, ten Hagen TLM, Bolkestein M, et al. Improved intratumoral nanoparticle extravasation and penetration by mild hyperthermia. J Controlled Release. 2013;167:130–137.

[81] Gao H, Bi Y, Chen J, et al. Near-Infrared Light-Triggered Switchable Nanoparticles for Targeted Chemo/Photothermal Cancer Therapy. ACS Appl Mater Interfaces. 2016;8:15103–15112.

[82] Baronzio GF, Galante F, Gramaglia A, et al. Tumor microcirculation and its significance in therapy: possible role of omega-3 fatty acids as rheological modifiers. Med Hypotheses. 1998;50:175–182.

[83] Fite BZ, Kheirolomoom A, Foiret JL, et al. Dynamic contrast enhanced MRI detects changes in vascular transport rate constants following treatment with thermally-sensitive liposomal doxorubicin. J Controlled Release. 2017;256:203–213.

[84] Song CW, Park HJ, Lee CK, et al. Implications of increased tumor blood flow and oxygenation caused by mild temperature hyperthermia in tumor treatment. Int J Hyperthermia. 2005;21:761–767.

[85] Corr SJ, Shamsudeen S, Vergara LA, et al. A New Imaging Platform for Visualizing Biological Effects of Non-Invasive Radiofrequency Electric-Field Cancer Hyperthermia. Muñoz-Barrutia A, editor. PLOS ONE. 2015;10:e0136382.

[86] Marangon I, Silva AAK, Guilbert T, et al. Tumor Stiffening, a Key Determinant of Tumor Progression, is Reversed by Nanomaterial-Induced Photothermal Therapy. Theranostics. 2017;7:329–343.

[87] • Kolosnjaj-Tabi J, Marangon I, Nicolas-Boluda A, et al. Nanoparticle-based hyperthermia, a local treatment modulating the tumor extracellular matrix. Pharmacol Res. 2017;126:123–137.

A review summarizing tumor micro-environment and how hyperthermia can modulate ECM

[88] Yudina A, Moonen C. Ultrasound-induced cell permeabilisation and hyperthermia: Strategies for local delivery of compounds with intracellular mode of action. Int J Hyperthermia. 2012;28:311–319.

[89] Ryu JS, Raucher D. Elastin-like polypeptides: The influence of its molecular weight on local hyperthermia-induced tumor accumulation. Eur J Pharm Biopharm. 2014;88:382–389.

[90] Kolosnjaj-Tabi J, Di Corato R, Lartigue L, et al. Heat-Generating Iron Oxide Nanocubes: Subtle “Destructurators” of the Tumoral Microenvironment. ACS Nano. 2014;8:4268–4283.

[91] Thakkar S, Sharma D, Kalia K, et al. Tumor microenvironment targeted nanotherapeutics for cancer therapy and diagnosis: A review. Acta Biomater. 2020;101:43–68.

[92] Lokerse WJM, Bolkestein M, Dalm SU, et al. Comparing the therapeutic potential of thermosensitive liposomes and hyperthermia in two distinct subtypes of breast cancer. J Controlled Release. 2017;258:34–42.

[93] Raeesi V, Chan WCW. Improving nanoparticle diffusion through tumor collagen matrix by photo-thermal gold nanorods. Nanoscale. 2016;8:12524–12530.

[94] Piehler S, Wucherpfennig L, Tansi FL, et al. Hyperthermia affects collagen fiber architecture and induces apoptosis in pancreatic and fibroblast tumor hetero-spheroids in vitro. Nanomedicine Nanotechnol Biol Med. 2020;102183.

[95] Kolosnjaj-Tabi J, Kralj S, Griseti E, et al. Magnetic Silica-Coated Iron Oxide Nanochains as Photothermal Agents, Disrupting the Extracellular Matrix, and Eradicating Cancer Cells. Cancers. 2019;11:2040.

[96] Ta T, Bartolak-Suki E, Park E-J, et al. Localized delivery of doxorubicin in vivo from polymer-modified thermosensitive liposomes with MR-guided focused ultrasound-mediated heating. J Controlled Release. 2014;194:71–81.

[97] Beola L, Asín L, Fratila RM, et al. Dual Role of Magnetic Nanoparticles as Intracellular Hotspots and Extracellular Matrix Disruptors Triggered by Magnetic Hyperthermia in 3D Cell Culture Models. ACS Appl Mater Interfaces. 2018;10:44301–44313.

[98] Li J, Xie C, Huang J, et al. Semiconducting Polymer Nanoenzymes with Photothermic Activity for Enhanced Cancer Therapy. Angew Chem Int Ed. 2018;57:3995–3998.

[99] Ramos-Docampo MA, Fernández-Medina M, Taipaleenmäki E, et al. Microswimmers with Heat Delivery Capacity for 3D Cell Spheroid Penetration. ACS Nano. 2019;13:12192–12205.

[100] Sebeke L, Deenen DA, Maljaars E, et al. Model predictive control for MR-HIFU-mediated, uniform hyperthermia. Int J Hyperthermia. 2019;36:1039–1049.

[101] Hancock HA, Smith LH, Cuesta J, et al. Investigations into Pulsed High-Intensity Focused Ultrasound–Enhanced Delivery: Preliminary Evidence for a Novel Mechanism. Ultrasound Med Biol. 2009;35:1722–1736.

[102] Lee S, Han H, Koo H, et al. Extracellular matrix remodeling in vivo for enhancing tumor-targeting efficiency of nanoparticle drug carriers using the pulsed high intensity focused ultrasound. J Controlled Release. 2017;263:68–78.

[103] Jiang T, Zhang B, Shen S, et al. Tumor Microenvironment Modulation by Cyclopamine Improved Photothermal Therapy of Biomimetic Gold Nanorods for Pancreatic Ductal Adenocarcinomas. ACS Appl Mater Interfaces. 2017;9:31497–31508.

[104] •• Tan T, Hu H, Wang H, et al. Bioinspired lipoproteins-mediated photothermia remodels tumor stroma to improve cancer cell accessibility of second nanoparticles. Nat Commun. 2019;10:3322.

A very elegant and efficient 2-step protocol based on hyperthermia that plays with remodelling of ECM before treatment by an anti-cancer drug

[105] Sorrin AJ, Ruhi MK, Ferlic NA, et al. Photodynamic Therapy and the Biophysics of the Tumor Microenvironment. Photochem Photobiol. 2020;96:232–259.

[106] Krammer B. Vascular effects of photodynamic therapy. Anticancer Res. 2001;21:4271–4277.

[107] Chen B, Pogue BW, Hoopes PJ, et al. Vascular and cellular targeting for photodynamic therapy. Crit Rev Eukaryot Gene Expr. 2006;16:279–305.

[108] Fingar VH, Wieman TJ, Wiehle SA, et al. The role of microvascular damage in photodynamic therapy: the effect of treatment on vessel constriction, permeability, and leukocyte adhesion. Cancer Res. 1992;52:4914–4921.

[109] Fingar VH, Wieman TJ, Doak KW. Changes in Tumor Interstitial Pressure Induced by Photodynamic Therapy. Photochem Photobiol. 1991;53:763–768.

[110] Malik Z, Faraggi A, Savion N. Ultrastructural damage in photosensitized endothelial cells: Dependence on hematoporphyrin delivery pathways. J Photochem Photobiol B. 1992;14:359–368.

[111] Leunig A, Staub F, Plesnila N, et al. Effect of photodynamic treatment of human endothelial cells on cell volume and cell viability. Int J Oncol. 1996;8:1217–1221.

[112] Sporn LA, Foster TH. Photofrin and Light Induces Microtubule Depolymerization in Cultured Human Endothelial Cells. Cancer Res. 1992;52:3443–3448.

[113] Gil M, Bieniasz M, Seshadri M, et al. Photodynamic therapy augments the efficacy of oncolytic vaccinia virus against primary and metastatic tumours in mice. Br J Cancer. 2011;105:1512–1521.

[114] Snyder JW, Greco WR, Bellnier DA, et al. Photodynamic therapy: a means to enhanced drug delivery to tumors. Cancer Res. 2003;63:8126–8131.

[115] Cheng C, Debefve E, Haouala A, et al. Photodynamic therapy selectively enhances liposomal doxorubicin uptake in sarcoma tumors to rodent lungs. Lasers Surg Med. 2010;42:391–399.

[116] Perentes JY, Wang Y, Wang X, et al. Low-dose vascular photodynamic therapy decreases tumor interstitial fluid pressure, which promotes liposomal doxorubicin distribution in a murine sarcoma metastasis model. Transl Oncol. 2014;7:393–399.

[117] Sano K, Nakajima T, Choyke PL, et al. The Effect of Photoimmunotherapy Followed by Liposomal Daunorubicin in a Mixed Tumor Model: A Demonstration of the Super-Enhanced Permeability and Retention Effect after Photoimmunotherapy. Mol Cancer Ther. 2014;13:426–432.

[118] Luo D, Carter KA, Miranda D, et al. Chemophototherapy: an emerging treatment option for solid tumors. Adv Sci. 2017;4:1600106.

[119] Lv T, Huang Z-F, Wang H-W, et al. Evaluation of collagen alteration after topical photodynamic therapy (PDT) using second harmonic generation (SHG) microscopy – in vivo study in a mouse model. Photodiagnosis Photodyn Ther. 2012;9:164–169.

[120] Mills S j., Farrar M d., Ashcroft G s., et al. Topical photodynamic therapy following excisional wounding of human skin increases production of transforming growth factor-β3 and matrix metalloproteinases 1 and 9, with associated improvement in dermal matrix organization. Br J Dermatol. 2014;171:55–62.

[121] Ryu A-R, Lee M-Y. Chlorin e6-mediated photodynamic therapy promotes collagen production and suppresses MMPs expression via modulating AP-1 signaling in P. acnes-stimulated HaCaT cells. Photodiagnosis Photodyn Ther. 2017;20:71–77.

[122] Yova DM, Hovhannisyan VA, Theodossiou T. Photochemical effects and hypericin photosensitized processes in collagen. J Biomed Opt. 2001;6:52–58.

[123] Hovhannisyan V, Guo HW, Hovhannisyan A, et al. Photo-induced processes in collagen-hypericin system revealed by fluorescence spectroscopy and multiphoton microscopy. Biomed Opt Express. 2014;5:1355–1362.

[124] Hovhannisyan V, Hovhannisyan A, Ghukasyan V, et al. Hypericin-mediated selective photomodification of connective tissues. Appl Phys Lett. 2014;105:263701.

[125] Ferrario A, Chantrain CF, von Tiehl K, et al. The matrix metalloproteinase inhibitor prinomastat enhances photodynamic therapy responsiveness in a mouse tumor model. Cancer Res. 2004;64:2328–2332.

[126] Karrer S, Bosserhoff AK, Weiderer P, et al. Influence of 5-aminolevulinic acid and red light on collagen metabolism of human dermal fibroblasts. J Invest Dermatol. 2003;120:325–331.

[127] Zhang C, Wang J, Chou A, et al. Photodynamic therapy induces antifibrotic alterations in primary human vocal fold fibroblasts. The Laryngoscope. 2018;128:E323–E331.

