



HAL
open science

Mécanismes cellulaires adaptatifs du microenvironnement tumoral exposé au plasma froid - Application au traitement du cholangiocarcinome

Allan Pavy

► **To cite this version:**

Allan Pavy. Mécanismes cellulaires adaptatifs du microenvironnement tumoral exposé au plasma froid - Application au traitement du cholangiocarcinome. Physique des plasmas [physics.plasm-ph]. Sorbonne Université, 2024. Français. NNT : 2024SORUS267 . tel-04824226

HAL Id: tel-04824226

<https://theses.hal.science/tel-04824226v1>

Submitted on 6 Dec 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.

Sorbonne Université

École doctorale Physiologie, physiopathologie et thérapeutique (ED 394)

*Centre de Recherche Saint-Antoine, INSERM UMRS 938
Équipe « Maladies biliaires et métaboliques du foie »*

**Mécanismes cellulaires adaptatifs du microenvironnement
tumoral exposé au plasma froid atmosphérique
- Application au traitement du cholangiocarcinome -**

Par **Allan PAVY**

Thèse de doctorat de cancérologie

Dirigée par **Laura FOUASSIER** et **Thierry DUFOUR**

Présentée et soutenue publiquement le Mardi 5 Novembre 2024

Devant un jury composé de :

Pr. Isabelle CREMER (PU)	Présidente
Dr. Sylvie JOB (CRCN)	Rapporteuse
Dr. Jean-Michel POUVESLE (DR)	Rapporteur
Pr. Cindy NEUZILLET (PUPH)	Examinatrice
Dr. Laura FOUASSIER (CRCN)	Directrice de thèse
Dr. Thierry DUFOUR (MCU)	Co-directeur de thèse
Dr. Marine CAMUS (PUPH)	Invitée
Dr. Augusto STANCAMPIANO (CRCN)	Invité



À mon Papy Mouzo et à ma Mémé Maria, je sais qu'ils auraient été fiers de moi.

Remerciements

Tout d'abord, je souhaite exprimer ma reconnaissance envers les membres de mon jury de thèse pour avoir accepté de consacrer de leur temps à l'évaluation de mes travaux de doctorat :

Au Professeur Isabelle Cremer, je vous remercie d'avoir accepté la présidence de mon jury.

Je remercie également le **Docteur Sylvie Job** et le **Professeur Jean-Michel Pouvesle** d'avoir accepté de participer au jury de cette thèse en tant que rapporteurs et pour le temps qu'ils ont consacré à la lecture de mon manuscrit.

Merci au **Professeur Cindy Neuzillet** d'avoir accepté de siéger à ce jury et d'avoir bien voulu examiner cette thèse.

J'exprime également ma gratitude au **Professeur Marine Camus** et au **Docteur Augusto Stancampiano** pour leur présence le jour de ma soutenance de thèse.

Je vous remercie tous d'avoir jugé la qualité ainsi que la pertinence de mon travail.

Au cours de ce doctorat, j'ai eu la chance d'évoluer au sein d'une équipe de recherche accueillante et à l'écoute, et de travailler entouré de personnes bienveillantes avec qui j'ai partagé trois années et demie importantes de ma vie.

Je tiens bien évidemment à remercier très chaleureusement mes directeurs de thèse **Laura Fouassier** et **Thierry Dufour** de m'avoir fait confiance depuis le début de mon stage de Master 2.

Laura, je vous remercie énormément de m'avoir accueilli dans votre groupe de recherche et de m'avoir guidé et encadré toutes ces années. Vous m'avez offert l'opportunité de m'immerger dans le monde de la recherche académique en m'intégrant à un projet multidisciplinaire élégant et innovant, exigeant rigueur et ténacité. Vous avez su faire preuve d'une infinie patience à mon égard, dans les bons comme dans les mauvais moments, et je ne vous remercierai jamais assez pour cela. Vous avez toujours cru en moi, accepté tous mes

caprices et vous avez toujours su trouver les mots pour me remotiver. Je vous suis également très reconnaissant de m'avoir permis de présenter mes données à de nombreux congrès, tant nationaux qu'internationaux, mais également de m'avoir impliqué dans plusieurs de vos projets. C'est une chance inestimable pour un doctorant et cela témoigne de la confiance que vous m'accordez. Ce fut un réel plaisir pour moi de travailler à vos côtés.

(Jusqu'au bout je n'aurai jamais réussi à vous tutoyer ahah).

Thierry, je vous remercie d'avoir été mon co-encadrant durant mon doctorat. J'ai beaucoup apprécié collaborer et travailler avec vous au cours de ces trois années et demie. Nos interactions ont toujours été riches et intéressantes, tant sur le plan physique que biologique. J'espère avoir été assez didactique lors de nos entrevues et réunions pour que vous puissiez comprendre les enjeux biologiques du projet. Un grand merci également de m'avoir donné, avec Laura, l'opportunité de participer à des conférences scientifiques et d'avoir été un « ambassadeur plasma » comme vous l'avez toujours dit. Je vous remercie sincèrement pour votre encadrement, votre investissement et votre bienveillance.

Le projet plasma a pu rassembler un grand nombre de personnes dévouées et bienveillantes avec qui j'ai pu collaborer au cours de ce doctorat.

Bouchra, nos débuts ont été difficiles mais je suis heureux que notre relation se soit améliorée avec le temps. Tu as toujours été là pour moi et tu as toujours accepté de m'aider aussi bien dans les manips que juste pour me remonter le moral. Merci pour ton soutien en ce qui concerne l'expérimentation animale.

Mirko, je te remercie énormément pour toutes nos discussions scientifiques ainsi que pour m'avoir formé à l'art de la cytométrie en flux. Je n'oublierai jamais certaines de tes expressions comme « It's science man » ou bien « It's not my business ».

Marion, fraîchement arrivée au labo, je sais que le projet est entre de bonnes mains avec toi. Tu es créative, motivée et consciencieuse, donc je sais que je peux te faire confiance en ce qui concerne le devenir du cathéter à plasma. Je te remercie infiniment pour les quelques discussions scientifiques que l'on a pu avoir, ainsi que pour ton aide aussi bien pour les manips que pour l'analyse de données. Merci également pour ta relecture attentive de mon

manuscrit. J'espère avoir été un bon mentor et avoir pu t'intégrer convenablement au labo. Je te souhaite, comme pour Mirko, que de la réussite dans ton avenir professionnel.

Marie et Claire, merci pour nos discussions de bureau ainsi que pour les nombreuses pauses sucrées que l'on a partagées ensemble. J'espère ne pas avoir été trop bavard non plus ahah. Claire, je te souhaite beaucoup de courage pour la réalisation de ta thèse, ça va le faire !

Je tenais également à remercier toutes les personnes que j'ai eu la chance de rencontrer au cours de ma thèse et qui ont contribué, de près ou de loin, à la réalisation du projet. **Lynda, Haquima** et **Jonathan**, je vous remercie de m'avoir initié respectivement à la création de modèles 3D de type sphéroïdes, à l'art de l'immunomarquage et à l'onco-immunologie. Un grand merci pour votre bienveillance, votre gentillesse et nos échanges enrichissants. Je souhaite également exprimer ma gratitude envers **Romain**, pour ton aide précieuse pour de nombreuses manip d'imagerie ainsi que pour ta gentillesse.

Un grand merci également à la PIV Team de Cochin ; **Gilles, Franck, Isabelle** et **Carmen**, ainsi qu'à **Thomas** de la plateforme d'imagerie.

Je veux également remercier chaleureusement les médecins avec qui j'ai eu l'occasion de travailler ou de discuter pendant mon doctorat. **Manon**, je tiens particulièrement à te remercier pour tout le temps que l'on a passé ensemble à l'animalerie, mais également pour nos nombreuses discussions. Je te souhaite beaucoup de succès dans ta carrière future. **Korentin**, accroche-toi pour ta thèse, c'est bientôt la fin ! Et également merci à **Henri**, avec qui le projet a commencé. Tu m'as beaucoup aidé pour l'obtention de ma bourse doctorale et tu m'as permis d'être autonome en ce qui concerne les traitements plasma.

Je voudrais être également reconnaissant envers les personnes que j'ai rencontrées au cours de ma thèse et qui sont devenues de proches amis aujourd'hui. **Lara**, tu le sais et je n'ai pas besoin de t'expliquer quoi que ce soit. Tu as toujours été là pour moi et nos moments à boire des cafés (qui se sont souvent transformés en bières ahah) vont me manquer. Un grand merci à **Sabrina, Juliane, Tiphaine, Ana Lou, Inès, Aurélia, Mariana, Céline, Hugo, Mathias, Hoan, Pierre** et **Toky** pour tous les bons moments que l'on a passés ensemble. Vous allez me manquer et je n'oublierai jamais nos moments passés à Mon Café ou au Social.

Un immense merci à mon meilleur ami **Loris**. J'ai été moins présent ces derniers temps, mais tu as toujours su me comprendre et me remonter le moral quand j'en avais besoin. Je t'aime mon petit suisse.

Un merci inconditionnel à mes parents pour leur soutien indéfectible. Ils m'ont donné la possibilité de poursuivre les études de mon choix et m'ont toujours encouragé dans cette voie. Vous avez toujours su me conseiller et me soutenir quand j'en avais besoin, même si parfois c'était difficile à la maison. Merci également à ma sœur **Morgane**, merci d'exister, tout simplement. Tu as toujours été là pour moi et je ne t'en remercierai jamais assez. Également merci à mes grands-parents, je sais que je n'ai pas été très présent ces dernières années, mais je vais essayer de me rattraper.

Merci pour votre amour, je vous aime.

To my girlfriend **Savanna**, thank you so much for your daily support and love. It has not all been easy, we've had our ups and downs, but we've always made it through. We have managed to overcome the distance that separates our two continents and it is the greatest success. Abandoning your two employment contracts to come work in France while I was starting my third year of my doctorate is the greatest proof of love that anyone could give me. Thank you so much for attending my Ph.D defense, that shows the love you have for me. I really hope to get this position in Roswell to be closer to you.

Thank you so much for your affection, I love you so much!

Et à tous ceux que j'aurai oublié, je vous dis un grand merci !

Table des Matières

Remerciements	4
Table des Matières	8
Liste des abréviations.....	11
Liste des figures.....	16
Liste des tables	18

REVUE BIBLIOGRAPHIQUE 19

Chapitre 1

Anatomie et physiologie hépatobiliaire 20

I. L'organe hépatique	21
1. Anatomie et organisation structurelle du foie	21
2. La composition cellulaire du foie.....	24
3. Les fonctions hépatiques.....	28
3.1 Métabolisme des glucides – stockage du glycogène.....	28
3.2 Métabolisme des lipides.....	29
3.3 Métabolisme des protéines – synthèse des protéines sanguines.....	31
3.4 Détoxification des xénobiotiques	31
3.5 Capacité de régénération	32
3.6 Production et excrétion de la bile	33
II. L'arbre biliaire.....	34
1. Anatomie de la vésicule et physiopathologie des voies biliaires	34
1.1 La vésicule biliaire.....	34
1.2 L'arbre biliaire.....	35
2. Les cholangiocytes.....	36
3. Les pathologies biliaires ou cholangiopathies	37
3.1 La cholangite biliaire primitive ou CBP.....	38
3.2 La cholangite sclérosante primitive ou CSP	38
3.3 Les autres cholangiopathies.....	40

Chapitre 2

Le cholangiocarcinome, cancer des voies biliaires 43

I. Classification des CCA.....	44
1. Classification anatomique	44
2. L'apport des omiques dans la classification des CCA	46
2.1 Classification moléculaire.....	46

2.2	Classification épigénétique	47
2.3	Classification basée sur le microenvironnement tumoral	48
2.4	Classification par protéomique et radiogénomique	52
II.	Épidémiologie et facteurs de risque.....	53
III.	Mécanismes moléculaires et cellulaires de carcinogénèse du CCA	56
1.	Une origine pluricellulaire du CCA.....	56
2.	Altérations génétiques et épigénétiques	58
3.	Voies de signalisation impliquées	60
3.1	Voies du développement	60
3.2	Facteurs de croissance et récepteurs à activité tyrosine kinase.....	62
3.3	Facteurs inflammatoires	63
3.4	Voies de l'angiogénèse.....	63
4.	Microenvironnement tumoral du CCA	64
4.1	Les fibroblastes associés au cancer et la matrice extracellulaire.....	66
4.2	Les cellules endothéliales tumorales	70
4.3	Les cellules immunitaires	72
4.4	Les modèles d'étude du CCA.....	79
IV.	Diagnostic et prise en charge des CCA	82
V.	Options thérapeutiques disponibles et pronostic du CCA	84
1.	Mécanismes de chimiorésistance	84
2.	Chirurgie et transplantation hépatique.....	87
2.1	Résection tumorale et thérapie adjuvante	87
2.2	Transplantation hépatique.....	88
3.	Thérapies locorégionales.....	91
4.	Thérapies systémiques	92
5.	Thérapies ciblées	93

Chapitre 3

Le plasma froid atmosphérique : un outil physique prometteur en cancérologie 95

I.	Généralités et applications du plasma froid atmosphérique	96
1.	Qu'est-ce qu'un plasma ?.....	96
2.	Propriétés physicochimiques et applications du CAP	100
2.1	Production d'espèces réactives de l'oxygène et de l'azote	100
2.2	Autres agents du CAP influant sur la cellule	102
2.3	Applications du CAP	103
II.	Des effets multimodaux prometteurs en cancérologie	105
1.	Différents dispositifs et méthodes de traitement.....	105

1.1	Une diversité de dispositifs médicaux.....	105
1.2	Différentes méthodes de traitements standardisées	107
2.	Mécanismes d'action du CAP contre la cellule tumorale.....	109
2.1	Balance oxydante des cellules tumorales et innocuité sur les cellules saines....	110
2.2	Modes d'action intracellulaires du CAP	112
2.3	Morts cellulaires enclenchées par le CAP	117
3.	Effets antitumoraux du CAP sur le stroma tumoral	122
3.1	Impacts du CAP sur les composantes cellulaires du stroma	122
3.2	Impacts du CAP sur les composantes acellulaires du stroma	125
3.3	Impacts du CAP sur les communications cellulaires	126
3.4	Mise en place d'une mort cellulaire immunogène	128
4.	Perspectives d'étude possibles en oncoplasmathérapie	133
4.1	Sensibilisation de la tumeur aux médicaments	133
4.2	Avancée vers la clinique ?	137
	HYPOTHÈSES ET OBJECTIFS	142
	TRAVAUX DE RECHERCHE	145
	Article 1 : Preventing Cholangiocarcinoma Progression via a stromal dysregulation and an immune infiltration triggered by Cold Atmospheric Plasma.....	146
	Article 2 : Cold plasma endoscopy applied to biliary ducts: feasibility risk assessment on human-like and porcine models for the treatment of cholangiocarcinoma.....	220
	Article 3 : Targeting cholangiocarcinoma cells by cold piezoelectric plasmas: <i>in vitro</i> efficacy and cellular mechanisms	244
	CONCLUSION, DISCUSSION ET PERSPECTIVES	272
	BIBLIOGRAPHIE	286

Liste des abréviations

5-FU : 5-FluoroUracile	BAK : <i>BCL2 Antagonist/Killer 1</i>
5-LO : 5-LipOxygénase	BAP1 : <i>Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase</i>
7-AAD : 7-AminoActinomycin D	BAX : <i>Bcl-2–Associated X</i>
ABC : <i>ATP Binding Cassette</i>	BCL-2 : <i>B-Cell Lymphoma 2</i>
ACE : Antigène CarcinoEmbryonnaire	BLT2 : <i>Leukotriene B4 receptor 2</i>
ADN : Acide DésoxyriboNucléique	BRAF : <i>B-Raf Proto-Oncogene</i>
AE2 : <i>Anion Exchange protein 2</i>	BRCA1/2 : <i>BReast CAncer gene 1/2</i>
AFF : Association Française pour l'Étude du Foie	BSEP : <i>Bile Salt Export Pump</i>
AFP : Alpha-FœtoProtéine	CA19-9 : Antigène Carbohydrate 19-9
AKT : <i>AKT Serine/Threonine Kinase 1</i>	CAF : <i>Cancer-Associated Fibroblast</i>
ALAT : Alanine AminoTransférase	CAP : <i>Cold Atmospheric Plasma</i>
APC : <i>Antigen-Presenting Cell</i>	CAR-T : <i>Chimeric Antigen Receptor T cell</i>
APPJ : <i>Atmospheric Pressure Plasma Jet</i>	CASP : Caspase
AQP1 : AQuaPorine 1	CAT2 : Catalase 2
ARID : <i>AT-Rich Interaction Domain</i>	CBP : Cholangite Biliaire Primitive
ARN : Acide RiboNucléique	CCA : CholangioCArcinome
ASAT : ASpartate AminoTransférase	CCK : CholécystoKinine
ASBT : <i>Apical Sodium dependent Bile acid Transporter</i>	CCL2 : <i>Chemokine Ligand 2</i>
ASC : <i>Apoptosis-associated SpeCk-like protein</i>	CCR2 : <i>C-C Motif Chemokine Receptor 2</i>
ATF6 : <i>Activating Transcription Factor 6</i>	CD : Cluster de Différenciation
ATM : <i>Ataxia Telangiectasia Mutated</i>	CDH1 : <i>Cadherin 1</i>
ATP : Adénosine Tri-Phosphate	CFTR : <i>Cystic Fibrosis Transmembrane conductance Regulator</i>
AUDC : Acide Urso-DésoxyCholique	CHC : Carcinome Hépatocellulaire

CNT : Concentrative Nucleoside Transporter

COL1A1 : COLlagen type I Alpha 1 chain

CPRM : CholangioPancréatographie par Résonance Magnétique

CRT : CalRÉticuline

CSP : Cholangite Sclérosante Primitive

CTGF : Connective Tissue Growth Factor

CTLA-4 : Cytotoxic T-Lymphocyte-Associated protein 4

CTR1 : Copper TRansporter 1

CXCL-12 : C-X-C motif Chemokine 12

CYP : CYtochrome P450

DAMP : Damage-Associated Molecular Pattern

DAPK : Death Associated Protein Kinase

DBD : Dielectric Barrier Discharge

DC : Dendritic Cell

dCCA : Cholangiocarcinome distal

DDR : DNA Damage Response

DPC : DNA-Protein Crosslink

DSB : Double-Strand Break

EASL : European Association for the Study of the Liver

eCCA : Cholangiocarcinome extrahépatique

EGF : Epithelial Growth Factor

EGFR : Epithelial Growth Factor Receptor

eIF2 α : eukaryotic translation initiation Factor 2A

ELF3 : E74 Like ETS Transcription Factor 3

EMT : Epithelial-to-Mesenchymal Transition

ENT : Equilibrative Nucleoside Transporter

ERBB1 : ERB-B1 receptor tyrosine kinase

ERK : Extracellular signal-Regulated Kinase

EZH2 : Enhancer of Zeste Homolog 2

FABP : Fatty Acid Binding Protein

FAK : Focal Adhesion Kinase

FAS : Fas cell Surface death receptor

FasL : FAS ligand

FDA : Food and Drug Administration

FGF : Fibroblast Growth Factor

FGFR : Fibroblast Growth Factor Receptor

FIC1 : Familial Intrahepatic Cholestasis 1

FISH : Fluorescence In Situ Hybridization

FOXP3 : FOlkhead boX P3

FPR1 : Formyl Peptide Receptor 1

FSP1 : Ferroptosis Suppressor Protein 1

FXR : Farnesoid X Receptor

GLUT : GLUcose Transporter

GM-CSF : Granulocyte Macrophage Colony-Stimulating Factor

GNAS : Guanine Nucleotide binding protein, Alpha Stimulating activity polypeptide

GPX4 : Glutathione PeroXidase 4

GSH : Glutathione

GST : Glutathion-Transferase

GSTA4 : *Glutathione S-Transferase Alpha 4*

GWAS : *Genome-Wide Association Study*

HB-EGF : *Heparin-Binding EGF-like growth factor*

HER2 : *Human Epidermal growth factor Receptor-2*

HGF : *Hepatocyte Growth Factor*

HIF-1 α : *Hypoxia Inducible Factor 1 subunit alpha*

HMGA1 : *High Mobility Group AT-hook 1*

HMGB1 : *High Mobility Group Box 1 protein*

HMOX1 : *HeMe OXYgenase 1*

HpSc : *Cellule souche hépatique*

HR : *Hazard Ratio*

HSC : *Hepatic Stellate Cell*

HSP70 : *Heat Shock Protein*

iCCA : *Cholangiocarcinome intrahépatique*

ICD : *Immunogenic Cell Death*

IDH : *Isocitrate DeHydrogenase*

IFNAR : *InterFeroN Alpha and Beta Receptor*

IFN γ : *InterFéroN gamma*

IgG4 : *Immunoglobuline G4*

IG-iCCA : *Intraductal-Growing iCCA*

IHC : *ImmunoHistoChimie*

IL : *InterLeukine*

ILCA : *International Liver Cancer Association*

iNOS : *Nitric Oxide Synthase, inducible*

IRE1 : *Inositol-Requiring Enzyme 1*

IRM : *Imagerie par Résonance Magnétique*

JAG1 : *JAGged canonical Notch Ligand 1*

JAK : *Just Another Kinase*

kb : *kilobase*

KC : *Kupffer Cell*

KRAS : *Kirsten RAt Sarcoma virus*

LATS1 : *LARge Tumor Suppressor kinase 1*

LC3B : *Light Chain 3B*

LEC : *Lymphatic Endothelial Cell*

LIF : *Leukemia Inhibitory Factor*

lncARN : *ARN long non-codant*

LPAC : *Low Phospholipid Associated Cholelithiasis*

LRP5 : *Low-density lipoprotein Receptor-related Protein 5*

LSEC : *Liver Sinusoidal Endothelial Cell*

LTB4 : *LeukoTriene B4 receptor*

MAFLD : *Metabolic-Associated Fatty Liver Disease*

MAM : *Mitochondria Associated Membrane*

MAPK : *Mitogen-Activated Protein Kinase*

MASH : *Metabolic dysfunction-Associated SteatoHepatitis*

MCL-1 : *Myeloid Cell Leukemia-1*

MDR3 : *MultiDrug Resistance 3*

MDSC : *Myeloid-Derived Suppressor Cell*

MEC : *Matrice ExtraCellulaire*

MEK1 : *MAP/ERK kinase-1*

MET : *hepatocyte growth factor receptor*

MET : *MicroEnvironnement Tumoral*

MF-iCCA : *Mass-Forming iCCA*

MHC : *Major Histocompatibility Complex*

miARN : *micro-ARN*

MLKL : *Mixed Lineage Kinase domain Like pseudokinase*

MMP1 : *MetalloProteinase 1*

MOC : *Mechanism Of Chemoresistance*

mPTP : *mitochondrial Permeability Transition Pore*

MRP1 : *Multidrug Resistance-associated Protein 1*

MSRB3 : *Methionine Sulfoxide Reductase B3*

MST1 : *Hippo*

mTOR : *mechanistic Target Of Rapamycin kinase*

MUC : *Mucin*

MYC : *MYC Proto-Oncogene*

MyD88 : *Myeloid Differentiation primary response 88*

NADPH : *Nicotinamide Adénine Dinucléotide Phosphate*

NER : *Nucleotide Excision Repair*

NET : *Neutrophil Extracellular Trap*

NFκB : *Nuclear Factor kappa B*

NGS : *Next-Generation Sequencing*

NICD-1 : *Notch IntraCellular Domain 1*

NK : *Natural Killer cell*

NOTCH2 : *Notch receptor 2*

NPC : *Non-Parenchymal Cell*

NRAS : *NRAS Proto-Oncogene*

OPRT : *Orotate PhosphoRibosylTransferase*

PAM : *Plasma-Activated Medium*

PAMP : *Pathogen-Associated Molecular Pattern*

PBS : *Phosphate-Buffered Saline*

pCCA : *Cholangiocarcinome périhilaire*

PCL : *Plasma-Conditioned Liquid*

PD-1 : *Programmed cell Death protein 1*

PDGF : *Platelet-Derived Growth Factor*

PD-L1 : *Programmed Death-Ligand 1*

PERK : *PKR-like ER Kinase*

PET-Scan : *Tomographie par émission de positons*

PFIC : *Progressive Familial Intrahepatic Cholestasis*

PGE2 : *ProstaGlandin E2*

PI : *Propidium Iodide*

PI3K : *Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-Kinase*

PI-iCCA : *Periductal-Infiltrating iCCA*

PPAR : *Peroxisome Proliferator Activated Receptor*

PRKACA : *PRotein Kinase cAMP-Activated CAlytic subunit alpha*

PTH : *Plasma-Treated Hydrogel*

RE : Réticulum Endoplasmique

RIPK1 : *Receptor-Interacting serine/threonine-Protein Kinase 1*

RONS : *Reactive Oxygen and Nitrogen Species*

ROS : *Reactive Oxygen Species*

S100p : *calcium-binding protein S100P*

SASP : *Senescence-Associated Secretory Phenotype*

scRNA-Séq : Séquençage à l'échelle de la cellule unique

SDF1 : *Stromal cell-Derived Factor 1*

SHG : *Second Harmonic Generation*

SIRP α : *Signal Regulatory Protein alpha*

SIRT : Radiothérapie interne sélective

SLUG : *SNAI2 gene*

SMAD4 : *mothers Against Decapentaplegic homolog 4*

SOD1 : SuperOxyde Dismutase 1

SSB : *Single-Strand Break*

STAT : *Signal Transducer and Activator of Transcription*

SULT : SULfoTransférase

TACE : *TransArterial ChemoEmbolization*

TAM : *Tumor-Associated Macrophage*

TAN : *Tumor-Associated Neutrophil*

TARE : *TransArterial RadioEmbolization*

TAZ : *TAfaZzin*

TCR : *T-Cell Receptor*

TDM : TomoDensitoMétrie

TEC : *Tumor-Endothelial Cell*

TET1 : *TET methylcytosine dioxygenase 1*

TGF : *Tumor Growth Factor*

TGR5 : *Takeda G protein-coupled Receptor 5*

TH : Transplantation Hépatique

Th1 : *T helper 1*

TIL : *Tumor-Infiltrating Lymphocyte*

TLR4 : *Toll-Like Receptor 4*

TNF : *Tumor Necrosis Factor*

TP53 : *Tumor Protein P53*

TRAIL : *Tumor-necrosis-factor Related Apoptosis Inducing Ligand*

Treg : T régulateur

UGT : UDP-GlucuronylTransférase

UPR : *Unfolded Protein Response*

VEC : *Vascular Endothelial Cell*

VEGF : *Vascular Endothelial Growth Factor*

VEGFR : *Vascular Endothelial Growth Factor Receptor*

VHB : Virus de l'Hépatite B

VHC : Virus de l'Hépatite C

VLDL : *Very-Low Density Lipoprotein*

WNT : *Wnt Family Member*

YAP : *Yes-Associated Protein*

α -SMA : *alpha Smooth-Muscle Actin*

Liste des figures

• Figure 1 : Anatomie et segmentation du foie humain	21
• Figure 2 : Zonation métabolique du foie	23
• Figure 3 : Composition cellulaire du foie sain	24
• Figure 4 : Localisation des cellules du foie au sein du lobule hépatique.....	28
• Figure 5 : Principales fonctions métaboliques du foie.....	30
• Figure 6 : Production et excrétion de la bile par le foie.....	34
• Figure 7 : Anatomie de la vésicule biliaire.....	35
• Figure 8 : Caractéristiques structurales de l'arbre biliaire.....	36
• Figure 9 : Propriétés des cellules cancéreuses.....	43
• Figure 10 : Classification anatomique et histologique des CCA.....	45
• Figure 11 : Incidence mondiale des CCA.....	54
• Figure 12 : Potentielles cellules à l'origine des cancers hépatobiliaires	58
• Figure 13 : Altérations génomiques fréquemment rencontrées dans le CCA	60
• Figure 14 : Voies de signalisation impliquées dans le développement et la progression du CCA.....	64
• Figure 15 : Microenvironnement tumoral du CCA.....	66
• Figure 16 : Fonctions des CAFs dans la progression du CCA.....	70
• Figure 17 : Fonctions des TECs dans la progression du CCA.....	72
• Figure 18 : Microenvironnement immunitaire tumoral du CCA.....	78
• Figure 19 : Diagnostic du CCA par tomographie et IRM.....	84
• Figure 20 : Mécanismes de chimiorésistance dans le CCA.....	87
• Figure 21 : Prise en charge chirurgicale du CCA.....	90
• Figure 22 : Diagnostic et options thérapeutiques du CCA.....	94
• Figure 23 : Évolution annuelle du nombre de publications portant sur l'utilisation du CAP en oncologie	96