[128] Biel MA. Photodynamic Therapy Treatment of Early Oral and Laryngeal Cancers. Photochem Photobiol. 2007;83:1063–1068.

[129] Ihsanullah KM, Kumar BN, Zhao Y, et al. Stepwise-activatable hypoxia triggered nanocarrier-based photodynamic therapy for effective synergistic bioreductive chemotherapy. Biomaterials. 2020;245:119982.

[130] Tachibana K, Uchida T, Ogawa K, et al. Induction of cell-membrane porosity by ultrasound. The Lancet. 1999;353:1409.

[131] Frenkel V. Ultrasound mediated delivery of drugs and genes to solid tumors. Adv Drug Deliv Rev. 2008;60:1193–1208.

[132] Ferrara K, Pollard R, Borden M. Ultrasound Microbubble Contrast Agents: Fundamentals and Application to Gene and Drug Delivery. Annu Rev Biomed Eng. 2007;9:415–447.

[133] Hernot S, Klibanov AL. Microbubbles in ultrasound-triggered drug and gene delivery. Adv Drug Deliv Rev. 2008;60:1153–1166.

[134] Lentacker I, De Cock I, Deckers R, et al. Understanding ultrasound induced sonoporation: Definitions and underlying mechanisms. Adv Drug Deliv Rev. 2014;72:49–64.

[135] Tharkar P, Varanasi R, Wong WSF, et al. Nano-Enhanced Drug Delivery and Therapeutic Ultrasound for Cancer Treatment and Beyond. Front Bioeng Biotechnol. 2019;7:324.

[136] Skyba DM, Price RJ, Linka AZ, et al. Direct in vivo visualization of intravascular destruction of microbubbles by ultrasound and its local effects on tissue. Circulation. 1998;98:290–293.

[137] Chen H, Kreider W, Brayman AA, et al. Blood Vessel Deformations on Microsecond Time Scales by Ultrasonic Cavitation. Phys Rev Lett. 2011;106:034301.

[138] Chen H, Brayman AA, Evan AP, et al. Preliminary observations on the spatial correlation between short-burst microbubble oscillations and vascular bioeffects. Ultrasound Med Biol. 2012;38:2151–2162.

[139] Wamel A van, Kooiman K, Emmer M, et al. Ultrasound microbubble induced endothelial cell permeability. J Controlled Release. 2006;116:e100–e102.

[140] Patil AV, Rychak JJ, Klibanov AL, et al. Real-Time Technique for Improving Molecular Imaging and Guiding Drug Delivery in Large Blood Vessels: In Vitro and Ex Vivo Results. Mol Imaging. 2011;10:7290.2011.00002.

[141] Meijering BDM, Henning RH, Gilst WHV, et al. Optimization of ultrasound and microbubbles targeted gene delivery to cultured primary endothelial cells. J Drug Target. 2007;15:664–671.

[142] Juffermans LJM, Meijering BDM, Henning RH, et al. Ultrasound and Microbubble-Targeted Delivery of Small Interfering RNA Into Primary Endothelial Cells Is More Effective Than Delivery of Plasmid DNA. Ultrasound Med Biol. 2014;40:532–540.

[143] Meijering BDM, Juffermans LJM, van Wamel A, et al. Ultrasound and Microbubble-Targeted Delivery of Macromolecules Is Regulated by Induction of Endocytosis and Pore Formation. Circ Res. 2009;104:679–687.

[144] Juffermans LJM, van Dijk A, Jongenelen CAM, et al. Ultrasound and Microbubble-Induced Intra- and Intercellular Bioeffects in Primary Endothelial Cells. Ultrasound Med Biol. 2009;35:1917–1927.

[145] Bekeredjian R, Kroll RD, Fein E, et al. Ultrasound Targeted Microbubble Destruction Increases Capillary Permeability in Hepatomas. Ultrasound Med Biol. 2007;33:1592–1598.

[146] Mukherjee D, Wong J, Griffin B, et al. Ten-fold augmentation of endothelial uptake of vascular endothelial growth factor with ultrasound after systemic administration. J Am Coll Cardiol. 2000;35:1678–1686.

[147] Cochran MC, Eisenbrey JR, Soulen MC, et al. Disposition of ultrasound sensitive polymeric drug carrier in a rat hepatocellular carcinoma model. Acad Radiol. 2011;18:1341–1348.

[148] Yan F, Li L, Deng Z, et al. Paclitaxel-liposome–microbubble complexes as ultrasound-triggered therapeutic drug delivery carriers. J Controlled Release. 2013;166:246–255.

[149] Qin J, Wang T-Y, Willmann JK. Sonoporation: applications for cancer therapy. Ther Ultrasound. Springer; 2016. p. 263–291.

[150] Chowdhury SM, Wang T-Y, Bachawal S, et al. Ultrasound-guided therapeutic modulation of hepatocellular carcinoma using complementary microRNAs. J Controlled Release. 2016;238:272–280.

[151] Devulapally R, Sekar NM, Sekar TV, et al. Polymer nanoparticles mediated codelivery of antimiR-10b and antimiR-21 for achieving triple negative breast cancer therapy. ACS Nano. 2015;9:2290–2302.

[152] • Han H, Kim D, Jang Y, et al. Focused ultrasound-triggered chemo-gene therapy with multifunctional nanocomplex for enhancing therapeutic efficacy. J Controlled Release. 2020;322:346–356.

Focused ultrasound-responsive nanocomplex can be regarded as a novel drug delivery system using sonoporation effect

[153] • Kolosnjaj-Tabi J, Gibot L, Fourquaux I, et al. Electric field-responsive nanoparticles and electric fields: physical, chemical, biological mechanisms and therapeutic prospects. Adv Drug Deliv Rev. 2019;138:56–67.

2 [154] Yarmush ML, Golberg A, Serša G, et al. Electroporation-Based Technologies for Medicine:
3 Principles, Applications, and Challenges. Annu Rev Biomed Eng. 2014;16:295–320.

4 [155] Gehl J, Sersa G, Matthiessen LW, et al. Updated standard operating procedures for
5 electrochemotherapy of cutaneous tumours and skin metastases. Acta Oncol. 2018;57:874–
6 882.

7 [156] Ramirez L, Orlowski S, An D, et al. Electrochemotherapy on liver tumours in rabbits. Br J
8 Cancer. 1998;77:2104–2111.

9 [157] Sersa G, Beravs K, Cemazar M, et al. Contrast enhanced MRI assessment of tumor blood
10 volume after application of electric pulses. Electro- Magnetobiology. 1998;17:299–306.

11 [158] Gehl J, Skovsgaard T, Mir LM. Vascular reactions to in vivo electroporation: characterization
12 and consequences for drug and gene delivery. Biochim Biophys Acta BBA - Gen Subj.
13 2002;1569:51–58.

14 [159] Sersa G, Jarm T, Kotnik T, et al. Vascular disrupting action of electroporation and
15 electrochemotherapy with bleomycin in murine sarcoma. Br J Cancer. 2008;98:388–398.

16 [160] Gehl J, Geertsen PF. Efficient palliation of haemorrhaging malignant melanoma skin
17 metastases by electrochemotherapy. Melanoma Res. 2000;10:585–589.

18 [161] Markelc B, Bellard E, Sersa G, et al. In Vivo Molecular Imaging and Histological Analysis of
19 Changes Induced by Electric Pulses Used for Plasmid DNA Electrotransfer to the Skin: A Study
20 in a Dorsal Window Chamber in Mice. J Membr Biol. 2012;245:545–554.

21 [162] Markelc B, Bellard E, Sersa G, et al. Increased permeability of blood vessels after reversible
22 electroporation is facilitated by alterations in endothelial cell-to-cell junctions. J Controlled
23 Release. 2018;276:30–41.

24 [163] Sersa G, Cemazar M, Miklavcic D, et al. Tumor blood flow modifying effect of
25 electrochemotherapy with bleomycin. Anticancer Res. 1999;19:4017–4022.

26 [164] Sersa G, Cemazar M, Parkins CS, et al. Tumour blood flow changes induced by application of
27 electric pulses. Eur J Cancer. 1999;35:672–677.

28 [165] Sersa G, Krzic M, Sentjurc M, et al. Reduced blood flow and oxygenation in SA-1 tumours
29 after electrochemotherapy with cisplatin. Br J Cancer. 2002;87:1047–1054.

30 [166] Kanthou C, Kranjc S, Sersa G, et al. The endothelial cytoskeleton as a target of
31 electroporation-based therapies. Mol Cancer Ther. 2006;5:3145–3152.

32 [167] Meulenberg CJW, Todorovic V, Cemazar M. Differential cellular effects of electroporation
33 and electrochemotherapy in monolayers of human microvascular endothelial cells. PloS One.
34 2012;7:e52713.

35 [168] Kodama H, Shamay Y, Kimura Y, et al. Electroporation-induced changes in tumor vasculature
36 and microenvironment can promote the delivery and increase the efficacy of sorafenib
37 nanoparticles. Bioelectrochemistry Amst Neth. 2019;130:107328.

[169] Kis E, Baltás E, Kinyó Á, et al. Successful Treatment of Multiple Basaliomas with Bleomycin-based Electrochemotherapy: A Case Series of Three Patients with Gorlin-Goltz Syndrome. Acta Derm Venereol. 2012;92:648–651.

[170] Campana LG, Mocellin S, Basso M, et al. Bleomycin-Based Electrochemotherapy: Clinical Outcome from a Single Institution's Experience with 52 Patients. Ann Surg Oncol. 2009;16:191–199.

[171] Maor E, Ivorra A, Leor J, et al. The effect of irreversible electroporation on blood vessels. Technol Cancer Res Treat. 2007;6:307–312.

[172] Golberg A, Villiger M, Broelsch GF, et al. Skin regeneration with all accessory organs following ablation with irreversible electroporation. J Tissue Eng Regen Med. 2018;12:98–113.

[173] Weltmann KD, Von Woedtke T. Plasma medicine—current state of research and medical application. Plasma Phys Control Fusion. 2016;59:014031.

[174] Privat-Maldonado A, Bengtson C, Razzokov J, et al. Modifying the Tumour Microenvironment: Challenges and Future Perspectives for Anticancer Plasma Treatments. Cancers. 2019;11:1920.

[175] Arndt S, Unger P, Berneburg M, et al. 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. J Dermatol Sci. 2018;89:181–190.

[176] Duchesne C, Banzet S, Lataillade J-J, et al. Cold atmospheric plasma modulates endothelial nitric oxide synthase signalling and enhances burn wound neovascularisation. J Pathol. 2019;249:368–380.

[177] Nikitovic D, Corsini E, Kouretas D, et al. ROS-major mediators of extracellular matrix remodeling during tumor progression. Food Chem Toxicol. 2013;61:178–186.

[178] Keyvani A, Atyabi SM, Sardari S, et al. Effects of cold atmospheric plasma jet on collagen structure in different treatment times. Basic Res J Med Clin Sci. 2017;6:84–90.

[179] Dong X, Chen M, Wang Y, et al. A Mechanistic study of Plasma Treatment Effects on Demineralized Dentin Surfaces for Improved Adhesive/Dentin Interface Bonding. Clin Plasma Med. 2014;2:11–16.

[180] Samouillan V, Merbahi N, Yousfi M, et al. Effect of Low-Temperature Plasma Jet on Thermal Stability and Physical Structure of Type I Collagen. IEEE Trans Plasma Sci. 2012;40:1688–1695.

[181] Wiegand C, Fink S, Beier O, et al. Dose- and Time-Dependent Cellular Effects of Cold Atmospheric Pressure Plasma Evaluated in 3D Skin Models. Skin Pharmacol Physiol. 2016;29:257–265.

[182] Arndt S, Unger P, Wacker E, et al. Cold atmospheric plasma (CAP) changes gene expression of key molecules of the wound healing machinery and improves wound healing in vitro and in vivo. PloS One. 2013;8:e79325–e79325.

[183] Shi X, Cai J, Xu G, et al. Effect of Cold Plasma on Cell Viability and Collagen Synthesis in Cultured Murine Fibroblasts. Plasma Sci Technol. 2016;18:353–359.

[184] Vijayarangan V, Delalande A, Dozias S, et al. Cold Atmospheric Plasma Parameters Investigation for Efficient Drug Delivery in HeLa Cells. IEEE Trans Radiat Plasma Med Sci. 2018;2:109–115.

[185] Jinno M, Tachibana K, Motomura H, et al. Improvement of efficiency and viability in plasma gene transfection by plasma minimization and optimization electrode configuration. Jpn J Appl Phys. 2016;55:07LG09.

[186] Zhu W, Lee S-J, Castro NJ, et al. Synergistic Effect of Cold Atmospheric Plasma and Drug Loaded Core-shell Nanoparticles on Inhibiting Breast Cancer Cell Growth. Sci Rep. 2016;6:21974.

[187] Kim GC, Kim GJ, Park SR, et al. Air plasma coupled with antibody-conjugated nanoparticles: a new weapon against cancer. J Phys Appl Phys. 2008;42:032005.

[188] Wang M, Geilich BM, Keidar M, et al. Killing malignant melanoma cells with protoporphyrin IX-loaded polymersome-mediated photodynamic therapy and cold atmospheric plasma. Int J Nanomedicine. 2017;12:4117–4127.

[189] • Raavé R, van Kuppevelt TH, Daamen WF. Chemotherapeutic drug delivery by tumoral extracellular matrix targeting. J Controlled Release. 2018;274:1–8.

Description of the emerging field of drug delivery targeting tumour ECM in order to affect all subsets of cells within the tumour microenvironment.

[190] Guo J, Zeng H, Chen Y. Emerging Nano Drug Delivery Systems Targeting Cancer-Associated Fibroblasts for Improved Antitumor Effect and Tumor Drug Penetration. Mol Pharm. 2020;17:1028–1048.

[191] Van der Steen SC, Raavé R, Langerak S, et al. Targeting the extracellular matrix of ovarian cancer using functionalized, drug loaded lyophilisomes. Eur J Pharm Biopharm. 2017;113:229–239.

[192] Li L, Zhou S, Lv N, et al. Photosensitizer-Encapsulated Ferritins Mediate Photodynamic Therapy against Cancer-Associated Fibroblasts and Improve Tumor Accumulation of Nanoparticles. Mol Pharm. 2018;15:3595–3599.

[193] Vail DM, Amantea MA, Colbern GT, et al. Pegylated liposomal doxorubicin: proof of principle using preclinical animal models and pharmacokinetic studies. Semin Oncol. Elsevier; 2004. p. 16–35.

[194] Dreher MR, Liu W, Michelich CR, et al. Tumor vascular permeability, accumulation, and penetration of macromolecular drug carriers. J Natl Cancer Inst. 2006;98:335–344.

[195] Wang H, Lin Y, Nienhaus K, et al. The protein corona on nanoparticles as viewed from a nanoparticle-sizing perspective. WIREs Nanomedicine Nanobiotechnology. 2018;10:e1500.

[196] Cai R, Chen C. The Crown and the Scepter: Roles of the Protein Corona in Nanomedicine. Adv Mater Deerfield Beach Fla. 2019;31:e1805740.

[197] •• Appelboom G, Detappe A, LoPresti M, et al. Stereotactic modulation of blood-brain barrier permeability to enhance drug delivery. Neuro-Oncol. 2016;18:1601–1609.

Review on physical ways to disrupt blood-brain barrier to enhance drug delivery

[198] Hynynen K. Focused ultrasound for blood–brain disruption and delivery of therapeutic molecules into the brain. Expert Opin Drug Deliv. 2007;4:27–35.

[199] Lorenzo MF, Thomas SC, Kani Y, et al. Temporal Characterization of Blood-Brain Barrier Disruption with High-Frequency Electroporation. Cancers. 2019;11:1850.

Annexe 5: *Cold helium plasma jet does not stimulate collagen remodeling in a 3D human dermal substitute*. *Gouarderes S, Marches A, Vicendo P, Simon M, Merbahi N, Gibot L.* Bioelectrochemistry. 2021 (Sous presse)

Cold helium plasma jet does not stimulate collagen remodeling in a 3D human dermal substitute

Sara Gouarderes[1], Aurélie Marches[2,3], Patricia Vicendo[1], Isabelle Fourquaux[4], Michel Simon[2], Nofel Merbahi[3]*, Laure Gibot[1]*

[1] Laboratoire des IMRCP, CNRS UMR 5623, Université Toulouse III - Paul Sabatier, France

[2] Toulouse Institute for Infectious and Inflammatory Diseases (Infinity), Toulouse University, CNRS, Inserm, Toulouse III – Paul Sabatier University, Toulouse, France

[3] Laplace UMR CNRS 5213, Université Toulouse III - Paul Sabatier, France

[4] Centre de Microscopie Électronique Appliquée à la Biologie, CMEAB, 133 route de Narbonne, 31062 Toulouse, France

* Correspondence: merbahi@laplace.univ-tlse.fr; gibot@chimie.ups-tlse.fr

KEY WORDS: extracellular matrix, metalloproteinases MMPs, oxidative stress, cold atmospheric plasma (CAP), plasma-activated medium (PAM), skin, wound healing.

ABBREVIATIONS: CAP, cold atmospheric plasma; ECM, extracellular matrix; MMP, matrix metalloproteinase; PAM, plasma-activated medium; RONS, reactive oxygen and nitrogen species.

ABSTRACT

Cold Atmospheric Plasma (CAP) is an emerging physical approach displaying encouraging antitumor and wound healing effects both *in vitro* and *in vivo*. In this study, we assessed the potential of direct CAP to remodel skin collagens using an original tissue-engineered human dermal substitute model rich in endogenous extracellular matrix (ECM) covered with 600 µl of culture medium and treated with CAP for 30 and 120 seconds. Our results indicated that Reactive Oxygen and Nitrogen Species such as H_2O_2, NO_3^- and NO_2^- were produced in the medium during treatment. It appeared that in the CAP-treated dermal substitutes 1) cell viability was not altered, 2) pro-collagen I secretion was not modified over 48 h of culture after treatment, 3) global activity of matrix metalloproteinases was not modulated over 48 h after treatment, and 4) no change in hydroxyproline content was observed over 5 days after treatment. In order to confirm the efficiency of our device, we showed that the plasma-activated culture medium induced cell apoptosis and growth delay using a 3D human tumor spheroid model. In conclusion, no effect of direct CAP treatment was monitored on ECM production and degradation, indicating that CAP does not stimulate collagen remodeling at the tissue scale.

INTRODUCTION

Cold Atmospheric Plasmas (CAPs) are generated by coupling energy from either electric currents, radiofrequencies or microwaves to a gas at atmospheric pressure, resulting in a partially ionized gas. Two main devices are used to produce CAPs: plasma torches and dielectric barrier discharge devices, including rare gas plasma jets [1,2]. CAPs are a source of UV-Vis emission, ions, electrons, radicals and excited atoms and molecules. These species may interact with the ambient air and produce high levels of reduction/oxidation-based molecules [2], particularly reactive oxygen and nitrogen species (RONS) such as nitric oxide (°NO), nitrite (NO_2^-) and nitrate (NO_3^-) ions, hydroxyl radical (°OH) and hydrogen peroxide (H_2O_2). Since RONS are known to be involved in a variety of physiological functions and homeostatic tissue regulation in human [3], and CAPs can be generated at low temperatures not higher than 40 °C, CAPs raise a growing interest for biomedical applications [4]. Direct exposure to CAP as well as to plasma-activated medium (PAM) is highly effective to inactivate various pathogens, including drug-resistant microorganisms; therefore it is used for sterilization and biological decontamination [5–7]. Other potential CAP and PAM biomedical applications include surface modification of medical implants, management of dental carries and composite restoration, improvement of blood coagulation, treatment of various skin conditions and killing of cancer cells [8] while minimally damaging healthy surrounding cells [9–11].

The selective cytotoxic effect of CAP treatment may be partly explained by the overproduction of RONS in various tumor cell lines compared to their normal counterparts, ensuring a greater sensitivity to the oxidative stress generated by the plasma. This property has been exploited for the specific destruction of tumor cells in breast, cervical, colorectal, lung, pancreatic, prostate, and skin cancers [3,9,10,12,13]. It should be noted that a recent and extensive study on more than 38 healthy and cancerous cell lines studying expression of 33 surface markers demonstrated that the best predictor of sensitivity to plasma treatment is the basal level of metabolic activity [14].

An important potential application of CAP relies on its capacity, in well-defined *in vitro* conditions, to increase proliferation and motility of both cutaneous fibroblasts and keratinocytes [15–19], to promote the production of wound healing-relevant growth factors and cytokines [1,16], and to activate angiogenesis [17]. These effects subsequently lead to stimulation of wound healing and tissue regeneration [1,20–22].

The dermis extracellular matrix (ECM), a complex network of proteins including collagens, proteoglycans, elastin and fibronectin, plays an important role during the wound repair process. ECM ensures a structural bioactive role, providing mechanical support, activation and modulation of cytokines and growth factor's action, and stimulation of the cells adhesion and migration in the wound bed [23]. It is known that RONS induce ECM remodeling [24,25] and modulate the communication between cells and their surrounding ECM [26]. Since RONS are considered the major mediators of the biological effects of CAPs [3], it has been hypothesized that CAP exposure may induce local RONS-mediated ECM remodeling [26,27].

In the present study, we propose to assess the potential of cold atmospheric helium plasma jet to

directly remodel collagens, using a 3D tissue-engineered human reconstructed dermis model [28,29]. This original model offers multiple layers of primary dermal fibroblasts embedded within their endogenous, collagen-rich ECM. We analyzed remodeling of collagens after CAP treatment, through quantification of both pro-collagen I secretion and global collagen content. We also quantified global metalloproteinases (MMPs) activity and MMP-1 content, main actors in maintenance and remodeling of the ECM [30].

MATERIAL & METHODS

Plasma jet device. The cold atmospheric helium plasma jet was generated by means of a dielectric barrier discharge homemade device, as described elsewhere [31,32]. Briefly, two aluminum electrodes were wrapped around a quartz tube and connected to a high-voltage mono-polar square pulse generator. The characteristics of the applied power supply were fixed at 10 kV voltage, 10 kHz frequency and 1 µs pulse duration. Helium gas is delivered through the quartz tube at a controlled flow rate of 3 L/min.