- **Figure 24 : Les différents états de la matière et la description physique des plasmas
.....97**
- **Figure 25 : Les différents plasmas existant dans l'univers.....98**
- **Figure 26 : Le plasma froid atmosphérique.....100**
- **Figure 27 : Production de RONS par le CAP.....102**
- **Figure 28 : Propriétés physico-chimiques et applications du CAP.....104**
- **Figure 29 : Les différents configurations électroniques du CAP.....107**
- **Figure 30 : Les différentes méthodes de traitement au CAP.....109**
- **Figure 31 : Effets du CAP sur les cellules tumorales.....116**
- **Figure 32 : Effets du CAP sur les cellules non malignes du MET.....128**
- **Figure 33 : Mécanisme de la mort cellulaire immunogène et de l'activation de la
réponse immunitaire antitumorale.....130**
- **Figure 34 : Différentes méthodes *in vitro* et *in vivo* de caractérisation de l'ICD et
résultats obtenus dans le cancer colorectal dans une étude *in vivo*.....132**
- **Figure 35 : Évolution de la tumeur d'un patient atteint d'un cancer de la tête et du
cou et soumis à des expositions de CAP.....138**
- **Figure 36 : Procédure expérimentale et résultats histologiques de la première étude
clinique de phase I approuvée par la FDA sur l'utilisation du CAP en oncologie.....140**

Liste des tables

- **Table 1 : Comparaison des caractéristiques de la CBP et de la CSP.....40**
- **Table 2 : Principaux facteurs de risque du CCA.....55**
- **Table 3 : Les différents modèles d'étude du CCA.....81**
- **Table 4 : Liste des études menées sur les effets antitumoraux du CAP.....121**

REVUE BIBLIOGRAPHIQUE

Chapitre 1

Anatomie et physiologie hépatobiliaire

Le terme « hépatobiliaire » se réfère à l'organe hépatique, le foie, ainsi qu'aux voies biliaires.

Étymologiquement, le terme « foie » provient du bas latin *ficatum* signifiant « farci de figues », qui lui-même est un dérivé du grec ἥπαρ συκωτόν (*hêpar sukôton*) qui signifie « foie gras ». En effet, à l'époque romaine, la figue servait notamment à engraisser les oies afin de produire du foie gras. En parallèle, « biliaire » vient du latin *biliarus* qui fait référence à la bile, liquide biologique jaune-verdâtre légèrement basique sécrété par le foie.

Dans l'Antiquité, la bile faisait partie des quatre humeurs d'Hippocrate, une théorie ancienne selon laquelle le corps humain est composé de quatre substances essentielles :

- Le sang, produit par le foie et reçu par le cœur, associé à un caractère jovial et chaleureux ;
- La pituite ou lymphe, liée au cerveau et évoquant un caractère lymphatique et nonchalant ;
- La bile jaune, également issue du foie et associée à un caractère bilieux, plutôt enclin à la violence, d'où l'expression « déverser sa bile » ;
- L'atrabile ou la bile noire, venant de la rate, et qui fait référence à un caractère mélancolique, d'où l'expression « se faire de la bile ».

Selon le philosophe grec, l'ensemble de ces composants doit maintenir un équilibre parfait pour que la maladie ne se développe ni dans le corps, ni dans l'esprit.

I. L'organe hépatique

1. Anatomie et organisation structurale du foie

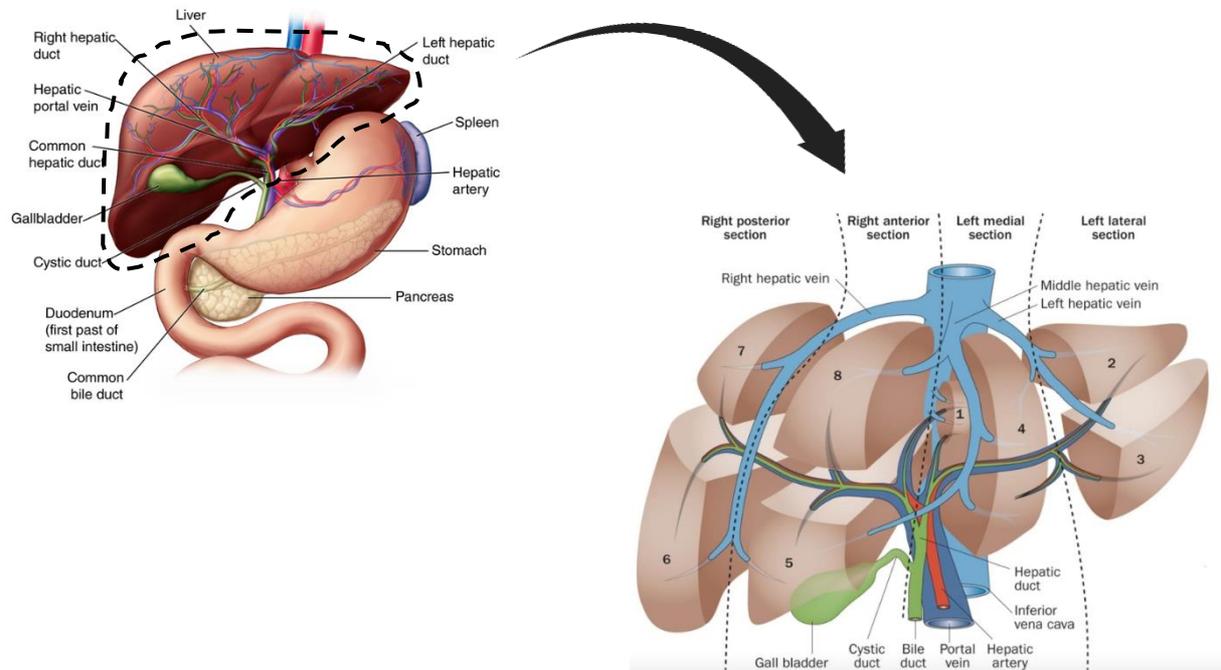


Figure 1 : Anatomie et segmentation du foie humain. Vue antérieure de l'organe hépatique et de son insertion au niveau du tube digestif ¹. Zoom sur la division du foie en huit segments fonctionnels d'après la segmentation de Couinaud ².

Le foie est l'organe le plus volumineux du corps humain et fait partie de l'appareil digestif. Celui-ci se situe sous le diaphragme, dans la partie supérieure droite de la cavité abdominale, au-dessus de l'estomac (**Figure 1**). Anatomiquement, chez l'Homme, il est constitué de deux lobes principaux, le droit et le gauche, et compte huit segments fonctionnels d'après la segmentation de Couinaud qui est utilisée en chirurgie. Celle-ci se base essentiellement sur la vascularisation du foie, qui bénéficie d'un système circulatoire unique.

En effet, l'organe hépatique possède la particularité d'être à la fois alimenté par une artère et par une veine. Environ deux tiers de l'apport sanguin provient de l'intestin via la veine porte, tandis que le tiers restant est acheminé par l'artère hépatique depuis le cœur. Les veines hépatiques permettent de drainer le sang du foie en rejoignant la veine cave inférieure. Lors du mélange, le sang s'équilibre et s'écoule dans les veines centrales, tandis que la bile produite par le foie s'écoule dans la direction opposée pour rejoindre le duodénum ^{3,4}.

À l'échelle micro-anatomique, le parenchyme hépatique est constitué d'environ un million d'unités fonctionnelles nommées lobules hépatiques. Chaque lobule est composé d'hépatocytes, les cellules majoritaires du foie, agencées en travées disposées radialement autour d'une veine centrale appelée veine centrolobulaire. Ces travées, délimitées par des sinusoides, confèrent au lobule une structure polyédrique de forme hexagonale, dans laquelle se trouvent les canalicules biliaires (**Figure 2**).

Aux extrémités des lobules hépatiques se trouvent les triades portales, composées d'un canal biliaire, d'une ramification de la veine porte hépatique et d'une branche de l'artère hépatique. Cette organisation permet à chaque segment hépatique d'être relié indépendamment à la circulation générale et à l'arbre biliaire. Cependant, cette structure entraîne également une hétérogénéité fonctionnelle des hépatocytes au sein des lobules hépatiques. En effet, au niveau des zones dites périportales (situées près des triades portales), le sang riche en oxygène issu de l'artère hépatique se mélange à celui apporté par la veine porte, riche en nutriments. Ce mélange traverse alors le lobule via les sinusoides hépatiques, apportant oxygène et nutriments aux hépatocytes et aux autres cellules hépatiques à travers les fenêtres formées par les cellules endothéliales. En retour, les cellules du foie excrètent des métabolites et autres déchets, modifiant ainsi la composition du sang arrivant au niveau de l'espace péricentral (zone autour de la veine centrolobulaire) ^{3,4}. De ce fait, les différents gradients résultant de ces échanges (oxygène, hormones, nutriments, déchets) ont pour conséquence le fractionnement du lobule hépatique en trois zones distinctes ^{3,5} dans lesquelles les hépatocytes remplissent des fonctions métaboliques différentes. Cette zonation, que l'on appelle zonation métabolique du foie, a été mise en exergue dans les années 1980 ⁶, et concerne tout aussi bien le métabolisme glucidique, protéique, lipidique mais aussi des xénobiotiques. Celle-ci est en partie contrôlée par la voie de signalisation Wnt/ β -caténine, qui est principalement active dans les hépatocytes péricentraux et inactive au niveau de l'espace périportal. Ce gradient d'expression permet ainsi de réguler l'homéostasie hépatique ⁷ (**Figure 2**).

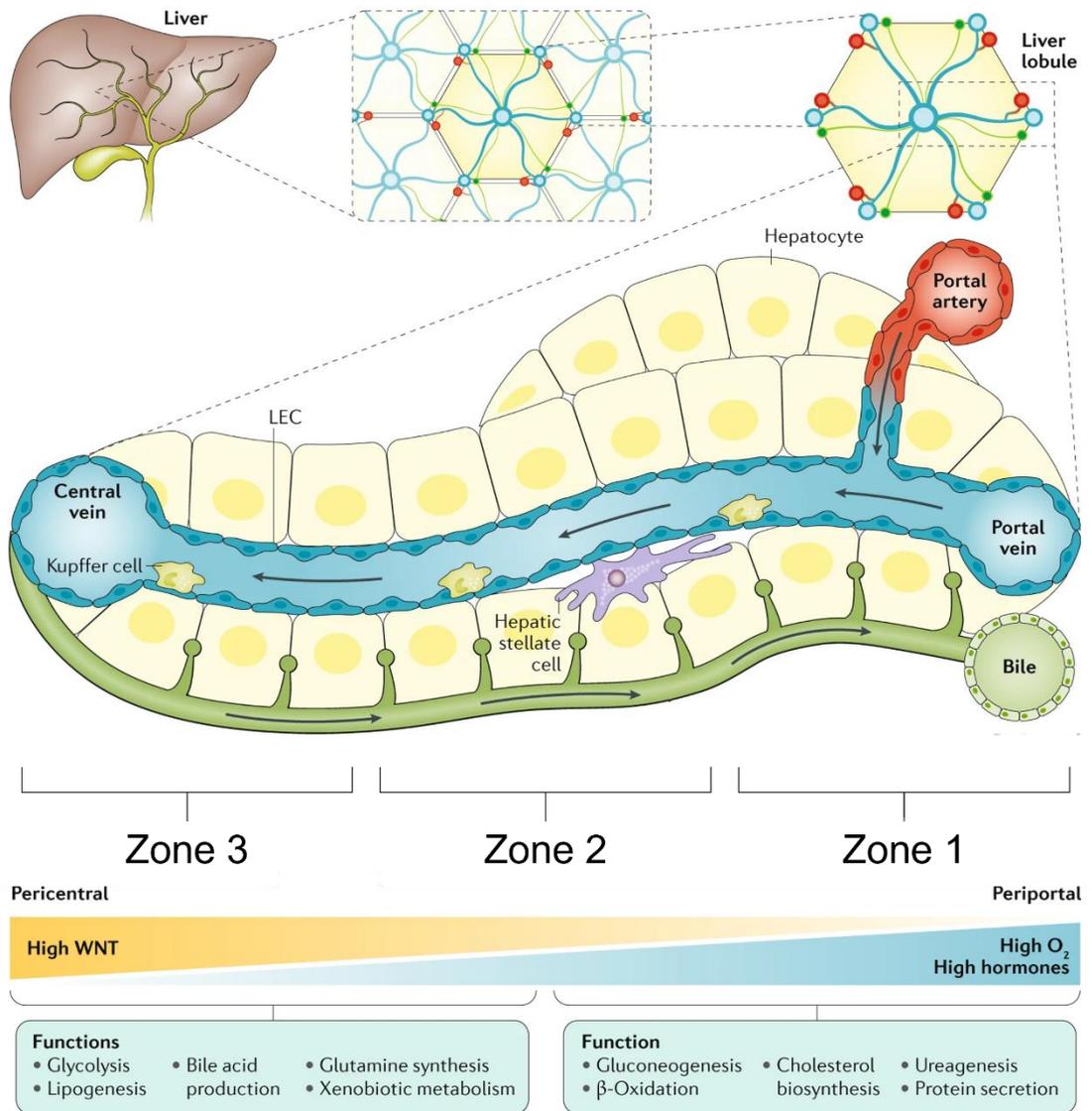


Figure 2 : Zonation métabolique du foie³ (modifié). Le foie est constitué de lobules hépatiques hexagonaux où se trouve à chaque sommet une triade hépatique, contenant des ramifications de l'artère hépatique (en rouge), de la veine porte (en bleu) et de l'arbre biliaire (en vert). Le sang circule dans les sinusoides radiales et s'écoule dans la veine centrale, en sens inverse par rapport à la bile sécrétée par les hépatocytes qui s'écoule de la zone centrale vers l'espace porte à travers les canalicules biliaires qui convergent vers le canal biliaire. Les différentes fonctions hépatocytaires (représentées sous le schéma) sont soutenues par les cellules hépatiques non-parenchymateuses, telles que les cellules de Kupffer (en vert clair), les cellules endothéliales hépatiques (LEC : *Liver Endothelial Cells*, en bleu et rouge) et les cellules étoilées hépatiques (en violet) qui résident le long du lobule. Le flux sanguin et les morphogènes sécrétés donnent naissance à un microenvironnement spatialement classé en trois zones distinctes, entraînant différentes fonctions métaboliques essentielles à l'homéostasie hépatique. Cela se nomme la zonation métabolique du foie.

2. La composition cellulaire du foie

La structure histologique du foie repose sur une diversité de types cellulaires aux nombreuses fonctions. Ces différentes cellules, présentes en proportions variables, contribuent à l'homéostasie générale de l'organe (**Figure 3**).

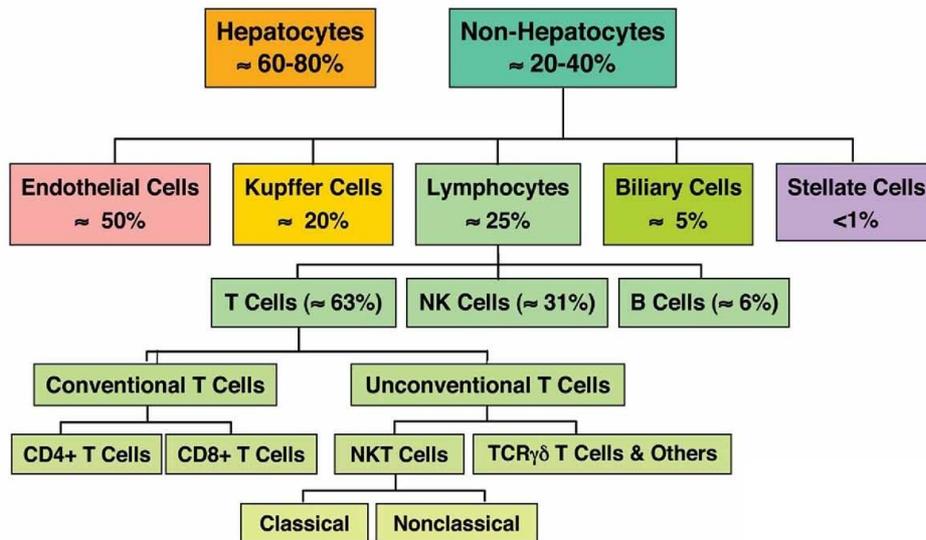


Figure 3 : Composition cellulaire du foie sain ⁸. Le foie est constitué de nombreux types cellulaires différents aux multiples fonctions. Les pourcentages donnés indiquent la fréquence estimée de chaque population cellulaire par rapport au nombre total de cellules parenchymateuses et non-parenchymateuses du foie.

Les cellules composant le foie peuvent être classées selon différents critères. Traditionnellement, on différencie les cellules parenchymateuses (hépatocytes) des cellules non-parenchymateuses (NPCs, pour *Non-Parenchymal Cells*), qui regroupent les cellules endothéliales, les cellules étoilées, les cholangiocytes et les leucocytes, incluant les cellules de Kupffer (macrophages hépatiques spécialisés). Alternativement, les cellules hépatiques peuvent être classées en cellules épithéliales (c'est-à-dire hépatocytes et cholangiocytes) et non épithéliales (les autres) ⁴.

Les hépatocytes, représentants majoritaires du parenchyme hépatique (environ 60 à 80 % des cellules du foie) (**Figure 3**), assurent la grande majorité des fonctions de l'organe. Ces cellules polyédriques et polarisées, mesurant de 20 à 30 μm , possèdent trois pôles distincts ⁹ :

- Un pôle latéral, en contact avec les autres hépatocytes de la travée ;

- Un pôle sinusoidal, correspondant au pôle basal de la cellule, facilitant les nombreux échanges avec le sang en faisant face aux cellules endothéliales du sinusoidé ;
- Un pôle canaliculaire, correspondant au pôle apical de la cellule, spécialisé dans la sécrétion biliaire. C'est à ce niveau que les hépatocytes adjacents forment des structures capillaires particulières nommées canalicules biliaires, dans lesquels ils sécrètent les premiers éléments de la bile (**Figure 4**).

Les cellules biliaires ou cholangiocytes sont des cellules épithéliales qui forment les canaux biliaires. Bien qu'ils ne représentent qu'une faible proportion des cellules hépatiques (entre 3 et 5 %) (**Figure 3**), ils remplissent des fonctions essentielles telles que le métabolisme et le transport de la bile ¹⁰. La biologie de ces cellules épithéliales biliaires sera abordée plus en détail dans le prochain axe portant sur l'anatomie et la physiologie des voies biliaires (**partie II de ce chapitre**).

Les cellules stellaires hépatiques (ou HSCs pour *Hepatic Stellate Cells*) constituent une population cellulaire minoritaire dans le foie (< 1 %) (**Figure 3**). Elles remplissent cependant de nombreuses fonctions critiques dans le foie normal et en réponse à des lésions. Ces cellules sont principalement localisées dans l'espace de Disse (entre les cellules endothéliales hépatiques et les hépatocytes) où elles résident dans un état de repos en l'absence de lésion hépatique (**Figure 4**). Dans un foie sain, les HSCs ont pour principale fonction le stockage de la vitamine A dans des gouttelettes lipidiques, qui joue un rôle crucial dans le développement, la régénération et l'homéostasie des tissus hépatiques. En revanche, à la suite de lésions hépatiques, les HSCs sont activées en myofibroblastes, perdent les gouttelettes de stockage de la vitamine A et acquièrent un phénotype pro-fibrotique et prolifératif. Elles produisent alors une matrice extracellulaire (MEC) excessivement riche en collagène et en acide hyaluronique, favorisant l'angiogenèse (développement de vaisseaux capillaires sanguins à partir de vaisseaux préexistants) dans la fibrogenèse hépatique. Les HSCs activées contribuent ainsi de manière significative à la progression de la fibrose hépatique. De récentes études ont également montré que les HSCs activées en myofibroblastes pro-fibrosants pouvaient aussi amplifier la réponse inflammatoire hépatique et l'expression de facteurs de croissance essentiels à l'initiation et à la terminaison de la régénération hépatique en cas de lésion ^{4,11}.

Les cellules endothéliales sinusoidales du foie (ou LSECs pour *Liver Sinusoidal Endothelial Cells*) représentent environ la moitié des NPCs de l'organe (**Figure 3**). Ces cellules forment les parois des sinusoides hépatiques, qui sont les vaisseaux sanguins transportant le sang de l'artère hépatique et de la veine porte jusqu'à la veine centrolobulaire (**Figure 4**). Contrairement aux autres capillaires sanguins, ces sinusoides n'ont pas de lame basale organisée et possèdent un cytoplasme traversé de fenêtres ouvertes de 50 à 280 nm de diamètre, ce qui rend l'endothélium microvasculaire hépatique discontinu. Cette structure en tamis est indispensable au passage de fluides et de métabolites de l'espace de Disse vers la circulation générale. Les LSECs jouent donc un rôle essentiel dans le maintien de l'homéostasie hépatique, notamment dans la régulation du tonus vasculaire, de l'inflammation, et de la thrombose (formation de caillots sanguins). Elles sont également cruciales dans le contrôle de la réponse immunitaire hépatique ^{4,12}.