Cell culture medium exposition to cold atmospheric plasma. Dulbecco's Modified Eagles Medium (DMEM) without pyruvate (Gibco #41965-039, ThermoFisher scientific, MA, USA) supplemented with 10% of heat inactivated fetal calf serum (Gibco #10270106), 100 U/ml of penicillin, and 100 µg/ml of streptomycin (Gibco #15140122) was exposed to the helium plasma jet. For that purpose, one well of a 24-well plate containing 600µl of cell culture medium was used and the output of the plasma jet was placed at a distance of 2 cm from the liquid surface. Two different durations of exposition to plasma jet were used: 30 and 120 seconds. Two minutes helium exposure and no exposure were settled as control conditions.

Hydrogen peroxide (H_2O_2) quantification. H_2O_2 concentration in cell culture medium was quantified immediately after exposure to the plasma using Amplex® Red Hydrogen Peroxide/Peroxidase Assay Kit (Invitrogen, #A22188, ThermoFisher scientific) according to manufacturer's protocols. Absorbance at 560 nm was read using a plate reader (Biochrom Asys UVM340, Biochrom Ltd, Cambridge, United Kingdom).

Nitrite/nitrate (NO_2^-/NO_3^-) ions quantification. NO_2^-/NO_3^- ion concentrations in cell culture medium were quantified immediately after plasma jet exposure using a colorimetric Nitrite/Nitrate Assay kit (Sigma#23479, Merck KGaA, Darmstadt, Germany) according to manufacturer's protocols. Absorbance at 540 nm was read using a plate reader (Biochrom Asys UVM340).

Cell culture. Primary human dermal fibroblasts previously isolated from a skin biopsy provided by Icelltis (Toulouse, France) were grown in DMEM GlutaMAX (Gibco #10569010) containing 4.5 g/L glucose, 110 mg/L of sodium pyruvate, supplemented with 10% of heat inactivated fetal calf serum (Gibco #10270106), 100 U/ml of penicillin, and 100 µg/ml of streptomycin (Gibco #15140122), at 37°C and 5% CO_2 in a humidified atmosphere. The medium was renewed 3 times a week. For 3D tumor spheroid experiments, human colorectal carcinoma cell line HCT-116 (ATCC) was cultivated in DMEM without pyruvate (Gibco #41965-039) supplemented with 10% of heat inactivated fetal calf serum (Gibco #10270106), 100 U/ml of penicillin, and 100 µg/ml of streptomycin (Gibco #15140122) at 37°C and 5% CO_2 in a humidified atmosphere. The medium was renewed 3 times a week. Cells were regularly tested (every two weeks) for mycoplasma contamination using the MycoAlert Mycoplasma detection kit (Lonza #LT07-118, Basel, Switzerland).

Reconstruction of a human 3D dermal substitute. Human dermal tissues were generated following the tissue-engineering self-assembly approach as previously described [33,34]. Cells were cultivated four weeks in cell culture medium supplemented with 50 µg/ml of ascorbic acid (Sigma #A4034). Three days before experiments, cell medium was replaced by DMEM without pyruvate (Gibco #41965-039) supplemented with 10% of heat inactivated fetal calf serum (Gibco #10270106), 100 U/ml of penicillin, and 100 µg/ml of streptomycin (Gibco #15140122).

Tissue exposure to CAP. Four-weeks-old dermal substitutes in 24-well plates were exposed to the plasma jet for either 30 s or 2 min in presence of 600 µl of fresh complete (10% fetal calf serum + antibiotics) DMEM without pyruvate (Gibco #41965-039). Exposure during 2 min to helium gas at 3 L/min alone and no exposure were settled as control conditions. Evaporation of 20 µl of cell culture medium was quantified (3% of total volume) after 2 min exposure to either plasma or helium alone (data not shown). This volume loss was not compensated during experiments. The distance between plasma jet tube output and samples was set and fixed at 2 cm for every experimental conditions.

Quantification of tissue hydroxyproline content. Total hydroxyproline content of dermal substitutes was measured up to five days after cold plasma exposure using the Hydroxyproline Assay Kit (Sigma #MAK008) according to the manufacturer's protocol. The absorbance was read on plate reader Synergy H1 (BioTek, Winooski, VT, USA).

Quantification of metalloproteinases activity. Quantification of global MMPs activity in the supernatants was carried out using a SensoLyte 520 Generic MMP Assay Kit *fluorimetric* (Anaspec #AS-71158, Fremont, CA, USA) without chemical prior-activation, allowing detecting simultaneously the activity of MMP-1, 2, 3, 7, 8, 9, 12, 13 and 14. Fluorescence (λexc = 490 nm, λem = 520 nm) was read on plate reader Synergy H1 (BioTek) in black 96-well plate.

ELISA quantifications. Four-weeks-old dermal substitutes were treated and cultivated in 600 µl of cell culture medium. Supernatants were harvested at different time points (6h, 24h, 48h) after cold-plasma exposure and stocked at -80°C to be used within a week. ELISA kits were used strictly according to manufacturer's protocols: human Pro-Collagen I alpha 1 DuoSet ELISA kit (R&D systems, #DY008, Minneapolis, MN, USA), human MMP-1 (ELISA Genie, #HUFI00205, Dublin, Ireland) and the absorbance was read using a plate reader Synergy H1 (BioTek).

Spheroid generation and plasma treatment. 500 HCT-116 cells were seeded in ultralow attachment 96-well plates with a round bottom (Corning, ThermoFisher Scientific) and allowed to grow for 5 days in DMEM without pyruvate (Gibco #41965-039) supplemented with 10% of heat inactivated fetal calf serum (Gibco #10270106), 100 U/ml of penicillin, and 100 µg/ml of streptomycin (Gibco #15140122) as previously described [35]. On the day of treatment, 600 µl of fresh complete (10% fetal calf serum + antibiotics) DMEM without pyruvate were exposed to the plasma jet for 30 s or 2 min. Cell culture

medium was removed from the wells containing spheroids and replaced by 100 µl of this exposed medium. Exposure of DMEM for 2 min to helium gas alone and no exposure were settled as control conditions.

Spheroid analysis: growth curve, apoptosis, plasma membrane integrity and intracellular ATP quantification. Spheroids' growth was followed by taking photographs before treatment and each day after treatment for 4 days, without cell culture medium changing. Spheroids' area was measured using ImageJ software (NIH, Bethesda, MD, USA) as previously described [36–38]. Cell death by apoptosis was visualized in spheroids treated with plasma by adding NucView 488 Caspase-3 Substrate (Biotium #10402, San Francisco, CA, USA) to each well 2h after plasma treatment. Plasma membrane integrity of cells within spheroids was assessed by adding 100 µM of propidium iodide (Sigma-Aldrich #P4170) to each well 24h after plasma treatment. Propidium iodide fluorescence (λex = 493; λem = 636 nm) was detected by fluorescence microscopy and images were analyzed using ImageJ software. Finally, number of viable cells per spheroid 4 days after treatments was determined by intracellular ATP quantification using CellTiter-Glo® 3D Cell Viability Assay (Promega, #G9681) according to the manufacturer's instructions. Luminescence was read using a plate reader Synergy H1 (BioTek).

Statistical analyses. Data analysis was performed using GraphPad Prism 8 program (GraphPad Software, Inc., La Jolla, CA, USA) and individual data were plotted and expressed as mean ± SEM (standard error to the mean). If not indicated otherwise in the legend of the figures, the data have been statistically analyzed using one-way analysis of variance (ANOVA) followed by Dunnett's post-test to compare every condition to the gas alone reference. Statistics are expressed relative to the control condition (0 V/cm). ns, non-significant; *, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$; ***, $p < 0.001$; ****, $p < 0.0001$.

RESULTS AND DISCUSSION

Concentrations of RONS increased with the exposure time to helium plasma jet. During interaction between plasma and liquid, RONS are generated [39,40]: short life-time reactive species such as nitric oxide (NO), hydroxyl radical ($OH^{\bullet}$) or superoxide anion radical ($O2^{\bullet -}$) which need specific physico-chemical technics like chemical dosimetry or electron paramagnetic resonance spectroscopy to be quantified, and hydrogen peroxide (H_2O_2), nitrites (NO_2^-) and nitrates (NO_3^-) which are long-lived RONS. Their long lifetime allows them to be easily quantified in the plasma-treated cell culture medium using commercially available kits. Since pyruvate is known to play a key role in cell response to plasma because of its anti-oxidative properties [41], we used for all experiments pyruvate-free cell culture medium. H_2O_2, NO_2^- and NO_3^- were quantified in cell culture medium (600µl in a well of a 24-well plate) immediately after exposure to helium plasma jet (Figure 1). H_2O_2 concentration increased with the exposure time to plasma jet (Figure 1A). Indeed, hydrogen peroxide concentration was 14.31 ± 0.17 µM and 11.28 ± 0.5 µM respectively for 120 and 30 s plasma exposure. As for H_2O_2, the concentration of nitrite and nitrate anions increases with exposure time to plasma. The nitrite concentration was 31.36 ± 0.4 µM for 2 min plasma exposure and 9.1 ± 0.19 µM for 30 s plasma exposure (Figure 1B), and nitrate concentration was 36.20 ± 0.58µM for 2 min plasma exposure and 9.15 ± 0.41 µM for 30 s plasma exposure (Figure 1C). No significant amount of RONS was quantified in both the non-exposed control condition and after 2 min of exposure to helium gas alone. This accumulation of RONS during increasing time of exposure was largely documented in the literature [32,42,43]. We had previously quantified H_2O_2, NO_2^- and NO_3^- produced using a similar experimental helium plasma jet set up by treating 100 µl of the same cell culture medium in a well of a 96-well plate [44]. Under this configuration, 2 min exposure led to a production of 1.2 mM of H_2O_2 and 450 µM of NO_2^-. Since we used the same helium plasma jet device in our previous published study and this one, this underlines the importance of the experimental conditions in the production and maintenance of RONS generated by helium plasma jet.

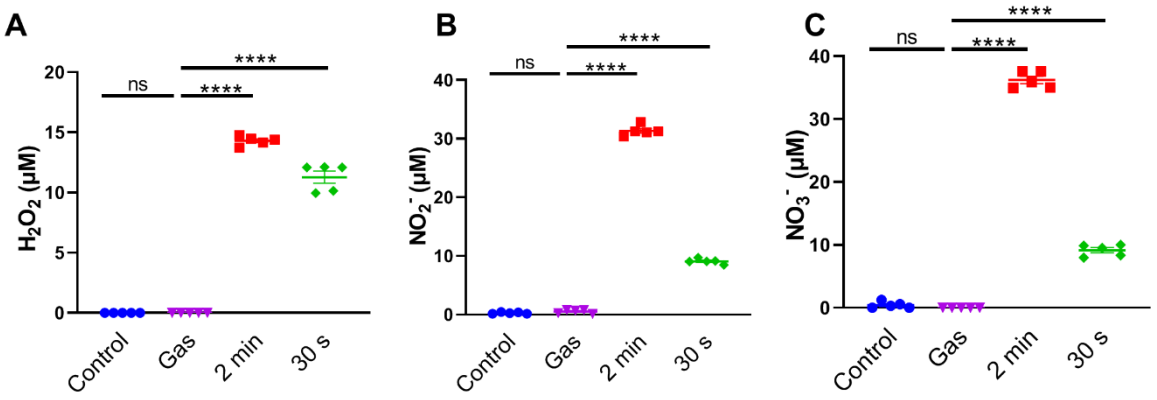


Figure 1 : RONS concentrations increase with the exposure time to helium plasma jet in pyruvate-free cell culture medium. A. Hydrogen peroxide **B.** Nitrite anion **C.** Nitrate anion. Control condition (●), gas alone 2 min (▼), plasma 2 min (■), plasma 30 s (◆). n=5. ****, $p < 0.001$.

Helium-CAP did not affect dermal collagen content in healthy dermal tissue rich in endogenous extracellular matrix. To study the direct effect of cold plasma on the ECM remodeling, we used a sophisticated model of human dermis substitute produced by tissue engineering using the self-assembly approach [45]. This human dermal tissue substitute is totally devoid of exogenous material but is rich in endogenous ECM proteins as demonstrated by proteomic analyses [46]. In particular, the fibril-forming collagen types I, III and V are the major components of the extracellular matrix in the model [46], which demonstrates its complex composition and its similarity to the composition of the native dermis in human skin [47]. This endogenous extracellular matrix revealed to be of utmost importance in providing to this dermal tissue model biomechanical properties closed to those of the native dermis [48]. It appears that self-assembled human dermal substitutes are a valuable tool to investigate the effects of CAP on the collagens. The collagen fibers were characterized within the model by complementary microscopy approaches. Electron microscopy and second harmonic generation showed the typical supramolecular assembly of the collagen fibers (Figure 2). As expected [49], transmission electron microscopy underlined that dermal fibroblasts exhibited an elongated shape with a dense endoplasmic reticulum due to high secretory activity, and abundant exocytosis vesicles secreting collagens in the extracellular space, as shown on the transversal and longitudinal sections of the dermal substitute (Figure 2).

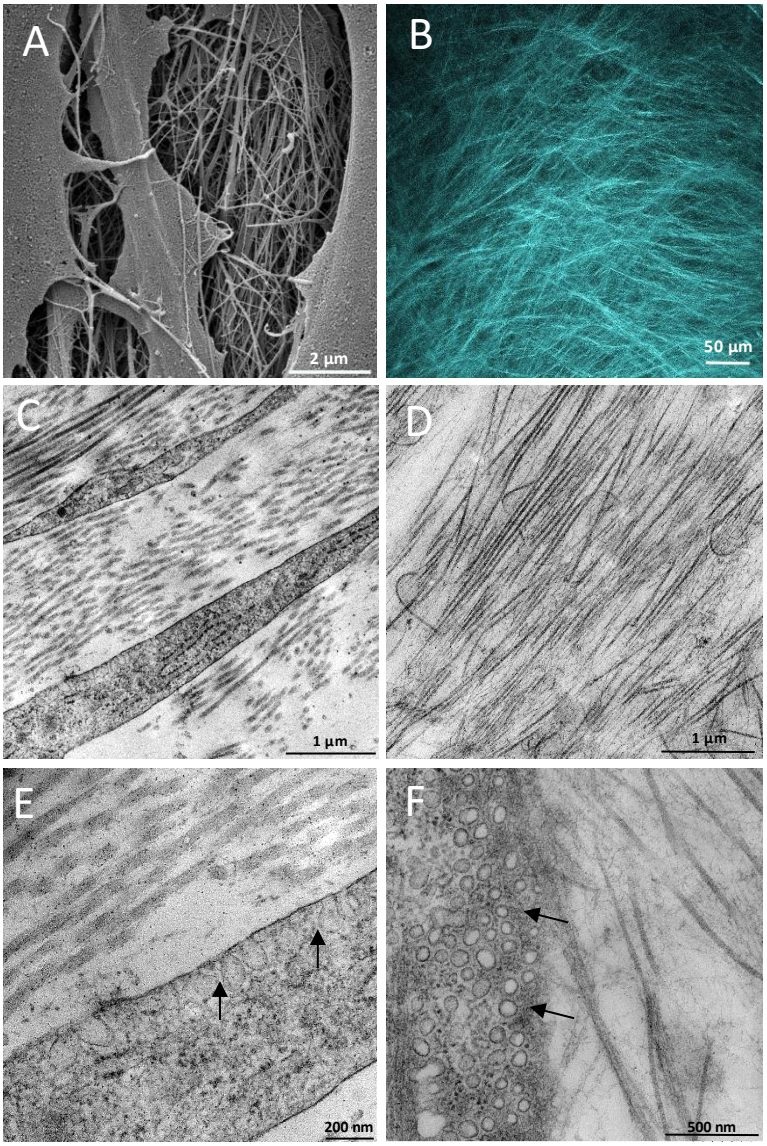


Figure 2: The tissue-engineered human dermal substitute is rich in endogenous collagens. A. Top surface of the dermal substitute observed by scanning electron microscopy **B**. Second Harmonic Generation (SHG) signal (in cyan) detected in fresh dermal substitute by two-photon microscopy. **C.** Transversal and **D.** Longitudinal section of collagens fibers in the dermal substitute. **E**. Transversal and **F.** Longitudinal section of a dermal substitute (arrows indicate exocytosis vesicles in fibroblasts).

To analyze effect of plasma on dermal collagen remodeling, human dermal substitutes were CAP-treated in 600µl of fresh pyruvate-free cell culture medium for either 30 s or 2 min. Note that cell culture medium was not renewed after exposure to CAP, meaning that dermal substitutes were exposed to CAP and then cultivated in the same medium. Exposure during 2 min to helium alone, and no exposure were settled as control conditions. The “gas alone” condition was set as the reference to statistically analyze data in plasma-treated conditions. The experimental set-up is outlined in figure 3A. Firstly, the maintenance of cell viability was checked in dermal substitutes 24 h after CAP-treatment, showing a lack of deleterious effect of the

treatment on skin fibroblasts and the sub-lethal range of CAP-treatment (Figure 3B). Then, collagen I being the major dermal collagen [47], procollagen Iα1 secretion was quantified in the supernatant up to 48 h after the treatment. Results showed no statistical differences in procollagen Iα1 secretion compared to the gas alone reference condition over 48 h (Figure 3C). To go further, the global collagen content within the dermal substitute was determined by chemical measurement of a collagen specific amino acid, namely hydroxyproline [50]. The results obtained indicated that CAP-treatment did not affect the global collagen content in the dermal substitute over 4 days after treatment (Figure 3D). MMPs are key players in the remodeling and maintenance of the ECM [51]. MMPs are known to be activated in response to exogenous signals such as low pH, heat, and reactive oxygen species [51,52]. Because plasma jets are recognized to be RONS generators, we quantified global MMPs activity in the supernatants by fluorimetry. Contrary to what was expected and despite the presence of numerous RONS in the CAP treated culture medium (Figure 1), MMPs' activity was not statistically modified over 48 h by plasma treatment (Figure 3E). To go further, we quantified by ELISA the amount of MMP-1 protein, also named collagenase, which is known to degrade types I, III, and V fibrillar collagens. A transient increase in MMP-1 amount was observed 6 h after the plasma treatments (Figure 3F), independent of RONS and plasma exposure since even the gas alone condition displayed this increase. CAP-treatment induced no statistical difference in MMP-1 concentration over 48 h when compared to the gas alone reference.

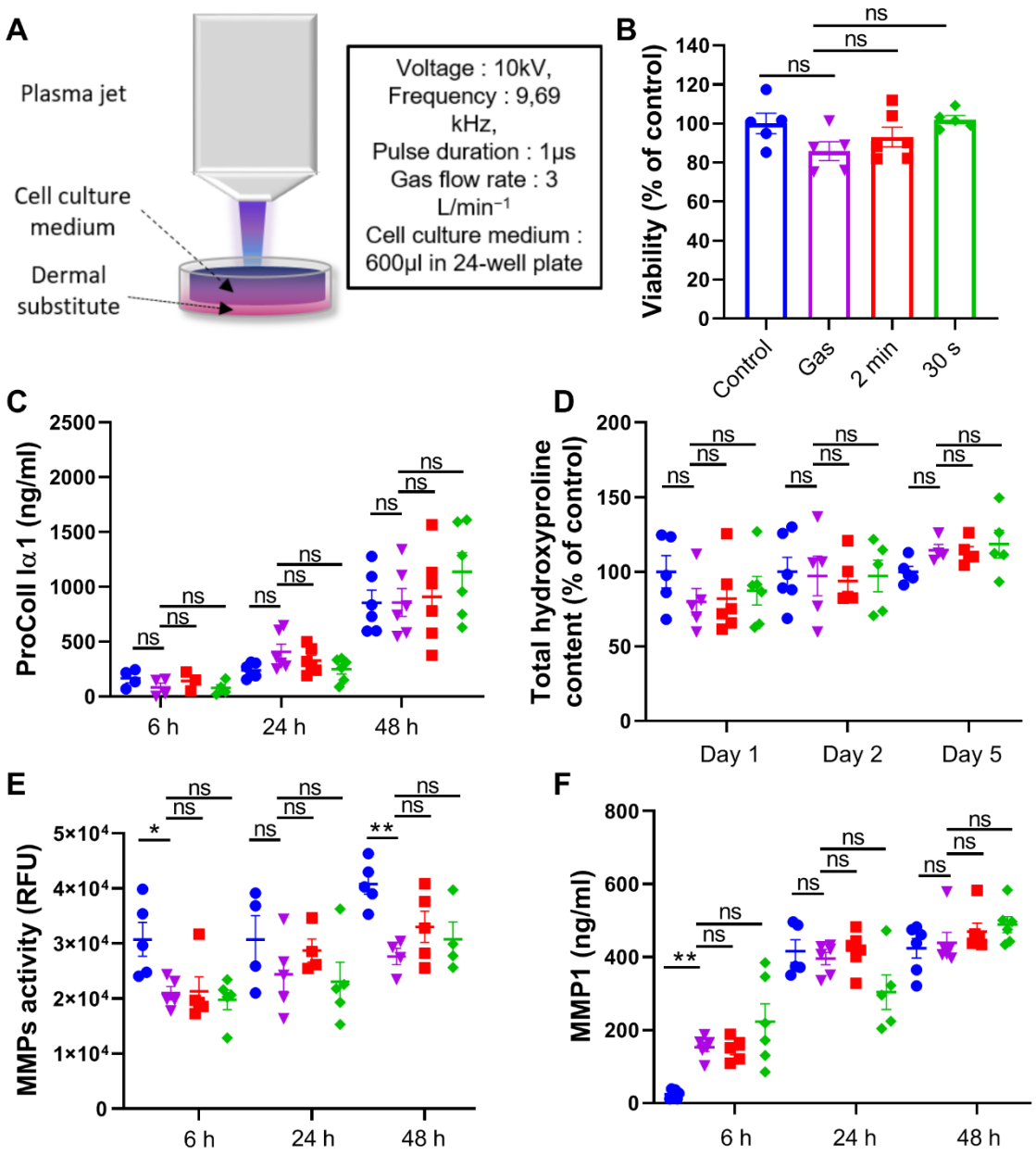


Figure 3: Sub-lethal cold helium plasma jet treatment does not affect collagen content in dermal substitutes. A. Experimental set-up for CAP-treatment of dermal substitutes. **B.** Cell viability in the dermal substitute determined with PrestoBlue assay 24h after cold plasma treatment, (n≥4 dermal substitutes) **C.** Dosage by ELISA of secreted pro-collagen Iα1 in supernatants, (n≥4 dermal substitutes) **D**. Hydroxyproline content in the whole dermal substitute measured over the time after cold plasma treatment, (n≥4 dermal substitutes). **E.** MMPs activity quantified by fluorimetry, (n≥4 dermal substitutes). **F**. Expression of MMP-1 quantified by ELISA in dermal substitute supernatants, (n≥4 dermal substitutes). Control condition (●), gas alone 2 min (▼), plasma 2 min (■), plasma 30 s (◆).