Le foie présente également une population de cellules présentatrices d'antigènes (APCs pour *Antigen-Presenting Cells*) résidentes, connues sous le nom de cellules de Kupffer (ou KCs pour *Kupffer Cells*). Ces macrophages dérivent de monocytes originaires de la moelle osseuse et résident dans l'espace sinusoidal vasculaire (**Figure 4**). Ces cellules représentent 20 % des NPCs du foie (**Figure 3**) et forment la première ligne de défense immunitaire hépatique contre les infections bactériennes. En effet, ces cellules phagocytent directement les pathogènes et éliminent les motifs moléculaires associés aux pathogènes (ou PAMPs pour *Pathogen-Associated Molecular Patterns*) ainsi que les toxines provenant du tractus intestinal via la circulation porte, empêchant ainsi leur passage dans la circulation générale ^{4,13}. Dans des conditions physiologiques normales, les KCs jouent principalement un rôle tolérogène pour éviter l'induction d'une immunité contre des antigènes inoffensifs, tels que des nutriments dérivés de l'intestin ou des antigènes provenant de cellules âgées ou mortes ¹³. Ce processus tolérogène repose notamment sur la capacité des KCs à exprimer et sécréter des cytokines immunosuppressives telles que l'interleukine (IL) 10 et le TGF- β (*Tumor Growth Factor*) ¹⁴. Bien que les KCs protègent le parenchyme hépatique, elles semblent également être impliquées dans de nombreuses pathologies du foie ^{13,15}, telles que les cancers hépatiques, la fibrose hépatique et les stéatoses alcooliques et non-alcooliques ¹⁶⁻¹⁸. Cette implication est principalement due à la production d'espèces réactives de l'oxygène (ou ROS pour *Reactive Oxygen Species*), qui détériorent le foie à long terme. Le foie présente également d'autres

APCs, notamment des cellules dendritiques (ou DCs pour *Dendritic Cells*), principalement localisées autour des veines centrolobulaires et des espaces portes ¹⁹.

Pour finir, le foie comprend également diverses populations immunitaires lymphocytaires, qui représentent environ 25 % des NPCs. Parmi ces lymphocytes, on trouve principalement des lymphocytes T (environ 63 % des lymphocytes) et des cellules NK (*Natural Killer*, environ 31 % des lymphocytes), localisées au niveau des sinusoides hépatiques (**Figure 3**). Les cellules NK, dotées d'une activité cytolytique importante contre les cellules tumorales ou infectées par des virus, n'ont pas besoin de coopération par présentation d'antigène. Leur fonction est finement régulée par des récepteurs activateurs ou inhibiteurs, ces derniers étant dominants ⁸. Parmi les lymphocytes T du foie, on distingue les cellules T conventionnelles (T CD4⁺ et T CD8⁺), qui présentent un répertoire diversifié de TCR (*T-Cell Receptor*) avec une chaîne α et β . Ces récepteurs reconnaissent des antigènes présentés par les molécules du complexe majeur d'histocompatibilité (MHC pour *Major Histocompatibility Complex*) de type I (reconnus par les CD8⁺) ou de type II (reconnus par les CD4⁺). Le foie contient également une proportion significative de lymphocytes non conventionnels, tels que les NKT (*Natural Killer T Cells*) et les lymphocytes T $\gamma\delta$ ^{8,19}. Les NKT ont un répertoire de TCR très restreint et reconnaissent la molécule non-polymorphique CD1d (CD = *Cluster of Differentiation*), une protéine analogue aux protéines du MHC de type I. Les lymphocytes T $\gamma\delta$, qui représentent 15 à 25 % de tous les lymphocytes T intrahépatiques, possèdent des chaînes γ et δ au lieu des chaînes α et β des T conventionnels, et ils reconnaissent une gamme limitée d'antigènes, tels que des protéines de stress et des antigènes non-protéiques ^{8,19,20}.

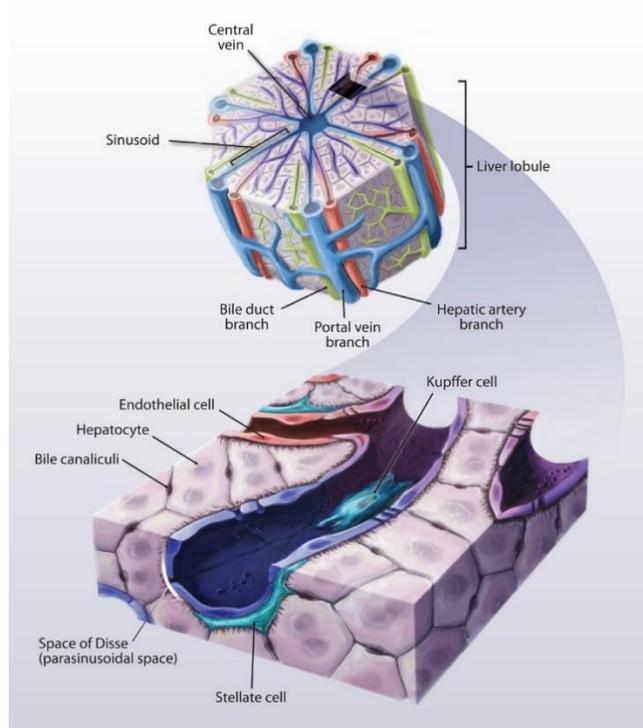


Figure 4 : Localisation des cellules du foie au sein du lobule hépatique ²¹. Au sein du lobule hépatique se trouvent des sinusoides bordées de cellules endothéliales et dans lesquels patrouillent les cellules de Kupffer. L'endothélium sinusoidal recouvre l'espace de Disse, qui contient des cellules stellaires hépatiques et des cellules dendritiques (non présents sur le schéma). On y retrouve également des canalicules biliaires, situés à la base des hépatocytes et chargés de véhiculer la bile produite.

3. Les fonctions hépatiques

L'organe hépatique remplit de nombreuses fonctions vitales variées et essentielles au bon fonctionnement de l'organisme ⁴. En effet, le foie joue un rôle central dans le métabolisme, assure la production et l'excrétion de la bile, et est capable de détoxifier des agents toxiques endogènes ou exogènes. C'est également un organe de stockage du glycogène et des vitamines liposolubles, et il participe à la régulation du volume sanguin ainsi qu'à la surveillance immunitaire.

3.1 Métabolisme des glucides – stockage du glycogène

Le foie joue un rôle crucial dans la régulation de la glycémie grâce à la capacité des hépatocytes à stocker les glucides (glucose, fructose, galactose) sous forme de glycogène. En

période postprandiale, le glucose est capté par le foie et pénètre dans les hépatocytes via le transporteur GLUT2 (*Glucose Transporter 2*). Selon les besoins de l'organisme, ce glucose peut être utilisé comme source d'énergie, notamment par le cerveau et les muscles, en étant transformé en pyruvate, une molécule essentielle à la formation d'ATP (*Adénosine Tri-Phosphate*) par le biais de la glycolyse. Cependant, cette voie métabolique n'utilise qu'environ 20 à 30 % du glucose internalisé par le foie. Le glucose résiduel est en effet majoritairement utilisé pour la synthèse de glycogène (= glycogénogenèse), d'acides gras et de corps cétoniques, qui sont stockés dans les hépatocytes et utilisés comme source d'énergie en cas de jeûne pour maintenir une glycémie normale. En période de jeûne de courte durée, lorsque la sécrétion d'insuline (hormone responsable de la baisse de la glycémie) est inhibée et celle du glucagon (responsable à l'inverse de son augmentation) est amplifiée, le stock de glycogène peut alors être mobilisé et dégradé lors de la glycogénolyse afin de produire une source d'énergie utilisable par les autres organes ²². En période de jeûne prolongé ou de famine, lorsque la réserve de glycogène est épuisée, le foie est capable de synthétiser du glucose à partir d'acides aminés (essentiellement l'alanine musculaire), de lactate et de glycérol au cours de la néoglucogenèse ²³ (**Figure 5**).

3.2 Métabolisme des lipides

Le foie joue également un rôle important dans l'homéostasie lipidique de l'organe ^{22,23}. Après un repas, les graisses alimentaires sont digérées dans l'intestin grêle et absorbées par les entérocytes, où les acides gras sont convertis en triglycérides ou en esters de cholestérol et sécrétés dans le système lymphatique intestinal sous forme de chylomicrons, de grosses particules lipidiques. Celles-ci sont ensuite absorbées par les hépatocytes, qui peuvent également stocker les acides gras libres provenant du tissu adipeux. Les triglycérides et les esters de cholestérol sont stockés dans les hépatocytes sous forme de gouttelettes lipidiques ou bien sécrétés dans la circulation générale sous forme de particules VLDL (*Very-Low Density Lipoproteins*) ^{23,24} (**Figure 5**). À l'intérieur des hépatocytes, les acides gras se lient à la protéine FABP-1 (*Fatty Acid-Binding Protein 1*), qui les dirige vers différents compartiments cellulaires. Ils sont ainsi utilisés pour le métabolisme énergétique ou pour la régulation de l'expression de gènes via des interactions avec des facteurs de transcription tels que PPAR α (*Peroxisome Proliferator Activated Receptor alpha*), protégeant ainsi le foie de la lipotoxicité ²². Les acides

gras servent également à la formation de lipoprotéines et de phospholipides, composants essentiels des membranes cellulaires et des acides biliaires. En cas de besoin énergétique, les hépatocytes génèrent de l'énergie à partir des acides gras par le biais de la lipolyse (ou β -oxydation)⁴. De plus, le foie est capable de synthétiser des acides gras à partir de précurseurs non-lipidiques tels que le glucose, un processus appelé lipogenèse *de novo* et basé sur des réactions comme la glycolyse et le cycle de Krebs^{4,23,24}. Enfin, le foie est un lieu de stockage de nombreuses vitamines liposolubles⁴, telles que la vitamine A (stockée dans les cellules stellaires), qui est essentielle pour le développement cellulaire et la surveillance immunitaire ; la vitamine E, un puissant antioxydant ; la vitamine K, impliquée dans le métabolisme osseux ; ainsi que les vitamines B12 et D, libérées en cas de besoin.

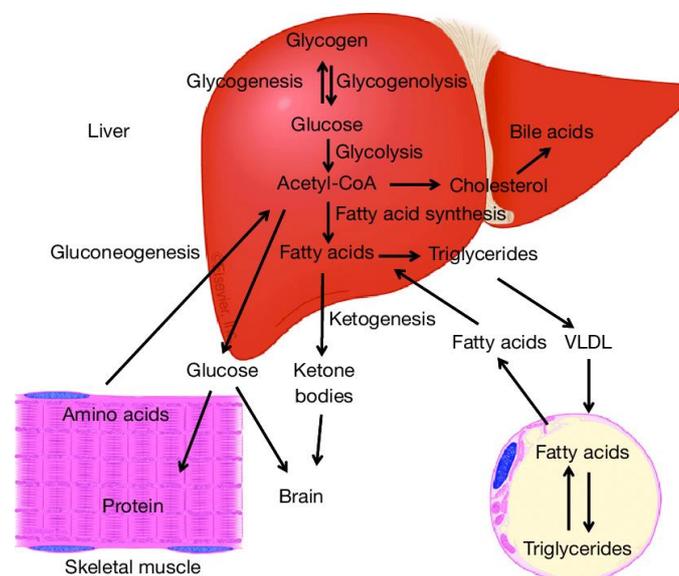


Figure 5 : Principales fonctions métaboliques du foie²³. Après un repas, le glucose ingéré est stocké dans le foie sous forme de glycogène. Le glucose passe par la glycolyse pour générer de l'acétyl-CoA, une molécule essentielle dans la synthèse des acides gras et du cholestérol, qui est lui-même catabolisé en acides biliaires. Les acides gras sont estérifiés en glycérol pour former des triglycérides, qui sont assemblés en VLDL (*Very-Low Density Lipoproteins*) pour assurer leur sécrétion et leur transport vers les adipocytes et d'autres tissus pour la production d'énergie. Le glucose est absorbé par les muscles afin de générer de l'énergie et des protéines. À jeun, les triglycérides des adipocytes sont hydrolysés en acides gras libres, qui sont transportés vers le foie pour permettre la synthèse de triglycérides et de corps cétoniques, utilisés pour la production d'énergie dans le cerveau et les muscles. En cas de jeûne prolongé, les protéines musculaires sont dégradées en acides aminés, qui sont transportés vers le foie pour la synthèse de glucose par néoglucogenèse.

3.3 Métabolisme des protéines – synthèse des protéines sanguines

Le foie est capable de dégrader et de recycler les acides aminés libres issus de la digestion des protéines alimentaires et de la dégradation des protéines cellulaires ^{4,22,23}. Ce processus nécessite principalement l'élimination du groupe amine NH_2 des acides aminés, mais cela génère généralement de l'ammoniaque NH_3 , une substance hautement toxique. Cette désamination est prise en charge par des enzymes appelées transaminases, notamment l'aspartate aminotransférase ASAT et l'alanine aminotransférase ALAT. Ces enzymes convertissent les acides aminés en glutamate, qui est ensuite désaminé par la glutamate déshydrogénase, ce qui produit de l'ammonium NH_4^+ . D'ailleurs, en cas de cytolysse hépatique, les transaminases sont libérées dans la circulation sanguine, ce qui en fait des marqueurs importants de la souffrance ou de la toxicité hépatique lors des prises de sang. Le foie est ainsi hautement spécialisé dans la gestion de l'ammonium, qu'il métabolise en urée. En effet, le cycle de l'urée est exclusivement réalisé dans l'organe hépatique. Celui-ci repose sur de nombreuses enzymes qui utilisent deux molécules d'ammoniac et une molécule de CO_2 pour produire de l'urée, laquelle est majoritairement excrétée dans l'urine par les reins. En outre, les acides aminés recyclés par le foie peuvent être réutilisés pour former de nouvelles protéines ^{4,22,23}. Ainsi, 85 à 90 % des protéines plasmatiques sont produites par le foie. L'albumine, la protéine majoritaire du plasma sanguin, est principalement anabolisée par le foie et joue un rôle essentiel dans la régulation du volume sanguin et la distribution des fluides entre les différents organes. Le foie produit également des inhibiteurs de protéases, des hormones de croissance et des protéines de la coagulation sanguine.

3.4 Détoxification des xénobiotiques

En plus de ses capacités métaboliques et de synthèse, le foie est également réputé pour son aptitude à transformer des composants toxiques, qu'ils soient endogènes (sels, composés lipophiles) ou exogènes (médicaments, alcool) en dérivés inactifs pour faciliter leur élimination ^{4,22,23}. Ce processus, connu sous le nom de détoxification, se déroule généralement en deux étapes distinctes. La première phase de la détoxification implique des réactions enzymatiques médiées par des monooxygénases de la famille des cytochromes P450 (CYP). Principalement localisées dans le foie ²², ces enzymes sont des hémoprotéines contenant un groupe hème lié à leur site actif. Elles utilisent alors le fer pour catalyser des

réactions d'oxydo-réduction, d'hydrolyse, d'hydratation ou de dé-halogénéation. Ces réactions visent à exposer ou ajouter des groupements fonctionnels (-OH, -NH₂, -SH, -COOH) aux xénobiotiques, les rendant ainsi plus hydrophiles. Cela permet de faciliter leur élimination ou leur conjugaison avec d'autres molécules. Cette phase génère des ROS qui doivent être rapidement métabolisés afin d'éviter un stress oxydatif potentiellement nocif pour les tissus environnants. Pour ce faire, le foie met en place des systèmes antioxydants tels que le glutathion et les vitamines A, E et C ²⁵. La seconde phase de détoxification consiste en des réactions de conjugaison qui ajoutent un groupement polaire aux métabolites oxydés pour les rendre encore plus hydrosolubles. Cette étape implique des sulfonations, des glucuroconjugaisons, des méthylations ou des glutathionylations nécessitant des enzymes spécifiques telles que des sulfotransférases (SULT), des UDP-glucuronyltransférases (UGT), des méthyltransférases et des glutathion-transférases (GST) ²⁵. Les molécules toxiques ainsi neutralisées sont ensuite éliminées par voie rénale ou digestive via la bile.

Par ailleurs, en plus de la détoxification de l'ammoniaque qui a été précisée ci-dessus, le foie est également un acteur important de l'élimination de la bilirubine, un produit du catabolisme de l'hémoglobine et des hémoprotéines ^{4,25}. La bilirubine libérée est hydrophobe et toxique pour l'organisme. Pour la neutraliser, le foie la transforme en bilirubine conjuguée en l'associant à l'albumine. Cette dernière est ensuite éliminée par voie fécale ou déversée dans la bile, dont elle est un composant majeur, conférant ainsi à cette dernière sa couleur jaunâtre caractéristique.

3.5 Capacité de régénération

Le foie est unique parmi les organes solides de par sa capacité à se régénérer ^{4,26}. En effet, en réponse à une lésion ou un stress, il est capable de stimuler la prolifération des cellules hépatiques afin de maintenir un rapport foie/poids corporel constant et d'assurer l'homéostasie générale. Cette capacité de régénération est intimement liée aux fonctions de détoxification du foie et à son interaction étroite avec le tube digestif, qui l'expose continuellement à des conditions de stress ^{4,26}. Ce processus dépend de nombreux facteurs de croissance, comme l'HGF (*Hepatocyte Growth Factor*) et de la surexpression de certains récepteurs comme EGFR (*Epithelial Growth Factor Receptor*) qui favorisent l'auto-renouvellement des hépatocytes. Il a été également montré que les HSCs pouvaient sécréter

l'HGF et le TGF- β 1, qui jouent des rôles pro-mitotiques²⁷. D'autres voies de signalisation, telles que NF κ B (*Nuclear Factor kappa B*) et YAP (*Yes-Associated Protein*), ainsi que le recrutement de leucocytes et l'activation des HSCs en myofibroblastes par la sécrétion d'IL-6 et de TNF- α (*Tumor Necrosis Factor alpha*) par les KCs peuvent aussi induire la prolifération cellulaire des hépatocytes^{26,28}. De plus, le parenchyme hépatique contient des cellules souches progénitrices capables de se différencier en hépatocytes ou cholangiocytes en cas de besoin, contribuant ainsi à la régénération du foie^{4,29}.

3.6 Production et excrétion de la bile

Pour finir, le foie est responsable de la production et de l'excrétion de la bile⁴, qui est un fluide jaunâtre principalement constitué d'eau, de sels et d'acides biliaires, de phospholipides, d'électrolytes, de cholestérol, d'acides aminés et de bilirubine conjuguée^{30,31}. Ses principales fonctions sont l'émulsification et l'adsorption des graisses alimentaires pour faciliter leur digestion, ainsi que l'élimination des substances lipophiles ou des xénobiotiques non assimilés par les reins. Au niveau mécanistique, le pool d'acides biliaires composant la bile est constitué d'acides biliaires primaires, produits dans les hépatocytes et stockés dans la vésicule biliaire, et d'acides biliaires secondaires issus du métabolisme bactérien. Les acides biliaires primaires sont formés à partir de l'hydroxylation du cholestérol, soit par la cholestérol-7 α -hydroxylase (CYP7A1) dans la voie classique (neutre) des hépatocytes, soit par la stérol-27-hydroxylase (CYP27A1) dans la voie alternative (acide) trouvée dans les tissus extrahépatiques^{30,31}. Cela produit des acides cholique et chénodésoxycholique, qui se conjuguent à la taurine ou à la glycine pour former une bile capable d'être sécrétée par les canalicules biliaires des hépatocytes par le biais de transporteurs membranaires de la famille ABC (*ATP Binding Cassette*). Les cholangiocytes la prennent ensuite en charge, la diluent et l'alcalinisent, avant qu'elle ne soit stockée dans la vésicule biliaire. Lors de la digestion, la bile est libérée dans le duodénum afin d'être métabolisée par le microbiote intestinal. Environ 95 % des acides biliaires sont réabsorbés (par transport actif et passif) au niveau de l'iléon terminal et recyclés par le foie via le cycle entéro-hépatique, tandis que le reste des acides biliaires pénètre dans le côlon, où ils sont métabolisés en acides biliaires secondaires comme l'acide désoxycholique, l'acide lithocholique et l'acide ursodésoxycholique, qui sont recapturés passivement^{30,31} (**Figure 6**).

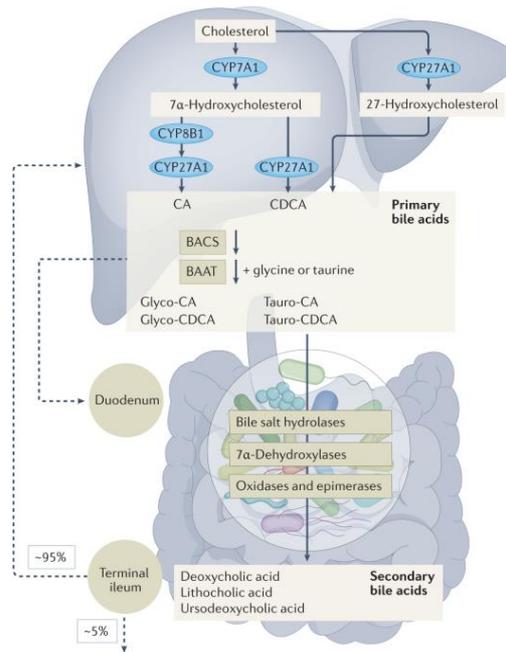


Figure 6 : Production et excrétion de la bile par le foie ³⁰ (modifié). Les acides biliaires primaires sont synthétisés à partir du cholestérol dans le foie par la voie classique (médiation par la cholestérol-7 α -hydroxylase (CYP7A1)) ou par la voie alternative (médiation par la stérol-27-hydroxylase (CYP27A1)). La BA-CoA synthétase (ou BACS pour *Bile Acid-CoA synthetase*) et la BA-CoA : amino acid N-acyltransférase (ou BAAT pour *Bile Acid-CoA Amino-acid Transferase*) catalysent ensuite la conjugaison des acides biliaires avec la glycine ou la taurine pour former des sels biliaires. Le microbiote intestinal métabolise ensuite les acides biliaires sécrétés dans le duodénum en acides biliaires secondaires. La réabsorption d'environ 95 % des acides biliaires au niveau de l'iléon terminal permet leur recyclage par le foie. CA, acide cholique ; CDCA, acide chénodésoxycholique.

II. L'arbre biliaire

1. Anatomie de la vésicule et physiopathologie des voies biliaires

1.1 La vésicule biliaire

Comme nous venons de le voir, la bile synthétisée par les hépatocytes est stockée dans la vésicule biliaire, un petit organe creux en forme de poire, mesurant chez l'adulte 7 à 10 cm de long pour 3 cm de large (**Figure 7**). Cet organe a pour principale fonction de concentrer la bile entre les repas ^{30,31}. Elle dispose ainsi d'une fonction motrice lui permettant de libérer son stock de bile en cas de besoin, principalement régulée par les acides biliaires via le récepteur membranaire TGR5 (*Takeda G protein-coupled Receptor 5*), mais aussi par des signaux neurohormonaux liés à la digestion ³². En effet, des cellules entéroendocrines spécialisées, nommées cellules I et situées dans le duodénum et le jéjunum, libèrent une hormone

peptidique appelée cholécystokinine (CCK) lorsqu'elles sont stimulées par des acides gras et des acides aminés provenant de l'estomac. La CCK stimule le muscle lisse de la vésicule biliaire pour permettre sa contraction et la libération de la bile dans le duodénum. Elle contrôle également l'ouverture et la fermeture du sphincter d'Oddi, maîtrisant le flux de bile traversant la papille duodénale. L'épithélium de la vésicule sécrète également du bicarbonate et des mucines, assurant ainsi une cytoprotection contre les acides biliaires ³².

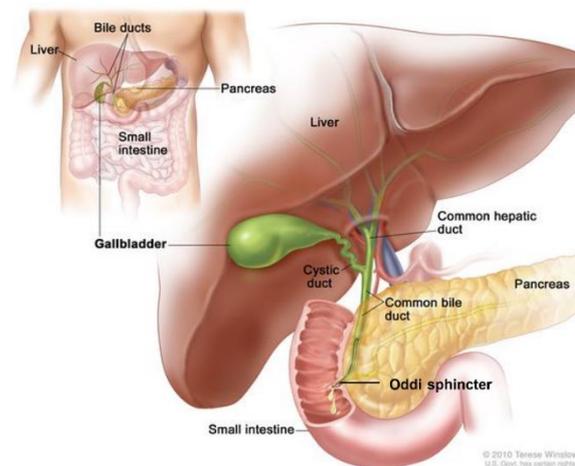


Figure 7 : Anatomie de la vésicule biliaire ³³ (modifié). La vésicule se situe sous le foie et a pour fonction principale de stocker la bile produite par les hépatocytes. Celle-ci s'écoule à travers le canal cystique et le canal biliaire principal dans l'intestin grêle lors de la digestion des aliments. La bile est alors déversée dans l'intestin au niveau du sphincter d'Oddi.

La vésicule biliaire est reliée via le canal cystique à un réseau complexe et ramifié de canaux biliaires nommé arbre biliaire, dans lequel la bile est acheminée.