To the best of our knowledge, a few studies assessed the effect of CAP on ECM components, although this notion is becoming increasingly important, especially in the context of anti-cancer applications *via* the targeting of the tumor microenvironment [26]. CAP treatment of extracted bovine type I collagen, either in dry state [53] or in solution [54], induced its oxidation and structure denaturation in acellular context. CAP surface treatment of acellular 3D dermis substitute enhanced the *in vitro* angiogenesis process and accelerated the neovascularization when transplanted into mouse back skin [55]. In 2D monolayer cell culture, a transient increase in mRNA level of collagen I has been observed 6 h after skin fibroblasts were treated for 2 min with an argon-based plasma jet device while MMP-9 gelatinase protein was undetectable in cell culture supernatant [15], despite a moderate (1.4 fold) induction at mRNA level [17]. Air-based CAP treatment of human osteoblast-like MG63 osteosarcoma cells upregulated the expression of collagen I both at the mRNA and protein level, together with a moderate but statistically significant increase of MMP-1 expression and secretion [56]. Likewise, collagen I gene and protein expression was elevated by treatment of murine dental cementoblasts [57]. CAP treatment of human periodontal ligament cells was also shown to enhance the expression of collagen I and MMP-1 [58]. A study by Schmidt *et al* demonstrated that *in vitro* exposure of murine primary dermal fibroblasts to Argon plasma decreased cell viability but promoted mobility by regulation of transmembrane receptors and actin cytoskeleton [59]. Most of the *in vitro* studies were led using acellular models and cells grown in monolayers, which not fully mimics the dynamic and reciprocal interactions between cells and ECM components. That is why we believe that our *in vitro* 3D human dermal substitute produced by tissue-engineering revealed to be a useful model to better understand the effects of CAP on the ECM remodeling at tissue scale. Further work will be necessary to clarify the effect of each individual mode of CAP generation and decipher the optimal conditions of use.

Published results about *in vivo* plasma exposure and ECM remodeling should be mentioned. One minute argon micro-plasma treatment was shown to promote wound healing in a murine laser-induced partial thickness skin wound and to reduce the protein level of MMP-3 in the wound bed [60]. Using a full-thickness dermal wound in mice ears, Schmidt et al demonstrated that argon cold plasma promoted wound closure depending on treatment time, with a better efficacy after only 3 s of exposure [61]. The same group recently demonstrated using the same model that a daily repeated 3 s treatment with argon plasma transiently and significantly increased mRNA and protein levels of collagens *COL1A1* and *COLIV,* and up-regulated *MMP2 and MT1-MMP mRNA expression while TIMP2 mRNA was down-regulated* [59].

Finally, Shi *et al*. proposed a dose-dependent effect of CAP where low doses of plasma enhanced fibroblast viability and collagen synthesis while high doses displayed the opposite effects [62]. A reason for the discrepancy between most of these data and our results could be the difference in either the cell types used, the mode of CAP generation (air-, argon- *versus* helium-generated) or the treatment settings (duration, intensity, etc.). In our experiments, we applied two different times of exposure in order to generate distinct

levels of oxidative stress, keeping in mind not to kill the cells meaning staying in the sub-lethal range. Although this threshold theory makes sense, it seemed that our experimental conditions (30 s and 2 min exposure to CAP) did not allow to enter this effective range. Our preliminary tests applying longer time exposure to CAP (i.e 4 min) led to significant cell death induction in the dermal substitute tissue which appeared not optimal to study extracellular matrix remodeling.

In our experimental set up, dermal substitutes were exposed to CAP in 24-well plates while covered by 600 µl of pyruvate-free cell culture medium, and no effects were observed in terms of extracellular matrix remodeling. In the following experiments, we planned to verify the well-documented anticancer effect of PAM generated under quasi-similar conditions. Thus, 600 µl of pyruvate-free culture medium were exposed to CAP in 24-well plates, producing PAM, of which 100 µl were then immediately deposited onto human 3D tumor spheroids. The objective, even if the spheroids exposed to PAM were not exposed to the direct effects of CAP (UV radiation, heating, electric field...) was to verify that in these quasi-similar conditions, the plasma treatment presented efficient therapeutic antitumor effects. The results of these second batch of experiments would allow to reinforce the conclusion that cold helium plasma does not stimulate collagen remodeling in a 3D human dermal substitute.

Plasma-activated medium induced apoptosis in tumor spheroids. The antitumor effects of plasma activated media have already been largely demonstrated by others [9,10,12,26] and by ourselves with similar helium plasma jet experimental set up [63,38]. However, the concentration of RONS generated in our experimental set-up was much lower than those usually observed. For this reason, antitumor properties of this plasma treated medium were checked onto a 3D tumor spheroid model composed of human colorectal tumor HCT-116 cells. Spheroids were immersed in plasma-treated or control cell culture medium and their macroscopic aspect was monitored by bright-field microscopy 24 h after treatment (Figure 4A). Spheroid integrity was preserved when exposed over 24 h to medium treated with helium only (gas alone) and 30s plasma-exposed medium, as compared to the control condition. In contrast, when exposed to medium treated with plasma during 2 min, the spheroids started to disintegrate allowing to distinguish a crown of detached cells surrounding the spheroid core. At this time-point, apoptosis and plasma membrane integrity in the spheroids were monitored looking at caspases 3/7 activity (green) and propidium iodide (red) penetration (Figure 4A), respectively. Spheroids were treated with staurosporine, as a positive control for cell death induction. It clearly appears that plasma treatments induced apoptosis in the spheroids, particularly when these were exposed to 2 min plasma-treated medium and to a lesser extent with 30 s plasma-treated medium. Concomitantly, loss of plasma membrane integrity was observed in the crown of detached cells in the 2 min treatment condition, and marginally in the 30 s treatment condition. Spheroids' growth was then followed during 4 days by taking photographs before treatment and each day after, without medium replacement. Spheroid growth was delayed by 2 min plasma-treated medium only (Figure 4B), with about 30% loss of cell

number 4 days after the treatment (Figure 4C). Therefore, we confirmed the *in vitro* anti-tumor effect of plasma activated medium generated with a cold atmospheric helium plasma jet in our experimental conditions. These data showing that PAM, in our experimental conditions, reduced growth of tumor cells, reinforce the conclusion that CAP-treatment does not induce or stimulate ECM remodeling, at least in a 3D human dermal substitute.

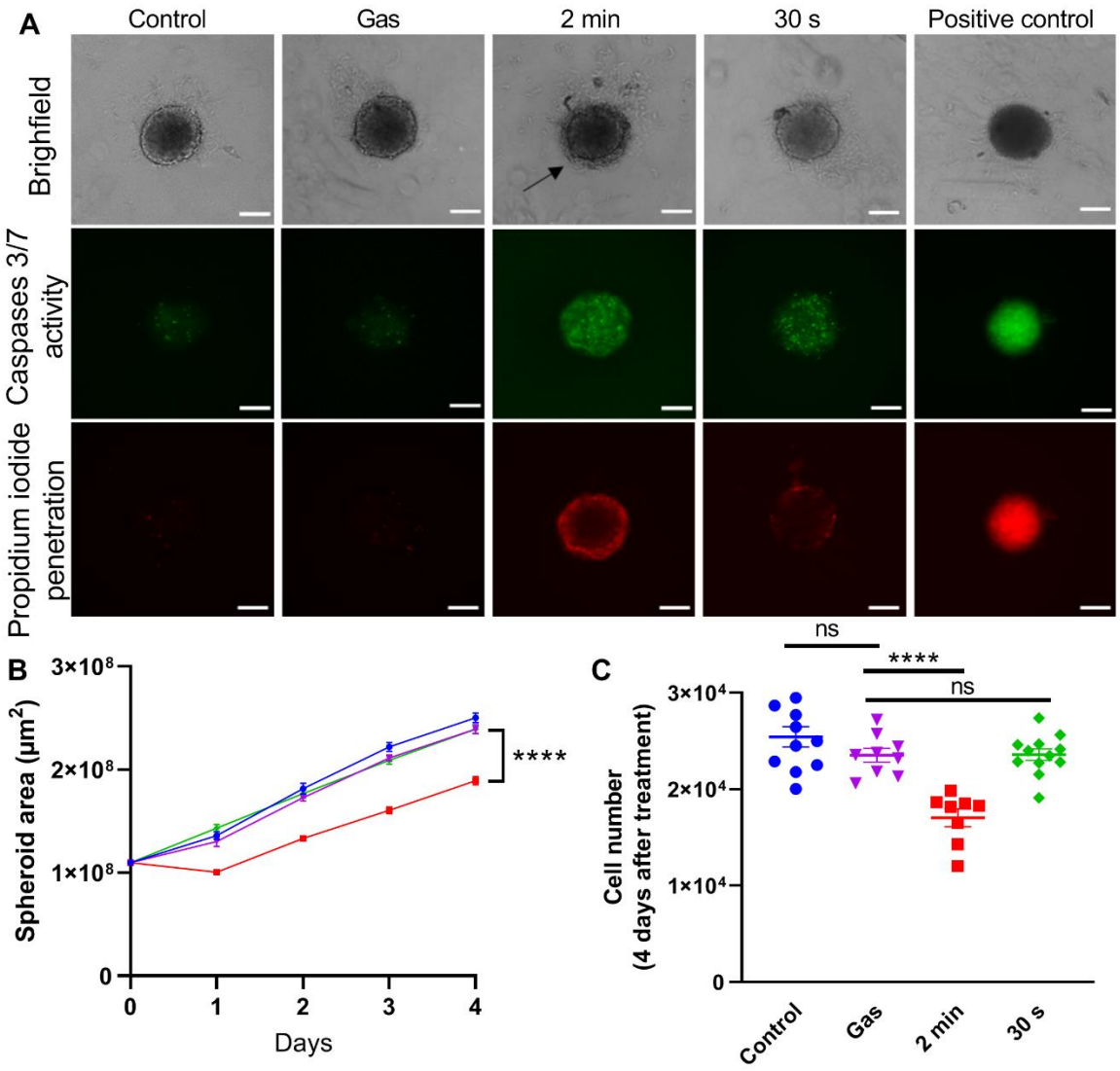


Figure 4 : HCT-116 spheroid growth is delayed by PAM-treatment through apoptosis induction. A. Spheroid macroscopic aspect, apoptosis (Caspases 3/7 activity, green) and loss of plasma membrane integrity (propidium iodide penetration, red) were observed 24h after PAM-treatment. Arrow indicates a crown of detached cells. 1 µM of staurosporine was used as a positive control for cell death induction. Scale bar: 200 µm. **B.** Spheroids growth over four days after plasma treatment (each growth curve represents mean values ± SEM corresponding to n ≥ 9 spheroids). Data have been statistically analysed using 2-way ANOVA followed by Dunnett's post-test to compare every condition to the gas alone reference. Control condition (●), gas alone 2min (▼), plasma 2 min (■), plasma 30 s

(◆). ****, $p < 0.001$. **C.** Number of cells per spheroid measured via intracellular ATP quantification 4 days after plasma treatment, (n ≥ 9 spheroids, coming from the same experiment presented in B). Control condition (●), gas alone 2min (▼), plasma 2 min (■), plasma 30 s (◆). ****, $p < 0.001$. Same colour code as in B.

CONCLUSION

This study aimed to determine the effect of CAP on skin collagens using an original tissue-engineered human dermal substitute model rich in endogenous extracellular matrix. The type of plasma used in the present study is helium plasma jet based on dielectric barrier discharge configuration generated by pulsed power supply. This work highlights that after helium CAP treatment no major modification in extracellular matrix remodeling occurred at dermal tissue scale, despite the inhibitory effect of the tumor growth of the treatment.

ACKNOWLEDGEMENTS

This research was partially funded and performed in the scope of HAPPYBIO GDR. We would like to thank Dr Elisabeth Bellard for her valuable help for the Second Harmonic Generation imaging on TRI-Genotoul platform (Toulouse, France).

AUTHOR CONTRIBUTIONS

SG: Investigation, Formal Analysis, Visualization, Validation, Interpretation of data, Writing; AM: Investigation, Formal Analysis, Visualization, Interpretation of data, Writing; PV: Conceptualization, Interpretation of data, Writing; IF: Visualization; MS: Conceptualization, Interpretation of data, Writing; NM: Conceptualization, Interpretation of data, Writing; LG: Conceptualization, Interpretation of data, Writing, Funding acquisition, Supervision.

CONFLICTS OF INTEREST

The authors declare no conflict of interest. The funders had no role in the design of the study; in the collection, analyses, or interpretation of data; in the writing of the manuscript, or in the decision to publish the results.

REFERENCES

[1] S. Arndt, A. Schmidt, S. Karrer, T. von Woedtke, Comparing two different plasma devices kINPen and Adtec SteriPlas regarding their molecular and cellular effects on wound healing, Clin. Plasma Med. 9 (2018) 24–33. https://doi.org/10.1016/j.cpme.2018.01.002.

[2] D.B. Graves, The emerging role of reactive oxygen and nitrogen species in redox biology and some implications for plasma applications to medicine and biology, J. Phys. Appl. Phys. 45 (2012) 263001. https://doi.org/10.1088/0022-3727/45/26/263001.
[3] A. Privat-Maldonado, A. Schmidt, A. Lin, K.-D. Weltmann, K. Wende, A. Bogaerts, S. Bekeschus, ROS from Physical Plasmas: Redox Chemistry for Biomedical Therapy, Oxid. Med. Cell. Longev. 2019 (2019) 9062098. https://doi.org/10.1155/2019/9062098.
[4] K.-D. Weltmann, T. von Woedtke, Plasma medicine—current state of research and medical application, Plasma Phys. Control. Fusion. 59 (2017) 014031. https://doi.org/10.1088/0741-3335/59/1/014031.
[5] G. Daeschlein, M. Napp, S. Lutze, A. Arnold, S. von Podewils, D. Guembel, M. Jünger, Skin and wound decontamination of multidrug-resistant bacteria by cold atmospheric plasma coagulation, JDDG J. Dtsch. Dermatol. Ges. 13 (2015) 143–149. https://doi.org/10.1111/ddg.12559.
[6] G. Daeschlein, T. von Woedtke, E. Kindel, R. Brandenburg, K.-D. Weltmann, M. Jünger, Antibacterial Activity of an Atmospheric Pressure Plasma Jet Against Relevant Wound Pathogens in vitro on a Simulated Wound Environment, Plasma Process. Polym. 7 (2010) 224–230. https://doi.org/10.1002/ppap.200900059.
[7] M.J. Nicol, T.R. Brubaker, B.J. Honish, A.N. Simmons, A. Kazemi, M.A. Geissel, C.T. Whalen, C.A. Siedlecki, S.G. Bilén, S.D. Knecht, G.S. Kirimanjeswara, Antibacterial effects of low-temperature plasma generated by atmospheric-pressure plasma jet are mediated by reactive oxygen species, Sci. Rep. 10 (2020) 3066. https://doi.org/10.1038/s41598-020-59652-6.
[8] M. Izadjoo, S. Zack, H. Kim, J. Skiba, Medical applications of cold atmospheric plasma: state of the science, J. Wound Care. 27 (2018) S4–S10. https://doi.org/10.12968/jowc.2018.27.Sup9.S4.
[9] M. Wang, B. Holmes, X. Cheng, W. Zhu, M. Keidar, L.G. Zhang, Cold Atmospheric Plasma for Selectively Ablating Metastatic Breast Cancer Cells, PLOS ONE. 8 (2013) e73741. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0073741.
[10] K.R. Liedtke, S. Bekeschus, A. Kaeding, C. Hackbarth, J.-P. Kuehn, C.-D. Heidecke, W. von Bernstorff, T. von Woedtke, L.I. Partecke, Non-thermal plasma-treated solution demonstrates antitumor activity against pancreatic cancer cells in vitro and in vivo, Sci. Rep. 7 (2017) 8319. https://doi.org/10.1038/s41598-017-08560-3.
[11] N. Kaushik, N. Uddin, G.B. Sim, Y.J. Hong, K.Y. Baik, C.H. Kim, S.J. Lee, N.K. Kaushik, E.H. Choi, Responses of Solid Tumor Cells in DMEM to Reactive Oxygen Species Generated by Non-Thermal Plasma and Chemically Induced ROS Systems, Sci. Rep. 5 (2015). https://doi.org/10.1038/srep08587.
[12] K. Saito, T. Asai, K. Fujiwara, J. Sahara, H. Koguchi, N. Fukuda, M. Suzuki-Karasaki, M. Soma, Y. Suzuki-Karasaki, Tumor-selective mitochondrial network collapse induced by atmospheric gas plasma-activated medium, Oncotarget. 7 (2016) 19910–19927. https://doi.org/10.18632/oncotarget.7889.
[13] E. Griseti, J. Kolosnjaj-Tabi, L. Gibot, I. Fourquaux, M.-P. Rols, M. Yousfi, N. Merbahi, M. Golzio, Pulsed Electric Field Treatment Enhances the Cytotoxicity of Plasma-Activated Liquids in a Three-Dimensional Human Colorectal Cancer Cell Model, Sci. Rep. 9 (2019). https://doi.org/10.1038/s41598-019-44087-5.
[14] S. Bekeschus, G. Liebelt, J. Menz, J. Berner, S.K. Sagwal, K. Wende, K.-D. Weltmann, L. Boeckmann, T. von Woedtke, H.-R. Metelmann, S. Emmert, A. Schmidt, Tumor cell metabolism correlates with resistance to gas plasma treatment: The evaluation of three dogmas, Free Radic. Biol. Med. 167 (2021) 12–28. https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2021.02.035.
[15] S. Arndt, P. Unger, E. Wacker, T. Shimizu, J. Heinlin, Y.-F. Li, H.M. Thomas, G.E. Morfill, J.L. Zimmermann, A.-K. Bosserhoff, S. Karrer, Cold Atmospheric Plasma (CAP) Changes Gene Expression of Key Molecules of the Wound Healing Machinery and Improves Wound Healing In Vitro and In Vivo, PLoS ONE. 8 (2013) e79325. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0079325.
[16] S. Arndt, M. Landthaler, J.L. Zimmermann, P. Unger, E. Wacker, T. Shimizu, Y.-F. Li, G.E. Morfill, A.-K. Bosserhoff, S. Karrer, Effects of Cold Atmospheric Plasma (CAP) on ß-Defensins,

Inflammatory Cytokines, and Apoptosis-Related Molecules in Keratinocytes In Vitro and In Vivo, PLOS ONE. 10 (2015) e0120041. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0120041.
[17] S. Arndt, P. Unger, M. Berneburg, A.-K. Bosserhoff, S. Karrer, 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, J. Dermatol. Sci. 89 (2018) 181–190. https://doi.org/10.1016/j.jdermsci.2017.11.008.
[18] C. Duchesne, S. Banzet, J.-J. Lataillade, A. Rousseau, N. Frescaline, Cold atmospheric plasma modulates endothelial nitric oxide synthase signalling and enhances burn wound neovascularisation, J. Pathol. 0 (2019). https://doi.org/10.1002/path.5323.
[19] S. Hasse, T.D. Tran, O. Hahn, S. Kindler, H.-R. Metelmann, T. von Woedtke, K. Masur, Induction of proliferation of basal epidermal keratinocytes by cold atmospheric-pressure plasma, Clin. Exp. Dermatol. 41 (2016) 202–209. https://doi.org/10.1111/ced.12735.
[20] A. Barton, K. Wende, L. Bundscherer, S. Hasse, A. Schmidt, S. Bekeschus, K.-D. Weltmann, U. Lindequist, K. Masur, Nonthermal Plasma Increases Expression of Wound Healing Related Genes in a Keratinocyte Cell Line, Plasma Med. 3 (2013) 125–136. https://doi.org/10.1615/PlasmaMed.2014008540.
[21] B. Haertel, T. von Woedtke, K.-D. Weltmann, U. Lindequist, Non-thermal atmospheric-pressure plasma possible application in wound healing, Biomol. Ther. 22 (2014) 477–490. https://doi.org/10.4062/biomolther.2014.105.
[22] N. Frescaline, C. Duchesne, M. Favier, R. Onifarasoaniaina, T. Guilbert, G. Uzan, S. Banzet, A. Rousseau, J.-J. Lataillade, Physical plasma therapy accelerates wound re-epithelialisation and enhances extracellular matrix formation in cutaneous skin grafts, J. Pathol. n/a (n.d.). https://doi.org/10.1002/path.5546.
[23] P. Olczyk, Ł. Mencner, K. Komosinska-Vassev, The Role of the Extracellular Matrix Components in Cutaneous Wound Healing, BioMed Res. Int. 2014 (2014) e747584. https://doi.org/10.1155/2014/747584.
[24] C. Bonnans, J. Chou, Z. Werb, Remodelling the extracellular matrix in development and disease, Nat. Rev. Mol. Cell Biol. 15 (2014) 786–801. https://doi.org/10.1038/nrm3904.
[25] B. Kunkemoeller, T.R. Kyriakides, Redox Signaling in Diabetic Wound Healing Regulates Extracellular Matrix Deposition, Antioxid. Redox Signal. 27 (2017) 823–838. https://doi.org/10.1089/ars.2017.7263.
[26] A. Privat-Maldonado, C. Bengtson, J. Razzokov, E. Smits, A. Bogaerts, Modifying the Tumour Microenvironment: Challenges and Future Perspectives for Anticancer Plasma Treatments, Cancers. 11 (2019). https://doi.org/10.3390/cancers11121920.
[27] P. Eisenhauer, N. Chernets, Y. Song, D. Dobrynin, N. Pleshko, M.J. Steinbeck, T.A. Freeman, Chemical modification of extracellular matrix by cold atmospheric plasma-generated reactive species affects chondrogenesis and bone formation, J. Tissue Eng. Regen. Med. 10 (2016) 772–782. https://doi.org/10.1002/term.2224.
[28] M. Madi, M.-P. Rols, L. Gibot, Gene Electrotransfer in 3D Reconstructed Human Dermal Tissue, Curr. Gene Ther. 16 (2016) 75–82.
[29] L. Gibot, T. Galbraith, J. Huot, F.A. Auger, Development of a tridimensional microvascularized human skin substitute to study melanoma biology, Clin. Exp. Metastasis. 30 (2013) 83–90. https://doi.org/10.1007/s10585-012-9511-3.
[30] A. Page-McCaw, A.J. Ewald, Z. Werb, Matrix metalloproteinases and the regulation of tissue remodelling, Nat. Rev. Mol. Cell Biol. 8 (2007) 221–233. https://doi.org/10.1038/nrm2125.
[31] M. Yousfi, O. Eichwald, N. Merbahi, Analysis of ionization wave dynamics in low-temperature plasma jets from fluid modeling supported by experimental investigations, Plasma Sources Sci. Technol. - PLASMA SOURCES SCI TECHNOL. 21 (2012). https://doi.org/10.1088/0963-0252/21/4/045003.