1.2 L'arbre biliaire

L'arbre biliaire, dont fait partie la vésicule, est constitué d'un réseau complexe de canaux tapissés de cholangiocytes, qui régulent la composition et le transport de la bile produite par les hépatocytes ^{34,35}. La structure de ces canaux varie le long de l'arbre. Les voies biliaires commencent à la sortie des canalicules biliaires, situés au niveau des triades portales, parallèlement aux lobules hépatiques (**Figure 4**). Ces canaux convergent vers les canaux de Hering ou cholangiols, qui sont bordés par 3 à 4 cellules (cholangiocytes ou hépatocytes) et ont un diamètre n'excédant pas 15 μm . Ceux-ci peuvent également être délimités par des cellules souches bipotentes, appelées cellules ovales, capables de se différencier en cholangiocytes ou hépatocytes selon les besoins. Les canaux de Hering convergent pour

former des ductules, qui se rejoignent pour former les voies biliaires interlobulaires et septales, ayant un diamètre compris entre 15 et 300 μm . Les plus gros canaux biliaires, avec un diamètre de 300 à 800 μm , forment à leur tour les canaux hépatiques droit et gauche. Ces canaux sont entourés d'une couche de tissu fibreux en contact avec les cholangiocytes, leur conférant une certaine souplesse (**Figure 8**). Le canal hépatique commun découlant de la convergence de ces deux conduits est relié à la vésicule biliaire via le canal cystique. La portion terminale issue de la réunion de ces deux canaux est appelée canal cholédoque, qui débouche sur le sphincter d'Oddi à l'entrée de l'intestin grêle ^{32,35} (**Figure 7**). Dans la paroi des canaux biliaires, on peut également retrouver des glandes péribilaires composées de cholangiocytes qui participent à la modification de la bile et à la protection de l'épithélium biliaire. Ces glandes peuvent être intramurales, lorsqu'elles sont reliées à la paroi, ou extramurales lorsqu'elles sont situées à l'extérieur ^{34,35} (**Figure 8**).

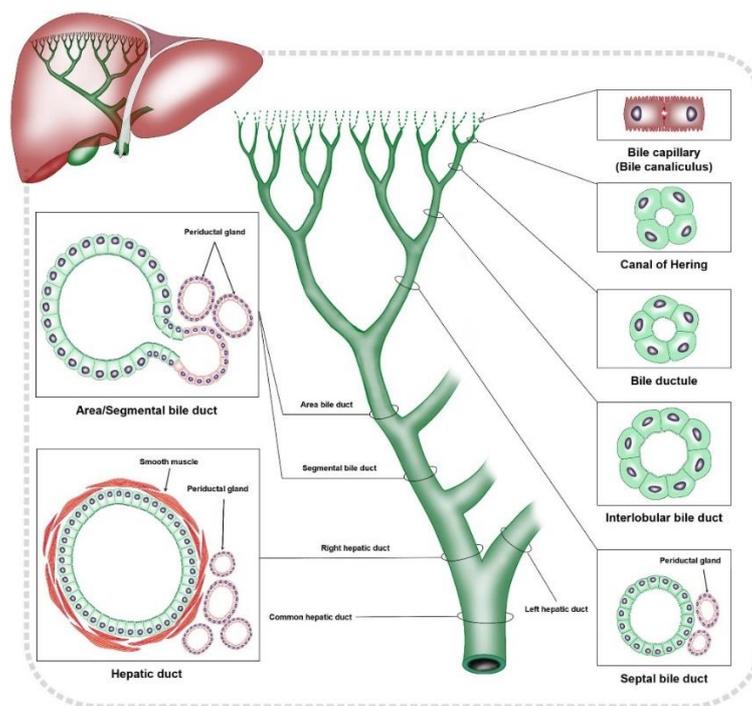


Figure 8 : Caractéristiques structurales de l'arbre biliaire ³⁴. Vue d'ensemble de l'architecture ramifiée des voies biliaires et nomenclature des différents canaux intra et extrahépatiques.

2. Les cholangiocytes

Les cholangiocytes, également connus sous le nom de cellules biliaires, sont des cellules épithéliales cubiques et polarisées qui tapissent les voies biliaires intra et extrahépatiques. Ces cellules très spécialisées représentent environ 3 à 5 % des cellules hépatiques (**Figure 3**)

et jouent un rôle crucial dans l'homéostasie du cycle entéro-hépatique (**Figure 6**). Présents dès les canaux de Hering (**Figure 8**), leur principale fonction est de modifier la bile primaire sécrétée par les hépatocytes, notamment en l'alcalinisant^{10,36}. Cette fonction est régulée par divers transporteurs membranaires tels que ASBT (*Apical Sodium dependent Bile acid Transporter*), CFTR (*Cystic Fibrosis Transmembrane conductance Regulator*) ou l'échangeur chlore-bicarbonate AE2 (*Anion Exchange protein 2*), ainsi que par plusieurs hormones gastro-intestinales. Les cholangiocytes jouent également un rôle dans la détoxification des xénobiotiques et la sécrétion de mucine, qui protège l'épithélium biliaire via la formation de glandes péribilières (**Figure 8**). Le pôle apical ou luminal de ces cellules est doté de nombreuses villosités qui augmentent leur surface d'échange dans les canaux biliaires. Celles-ci sont recouvertes d'une fine couche de bicarbonate (grâce à AE2), créant ainsi un microenvironnement alcalin qui protège les cellules des effets détergents des acides biliaires³⁶.

Les cholangiocytes présentent une hétérogénéité anatomique et fonctionnelle tout au long des voies biliaires. Leur taille varie généralement avec celle des canaux : les petits cholangiocytes (aplatis ou cubiques) se trouvent dans les petits canaux intrahépatiques et ont un rapport nucléo-cytoplasmique plus élevé que les plus grands cholangiocytes³⁷. Ces cellules, peu différenciées, sont considérées comme des cellules progénitrices contribuant au renouvellement de l'épithélium et à la régénération des tissus. À mesure que l'on progresse le long de l'arbre biliaire, les cholangiocytes acquièrent un degré croissant de différenciation en termes de polarité cellulaire et d'expression des récepteurs et transporteurs biliaires. Par exemple, seuls les petits cholangiocytes expriment la protéine anti-apoptotique BCL-2 (*B-Cell Lymphoma*), ce qui leur confère une résistance accrue aux xénobiotiques et métabolites, contrairement aux gros cholangiocytes qui sécrètent les principaux fluides biliaires.

3. Les pathologies biliaires ou cholangiopathies

Les cholangiocytes qui tapissent les voies biliaires peuvent subir des dommages dans le cadre de diverses pathologies appelées cholangiopathies. Les deux principales sont la cholangite biliaire primitive (CBP) et la cholangite sclérosante primitive (CSP)³⁸. Ces maladies entraînent souvent une cholestase, c'est-à-dire une réduction ou un arrêt de l'écoulement de la bile. La **Table 1** présente un comparatif global entre ces deux pathologies.

3.1 La cholangite biliaire primitive ou CBP

La CBP est la maladie hépatique cholestatique la plus courante chez l'Homme. Cette pathologie inflammatoire auto-immune se caractérise par une destruction progressive des petits canaux biliaires, pouvant conduire à une fibrose hépatique et, finalement, à l'établissement d'une cirrhose. La prévalence de la CBP est d'environ 40 cas pour 100 000 personnes, et cette fréquence tend à augmenter avec le temps. Cette pathologie prédomine chez la femme (ratio 9 :1) après ménopause, ce qui suggère un rôle protecteur des œstrogènes. Les symptômes les plus fréquents incluent une asthénie (fatigue) et un prurit, bien que ceux-ci fassent souvent défaut³⁸⁻⁴⁰. Le diagnostic de la CBP est relativement simple et repose sur la présence de signes biochimiques chroniques de cholestase, tels que l'augmentation des phosphatases alcalines, ainsi que sur la détection d'auto-anticorps spécifiques, notamment les anticorps anti-mitochondriaux de type M2. Bien que l'étiologie de la maladie ne soit pas entièrement comprise, il semble exister une forte prédisposition génétique. En effet, des études d'association à l'échelle du génome (GWAS) ont identifié environ trente loci de susceptibilité à la CBP, impliquant notamment des gènes participant à divers processus immunitaires^{38,41,42}. Le traitement actuellement recommandé pour la CBP repose sur l'acide ursodésoxycholique (AUDC), qui aide à réduire les niveaux d'acides biliaires endogènes circulants⁴⁰. Toutefois, 30 à 40 % des patients ne répondent pas à ce traitement de première ligne et nécessitent des traitements de deuxième intention incluant des agonistes des récepteurs FXR (*Farnesoid X Receptor*) comme l'acide obéticholique et des récepteurs PPAR comme les fibrates. En dernier recours, une transplantation hépatique peut être recommandée.

3.2 La cholangite sclérosante primitive ou CSP

La CSP est une maladie cholestatique chronique et inflammatoire qui affecte principalement les gros canaux biliaires. Elle se diagnostique généralement à la suite d'une cholestase due à l'installation d'une fibrose provoquant un rétrécissement des canaux biliaires et l'entrave du flux biliaire^{38,39}. Si elle n'est pas traitée à temps, la CSP peut progresser vers la cirrhose. La prévalence de cette maladie est relativement faible, variant de 0 à 16,2 cas pour 100 000 personnes. La CSP touche majoritairement les hommes (60 %) et reste asymptomatique dans environ 50 % des cas. Lorsqu'elle se manifeste, les symptômes les plus courants sont le prurit

et l'ictère (jaunisse) dû à un mauvais écoulement de la bile. Le diagnostic de la CSP repose sur la détection de signes de cholestase chronique, l'identification de lésions caractéristiques à la cholangio-IRM (sténoses biliaires multifocales) ou sur l'examen histologique du foie révélant une oblitération fibreuse des voies biliaires avec remplacement concentrique par du tissu conjonctif « en peau d'oignon ». Les mécanismes pathogéniques de la CSP ne sont pas encore entièrement élucidés, mais ils semblent impliquer des lésions auto-immunes exacerbées par des facteurs génétiques et environnementaux perturbant la surveillance immunitaire et altérant la perméabilité intestinale. Des études GWAS ont ainsi pu identifier une quinzaine de loci de susceptibilité à la CSP, souvent associés à d'autres maladies auto-immunes ³⁸. Actuellement, il n'existe pas de traitement curatif pour la CSP. Bien que des essais cliniques utilisant l'AUDC aient montré des effets bénéfiques sur les paramètres biochimiques sériques et sur l'histologie hépatique ⁴³, aucune étude n'a démontré une augmentation significative de la survie des patients. Pour les patients atteints de CSP avancée, la transplantation hépatique demeure le principal traitement disponible.

Table 1 : Comparaison des caractéristiques de la CBP et de la CSP ³⁹. La CBP touche uniquement les voies biliaires intrahépatiques contrairement à la CSP, qui affecte à la fois les voies biliaires intra et extrahépatiques. Dans les deux cas, une élévation des taux sériques des phosphatases alcalines (ALP : *Alkaline Phosphatase*) et des GGT (*Gamma Glutamyltransferases*) est attendue. La CBP est diagnostiquée suite à un dosage des anticorps anti-mitochondriaux et est souvent associée à un syndrome de Sjogren (maladie auto-immune), tandis que la CSP est diagnostiquée par des méthodes d'imagerie (ERCP : *Endoscopic Retrograde Cholangiopancreatography* / MRCP : *Magnetic Resonance Cholangiopancreatography*) et est souvent associée à des maladies chroniques de l'intestin (usuellement des rectocolites hémorragiques, UC sur le schéma pour *Ulcerative Colitis*). La CBP est traitée par de l'AUDC, tandis que l'unique traitement curatif de la CSP est la transplantation hépatique.



Primary Biliary Cholangitis (PBC) vs Primary Sclerosing Cholangitis (PSC)

Primary Biliary Cholangitis (PBC)		Primary Sclerosing Cholangitis (PSC)
Inflammation of intrahepatic bile ducts which may lead to fibrosis and cirrhosis	Site of Involvement	Inflammation of both intra and extrahepatic bile ducts (10-15% only intrahepatic affected)
♀ Female > male (9:1 ratio)	Gender	♂ Male > female
Often asymptomatic; Pruritus, fatigue, abdominal pain; Jaundice after years	Features	Pruritus, fatigue, cholangitis
Cholestatic picture with raised ALP, GGT	Liver function tests	Cholestatic picture with raised ALP, GGT
Anti-mitochondrial antibody (AMA) M2 subtype positive in 98% of PBC	Investigation	ERCP/MRCP shows beaded appearance of bile ducts
Sjogren's syndrome (seen in 80% of PBC) Rheumatoid arthritis Systemic sclerosis	Associated conditions	80% of those with PSC have inflammatory bowel disease (usually UC)
Cirrhosis	Complications	↑ Risk of cholangio and colorectal carcinoma Cirrhosis
<ul style="list-style-type: none"> Cholestyramine for pruritus Ursodeoxycholic acid – improves survival and delay transplantation Liver transplantation 	Treatment	<ul style="list-style-type: none"> Cholestyramine for pruritus Ursodeoxycholic acid – may improve LFTs but does not improve survival Liver transplantation

3.3 Les autres cholangiopathies

Certaines cholangiopathies peuvent également être présentes dès la naissance de l'enfant, désignées alors comme pathologies congénitales ⁴⁴, telles que :

- **L'atrésie des voies biliaires** ^{38,44,45} : D'étiologie inconnue, cette maladie se manifeste chez les nouveau-nés par une jaunisse, des selles de couleur argile et une hépatomégalie. Elle est causée par une obstruction fibrotique des voies biliaires et a une prévalence de 1 cas pour 12 000 naissances aux États-Unis. Son diagnostic est établi par des méthodes d'imagerie telles que la cholangiopancréatographie par résonance magnétique (CPRM) et elle est traitée par une intervention chirurgicale appelée hépatoparto-entérostomie, ou intervention de Kasai. Cette chirurgie consiste à retirer totalement la fibrose biliaire, suivie d'une anastomose bilio-entérique, qui permet de rétablir le flux biliaire via la création d'une voie « non-anatomique » de dérivation de la bile vers l'intestin.

- **Le syndrome d'Alagille** ^{38,44,46} : Ce trouble autosomique est causé par des variants pathogènes dans les gènes *JAG1* ou *NOTCH2*, qui codent pour des composants essentiels de la voie de signalisation Notch. Il est caractérisé par une cholestase chronique due à une raréfaction des voies biliaires intrahépatiques, une sténose de l'artère pulmonaire périphérique, des anomalies mineures de la segmentation vertébrale, un faciès caractéristique et des reins dysplasiques. Le diagnostic repose sur une biopsie hépatique et des examens d'imagerie, avec une attention particulière aux anomalies ophtalmiques, squelettiques ou vasculaires. Le séquençage de l'ADN peut confirmer le diagnostic. Il n'existe pas de traitement spécifique pour cette maladie, mais il comprend généralement une alimentation riche en glucides, en triglycérides et des suppléments vitaminiques. En cas de maladie réfractaire, une transplantation hépatique peut être envisagée.
- **Les cholestases intrahépatiques familiales progressives (PFIC)** ^{38,44,47} : Ce groupe hétérogène de cholangiopathies rares chez l'enfant affecte la sécrétion biliaire. Il existe trois types de PFIC, toutes liées à des défauts d'expression de transporteurs biliaires hépatocytaires. Les PFIC1 et PFIC2 sont dues à des anomalies des gènes *ATP8B1* (codant pour la protéine FIC1, *Familial Intrahepatic Cholestasis 1*) et *ABCB11* (codant pour BSEP, *Bile Salt Export Pump*), se manifestant dès les premiers mois de vie. La PFIC3 est causée par des mutations du gène *ABCB4* (codant pour MDR3, *Multidrug Resistance 3*) et peut apparaître plus tardivement. Le diagnostic de ces pathologies peut être basé sur la mesure des niveaux d'expression des protéines MDR3 et BSEP dans les hépatocytes et sur l'analyse de la composition lipidique de la bile. Le traitement initial inclut l'AUDC, mais une transplantation hépatique est souvent nécessaire avant l'âge adulte.

Enfin, le cholestérol présent dans la bile peut former des cristaux dans la vésicule biliaire, conduisant à la formation de calculs biliaires, une pathologie connue sous le nom de cholélithiase ou lithiase biliaire ^{38,48}. Dans 80 % des cas, les calculs ne provoquent ni gêne ni symptôme. Cette pathologie est plus fréquente chez les personnes âgées et prédomine chez les femmes, en particulier celles ayant eu plusieurs enfants. En effet, pendant la grossesse, la bile contient une plus grande quantité de cholestérol et la capacité motrice de la vésicule biliaire est altérée. Les calculs peuvent être détectés par échographie ou cholangio-IRM, et le

traitement le plus efficace à long terme est l'ablation de la vésicule biliaire, ou cholécystectomie. Cette intervention n'entraîne pas de troubles majeurs, car sans la vésicule, la bile continue de s'écouler directement dans l'intestin. Un cas particulier de lithiase biliaire est dû à une mutation génétique du gène *ABCB4*, connu sous le nom de LPAC (*Low Phospholipid Associated Cholelithiasis*)⁴⁸. Cette pathologie se caractérise par une faible concentration de phospholipides biliaires et la présence de micro-calculs dans les voies biliaires. Elle peut être traitée par un traitement curatif ou prophylactique à l'AUDC, ou par un drainage biliaire dans certains cas particuliers.

Ainsi, l'organe hépatobiliaire, véritable carrefour métabolique, joue un rôle essentiel dans l'homéostasie de l'organisme. Il présente une organisation structurelle unique fondée sur une multitude de cellules spécialisées. Les hépatocytes composant le foie sont principalement responsables de la production de la bile et de sa sécrétion dans la circulation biliaire, système ramifié tapissé de cellules polarisées nommées cholangiocytes. Bien que celles-ci présentent une hétérogénéité anatomique et fonctionnelle le long de l'arbre biliaire, elles ont pour mission commune de transporter la bile afin d'assurer la digestion des aliments. Toutefois, les cholangiocytes sont sujets à de nombreuses pathologies, dont certaines peuvent être néoplasiques et donner naissance à des tumeurs malignes. Dans ce cas, on parle de cancers des voies biliaires, ou plus communément de cholangiocarcinomes.

Chapitre 2

Le cholangiocarcinome, cancer des voies biliaires

Le terme « cancer » est utilisé pour décrire une maladie connue depuis l'Antiquité. Ce mot tire son origine du mot latin homonyme qui signifie « crabe ». En effet, c'est le médecin grec Hippocrate qui, en comparant des tumeurs à cet animal, leur a attribué les noms grecs de *karkinos* et *karkinoma* qui forment aujourd'hui la racine du terme « carcinome ». Cette analogie est basée sur l'apparence visuelle de certaines tumeurs, qui présentent des structures arrondies et globulaires entourées de prolongements rappelant les pattes d'un crabe.

Cette pathologie résulte de la transformation de cellules saines en cellules anormales qui se multiplient de manière incontrôlée. Ces cellules dérégulées finissent par former une masse que l'on appelle tumeur maligne et ont tendance à envahir les tissus voisins pour former des tumeurs secondaires ou métastases. Cette propriété métastatique n'est qu'une des très nombreuses caractéristiques des cellules tumorales, qui sont récapitulées dans la **Figure 9**.

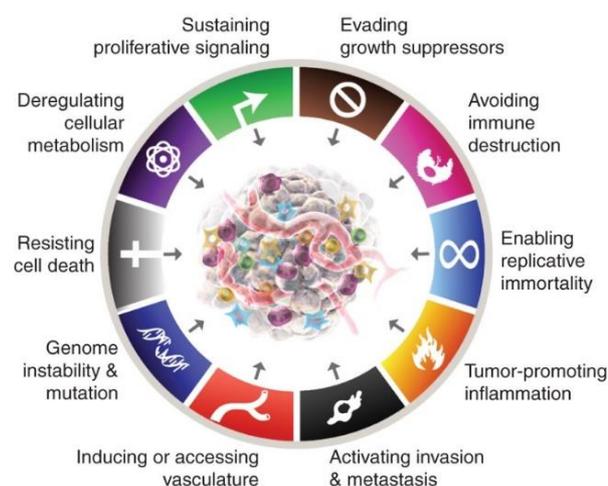


Figure 9 : Propriétés des cellules cancéreuses⁴⁹ (modifié). Les cellules cancéreuses présentent une dizaine de caractéristiques qui leur sont propres. Ainsi, elles promeuvent une inflammation pro-tumorale leur permettant d'échapper à l'immunosurveillance, peuvent envahir les autres tissus environnants en encourageant la formation de nouveaux vaisseaux sanguins et présentent un métabolisme dérégulé leur permettant de résister aux mécanismes de mort cellulaire.

Le cancer peut affecter n'importe quel organe de l'organisme et chaque néoplasie possède des caractéristiques spécifiques. Les tumeurs qui se développent au sein des voies biliaires se nomment cholangiocarcinomes (CCA).

I. Classification des CCA

1. Classification anatomique

Le terme « cholangiocarcinome » (CCA) désigne un ensemble de tumeurs malignes qui se développent à partir des cholangiocytes tapissant les voies biliaires. Les CCA peuvent apparaître à n'importe quel niveau de l'arbre biliaire, depuis le bas cholédoque jusqu'aux petits canaux biliaires intrahépatiques, ce qui leur confère une grande hétérogénéité anatomique, histologique et moléculaire ⁵⁰. En fonction de leur localisation et de leurs caractéristiques histologiques, on peut distinguer les CCA intrahépatiques (iCCA), qui se développent dans les petits et grands canaux intrahépatiques, et les CCA extrahépatiques (eCCA), eux-mêmes subdivisés en deux sous-classes : les CCA périhilaires (pCCA), anciennement appelés tumeurs de Klatskin et qui émergent du canal hépatique commun, et les CCA distaux (dCCA), qui se développent au niveau du cholédoque en aval du canal cystique. Les eCCA constituent la majorité des CCA diagnostiqués, représentant environ 70 à 80 % des cas ^{50,51} (**Figure 10.A**).

Histologiquement, les eCCA sont majoritairement définis comme des adénocarcinomes mucineux, caractérisés par une forte expression des marqueurs de surface MUC1, MUC6 et MUC5AC ^{50,51}. En revanche, les iCCA regroupent des tumeurs très hétérogènes pouvant présenter trois modèles de croissance différents. Les iCCA montrent généralement un schéma de croissance de type « mass-forming » (MF-iCCA pour *Mass-Forming iCCA*, 65 % des iCCA), tandis que les iCCA provenant des moyens et grands canaux biliaires présentent des schémas de croissance similaires à ceux des pCCA et des dCCA : de type périductal (PI-iCCA pour *Periductal-Infiltrating iCCA*, 6 % des iCCA) ou intraductal (IG-iCCA pour *Intraductal-Growing iCCA*, 6 % des iCCA). 25 % des iCCA combinent des caractéristiques des PI-iCCA et des IG-iCCA. Les PI-iCCA et IG-iCCA arborent généralement un type mucineux, contrairement aux MF-iCCA, qui affectent les petits canaux biliaires et présentent généralement un type mixte ^{50,51} (**Figure 10**).

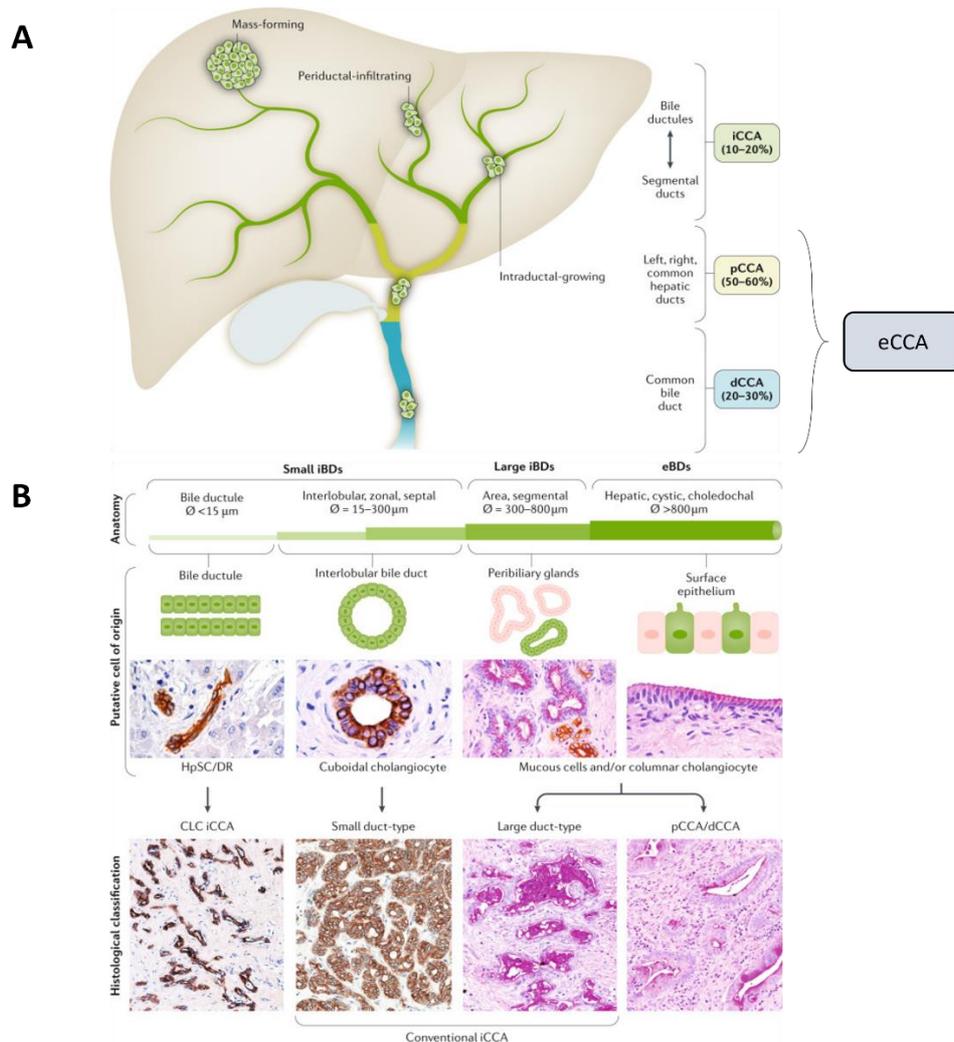


Figure 10 : Classification anatomique et histologique des CCA ⁵⁰ (modifié). **A.** En fonction du site anatomique d'origine, le CCA peut être classé en iCCA (10 à 20 % des cas), en pCCA (50 à 60 % des cas) ou dCCA (20 à 30 % des cas). Le pCCA, qui se développe dans le canal hépatique droit et/ou gauche et/ou à leur jonction, et le dCCA, qui implique le cholédoque, forment les eCCA. Le CCA peut présenter trois principaux modes de croissance : formation de masse ou « mass-forming », infiltration périductale (se développe à l'intérieur de la paroi du conduit et se propage longitudinalement le long de la paroi) ou croissance intraductale (tumeur polypoïde ou papillaire se développant vers la lumière du conduit). **B.** En fonction de la taille du canal, l'arbre biliaire intrahépatique peut être subdivisé en petits et grands canaux biliaires intrahépatiques (iBDs pour *Intrahepatic Bile Ducts*). Les petites iBDs sont bordées de petits cholangiocytes cuboïdes tandis que les grandes iBDs sont bordées de cholangiocytes cylindriques et muqueux et contiennent des glandes péribiliaries dans leur paroi. L'arbre biliaire extrahépatique (eBDs pour *Extrahepatic Bile Ducts*) partage des caractéristiques anatomiques avec les iBDs de grande taille. Les variantes histologiques du CCA reflètent le phénotype du canal impliqué et de la cellule d'origine présumée. L'iCCA peut présenter deux origines distinctes : il peut émaner des cholangiocytes cuboïdes des petites iBDs, ou bien des cholangiocytes cylindriques et des glandes péribiliaries (glandes séromuqueuses ; les acini muqueux sont représentés en rose clair, les acini séreux sont représentés en vert) peuplant les plus grosses iBDs. Le cholangiocarcinome (CLC) est une variante histologique fréquente de l'iCCA et se déclare principalement à la suite de la réaction ductulaire (DR pour *Ductular Reaction*) mise en place dans les pathologies hépatiques chroniques. La grande majorité des pCCA et des dCCA sont considérés comme provenant de l'épithélium de revêtement et des glandes péribiliaries. HpSC, cellule souche pluripotente humaine.