[32] J. Chauvin, F. Judée, M. Yousfi, P. Vicendo, N. Merbahi, Analysis of reactive oxygen and nitrogen species generated in three liquid media by low temperature helium plasma jet, Sci. Rep. 7 (2017) 1–15. https://doi.org/10.1038/s41598-017-04650-4.
[33] L. Gibot, T. Galbraith, J. Bourland, A. Rogic, M. Skobe, F.A. Auger, Tissue-engineered 3D human lymphatic microvascular network for in vitro studies of lymphangiogenesis, Nat. Protoc. 12 (2017) 1077.
[34] M. Madi, M.-P. Rols, L. Gibot, Efficient In Vitro Electropermeabilization of Reconstructed Human Dermal Tissue, J. Membr. Biol. 248 (2015) 903–908. https://doi.org/10.1007/s00232-015-9791-z.
[35] L. Gibot, M.-P. Rols, 3D spheroids' sensitivity to electric field pulses depends on their size, J. Membr. Biol. 246 (2013) 745–750. https://doi.org/10.1007/s00232-013-9535-x.
[36] U. Till, L. Gibot, C. Mingotaud, P. Vicendo, M.-P. Rols, M. Gaucher, F. Violleau, A.-F. Mingotaud, Self-assembled polymeric vectors mixtures: characterization of the polymorphism and existence of synergistic effects in photodynamic therapy, Nanotechnology. 27 (2016) 315102. https://doi.org/10.1088/0957-4484/27/31/315102.
[37] S.K. Frandsen, L. Gibot, M. Madi, J. Gehl, M.-P. Rols, Calcium Electroporation: Evidence for Differential Effects in Normal and Malignant Cell Lines, Evaluated in a 3D Spheroid Model, PloS One. 10 (2015) e0144028. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0144028.
[38] J. Chauvin, L. Gibot, E. Griseti, M. Golzio, M.-P. Rols, N. Merbahi, P. Vicendo, Elucidation of in vitro cellular steps induced by antitumor treatment with plasma-activated medium, Sci. Rep. 9 (2019) 4866–4866. https://doi.org/10.1038/s41598-019-41408-6.
[39] J.-S. Oh, E.J. Szili, N. Gaur, S.-H. Hong, H. Furuta, R.D. Short, A. Hatta, In-situ UV absorption spectroscopy for monitoring transport of plasma reactive species through agarose as surrogate for tissue, J. Photopolym. Sci. Technol. 28 (2015) 439–444.
[40] D. Braný, D. Dvorská, E. Halašová, H. Škovierová, Cold Atmospheric Plasma: A Powerful Tool for Modern Medicine, Int. J. Mol. Sci. 21 (2020) 2932. https://doi.org/10.3390/ijms21082932.
[41] J. Tornin, M. Mateu-Sanz, A. Rodríguez, C. Labay, R. Rodríguez, C. Canal, pyruvate plays a Main Role in the Antitumoral selectivity of Cold Atmospheric plasma in osteosarcoma, Sci. Rep. 9 (2019).
[42] E.J. Szili, F.J. Harding, S.-H. Hong, F. Herrmann, N.H. Voelcker, R.D. Short, The hormesis effect of plasma-elevated intracellular ROS on HaCaT cells, J. Phys. Appl. Phys. 48 (2015) 495401. https://doi.org/10.1088/0022-3727/48/49/495401.
[43] K. Wende, P. Williams, J. Dalluge, W. Van Gaens, H. Aboubakr, J. Bischof, T. von Woedtke, S.M. Goyal, K.-D. Weltmann, A. Bogaerts, K. Masur, P.J. Bruggeman, Identification of the biologically active liquid chemistry induced by a nonthermal atmospheric pressure plasma jet, Biointerphases. 10 (2015) 029518. https://doi.org/10.1116/1.4919710.
[44] J. Chauvin, F. Judée, M. Yousfi, P. Vicendo, N. Merbahi, Analysis of reactive oxygen and nitrogen species generated in three liquid media by low temperature helium plasma jet, Sci. Rep. 7 (2017) 4562–4562. https://doi.org/10.1038/s41598-017-04650-4.
[45] K.A. Athanasiou, R. Eswaramoorthy, P. Hadidi, J.C. Hu, Self-Organization and the Self-Assembling Process in Tissue Engineering, Annu. Rev. Biomed. Eng. 15 (2013) 115–136. https://doi.org/10.1146/annurev-bioeng-071812-152423.
[46] L. Magnan, G. Labrunie, S. Marais, S. Rey, N. Dusserre, M. Bonneu, S. Lacomme, E. Gontier, N. L'Heureux, Characterization of a Cell-Assembled extracellular Matrix and the effect of the devitalization process, Acta Biomater. 82 (2018) 56–67. https://doi.org/10.1016/j.actbio.2018.10.006.
[47] S. Ricard-Blum, The Collagen Family, Cold Spring Harb. Perspect. Biol. 3 (2011) a004978. https://doi.org/10.1101/cshperspect.a004978.

[48] F. Pillet, L. Gibot, M. Madi, M.-P. Rols, E. Dague, Importance of endogenous extracellular matrix in biomechanical properties of human skin model, Biofabrication. 9 (2017) 025017. https://doi.org/10.1088/1758-5090/aa6ed5.
[49] V. Malhotra, P. Erlmann, The Pathway of Collagen Secretion, Annu. Rev. Cell Dev. Biol. 31 (2015) 109–124. https://doi.org/10.1146/annurev-cellbio-100913-013002.
[50] A. Sorushanova, L.M. Delgado, Z. Wu, N. Shologu, A. Kshirsagar, R. Raghunath, A.M. Mullen, Y. Bayon, A. Pandit, M. Raghunath, The collagen suprafamily: from biosynthesis to advanced biomaterial development, Adv. Mater. 31 (2019) 1801651.
[51] C. Amălinei, I.-D. Căruntu, R.A. Bălan, Biology of metalloproteinases, Rom J Morphol Embryol. 48 (2007) 323–334.
[52] V.-M. Kähäri, U. Saarialho-Kere, Matrix metalloproteinases in skin, Exp. Dermatol. 6 (1997) 199–213. https://doi.org/10.1111/j.1600-0625.1997.tb00164.x.
[53] X. Dong, M. Chen, Y. Wang, Q. Yu, A Mechanistic study of Plasma Treatment Effects on Demineralized Dentin Surfaces for Improved Adhesive/Dentin Interface Bonding, Clin. Plasma Med. 2 (2014) 11–16. https://doi.org/10.1016/j.cpme.2014.04.001.
[54] A. Keyvani, M. Atyabi, H. Madanchi, Effects of cold atmospheric plasma jet on collagen structure in different treatment times, Basic Res. J. Med. Clin. Sci. 6 (2017) 84–90.
[55] A. Ring, S. Langer, A. Schaffran, I. Stricker, P. Awakowicz, H.-U. Steinau, J. Hauser, Enhanced neovascularization of dermis substitutes via low-pressure plasma-mediated surface activation, Burns. 36 (2010) 1222–1227. https://doi.org/10.1016/j.burns.2010.03.002.
[56] B. Eggers, J. Marciniak, S. Memmert, F.J. Kramer, J. Deschner, M. Nokhbehsaim, The beneficial effect of cold atmospheric plasma on parameters of molecules and cell function involved in wound healing in human osteoblast-like cells in vitro, Odontology. 108 (2020) 607–616. https://doi.org/10.1007/s10266-020-00487-y.
[57] B. Eggers, J. Marciniak, J. Deschner, M.B. Stope, A. Mustea, F.-J. Kramer, M. Nokhbehsaim, Cold Atmospheric Plasma Promotes Regeneration-Associated Cell Functions of Murine Cementoblasts In Vitro, Int. J. Mol. Sci. 22 (2021) 5280. https://doi.org/10.3390/ijms22105280.
[58] B. Kleineidam, M. Nokhbehsaim, J. Deschner, G. Wahl, Effect of cold plasma on periodontal wound healing—an in vitro study, Clin. Oral Investig. 23 (2019) 1941–1950. https://doi.org/10.1007/s00784-018-2643-3.
[59] A. Schmidt, G. Liebelt, F. Nießner, T. von Woedtke, S. Bekeschus, Gas plasma-spurred wound healing is accompanied by regulation of focal adhesion, matrix remodeling, and tissue oxygenation, Redox Biol. 38 (2021) 101809.
[60] P.-L. Shao, J.-D. Liao, T.-W. Wong, Y.-C. Wang, S. Leu, H.-K. Yip, Enhancement of wound healing by non-thermal N2/Ar micro-plasma exposure in mice with fractional-CO2-laser-induced wounds, PloS One. 11 (2016) e0156699.
[61] A. Schmidt, T. von Woedtke, B. Vollmar, S. Hasse, S. Bekeschus, Nrf2 signaling and inflammation are key events in physical plasma-spurred wound healing, Theranostics. 9 (2019) 1066.
[62] X. Shi, J. Cai, G. Xu, H. Ren, S. Chen, Z. Chang, J. Liu, C. Huang, G. Zhang, X. Wu, Effect of Cold Plasma on Cell Viability and Collagen Synthesis in Cultured Murine Fibroblasts, Plasma Sci. Technol. 18 (2016) 353–359. https://doi.org/10.1088/1009-0630/18/4/04.
[63] F. Judée, C. Fongia, B. Ducommun, M. Yousfi, V. Lobjois, N. Merbahi, Short and long time effects of low temperature Plasma Activated Media on 3D multicellular tumor spheroids, Sci. Rep. 6 (2016) 21421.