Bien que cette classification anatomique des tumeurs facilite considérablement le diagnostic, elle reste néanmoins limitée et gagnerait à être complétée par des approches plus approfondies, prenant en compte les variations génétiques et phénotypiques des tumeurs. Par exemple, les pCCA et les iCCA provenant des gros canaux biliaires intrahépatiques présentent des caractéristiques anatomiques et moléculaires similaires, ce qui peut conduire à des erreurs de diagnostic significatives⁵⁰⁻⁵² (**Figure 10.B**).

2. L'apport des omiques dans la classification des CCA

Ces dernières années, l'essor des approches multi-omiques a permis de proposer de nouvelles classifications des CCA^{52,53}. Grâce à ces méthodes avancées, des distinctions génétiques et génomiques ont été établies entre les divers sous-types de CCA. Les analyses moléculaires qui en résultent ont donné naissance à des classifications morpho-moléculaires pertinentes sur le plan clinique, mettant en évidence des voies de signalisation qui pourraient être ciblées pour traiter ce cancer.

2.1 Classification moléculaire

De nombreuses recherches ont mis en lumière des altérations génétiques spécifiques aux iCCA et eCCA⁵³. Par exemple, une étude publiée en 2015 a révélé que les iCCA présentaient fréquemment des mutations dans les gènes *IDH1/2* (*Isocitrate Dehydrogenase*) et *NRAS* (*NRAS proto-oncogene*), tandis que les eCCA sont généralement associés à des mutations dans les gènes *TP53* (*Tumor Protein P53*) (75 %), *KRAS* (*KRAS proto-oncogene*) (50 %) et *BRAF* (*B-Raf proto-oncogene*) (12,5 %)⁵⁴. Toutefois, cette étude avait une portée limitée en raison du faible nombre d'échantillons exploitables, avec seulement onze des seize échantillons de CCA humain utilisables. Une autre étude de la même année a renforcé ces observations en analysant un plus grand nombre d'échantillons (137 iCCA et 74 eCCA)⁵⁵. Cette recherche a également mis en évidence des altérations génétiques distinctives pour les iCCA, comme des mutations de *IDH1/2*, *BAP1* (*BRCA1 Associated Protein 1*) et des fusions de *FGFR2* (*Fibroblast Growth Factor Receptor 2*) et pour les eCCA, comme des mutations de *PRKACA* (*Protein Kinase CAMP-Activated catalytic subunit alpha*) ou *ARID18* (*AT-Rich Interaction Domain 18*), ainsi que des altérations communes à ces deux types de CCA (comme des mutations de *KRAS*, *GNAS* (*Guanine Nucleotide binding protein, Alpha Stimulating activity polypeptide*) ou *TP53*).

Un rapport plus récent publié en 2018, basé sur une large cohorte de 496 patients atteints d'iCCA, a identifié des signatures mutationnelles uniques ainsi que des profils de co-mutation et des voies enrichies pour chaque sous-groupe d'iCCA, en se concentrant sur trois gènes clés (*IDH*, *KRAS* et *TP53*)⁵⁶. Cette étude a notamment démontré que cette classification génétique pouvait aider à prédire la réponse thérapeutique, en particulier dans le contexte de repositionnement de médicaments.

Une autre approche consiste à lier les sous-classes morphologiques des CCA à des profils moléculaires spécifiques⁵⁷. Par exemple, les iCCA issus des gros canaux biliaires partagent un spectre mutationnel similaire à celui des eCCA, avec des mutations fréquentes dans *KRAS* (15-30 %) et *TP53* (10-40 %). À l'inverse, les iCCA provenant des petits canaux biliaires tendent à former des masses tumorales et montrent une prévalence accrue de mutations dans les gènes *IDH1/2* ainsi que des fusions de *FGFR2*⁵¹.

Ces découvertes ont renforcé la pertinence des essais cliniques de phase III menés récemment, tels que l'étude NCT03773302 pour les CCA positifs à la fusion de *FGFR2*⁵⁸ et l'étude NCT02989857 pour les CCA mutés pour *IDH*^{59,60}. Ces essais, récemment achevés, ont montré des résultats prometteurs dans le traitement des CCA, mais malgré l'approbation par la FDA (*Food and Drug Administration*) d'inhibiteurs de FGFR et d'*IDH1*, le taux de survie à 5 ans pour ces traitements reste inférieur à 10 %.

2.2 Classification épigénétique

Il a été démontré que les modifications épigénétiques jouaient un rôle crucial dans l'initiation et la progression du CCA, en influençant le phénotype tumoral sans modifier les séquences d'ADN^{53,61}. Les différences de signatures épigénétiques, telles que des schémas de méthylation altérés, des modifications des histones ou l'expression anormale d'ARN non codants, sont fréquentes entre les cellules normales et cancéreuses. Ces altérations sont généralement associées à une diminution de l'expression des gènes suppresseurs de tumeurs et à une augmentation de l'expression des oncogènes⁶¹. Par exemple, dans le CCA, on observe souvent une hyperméthylation des sites CpG (régions riches en guanine et cytosine) dans les promoteurs des gènes suppresseurs de tumeurs tels que *DAPK* (*Death Associated Protein Kinase*) ou *ASC* (*Apoptosis-associated Speck-like protein*)^{53,62}.

Ainsi, une étude de 2017 a révélé des différences de méthylation dans les îlots CpG à la fois dans les iCCA et les eCCA, ciblant des gènes impliqués dans les voies de signalisation Wnt, TGF- β , PI3K (*Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-Kinase*), MAPK (*Mitogen-Activated Protein Kinase*) et Notch. Cette étude, l'une des plus vastes sur les profils de méthylation de l'ADN dans le CCA, a inclus 489 échantillons de CCA provenant de dix pays différents⁶³. Elle a classé les tumeurs en quatre groupes distincts en combinant le séquençage de l'ADN avec des analyses de méthylation. Les tumeurs du premier groupe présentaient des mutations fréquentes dans les gènes *TP53*, *ARID1A*, *BRCA1/2*, une forte méthylation des îlots CpG dans les promoteurs, et étaient associées à un mauvais pronostic. Cette hyperméthylation était liée à une régulation négative de l'enzyme de déméthylation TET1 (*TET methylcytosine dioxygenase 1*) et à une augmentation de l'expression de l'histone méthyltransférase EZH2 (*Enhancer of Zeste Homolog 2*). En revanche, le quatrième groupe présentait des tumeurs enrichies en mutations *IDH1/2* et *BAP1*, ainsi que des altérations de FGFR et une signalisation FGF (*Fibroblast Growth Factor*) et PI3K élevée, associées à un meilleur pronostic. Ces tumeurs montraient également une hyperméthylation, mais principalement dans les régions proches des îlots CpG des promoteurs (jusqu'à 2 kb de distance). Les aberrations épigénétiques observées dans les tumeurs de ce groupe pourraient être le résultat de mutations somatiques produisant des oncométabolites, qui induisent une hyperméthylation de l'ADN (par exemple, les états d'hyperméthylation seraient favorisés par l'oncométabolite produit par les formes mutées de *IDH1* et *IDH2* : le 2-hydroxyglutarate).

Ainsi, l'intégration de la génétique et de l'épigénétique dans la classification des CCA pourrait avoir des implications cliniques significatives. D'une part, les événements épigénétiques précoces pourraient servir de biomarqueurs pour la détection précoce des tumeurs, permettant une intervention plus rapide et potentiellement plus efficace. D'autre part, les mutations clonales tumorales pourraient indiquer des cibles potentielles pour des thérapies ciblées, améliorant ainsi la précision et l'efficacité des traitements.

2.3 Classification basée sur le microenvironnement tumoral

Des études récentes ont également proposé une classification des CCA basée sur leur microenvironnement tumoral⁵³. En effet, l'homéostasie du stroma tumoral est orchestrée par un écosystème complexe comprenant divers types cellulaires, tels que des fibroblastes

associés au cancer (ou CAFs pour *Cancer-Associated Fibroblasts*), des cellules endothéliales (ou TECs pour *Tumor-Endothelial Cells*), des lymphocytes infiltrant la tumeur (ou TILs pour *Tumor-Infiltrating Lymphocytes*) ainsi que d'autres populations immunitaires comme les cellules NK ou les macrophages ⁶⁴. Ces cellules jouent un rôle crucial dans la tumorigenèse et la progression de la tumeur (**voir la partie III.4 de ce chapitre**), influençant ainsi la réponse aux traitements anti-cancéreux. Par conséquent, une classification des CCA basée sur les caractéristiques du stroma tumoral pourrait offrir une meilleure gestion de la maladie.

Ainsi, une première étude de profilage moléculaire publiée en 2013 a identifié des altérations génomiques spécifiques au stroma de l'iCCA. L'analyse de l'expression de 1073 gènes a permis de différencier le stroma tumoral du tissu fibreux non tumoral et de mettre en évidence plusieurs biomarqueurs d'intérêt clinique. Par exemple, une corrélation claire a été observée entre l'agressivité de l'iCCA et l'expression de l'ostéopontine dans le stroma ⁶⁵.

Avec l'essor de l'immunothérapie et l'approbation récente du durvalumab, un inhibiteur de PD-L1 (*Programmed Death-Ligand 1*), par la FDA en 2022 pour le traitement des CCA ⁶⁶ (**voir partie V de ce chapitre**), l'intérêt scientifique pour la classification des CCA en fonction de leur microenvironnement immunitaire et de l'expression de PD-L1 dans les tumeurs a considérablement augmenté, PD-L1 étant une protéine inhibant la réponse immunitaire antitumorale. Une étude récente menée sur une cohorte de 198 échantillons d'iCCA, étendue à un total de 368 échantillons pour validation, a proposé une classification des tumeurs en quatre sous-types basés sur la composition et l'activité de leur microenvironnement tumoral (MET) ⁶⁷. Cette étude, datant de 2020, a utilisé des approches de génomique intégrative combinées à de l'immunohistochimie pour identifier ces sous-types immunitaires :

- Sous-type « désert immunitaire » (46 % des iCCA analysés) : caractérisé par l'absence de cellules immunitaires intratumorales, ce sous-type est associé à un pronostic défavorable ;
- Sous-type « immunogène » (13 %) : ces tumeurs présentent une diversité de cellules immunitaires proches des cellules tumorales, avec un microenvironnement inflammatoire riche en facteurs immunostimulants et immunosuppresseurs. Ce profil ambivalent suggère que la potentielle réponse immunitaire antitumorale est entravée

par des protéines de point de contrôle immunitaire telles que PD-L1/PD-1 (*Programmed cell Death protein 1*) ;

- Sous-type « myéloïde » (19 %) : caractérisé par une infiltration de cellules immunitaires mais dont l'action antitumorale est inhibée par les propriétés immunosuppressives des macrophages de type « M2-like » ;
- Sous-type « mésenchymateux » (22 %) : ce sous-type comprend les tumeurs enrichies en chimiokines et autres facteurs paracrines produits par les CAFs, qui favorisent les voies protumorigènes et limitent le recrutement des cellules immunitaires dans le tissu tumoral.

Cette étude a également révélé que le sous-type avec une activité immunitaire faible ou absente affichait le niveau d'expression de PD-L1 le plus élevé. Ces résultats soulignent l'importance de considérer le MET immunitaire dans la classification et le traitement des CCA, et suggèrent que les thérapies ciblant PD-L1 pourraient être particulièrement pertinentes pour certains sous-types de tumeurs.

Cette étude a notamment été reprise dans un article publié en 2023 ⁶⁸ dans lequel les auteurs proposent une nouvelle classification des iCCA basée sur le MET immunitaire. Cette classification s'appuie sur l'analyse transcriptomique d'environ 900 échantillons d'iCCA, permettant de répartir ces tumeurs en cinq classes distinctes, regroupant des profils inflammés (35 % des iCCA analysés) et non-inflammés (65 %). Les classes inflammées se composent de deux sous-types :

- « Stroma immunitaire classique » (~10 %) : ces tumeurs montrent un profil inflammatoire classique avec des réponses immunitaires associées ;
- « Stroma inflammatoire » (25 %) : caractérisé par un épuisement des cellules T, un stroma dense et des mutations fréquentes de *KRAS*, ce sous-type présente une interaction complexe entre les cellules tumorales et les cellules stromales, notamment les CAFs, qui pourraient jouer un rôle clé dans l'évasion immunitaire.

Les classes non-inflammées comprennent :

- « Désert immunitaire » (~20 %) : ce sous-type montre une faible activité inflammatoire et une forte présence de cellules T régulatrices (Treg) immunosuppressives, contribuant à un MET permissif pour la croissance tumorale ;
- « Souche hépatique » (35 %) : enrichie en macrophages de type « M2-like » et en mutations spécifiques telles que *IDH1/2* et *BAP1*, ainsi qu'en fusions de *FGFR2* ;
- « Tumeur classique » (~10 %) : défini par des voies du cycle cellulaire actives et un pronostic généralement défavorable, ce sous-type est marqué par une faible activité inflammatoire.

Enfin, une étude plus récente publiée en Janvier 2024 a proposé une nouvelle classification des CCA basée sur des analyses transcriptomiques du MET ⁶⁹. Cette étude, qui a utilisé une cohorte de 164 échantillons purifiés, et validée sur un total de 274 échantillons, a permis de distinguer deux sous-classes distinctes de CCA :

- Une classe « mésenchymateuse et immunosuppressive » (35,37 % des CCA analysés) : cette sous-classe, désignée C1, se caractérise par une forte activité de la voie de signalisation de l'EMT (*Epithelial-to-Mesenchymal Transition*), ce qui a été confirmé par immunohistochimie avec des marqueurs classiques tels que la E-cadhérine et la vimentine. Le caractère immunosuppressif de cette classe est lié à un enrichissement des voies IL-6/JAK/STAT3 (*Just Another Kinase/Signal Transducer and Activator of Transcription 3*) et Wnt/ β -caténine, qui sont connues pour favoriser l'évasion immunitaire ;
- Une classe « métabolique et proliférative » (64,63 % des CCA analysés) : ce sous-type, noté C2, se distingue par un enrichissement des voies de métabolisme et une forte infiltration de cellules immunitaires, suggérant une dynamique tumorale différente axée sur la prolifération et le métabolisme cellulaire.

Ces nouvelles classifications soulignent l'importance du microenvironnement immunitaire et stromal dans la compréhension et le traitement des CCA. Elles mettent en avant des caractéristiques spécifiques comme la desmoplasie et l'interaction cellulaire, qui pourraient être des cibles potentielles pour de nouvelles approches thérapeutiques, notamment dans le cadre des immunothérapies.

2.4 Classification par protéomique et radiogénomique

Certaines études récentes ont tenté de proposer une classification des CCA en utilisant des approches de protéomique et de radiogénomique. Bien que ces approches soient moins nombreuses, elles offrent des perspectives intéressantes pour une stratification plus précise des tumeurs ⁵³.

Par exemple, une étude publiée en 2022 a identifié quatre sous-classes (S1-S4) d'iCCA à partir de 262 échantillons de patients ⁷⁰. Les résultats ont montré que la classe S1 présentait une expression abondante de protéines inflammatoires ; S2 était caractérisée par des niveaux élevés de protéines associées aux CAFs et à la MEC ; S3 montrait une suractivation de la voie des MAPK ; et S4 se distinguait par une expression maximale de protéines d'adhésion et de protéines spécifiques aux voies biliaires.

En 2023, une autre étude a proposé une classification des CCA en trois sous-classes distinctes basée sur des analyses protéomiques de 102 échantillons ⁷¹ :

- Une classe « pauvrement immunogène », caractérisée par une absence d'infiltrat immunitaire et un pronostic sombre ;
- Une classe « souche-like », enrichie en voies de glycolyse et en expression de gènes associés aux cellules souches, présentant un pronostic intermédiaire ;
- Une classe « métabolisme », associée au meilleur pronostic.

La radiogénomique, discipline en plein essor, suscite également un intérêt croissant. Cette approche permet de corréler les caractéristiques d'imagerie du cancer avec les données moléculaires des tissus, offrant une méthode non-invasive pour prédire le profil moléculaire des tumeurs ^{53,72}. Ainsi, une étude publiée en Juillet 2024 a démontré sur une cohorte de 90 patients que les caractéristiques radiomiques de l'iCCA extraites de la tomodensitométrie (technique d'imagerie tridimensionnelle utilisant des rayons X projetés à travers la tumeur sous plusieurs angles pour avoir une image tomographique) au moment du diagnostic pouvaient prédire avec précision le profil génétique des tumeurs, notamment les statuts *FGFR2*, *IDH1* et *KRAS*, surpassant même les méthodes basées uniquement sur les données cliniques ⁷³.

Ainsi, il n'existe aujourd'hui pas de consensus scientifique concernant la classification des CCA. Une revue publiée en Juillet 2024 ⁷⁴ a notamment synthétisé l'ensemble des études multi-omiques visant à établir de nouvelles classifications des CCA. Les recherches mentionnées dans cette revue montrent quelques similitudes, mais les résultats restent toutefois très hétérogènes. Des efforts supplémentaires sont encore nécessaires pour créer un système de stratification complet qui inclut à la fois les caractéristiques moléculaires et cliniques dont le but est de faciliter la prise de décision aux premiers stades de la maladie.

Pour la suite de ce manuscrit, nous nous en tiendrons à la classification anatomique des CCA, qui reste la plus couramment utilisée aujourd'hui à l'international.

II. Épidémiologie et facteurs de risque

Le CCA est un cancer rare qui représente environ 3 % de toutes les malignités gastro-intestinales. Il touche plus fréquemment les hommes, avec une majorité de diagnostics établis chez des individus âgés de plus de 65 ans ⁵⁰. Après le carcinome hépatocellulaire (CHC), le CCA est considéré comme le deuxième type de cancer primitif du foie. L'épidémiologie du CCA varie de manière significative à travers le monde ^{50,75}. En effet, des disparités géographiques marquent l'incidence de ce cancer : en Occident, le CCA est relativement rare, avec une incidence estimée entre 0,35 et 2 cas pour 100 000 personnes (en France, il est de 1,3 cas pour 100 000 personnes ⁷⁵), tandis que dans certains pays du Sud-Est, l'incidence du CCA peut atteindre des niveaux alarmants, jusqu'à près de 100 cas pour 100 000 personnes (**Figure 11**). Ces disparités sont principalement liées à des facteurs de risque spécifiques. En effet, l'incidence élevée observée en Asie du Sud-Est est en grande partie attribuée à des infections fréquentes par des vers parasites (douve hépatique) de la classe des trématodes, notamment *Clonorchis sinensis* et *Opisthorchis viverrini*. Ces parasites, transmis par la consommation de poisson mal cuit, migrent vers les canaux biliaires intrahépatiques, dans lesquels ils pondent leurs œufs, provoquant ainsi une inflammation chronique pouvant conduire à une fibrose hépatique et à une cicatrisation, favorisant ainsi la transformation maligne des cellules ^{50,75}.

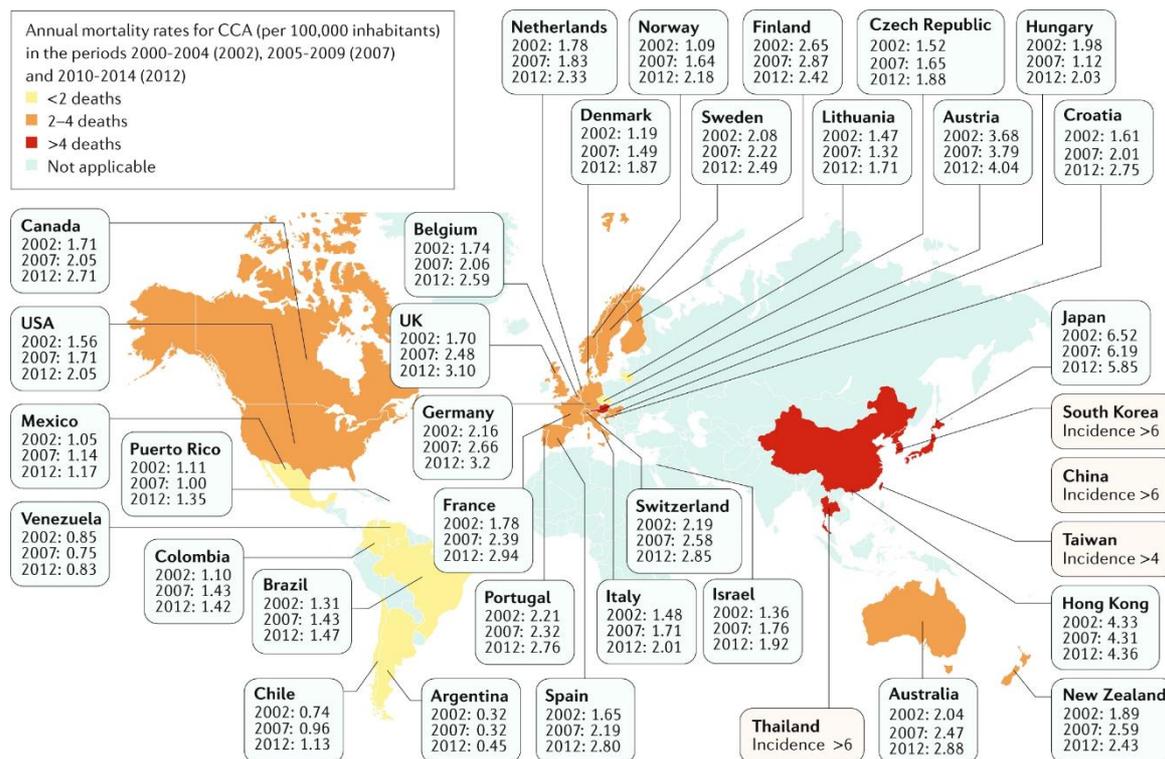


Figure 11 : Incidence mondiale des CCA ⁵⁰. La figure donne les taux de mortalité annuels standardisés selon l'âge pour le CCA (décès pour 100 000 habitants, inclut les iCCA, les pCCA et les dCCA). Les données se rapportent aux périodes 2000-2004, 2005-2009 et 2010-2014. Le jaune indique les régions à faible mortalité (< 2 décès pour 100 000 personnes), l'orange montre les régions avec une mortalité comprise entre 2 et 4 décès pour 100 000 personnes, et le rouge indique les pays à forte mortalité (> 4 décès pour 100 000 personnes). Au moment où la figure a été publiée, la mortalité dans les pays de l'Est où le CCA est très répandu (Thaïlande, Chine, Taïwan et Corée du Sud) n'avait pas encore été signalée : l'incidence du CCA est donc indiquée pour ces pays.

Dans les régions du monde où les CCA sont moins fréquents, comme en Occident, les principaux facteurs de risque sont souvent liés à une inflammation chronique des voies biliaires, accompagnée d'une fibrose et d'une réaction ductulaire marquée. Le principal facteur de risque en Occident est la CSP (définie dans le **chapitre 1** de ce manuscrit), avec une prévalence de 5 à 15 % chez les patients atteints d'un CCA ^{50,75}. L'inflammation chronique étant à l'origine du CCA peut également être due à des causes infectieuses. En effet, des études récentes ont montré une corrélation entre les infections par les virus des hépatites B (VHB) et C (VHC) et l'apparition d'un CCA, en particulier d'un iCCA. Ces infections présentent également des disparités géographiques, avec une prédominance du VHC en Occident et du VHB en Asie ⁷⁶. De plus, de récentes études épidémiologiques ont démontré une association forte entre les facteurs de risque connus du CHC et la déclaration d'un CCA. En effet, les troubles métaboliques tels que l'obésité, le diabète et les maladies dysmétaboliques d'origine

non-alcoolique (MAFLD, pour *Metabolic-Associated Fatty Liver Diseases*, qui englobent différentes pathologies hépatiques allant de la MASH (*Metabolic dysfunction-Associated Steatohepatitis*) à la cirrhose) peuvent également être bénéfiques au développement du CCA ^{50,75,77}. Certaines pathologies biliaires telles que les malformations congénitales (maladie de Caroli et kystes biliaires), ainsi que la lithiase biliaire constituent aussi des facteurs de risque significatifs pour la déclaration d'un CCA. L'exposition à des substances toxiques comme l'alcool et le tabac est également associée à un risque accru de CCA. La **Table 2** recense les principaux facteurs de risque du CCA.

Table 2 : Principaux facteurs de risque du CCA ⁵⁰ (modifié). La table donne les OR (*Odd Ratio*), qui désignent le risque relatif lié à chaque facteur.

Risk factor	OR from selected studies
Choledochal cyst	OR 26.71 for iCCA OR 34.94 for eCCA
Choledocholithiasis	OR 10.08 for iCCA OR 18.58 for eCCA
Cholelithiasis	OR 3.38 for iCCA OR 5.92 for eCCA
Cholecystolithiasis	OR 1.75 for iCCA OR 2.94 for eCCA
Caroli disease	OR 38 for iCCA OR 97 for eCCA
Primary sclerosing cholangitis	OR 22 for iCCA OR 41 for eCCA
Cirrhosis	OR 15.32 for iCCA OR 3.82 for eCCA
Chronic hepatitis B	OR 4.57 for iCCA OR 2.11 for eCCA
Chronic hepatitis C	OR 4.28 for iCCA OR 1.98 for eCCA
Inflammatory bowel disease	OR 2.68 for iCCA OR 2.37 for eCCA
Liver fluke (<i>Opisthorchis viverrini</i> , <i>Clonorchis sinensis</i>)	OR 5 iCCA > eCCA
Type 2 diabetes mellitus	OR 1.73 for iCCA OR 1.5 for eCCA
MAFLD	OR 2.2 for iCCA OR 1.5 for eCCA
Obesity	OR 1.14 for iCCA OR 1.2 for eCCA
Hypertension	OR 1.10 for iCCA OR 1.21 for eCCA
Alcohol consumption	OR 3.15 for iCCA OR 1.75 for eCCA
Cigarette smoking	OR 1.25 for iCCA OR 1.69 for eCCA

Plusieurs facteurs de risque sont communs aux trois sous-types de CCA, tandis que d'autres sont spécifiques à un sous-type particulier. Par exemple, la maladie de Caroli et les kystes cholédociens sont fortement associés aux trois sous-types de CCA. En revanche, la cirrhose, la MAFLD et l'infection par le VHB sont plus fortement liées à la déclaration d'un iCCA, en comparaison à la lithiase biliaire qui est le plus souvent corrélée au pCCA et/ou au dCCA ⁷⁷ (**Table 2**). Cependant, malgré l'identification de ces facteurs de risque, il est important de noter que la majorité des cas de CCA demeurent sporadiques, sans cause identifiable.

Malgré les défis inhérents à la classification des tumeurs en raison de leurs hétérogénéités anatomiques et moléculaires, une augmentation significative du nombre de cas a été observée au niveau mondial ces dernières années ^{50,75}. Alors que l'incidence des eCCA reste relativement stable, de nombreuses études récentes ont en effet montré une augmentation constante des cas de iCCA au cours de la dernière décennie ^{75,77,78}. Cette augmentation pourrait être en partie attribuée aux progrès réalisés dans le diagnostic des iCCA, conduisant à un reclassement de certains cas de cancers primitifs en iCCA, ce qui contribue à la hausse de l'incidence observée. Globalement, les études indiquent une augmentation des taux de mortalité liés à l'iCCA à l'échelle mondiale. Cette tendance pourrait refléter une augmentation des pathologies dysmétaboliques comme les MAFLD et des maladies hépatiques liées à la consommation d'alcool, qui sont des facteurs de risque importants pour le développement de l'iCCA.

III. Mécanismes moléculaires et cellulaires de carcinogénèse du CCA

La pathogénèse du CCA est liée à des changements génétiques et épigénétiques au sein des cellules tumorales, ainsi qu'à des modifications significatives du MET. Ces changements contribuent ensemble à l'activation de diverses voies de signalisation, qui jouent un rôle clé dans l'apparition et la progression de la tumeur ⁷⁹.

1. Une origine pluricellulaire du CCA

Avec la forte hétérogénéité intra- et intertumorale des sous-types de CCA et l'existence de facteurs communs partagés avec le CHC ⁸⁰, il est plausible que les CCA proviennent de la transformation maligne de cellules hépatiques autres que les cholangiocytes. En effet, de nombreuses études récentes suggèrent que la plasticité cellulaire joue un rôle dans la plasticité tumorale ^{52,79}.

Tout d'abord, en ce qui concerne les pCCA et les dCCA, des analyses immunohistochimiques (IHC) associées à un profilage génétique ont révélé que ces tumeurs présentaient un profil d'expression similaire à celui des cholangiocytes cylindriques producteurs de mucine que l'on retrouve dans les plus grands canaux biliaires ^{81,82} (**Figure 10**). Ces similarités indiquent que ces sous-types de CCA pourraient avoir une origine purement cholangiocytaire.

En revanche, pour les iCCA, les deux principaux sous-types histologiques classés comme iCCA conventionnels (**Figure 10.B**) semblent dériver de divers types cellulaires ⁸¹. Les iCCA mucineux, qui émergent des grands canaux biliaires, montrent des similitudes histologiques et génétiques importantes avec les pCCA, suggérant une origine cholangiocytaire. En revanche, les iCCA mixtes, provenant des petits canaux, présentent un profil semblable à celui des cholangiocytes cuboïdes et des cellules progénitrices hépatiques bipotentes (ou HpSc pour *Hepatic stem cells*) présentes dans les petits canaux biliaires intrahépatiques ^{79,81}. Ces cellules ont la capacité de se différencier en cholangiocytes et en hépatocytes, ce qui explique les similitudes observées entre le CHC et certains types de CCA en clinique. Il existe en effet des formes mixtes nommées CHC-CCA (Hépto-cholangiocarcinome), qui sont positives pour certains marqueurs tels que la cytokératine 19 et la nestine ⁸³. De plus, les iCCA mixtes montrent également des similitudes génétiques et phénotypiques avec le cholangiolocarcinome, un cancer du foie se développant au niveau des canaux de Hering, soutenant l'hypothèse d'une origine bipotente de ce sous-type d'iCCA ^{81,84}. La potentielle origine pluricellulaire des cancers hépatobiliaires est présentée dans la **Figure 12**. De récentes études utilisant des expériences de traçage de lignée génétique ont également démontré que des hépatocytes différenciés pouvaient se transdifférencier en une lignée biliaire, donnant naissance à un iCCA par modulation des voies de signalisation Notch et AKT (*AKT Serine/Threonine Kinase 1*) ^{85,86}.

Dans l'ensemble, l'existence des HpSc dans le foie adulte et le potentiel de transdifférenciation des hépatocytes restent des sujets de débat et de recherche intense ; il n'existe pas encore de consensus concernant l'origine cellulaire des CCA.

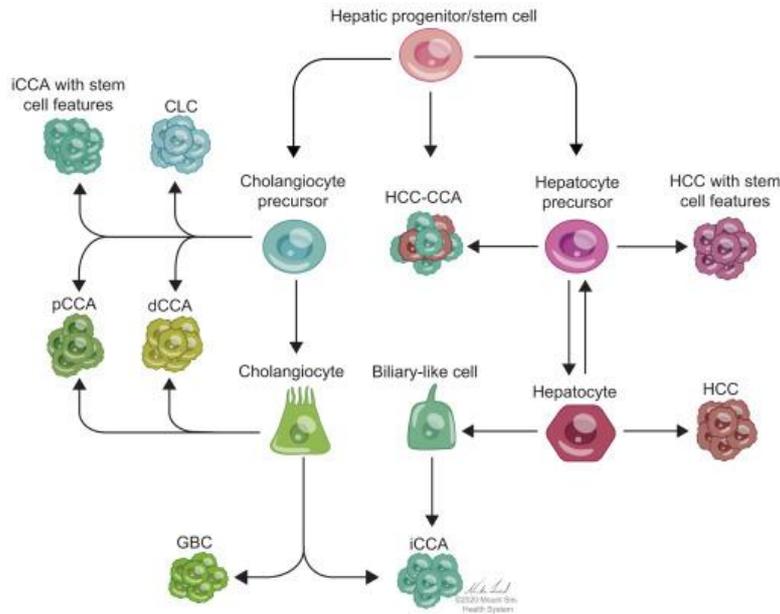


Figure 12 : Potentielles cellules à l'origine des cancers hépatobiliaires ⁸⁶. Les cellules souches hépatiques ou les hépatocytes différenciés peuvent potentiellement générer des tumeurs hépatiques présentant des caractéristiques biliaires. De plus, les états intermédiaires des cellules souches hépatiques, tels que les précurseurs engagés dans la bile, peuvent représenter la cellule d'origine du CLC (Cholangiolocarcinome) ou de l'iCCA possédant des caractéristiques de cellules souches. De plus, des données récentes soutiennent l'hypothèse selon laquelle les hépatocytes matures peuvent se transdifférencier en cellules de nature biliaire, conduisant au développement d'un iCCA. Enfin, les cellules de la lignée cholangiocytaire (précurseurs et/ou cholangiocytes matures) sont considérées comme les cellules d'origine communes à tous les sous-types anatomiques de cancers biliaires. HCC, carcinome hépatocellulaire ; GBG, cancer de la vésicule biliaire.

2. Altérations génétiques et épigénétiques

Les CCA présentent une grande hétérogénéité génomique, ce qui rend difficile la recherche de traitements universels, mais ouvre des perspectives prometteuses pour des thérapies personnalisées et ciblées. Cette diversité génétique et épigénétique joue également un rôle clé dans la plasticité des cellules de CCA ⁷⁹.

Des études de séquençage de l'ADN ont permis d'identifier les mutations et les réarrangements génétiques les plus courants dans le CCA. Parmi les altérations génétiques les plus fréquentes, on trouve celles affectant les gènes *KRAS*, *SMAD4* (*mothers Against Decapentaplegic homolog 4*), *ARID1A* et *GNAS*, qui sont des gènes impliqués dans la promotion de la croissance cellulaire ⁸⁷, le contrôle et le maintien de la stabilité génomique ^{55,87,88}, ainsi que le remodelage de la chromatine ⁸⁹ (**Figure 13**).

Les sous-types de CCA se distinguent par des profils génomiques variés. Les fusions de gènes *FGFR* ainsi que les mutations dans les gènes *TP53*, *KRAS*, *IDH1/2* et *BAP1* sont particulièrement fréquentes dans l'iCCA. En revanche, les fusions des gènes *PRKACA* et *PRKACB*, ainsi que les mutations dans *ELF3* (*Like ETS Transcription Factor 3*), se rencontrent plus souvent dans les pCCA et les dCCA^{55,79}. Des études de génomique intégrative ont cherché à classer les patients atteints de CCA selon leur pronostic^{57,90}. Il a été observé que les mutations dans *TP53* ou *KRAS* étaient associées à une survie globale réduite après résection chirurgicale et à un taux de récurrence plus élevé, comparativement aux patients présentant des mutations *IDH* ou sans mutations dans ces trois gènes. À l'opposé, les patients présentant des mutations *FGFR* semblent avoir un pronostic relativement favorable⁹¹. Bien que la majorité des mutations observées dans les CCA soient somatiques, environ 5 à 10 % des patients possèdent des mutations germinales dans des gènes comme *BRCA1/2*, *ATM* (*Ataxia Telangiectasia Mutated*) ou *BAP1*, prédisposant potentiellement à la cholangiocarcinogénèse.

Il est important de souligner que les altérations génomiques observées dans le CCA sont souvent liées à des processus épigénétiques⁵⁰. Par exemple, les mutations des gènes *IDH1* entraînent l'accumulation de l'oncométabolite 2-hydroxyglutarate⁹², lequel modifie le profil de méthylation des cellules tumorales en inhibant des enzymes comme les déméthylases d'histones. Ces modifications perturbent des voies de signalisation clés telles que Wnt, TGF- β et PI3K, qui sont essentielles pour la différenciation cellulaire, l'apoptose et la prolifération. Les mutations dans *IDH1* et *IDH2*, en particulier, favorisent la survie et la croissance des cellules cancéreuses en réduisant leur besoin d'oxygène⁹³.

L'épigénétique joue un rôle crucial dans l'initiation et la progression du CCA, influençant le phénotype tumoral sans modification des séquences d'ADN⁵⁰. Les mutations dans *ARID1A* et *BAP1*, présentes dans un nombre significatif de CCA, sont associées à des altérations épigénétiques et à des changements dans l'expression de gènes impliqués dans la prolifération et la différenciation cellulaire, tels que *MYC* (*MYC Proto-Oncogene*), *KRAS*, *CDH1* (*Cadherin 1*, codant la E-cadhérine) et *CDH2*, codant la N-cadhérine⁹¹. En outre, les ARN non codants, comme les miARN (micro-ARN) et les lncARN (ARN longs non-codants), jouent également un rôle clé dans la régulation du CCA. Par exemple, miR-204 supprime le potentiel métastatique du CCA en inhibant l'expression de *SLUG* (*SNAI2 gene*)⁹⁴.

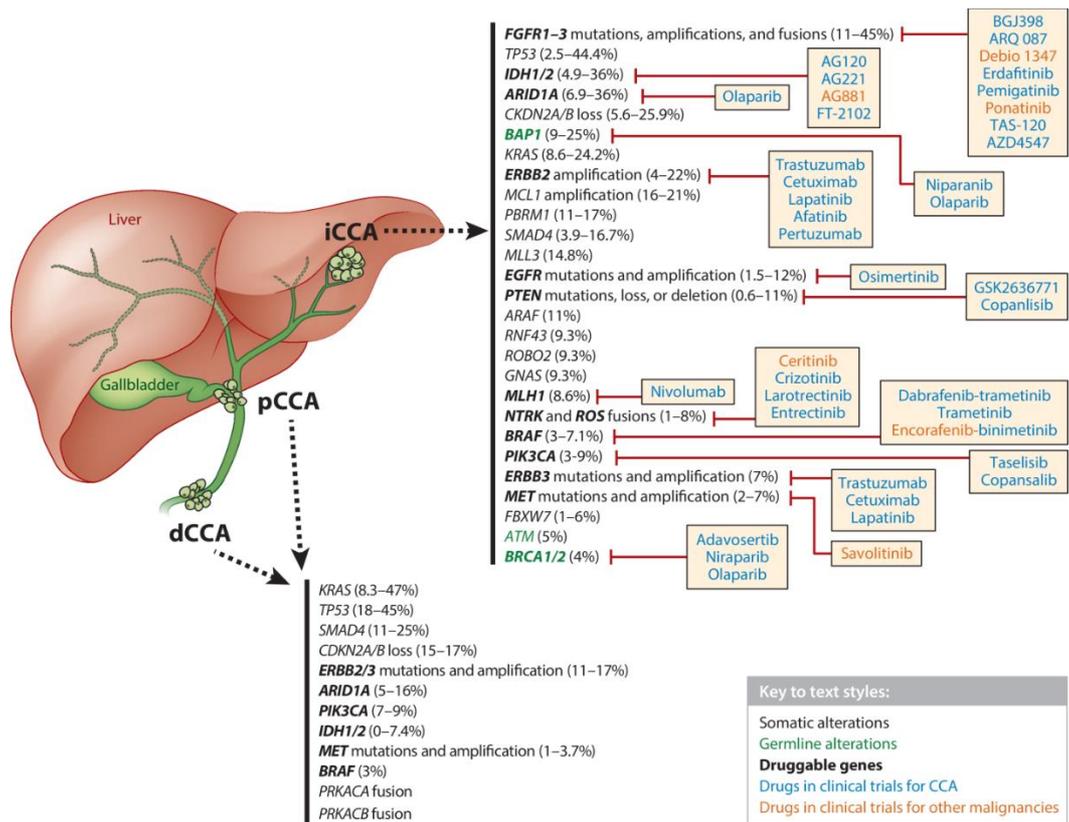


Figure 13 : Altérations génomiques fréquemment rencontrées dans le CCA⁷⁹. La fréquence de chaque mutation, ainsi que les possibles thérapies ciblées sont données sur la figure.

3. Voies de signalisation impliquées

L'inflammation chronique constitue un facteur de risque essentiel pour le CCA. Un milieu saturé en cytokines pro-inflammatoires, en facteurs de croissance et en composés biliaries toxiques peut déclencher une réponse mitogène chez les cholangiocytes, ce qui favorise l'accumulation de mutations et une prolifération cellulaire incontrôlée. Cette situation peut entraîner des dérégulations dans certaines voies de signalisation, contribuant à la carcinogenèse du CCA^{50,79}. L'ensemble des voies de signalisation dérégulées jouant un rôle dans la progression du CCA sont présentées dans la **Figure 14**.

3.1 Voies du développement

Au cours de la réparation hépatique, des voies de développement normalement activées durant l'embryogenèse telles que Notch, Wnt, Hippo/YAP ou Hedgehog, peuvent être restimulées^{36,79}. Ces voies sont anormalement activées dans le contexte de l'inflammation

chronique associée au CCA, et jouent un rôle dans la croissance, la survie et la dissémination métastatique du CCA (**Figure 14**).

Par exemple, la voie Notch est activée lorsque ses ligands se lient aux récepteurs Notch, qui sont surexprimés dans les CCA⁹⁵. Cette activation entraîne une série d'événements protéolytiques aboutissant à la libération du domaine intracellulaire Notch-1 (NICD1) de la membrane plasmique. NICD1 fonctionne ensuite comme un coactivateur transcriptionnel dans le noyau, régulant la différenciation cellulaire et la réparation des voies biliaires^{36,79,95}. Des études ont montré que l'utilisation d'inhibiteurs de la voie Notch, tels que des anticorps spécifiques ou des inhibiteurs de la γ -sécrétase (qui joue un rôle dans la libération de NICD1), pouvait significativement réduire la charge tumorale dans divers modèles murins de CCA⁹⁶. Cependant, une étude récente a révélé que le blocage de Notch-1 modifiait les proportions relatives de tumeurs chez la souris, diminuant le développement du CHC tout en augmentant celui des CCA⁹⁶. En effet, la surexpression expérimentale de NICD1 dans les hépatocytes, combinée à l'activation de AKT, favorise la transdifférenciation des hépatocytes en cellules de CCA chez la souris^{85,97}.

En ce qui concerne la voie Wnt/ β -caténine, elle est suractivée dans le contexte du CCA en raison de la sécrétion accrue de ligands Wnt, tels que Wnt7b et Wnt10a, par les macrophages activés dans le MET^{36,79}. Ces protéines se lient alors aux récepteurs Frizzled et aux corécepteurs LRP5 (*Low-density lipoprotein Receptor-related Protein 5*) et LRP6 sur les cellules de CCA, entraînant la translocation nucléaire de la β -caténine et favorisant ainsi la survie cellulaire⁹⁸. Dans un contexte normal, la β -caténine est principalement associée à la E-cadhérine au niveau des jonctions cellulaires, la E-cadhérine étant un marqueur des cellules épithéliales. Cependant, dans un contexte pathologique, les cellules perdent leurs marqueurs épithéliaux au profit de marqueurs mésenchymateux tels que la vimentine au cours de l'EMT, ce qui entraîne l'accumulation de β -caténine dans le noyau et facilite la migration cellulaire⁹⁸.

La voie Hippo/YAP joue également un rôle essentiel au cours du développement, car elle régule la taille des organes et la prolifération cellulaire^{36,79}. Dans des conditions normales, Hippo (MST1/2) phosphoryle LATS1/2 (*Large Tumor Suppressor kinase 1/2*), qui à son tour phosphoryle et inactive le coactivateur transcriptionnel YAP, responsable de l'induction de gènes liés à la prolifération. Dans le CCA, les mutations des gènes impliqués dans cette voie

sont relativement rares, mais les mutations dans *ARID1A*, présentes dans environ 14 % des cas⁹⁹, activent régulièrement les activités transcriptionnelles de YAP. En outre, cette voie de signalisation peut être activée par des modifications de la composition et de la rigidité de la MEC.

3.2 Facteurs de croissance et récepteurs à activité tyrosine kinase

Certains facteurs de croissance contribuant à l'activation de récepteurs à activité tyrosine kinase jouent un rôle important dans la cholangiocarcinogenèse. En effet, dans le CCA, on observe une dérégulation des voies impliquant des facteurs de croissance tels que EGF (*Epithelial Growth Factor*) et HGF, lesquels sont généralement associés à un pronostic défavorable (**Figure 14**)^{36,79,100}.

La famille des récepteurs ERBB (*Erb-B receptor tyrosine kinase*), comprenant EGFR, ERBB2 (ou HER2 (*Human Epidermal growth factor Receptor-2*)), ERBB3 et ERBB4, constitue un déclencheur significatif de la croissance du CCA. Le récepteur EGFR, dont les mutations et les amplifications sont présentes dans 15 % et 5 % des cas de CCA respectivement, est souvent surexprimé dans ces tumeurs¹⁰⁰. L'interaction avec son ligand EGF peut activer la voie MAPK/ERK, favorisant ainsi la prolifération cellulaire et la métastase des tumeurs en induisant l'EMT. Bien que les thérapies ciblant ERBB, comme l'utilisation de l'erlotinib, aient montré une réduction de la prolifération des cellules de CCA *in vitro*¹⁰¹, les résultats cliniques n'ont pas démontré d'efficacité thérapeutique significative¹⁰².

De même, la liaison de HGF avec son récepteur MET (*hepatocyte growth factor receptor*), qui est souvent surexprimé dans le CCA, encourage la prolifération cellulaire et la métastase des tumeurs^{36,79}. Ce mécanisme peut notamment suractiver la voie de signalisation PI3K/AKT/mTOR (*mechanistic Target Of Rapamycin kinase*), qui via la phosphorylation de AKT peut réguler la transcription de gènes intervenant dans l'évasion de l'apoptose.

Les fusions de *FGFR* associées à des réarrangements chromosomiques spécifiques aux iCCA peuvent également activer la voie MEK1/2 (*MAP/ERK kinase-1*), créant ainsi des protéines de fusion aux effets pro-oncogéniques^{36,79}.

Enfin, bien que les acides biliaires ne soient pas intrinsèquement génotoxiques, ils peuvent tout de même contribuer à la croissance du CCA^{36,79,103}. Ils ont en effet la capacité d'activer la voie EGFR.

3.3 Facteurs inflammatoires

L'inflammation chronique associée au CCA conduit souvent à la production de divers ligands extracellulaires, y compris une variété de cytokines comme le TNF- α , l'IL-6, et le TGF- β , qui sont sécrétés par les cellules stromales et tumorales. Ces molécules agissent par des mécanismes autocrines ou paracrines, favorisant l'activation de iNOS (*Nitric Oxide Synthase, inducible*), provoquant ainsi un stress nitrosatif à l'origine de dommages à l'ADN. Cela a pour conséquence d'inhiber spécifiquement les enzymes de réparation de l'ADN, contribuant ainsi à la formation et à la progression de la tumeur^{36,79,104}.

L'IL-6 joue un rôle crucial dans la cholangiocarcinogénèse. En se liant à son récepteur gp130, cette cytokine déclenche l'activation de JAK1/2, entraînant la phosphorylation et l'activation continue de STAT3. Cette cascade favorise la transcription de gènes impliqués dans la prolifération cellulaire^{36,79}. Par exemple, l'expression de *MCL-1 (Myeloid Cell Leukemia-1)* est augmentée en réponse à l'IL-6, conférant ainsi aux cellules tumorales une résistance accrue à l'apoptose induite par TRAIL (*Tumor-necrosis-factor Related Apoptosis Inducing Ligand*) (**Figure 14**)¹⁰⁵.

3.4 Voies de l'angiogénèse

Certains facteurs pro-angiogéniques jouent également un rôle dans la cholangiocarcinogénèse. En effet, un environnement riche en VEGF (*Vascular Endothelial Growth Factor*) est essentiel pour les tumeurs de CCA, et est associé à un mauvais pronostic^{36,79,106}. Le VEGF active le récepteur VEGFR (*Vascular Endothelial Growth Factor Receptor*) sur les cellules tumorales, déclenchant diverses voies de signalisation pro-tumorigènes (**Figure 14**). En parallèle, en se liant aux récepteurs VEGFR des cellules endothéliales, le VEGF favorise également la néoangiogénèse, un processus crucial pour la croissance et la survie des tumeurs.

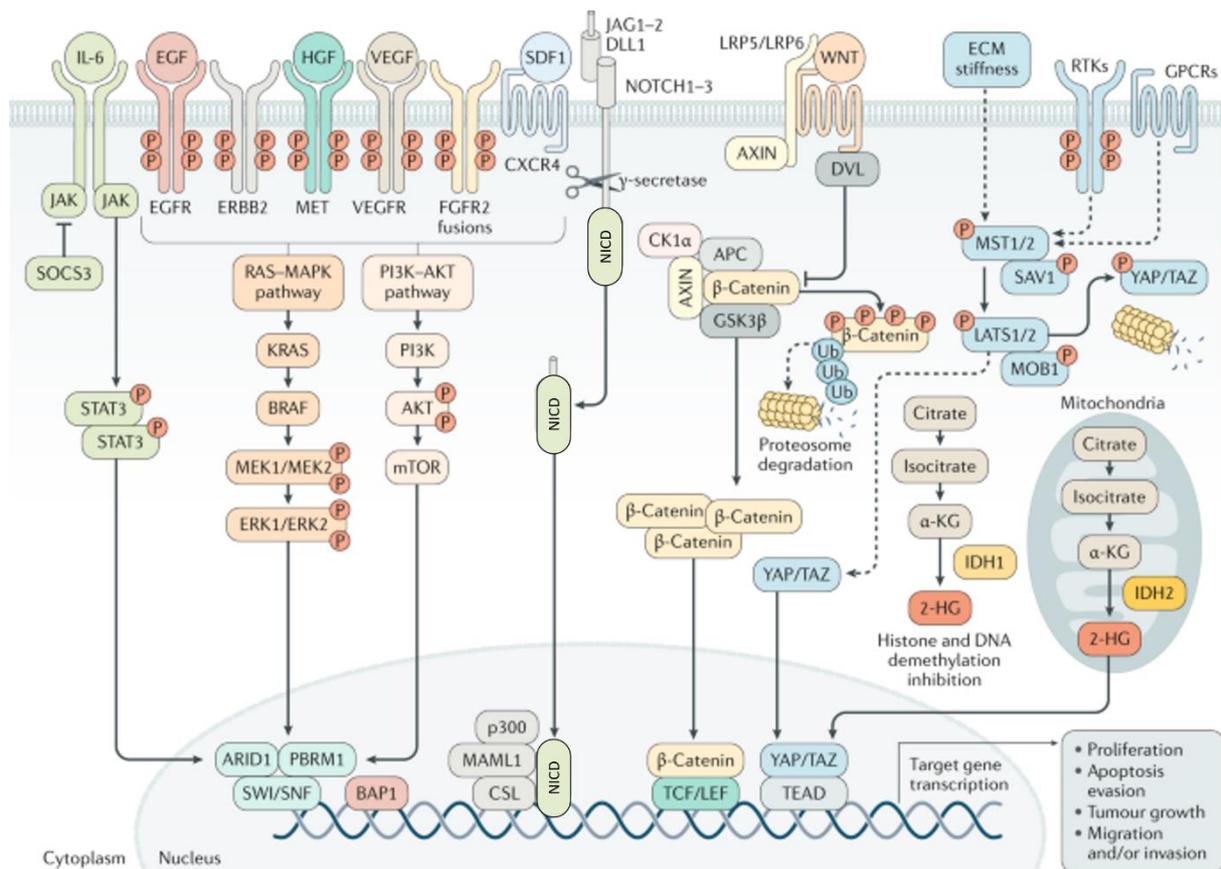


Figure 14 : Voies de signalisation impliquées dans le développement et la progression du CCA
⁵⁰. Le processus de cholangiocarcinogénèse, ainsi que l'évolution et la croissance tumorale ultérieures, impliquent des processus complexes et hétérogènes qui incluent l'interaction de ligands extracellulaires (tels que des cytokines pro-inflammatoires, des facteurs de croissance et des acides biliaires) avec une expression accrue et/ou une activation aberrante des récepteurs de surface cellulaire, et la dérégulation de voies de signalisation intracellulaires. Cela a pour conséquence la prolifération dérégulée des cellules tumorales, une amélioration de leur survie et l'invasion cellulaire. Les gènes les plus fréquemment mutés ou amplifiés entraînant une suractivation de certaines de ces voies sont *KRAS*, *BRAF*, *ARID1*, *PBRM1*, *BAP1*, *IDH1* et *IDH2*. L'activation de ces voies de signalisation pourrait également se produire à la suite de l'interaction entre l'épithélium tumoral et le stroma réactif tumoral. 2-HG, 2-hydroxyglutarate ; ECM, matrice extracellulaire ; RTK, récepteur tyrosine kinase.

4. Microenvironnement tumoral du CCA

Pendant longtemps, les recherches en oncologie se sont focalisées uniquement sur les cellules cancéreuses. Cependant, de nombreuses études récentes ont démontré que la progression tumorale s'appuyait également sur d'autres populations cellulaires composant le microenvironnement de la tumeur, que l'on appelle plus communément stroma ⁶⁴. Les populations stromales interviennent dans de nombreux processus cellulaires et peuvent avoir des implications cliniques significatives. En effet, des études récentes suggèrent que le stroma

peut soit réduire l'agressivité du cancer en formant une barrière freinant le potentiel métastatique, soit l'aggraver ¹⁰⁷.

Le CCA se distingue des autres types de tumeurs par la présence d'un stroma desmoplasique dense et très fibreux, lui conférant une rigidité significative ^{36,79,107}. Cet environnement complexe comprend une variété de types cellulaires non tumoraux, tels que des CAFs, des TECs et des cellules immunitaires ^{50,107} (**Figure 15**). Ces populations stromales interagissent avec la MEC, un vaste réseau de protéines structurales comprenant des collagènes, de la laminine et de la fibronectine. Elles entretiennent des échanges dynamiques avec l'épithélium cancéreux afin de soutenir la croissance tumorale. Ainsi, elles sont impliquées dans la régulation de la prolifération cellulaire, de l'angiogenèse, du potentiel métastatique et de la chimiorésistance des tumeurs. Ces interactions sont principalement médiées par des facteurs solubles, tels que des cytokines, des chimiokines, des facteurs de croissance et des vésicules extracellulaires ^{64,107}.

Une étude de séquençage à l'échelle de la cellule unique publiée en 2020 a permis de déterminer les proportions des différentes populations cellulaires présentes dans le stroma du CCA ¹⁰⁸. Les cellules tumorales représentent ainsi 37,1 % de la tumeur, tandis que les cellules immunitaires infiltrantes en constituent 55,8 %, avec respectivement 34,8 % de lymphocytes T et 10,9 % de macrophages (ou TAMs pour *Tumor-Associated Macrophages*). Les CAFs représentent 1,59 % et les TECs 2,6 %. Le reste des cellules comprend des cholangiocytes et des hépatocytes non malins. Ainsi, bien que représentant de faibles pourcentages, ces populations stromales jouent tout de même un rôle crucial dans la progression tumorale.

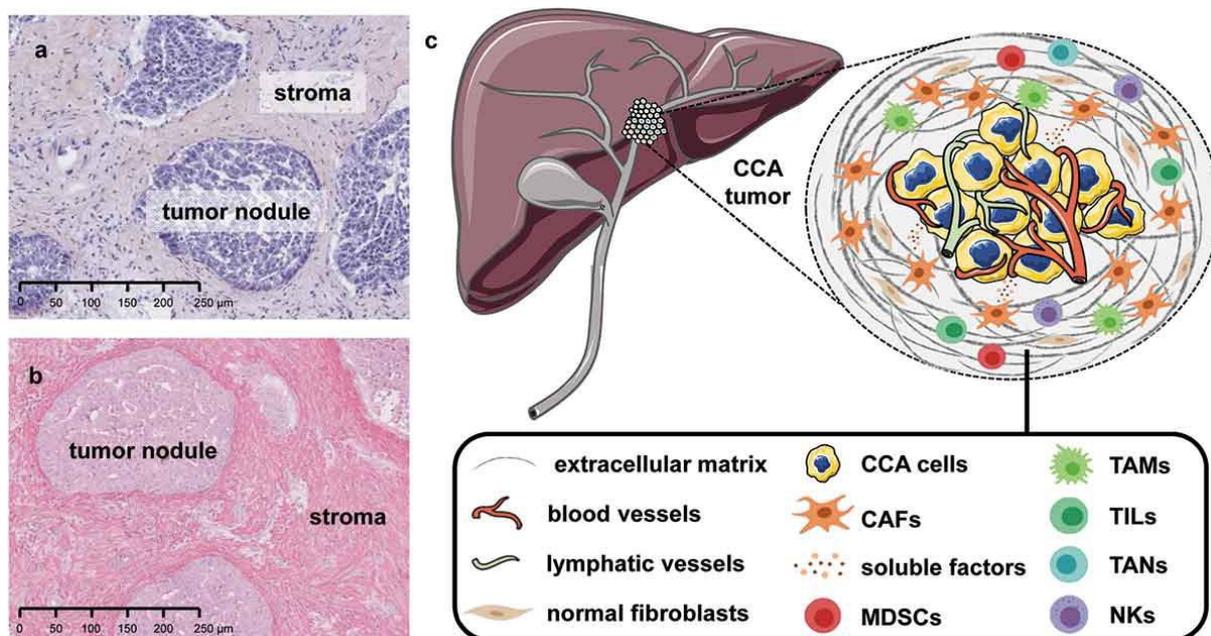


Figure 15 : Microenvironnement tumoral du CCA ¹⁰⁹. **A.** Coloration à l'hématoxyline et à l'éosine d'un tissu représentatif de CCA humain. **B.** Coloration au rouge Sirius d'un tissu tumoral de CCA humain. Les deux colorations mettent en évidence le stroma abondant du CCA. **C.** Aperçu schématique du microenvironnement tumoral complexe du CCA. Cet environnement est peuplé d'une grande variété de cellules, notamment des cellules cancéreuses, des CAFs et des cellules immunitaires incluant des cellules suppressives dérivées des myéloïdes (MDSCs pour *Myeloid-Derived Suppressor Cells*), des TAMs, des TILs, des neutrophiles associés aux tumeurs (TANs pour *Tumor-Associated Neutrophils*) et des cellules NK. Ces cellules interagissent entre elles ainsi qu'avec des composants de la MEC via des facteurs solubles afin de moduler la progression du CCA.

4.1 Les fibroblastes associés au cancer et la matrice extracellulaire

Les CAFs constituent une population hétérogène de myofibroblastes activés, caractérisés par l'expression de l' α -SMA (*alpha Smooth-Muscle Actin*), et représentent une composante majeure du stroma desmoplasique dans le CCA ¹¹⁰. Leurs origines sont diverses, comme l'ont démontré de récentes études utilisant du scRNA-Séq et du traçage de lignée (*lineage tracing*). Ces recherches ont révélé que les HSCs et les fibroblastes portaux (présents dans les espaces portes) sont les principales sources de CAFs dans le CCA ^{108,111}. Il a également été démontré que les CAFs peuvent dériver de cellules souches mésenchymateuses provenant de la moelle osseuse, de péricytes ou de fibrocytes dérivés de précurseurs de monocytes par transdifférenciation et activation. Cependant, l'origine exacte des CAFs dans le CCA reste encore largement incertaine aujourd'hui.

Les données cliniques ont confirmé l'importance des CAFs dans la promotion de la tumorigenèse du CCA. En effet, une expression élevée de l' α -SMA a été corrélée à une augmentation de la taille de la tumeur et à une réduction de la survie des patients ¹¹². Par ailleurs, l'induction de l'apoptose des CAFs par le navitoclax, un inhibiteur de la protéine anti-apoptotique BCL-2, a entraîné une diminution significative de la croissance tumorale dans un modèle murin syngénique de CCA ¹¹³. Ces résultats soulignent l'importance croissante d'étudier cette population cellulaire en profondeur pour développer de nouvelles potentielles applications thérapeutiques.

Au cours de la cholangiocarcinogenèse, les fibroblastes à l'origine des CAFs sont recrutés par les cellules tumorales grâce à la sécrétion de PDGF-D (*Platelet-Derived Growth Factor D*), qui migrent alors vers le site tumoral ¹¹⁴. Ces fibroblastes sont ensuite activés en myofibroblastes de manière permanente, principalement sous l'influence du TGF- β , du FGF et du PDGF-D, sécrétés à la fois par les cellules tumorales et les TAMs ¹¹⁵. Une fois activés, les CAFs adoptent des rôles pro-tumorigènes en favorisant la prolifération et l'invasion cellulaire, l'angiogenèse, et l'immunosuppression, tout en synthétisant une barrière protectrice rigide autour du noyau tumoral appelée matrice extracellulaire (MEC). Ces actions se manifestent par leur interaction avec les cellules tumorales et les autres populations stromales à travers la sécrétion de nombreuses molécules de signalisation, telles que des cytokines comme l'IL-1 β et des facteurs de croissance tels que le PDGF-B, l'HB-EGF (*Heparin-Binding EGF-like growth factor*), le SDF1 (*Stromal cell-Derived Factor 1*), l'HGF et le CTGF (*Connective Tissue Growth Factor*), ainsi que de vésicules extracellulaires et de protéines de la MEC ^{64,116}. En particulier, l'HB-EGF exprimé par les CAFs peut activer le récepteur EGFR dans les cellules de CCA, favorisant leur migration et leur invasivité. En retour, les cellules tumorales sécrètent du TGF- β 1, ce qui stimule l'expression de l'HB-EGF par les CAFs, créant ainsi une boucle de rétroaction continue qui soutient la progression du CCA ¹¹¹.

Les CAFs jouent un rôle central dans le MET du CCA, dans la mesure où ceux-ci coordonnent une grande variété de processus cellulaires (**Figure 16**). Ils interagissent non seulement avec les cellules tumorales, mais contribuent aussi à la cholangiocarcinogenèse en modifiant le phénotype d'autres populations stromales. Des données montrent que les CAFs peuvent interagir avec les cellules endothéliales lymphatiques via une boucle de régulation paracrine initiée par le PDGF-D sécrété par les cellules de CCA ^{110,117}. En réponse à cette stimulation, les

CAFs libèrent du VEGF-A et du VEGF-C, ce qui entraîne le recrutement de cellules endothéliales, l'expansion de la vascularisation lymphatique et l'intravasation des cellules tumorales ¹¹⁴. Les CAFs entretiennent également une communication croisée significative avec les cellules immunitaires présentes dans le MET. Les CAFs favorisent en effet un microenvironnement immunosuppresseur qui permet aux cellules tumorales d'échapper au système immunitaire et de continuer à proliférer ¹¹¹. Il a été démontré que les CAFs sécrètent divers facteurs immunosuppresseurs et molécules pro-inflammatoires ⁶⁴, tels que l'IL-8, l'IL-13, ou CCL2 (*Chemokine Ligand 2*), ce qui limite l'efficacité des traitements par inhibition des points de contrôle immunitaire dans plusieurs types de tumeurs ¹¹⁸. En outre, les CAFs soutiennent la polarisation des macrophages immunosuppresseurs de type « M2-like » en sécrétant de l'IL-6, du CXCL-12 (*C-X-C motif Chemokine 12*) et du GM-CSF (*Granulocyte Macrophage Colony-Stimulating Factor*), diminuent l'activation des cellules NK, favorisent la prolifération des cellules T régulatrices ¹¹¹, et encouragent le recrutement des cellules suppressives d'origine myéloïde (ou MDSCs pour *Myeloid-derived suppressor cells*) principalement en activant la voie de signalisation STAT3 ¹¹⁹.

L'une des caractéristiques les plus étudiées des CAFs est leur capacité à produire et sécréter des protéines de la MEC, qui servent de support compact et rigide facilitant les intercommunications cellulaires et favorisant la progression tumorale du CCA ¹¹⁴. La MEC peut représenter jusqu'à près de 60 % de la masse tumorale et est composée de nombreuses protéines structurales comprenant des collagènes, des protéoglycanes, des glycosaminoglycanes et de l'acide hyaluronique. Le collagène fibrillaire COL1A1 est d'ailleurs l'une des protéines les plus abondantes de la MEC du CCA. Le degré de réticulation des collagènes est directement lié à la rigidité de la tumeur et peut être évalué par des méthodes de microscopie biphotonique (=SHG, *Second Harmonic Generation*) ¹²⁰. La MEC est continuellement remodelée par le dépôt de protéines matricielles nouvellement synthétisées, telles que la ténascine C, l'ostéopontine et la périostine, en parallèle avec une dégradation intensive effectuée par les métalloprotéinases matricielles (MMP1, MMP2, MMP3 et MMP9 essentiellement), abondamment sécrétées par les CAFs ¹²⁰. Ce processus de renouvellement de la MEC stimule les fonctions pro-tumorigènes des cellules tumorales. L'augmentation de la rigidité de la MEC exerce des forces mécaniques anormales sur les cellules environnantes, activant des mécanosenseurs intracellulaires tels que YAP-TAZ, et qui sont impliqués dans la

progression tumorale. Par exemple, ces mécanosenseurs peuvent initier des processus invasifs via l'activation de la voie mTOR, ou encore permettre aux cellules tumorales d'échapper à l'apoptose par la voie AKT ¹²¹. En outre, les composants de la MEC peuvent contribuer à l'évasion immunitaire de la tumeur en bloquant physiquement la migration des cellules immunitaires vers les cellules tumorales ^{120,122}. La dureté de la tumeur qui découle de la rigidité de la MEC peut être d'ailleurs mesurée par des méthodes d'imagerie non-invasives comme l'élastographie, qui repose sur les propriétés des ondes ultrasonores afin de mesurer l'élasticité et la dureté d'un tissu ¹²³.

Étant donné les nombreuses fonctions des CAFs dans la progression tumorale, plusieurs études ont tenté de classer ces populations fibroblastiques. En effet, en se basant sur la technologie de scRNA-Séq, des signatures d'expression spécifiques ont pu être identifiées, révélant ainsi un spectre complet des différentes sous-populations de CAFs dont les plus mentionnées sont ^{108,111} :

- Les iCAFs (*inflammatory CAFs*) : caractérisés par une forte expression de gènes liés à la réponse inflammatoire et aux facteurs de croissance ;
- Les myCAFs (*myofibroblastic CAFs*) : enrichis en transcrits liés à la MEC ;
- Les apCAFs (*antigen-presenting CAFs*) : possédant une expression élevée de transcrits du complexe majeur d'histocompatibilité de classe II ;
- Les mesCAFs (*mesothelial CAFs*) : enrichis en marqueurs mésothéliaux ;
- Les vCAFs (*vascular CAFs*) : exprimant des transcrits impliqués dans le développement vasculaire.

Ces sous-populations démontrent que les CAFs forment une population stromale extrêmement hétérogène, orchestrant divers processus pro-tumorigènes. En conséquence, il est pertinent d'envisager de nouvelles thérapies ciblant ces cellules spécifiques pour potentiellement inhiber la progression tumorale. Par exemple, il a été montré que l'utilisation de nanoparticules activées par de la nanohyperthermie ciblait spécifiquement les CAFs et induisait une réduction significative de la croissance tumorale dans un modèle murin immunodéficient de CCA ¹²⁴.

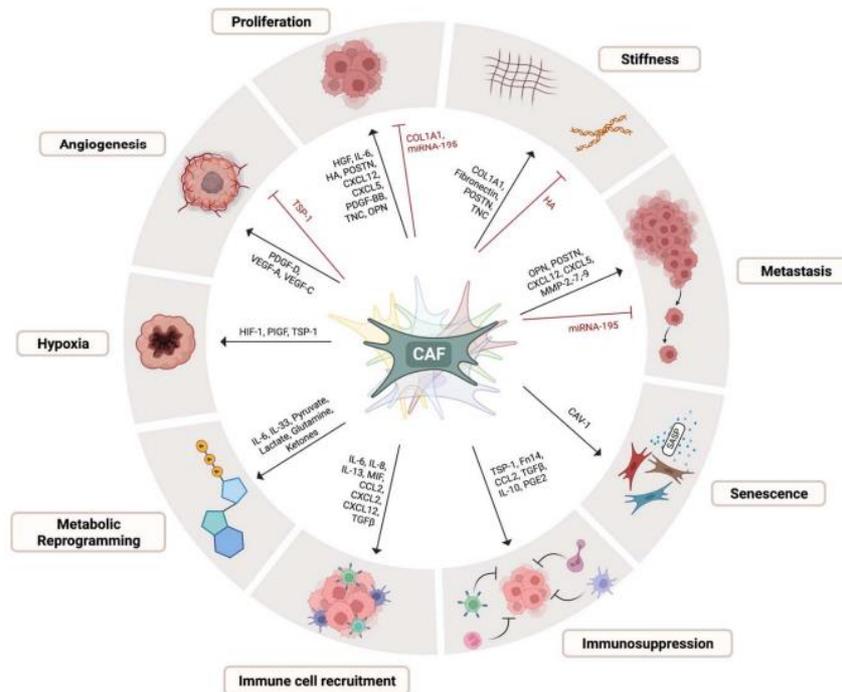


Figure 16 : Fonctions des CAFs dans la progression du CCA ¹¹¹. Divers sous-types de CAFs sécrètent une variété de médiateurs qui participent à la cholangiocarcinogénèse en affectant la prolifération tumorale, les métastases, l'angiogenèse, l'hypoxie, la rigidité de la MEC, la sénescence, l'immunosuppression, le recrutement des cellules immunitaires et la reprogrammation métabolique. TNC, téna-scine ; POSTN, périostine ; HA, acide hyaluronique ; CAV1, cavéoline-1 ; TSP-1, thrombospondine-1 ; Fn14, *FGF-inducible 14* ; MIF, *macrophage inhibitory factor* ; HIF-1, *hypoxia-inducible factor 1* ; PIGF, *placental growth factor* ; OPN, ostéopontine.

4.2 Les cellules endothéliales tumorales

Le MET du CCA est également riche en TECs, qui jouent un rôle crucial dans la vascularisation de la tumeur pour répondre à ses besoins énergétiques et favoriser la progression métastatique. Dans le CCA, on distingue deux types principaux de TECs : les cellules endothéliales lymphatiques (ou LECs, pour *Lymphatic Endothelial Cells*) et les cellules endothéliales vasculaires (ou VECs, pour *Vascular Endothelial Cells*) ¹²⁵ (**Figure 17**).

L'atteinte lymphatique est devenue une caractéristique marquante du cancer, également retrouvée dans le CCA. En effet, les tumeurs de CCA sont souvent caractérisées par la présence précoce de métastases ganglionnaires, un facteur fréquemment associé à un pronostic défavorable pour la maladie ¹²⁶. Ce processus, appelé lymphangiogenèse tumorale, désigne la prolifération de nouveaux vaisseaux lymphatiques intratumoraux ou péri-tumoraux, ce qui favorise la néovascularisation des tumeurs très agressives, facilitant ainsi la progression

métastatique précoce de la maladie. La présence de métastases précoces dans les ganglions lymphatiques régionaux rend souvent la résection de la tumeur impossible, et les tumeurs présentant une densité élevée de vaisseaux lymphatiques développent plus fréquemment des récives. Par conséquent, il est essentiel d'examiner les éléments du MET du CCA qui favorisent la lymphangiogenèse ¹²⁵. La création de nouveaux vaisseaux lymphatiques peut être facilitée par les CAFs via la sécrétion de VEGF-C, qui est stimulée par le PDGF-D (**voir la partie III.4.1 de ce chapitre**). Ce facteur de croissance vasculaire joue un rôle crucial dans la formation des vaisseaux lymphatiques initiaux (les plus petits) et collabore avec les angiopoïétines 1 et 2 pour former les vaisseaux terminaux ^{125,127,128}. La sécrétion de VEGF-C facilite le recrutement de LECs au site tumoral. Ces cellules tapissent les voies lymphatiques et surexpriment à leur surface des marqueurs tels que la podoplanine et VEGFR-3, qui sont devenus des biomarqueurs pronostiques négatifs du CCA ¹²⁵. De plus, le réseau dense de vaisseaux lymphatiques et le nombre réduit de vaisseaux sanguins dans le stroma du CCA créent un microenvironnement hypoxique, entraînant une surexpression de HIF-1 α (*Hypoxia Inducible Factor 1 subunit alpha*) dans les cellules tumorales. Cette condition favorise la lymphangiogenèse, ainsi que la progression tumorale (**Figure 17**) ¹²⁹.

La dissémination métastatique du CCA repose sur un autre mécanisme clé : l'angiogenèse tumorale. Ce processus est principalement stimulé par des facteurs pro-angiogéniques sécrétés par les cholangiocytes malins (**voir la partie III.3.4 de ce chapitre**) ^{125,130}. Dans les tissus normaux, l'induction de l'angiogenèse par ces facteurs conduit à un remodelage de la paroi vasculaire nouvellement formée, en créant des jonctions serrées entre les cellules endothéliales, ce qui permet l'élasticité des vaisseaux. Une fois ce processus achevé, le flux sanguin rétabli et l'atteinte de la normoxie (concentration physiologique en O₂) entraînent l'inhibition de l'angiogenèse. Cependant, dans un contexte tumoral, l'hypoxie persistante induit l'expression de VEGF, en particulier de VEGF-A ¹²⁵. Ce facteur de croissance interagit avec le récepteur VEGFR-2 surexprimé à la surface des VECs, ce qui entraîne la formation de nouveaux vaisseaux sanguins par ces cellules (**Figure 17**). Par ailleurs, les VECs peuvent sécréter des métalloprotéinases matricielles, facilitant le remodelage de la MEC et favorisant ainsi les métastases.

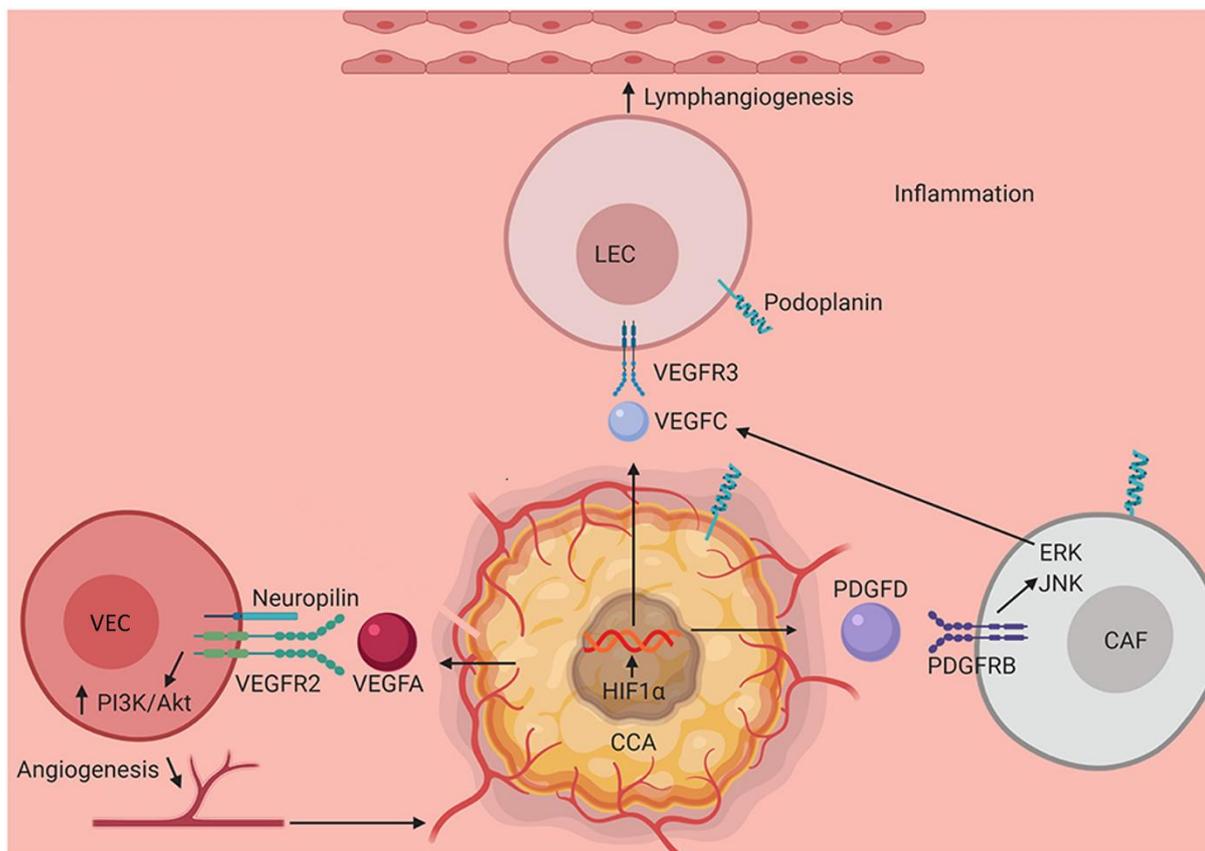


Figure 17 : Fonctions des TECs dans la progression du CCA ¹²⁵ (modifié). Plusieurs composants du MET activent des mécanismes qui favorisent la croissance tumorale, la migration et l'angiogénèse et de la lymphangiogénèse associées à la tumeur. L'interaction entre les VECs et les cellules de CCA via VEGFR-2 et VEGF-A assistée par la neuropiline conduit à l'angiogénèse tumorale via la régulation positive de la voie PI3K/AKT. L'activation de HIF-1 α par un MET inflammé stimule la progression du CCA. Le VEGF-C sécrété par les cellules de CCA et par les CAFs (via la stimulation par le PDGF-D) contribue au processus de lymphangiogénèse en stimulant la division des LECs via l'engagement de VEGFR-3 et la régulation positive de la voie ERK/JNK. JNK, c-Jun N-terminal Kinase.

Néanmoins, la littérature sur le CCA se concentre principalement sur les CAFs et les populations immunitaires, laissant peu de publications détaillées sur les rôles des TECs. Par exemple, l'origine des TECs dans le CCA reste largement inexplorée et méconnue.

4.3 Les cellules immunitaires

Les cellules immunitaires innées et adaptatives jouent un rôle crucial dans le stroma du CCA. En effet, les réactions inflammatoires induites par ces cellules sont fondamentales dans la cholangiocarcinogénèse et la progression tumorale. De plus, les populations immunitaires présentes dans la tumeur peuvent moduler les réponses aux immunothérapies, un aspect

particulièrement pertinent avec l'introduction récente du durvalumab, un anti PD-L1, sur le marché pour le traitement du CCA.

Le système immunitaire inné comprend principalement des macrophages, des neutrophiles, des MDSCs et des cellules NK (**Figure 18**).

TAMs

Parmi les cellules immunitaires infiltrantes du stroma du CCA, les TAMs constituent probablement la population la plus représentative⁵⁰. Ces cellules dérivent des macrophages résidents du foie (les cellules de Kupffer), ou de la différenciation de monocytes circulants d'origine médullaire. Les TAMs dans le CCA sont généralement classifiés comme des macrophages de type « M2-like », caractérisés par un phénotype anti-inflammatoire et immunosuppresseur. Ce type de TAMs est associé à un pronostic défavorable et à la présence de métastases chez les patients atteints de CCA^{131,132}. La polarisation des macrophages vers le phénotype « M2-like » est induite par les cellules tumorales, principalement via la voie de signalisation IL-6/STAT3¹³¹⁻¹³³.

Les TAMs jouent plusieurs rôles cruciaux dans la progression du CCA. Ils participent au remodelage de la MEC en sécrétant des MMPs et favorisent le recrutement de cellules immunosuppressives telles que des neutrophiles associés aux tumeurs (ou TANs pour *Tumor-Associated Neutrophils*), des MDSCs et des lymphocytes T régulateurs (Tregs). Ce recrutement est facilité par la libération d'interleukines (IL-4, IL-8 et IL-10) et de chimiokines (CCL2, CCL22 et CCL17)^{133,134}. De plus, il existe une interaction fonctionnelle entre les TAMs et les cellules tumorales de CCA. Les cellules tumorales sécrètent des ligands Wnt (tels que Wnt3, Wnt5a et Wnt7b), qui attirent et activent les TAMs au site tumoral. En retour, ces TAMs activés sécrètent à nouveau des ligands Wnt, stimulant ainsi la voie Wnt/ β -caténine dans les cellules de CCA, ce qui favorise leur prolifération et leur invasion¹³⁵. Les TAMs activés peuvent également promouvoir l'angiogenèse tumorale en produisant des facteurs pro-angiogéniques comme VEGF-A, IL-8 et iNOS.

TANs

Les TANs jouent également un rôle dans la tumorigenèse et la progression du CCA, bien que ce rôle soit encore en cours d'étude. L'infiltration de TANs au sein de la tumeur a été associée à un mauvais pronostic pour les patients atteints de CCA ¹³¹⁻¹³³. Ces TANs sont attirés au site tumoral par des signaux chimioattractants, notamment le CXCL5, via les voies de signalisation PI3K/AKT et ERK1/2. Lors de leur recrutement, les TANs peuvent adopter un phénotype de type N2, activé par des facteurs tels que le TGF- β et le GM-CSF ¹³⁶.

Les TANs de type N2 activés sont capables de libérer divers facteurs de croissance, enzymes, et cytokines qui favorisent la croissance tumorale, remodelent le MET, et stimulent l'angiogenèse. Cependant, le rôle précis et l'impact des TANs dans le MET du CCA restent largement inconnus, nécessitant davantage de recherches pour comprendre pleinement leur influence sur la progression de la maladie.

MDSCs

Les MDSCs constituent un groupe de cellules immunitaires hétérogènes qui exercent des effets immunosuppresseurs puissants, inhibant diverses activités des cellules immunitaires, telles que les lymphocytes T cytotoxiques et les cellules NK ¹³⁷. Dans le contexte inflammatoire du CCA, les MDSCs libèrent en effet des facteurs immunosuppresseurs, notamment le TGF- β et diverses interleukines, ce qui contribue à une évasion immunitaire et à une résistance accrue à l'immunothérapie dans divers types de cancers. Des études récentes ont révélé un dialogue moléculaire significatif entre les CAFs et les MDSCs. Les CAFs sécrètent des cytokines telles que l'IL-6 et l'IL-33, qui stimulent à leur tour les MDSCs à réguler à la hausse l'expression de la 5-lipoxygénase (5-LO). L'un des métabolites de la 5-LO, le LTB4 (*Leukotriene B4 receptor*), peut activer la voie de signalisation PI3K/AKT/mTOR dans les cellules de CCA via l'interaction avec le récepteur BLT2 (*Leukotriene B4 receptor 2*), contribuant ainsi à la progression tumorale du CCA ¹³⁸.

Une étude publiée en 2020 a souligné l'importance des interactions entre les TAMs et les MDSCs dans le CCA. Elle a montré que la déplétion des TAMs positifs pour PD-L1, dans des échantillons humains de CCA et des modèles murins, n'affectait pas la croissance tumorale, contrairement aux attentes ¹³⁹. Cette absence de réponse est attribuée à une accumulation

compensatoire de MDSCs granulocytaires, qui altèrent la réponse des cellules T et favorisent l'évasion immunitaire. Toutefois, la déplétion simultanée des TAMs et des MDSCs a montré des résultats prometteurs dans l'amélioration de l'efficacité du traitement anti PD-1 dans le CCA.

Cellules NK

Les cellules NK jouent un rôle essentiel dans la défense antitumorale, en collaborant avec les lymphocytes cytotoxiques pour éliminer les cellules tumorales. Elles les reconnaissent et les détruisent par des mécanismes de lyse cellulaire impliquant la libération de perforine, de facteurs cytotoxiques et de TNF¹⁴⁰. Cependant, les cellules de CCA développent diverses stratégies pour échapper à cette activité tumoricide. Par exemple, elles peuvent exprimer des antigènes du MHC de type I ou sécréter des molécules immunomodulatrices comme le TGF- β et la PGE2 (*Prostaglandin E2*), qui antagonisent l'action des cellules NK, favorisant ainsi la prolifération incontrôlée des cellules tumorales.

Des recherches antérieures ont indiqué que l'infiltration de cellules NK dans les tumeurs de CCA est corrélée à un meilleur pronostic post-résection, suggérant un rôle protecteur de ces cellules dans la progression tumorale¹⁴¹. Par ailleurs, des études *in vitro* menées sur des lignées de CCA humaines ont montré que les cellules NK amélioreraient l'efficacité cytotoxique du cétuximab, un anticorps monoclonal anti-EGFR¹⁴². De plus, l'administration de cellules NK humaines cultivées *ex vivo* dans des modèles de xénogreffes de CCA murins a significativement inhibé la croissance tumorale, mettant ainsi en lumière leur potentiel thérapeutique¹⁴³.

Dans le système immunitaire adaptatif, les TILs et les DCs jouent des rôles clés. Les TILs, composés principalement de lymphocytes T, sont essentiels pour une réponse immunitaire antitumorale spécifique et efficace, tandis que les DCs sont cruciales pour l'initiation de la réponse immunitaire via la présentation d'antigènes tumoraux (**Figure 18**).

TILs

Les TILs forment un groupe hétérogène de cellules immunitaires comprenant les lymphocytes B CD20⁺, les lymphocytes T cytotoxiques CD8⁺, les lymphocytes T auxiliaires CD4⁺ et les

lymphocytes T régulateurs CD4⁺CD25⁺FOXP3⁺ (*Forkhead box P3*). La distribution spatiale des TILs dans le tissu tumoral reste un sujet de débat aujourd'hui ¹⁴⁴, mais d'après de nombreuses publications, les Tregs, les lymphocytes B et les T CD4⁺ seraient principalement localisés dans les régions péri-tumorales, tandis que les T CD8⁺ prédominent à l'intérieur de la tumeur. Les lymphocytes T cytotoxiques sont capables de détruire directement les cellules cancéreuses en libérant des protéines cytotoxiques telles que la perforine et la granzyme, ainsi qu'en induisant l'apoptose par l'expression de FasL (ligand de FAS) ou la sécrétion de TNF- α ¹⁴⁵. Les lymphocytes T auxiliaires jouent un rôle de soutien dans les réponses immunitaires adaptatives. Ce groupe de cellules est hétérogène, incluant des sous-populations telles que les Th1 (*T helper*), Th2 et Th17. Chacune de ces sous-populations aide à orchestrer une réponse immunitaire efficace, notamment en aidant les lymphocytes B à produire des anticorps, ce qui contribue à l'inhibition de la prolifération des cellules tumorales.

Plusieurs études ont montré qu'un infiltrat accru en lymphocytes T CD4⁺, T CD8⁺ et en lymphocytes B (plus rares) est associé à un meilleur pronostic chez les patients atteints de CCA ^{144,145}. En effet, une faible abondance de lymphocytes T dans les tissus tumoraux est corrélée à une suractivation des voies de signalisation Wnt/ β -caténine et TGF- β dans les cellules tumorales, favorisant ainsi leur prolifération. Le rôle des lymphocytes B dans le CCA reste cependant très largement méconnu aujourd'hui.

Par ailleurs, il existe également un groupe de TILs immunosuppresseifs connus sous le nom de Tregs, caractérisés par la surexpression de FOXP3 et CTLA-4 (*Cytotoxic T-Lymphocyte-Associated protein 4*) ¹⁴⁶. Les Tregs induisent des réponses immunosuppressives contre les cellules NK et les lymphocytes T CD8⁺, principalement par la sécrétion de cytokines telles que l'IL-10 et le TGF- β . Comme pour les TAMs et les TANs, une infiltration élevée de Tregs dans la zone tumorale est associée à une survie réduite chez les patients atteints de CCA. En effet, la protéine CTLA-4, surexprimée à leur surface, se lie à CD80 exprimé à la surface des APCs, inhibant ainsi l'activation des lymphocytes T cytotoxiques.

DCs

Les cellules dendritiques jouent un rôle crucial dans le système immunitaire en reliant les réponses immunitaires innées et adaptatives. Leur fonction principale consiste à reconnaître les antigènes tumoraux et à les présenter aux cellules T cytotoxiques, activant ainsi ces

dernières pour déclencher une réponse immunitaire antitumorale. Une infiltration accrue de DCs dans les tumeurs a été associée à un taux réduit de métastases et à un meilleur pronostic chez les patients atteints de CCA ¹⁴⁷. Cependant, malgré leurs capacités à activer les réponses immunitaires, les DCs peuvent également contribuer à la création d'un microenvironnement immunosuppresseur ¹³¹⁻¹³³. Les DCs matures, identifiables par l'expression de CD83, favorisent l'accumulation de cellules T dans la région péri-tumorale et leur présence est généralement un indicateur de meilleur pronostic. À l'inverse, les DCs immatures, dépourvues de l'expression de CD83, sont souvent associées à un pronostic moins favorable. La sécrétion de cytokines immunosuppressives telles que le TGF- β et l'IL-10 par les cellules de CCA peut inhiber la maturation des DCs et réduire leur capacité à stimuler une réponse antitumorale efficace, diminuant ainsi l'activité des cellules T.

Ainsi, les cellules de CCA sont entourées d'une variété de cellules immunitaires, qui exercent à la fois des effets antitumoraux et immunosuppresseurs. Bien que les cellules de CCA expriment des antigènes immunogènes, elles déploient plusieurs stratégies pour recruter des cellules immunosuppressives et échapper à la surveillance immunitaire. Par exemple, elles sécrètent des cytokines immunosuppressives telles que le TGF- β et l'IL-10, qui favorisent la prolifération des Tregs et inhibent la présentation d'antigènes par les DCs ¹⁴⁸. De plus, les cellules de CCA expriment excessivement la glycoprotéine membranaire CD47, qui se lie à SIRP α (*Signal Regulatory Protein alpha*) sur les macrophages, bloquant ainsi la phagocytose des cellules tumorales. En ciblant CD47 ou les voies du TGF- β et de l'IL-10, nous pourrions ainsi développer des thérapies prometteuses pour le traitement du CCA ^{149,150}.

Un mécanisme essentiel de l'évasion immunitaire tumorale est l'augmentation de l'expression des molécules de point de contrôle immunitaire dans le MET ¹³¹. Par exemple, PD-L1 se lie au récepteur PD-1 sur les lymphocytes T effecteurs, inhibant leur fonction. Les TAMs sont probablement la principale source de PD-L1 dans les CCA ¹⁵¹. Bien que les études actuelles sur l'immunothérapie pour le CCA soient limitées, des médicaments tels que le pembrolizumab, un anticorps anti PD-1, ont montré des résultats prometteurs chez les patients atteints de CCA avancé ^{152,153}. De plus, les Tregs infiltrant les tumeurs de CCA expriment des niveaux élevés de CTLA-4, un autre point de contrôle immunitaire contribuant à l'immunosuppression. Inhiber ces protéines de point de contrôle immunitaire est ainsi un enjeu majeur dans la mise en place des nouvelles immunothérapies, afin de stimuler le système immunitaire antitumoral.

Il existe ainsi des sous-classes de CCA en fonction de l'infiltration des TILs ⁶⁷. Certaines tumeurs, qualifiées de « chaudes », présentent une infiltration élevée de TILs, ce qui est souvent associé à une réponse immunitaire plus active et potentiellement à une meilleure réponse aux immunothérapies. À l'inverse, la majorité des CCA sont considérés comme des tumeurs « froides », caractérisées par une faible infiltration de TILs, ce qui rend la réponse aux thérapies d'inhibition des points de contrôle immunitaire moins efficace. Ainsi, évaluer le profil immunitaire des CCA avant d'initier une immunothérapie est crucial pour prédire la réponse au traitement et pour adapter les stratégies thérapeutiques. Une meilleure compréhension de l'infiltration lymphocytaire et des caractéristiques immunitaires spécifiques de chaque tumeur peut aider à identifier les patients les plus susceptibles de bénéficier d'une immunothérapie et à développer des approches plus ciblées pour les tumeurs dites « froides ».

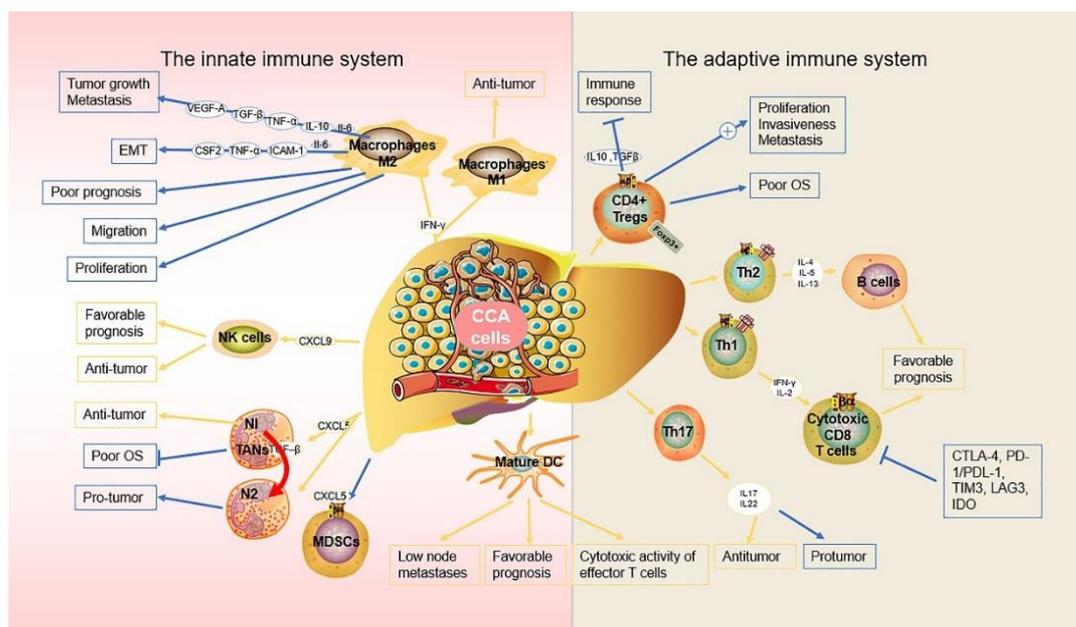


Figure 18 : Microenvironnement immunitaire tumoral du CCA ¹³³. Le microenvironnement immunitaire de la tumeur de CCA regroupe des populations des systèmes immunitaires inné et adaptatif. On y retrouve des populations immunosuppressives, comme les TAMs, les TANs, les MDSCs et les Tregs, ainsi que des cellules promouvant une immunité antitumorale incluant les DCs matures, les lymphocytes T auxiliaires CD4⁺ et T cytotoxiques CD8⁺. Des protéines de point de contrôle immunitaire, comme CTLA-4, PD-1, TIM3, LAG3 ou IDO sont actuellement au cœur de recherches intenses afin d'améliorer l'efficacité thérapeutique des immunothérapies. CSF2, *colony stimulating factor 2* ; ICAM-1, *intercellular adhesion molecule 1* ; OS, survie globale ; TIM3, *T cell immunoglobulin, mucin domain-containing 3* ; LAG3, *lymphocyte activation gene 3* ; IDO, *indoleamine 2,3-dioxygenase*.

4.4 Les modèles d'étude du CCA

Afin d'étudier les mécanismes de cancérogenèse ainsi que les communications cellulaires permettant la progression du CCA, il existe une multitude de modèles fidèles à la clinique. Le choix du modèle à utiliser dépend des objectifs du chercheur : les modèles *in vitro* sont plus faciles d'accès et nécessitent moins de logistique que les modèles *in vivo*, plus représentatifs mais également plus coûteux ¹⁵⁴. Chaque modèle présente des avantages et des inconvénients, qui sont résumés dans la **Table 3**.

In vitro, il est possible de travailler sur des lignées cellulaires immortalisées de CCA, ou bien sur des cultures primaires de CCA. Ces dernières, bien que plus rares, présentent une pertinence biologique accrue par rapport à des lignées immortalisées ^{155,156}. Ces dernières années ont été marquées par la volonté des chercheurs d'établir des modèles pathologiques de plus en plus proches de la maladie. En effet, l'émergence de la culture tridimensionnelle a permis de créer des modèles de CCA plus pertinents et plus optimaux pour étudier des voies de signalisation ou bien des interactions cellulaires. Ainsi, il est possible de générer des sphéroïdes ou bien des organoïdes, qui correspondent à des agrégats cellulaires récapitulant la structure 3D du tissu d'intérêt et permettant de mieux étudier les interactions entre le CCA et son MET ^{157,158}. Les interactions cellule-cellule prédominent dans les sphéroïdes par rapport aux organoïdes, qui sont cultivés dans une matrice d'hydrogel et qui sont principalement établis à partir de biopsie de tissu réséqué. Ces derniers récapitulent très fidèlement la tumeur du patient au niveau histopathologique, à la fois en culture et sous forme de xénogreffes chez des souris immunodéficientes ^{159,160}. Ainsi, il a été démontré que ces modèles forment des systèmes fiables pour les tests de médicaments et les applications de médecine personnalisée. Cependant, il est nécessaire d'incorporer des cellules stromales à ces modèles tridimensionnels afin de parfaitement récapituler les tumeurs de CCA observées *in vivo*.

In vivo, plusieurs approches ont été utilisées pour induire la formation d'un CCA chez la souris afin d'étudier la physiopathologie de la maladie et la réponse aux traitements, dans un contexte plus proche de la maladie humaine ^{154,161,162}. En effet, il existe quatre grands groupes de modèles murins de CCA :

- Les modèles induits chimiquement, dans lesquels une molécule chimiotoxique est responsable d'évènements oncogéniques ;
- Les modèles génétiquement modifiés, conçus pour imiter les altérations génétiques et épigénétiques et l'activation aberrante des voies de signalisation dans les stades tumoraux précoces et tardifs ;
- Les modèles d'implantation, qui consistent à injecter des cellules tumorales ou bien des biopsies afin de permettre une croissance tumorale chez la souris. Les greffes peuvent être orthotopiques (dans l'organe d'origine de la maladie) ou bien ectopiques (sous la peau des animaux). Il est possible de greffer des éléments tumoraux d'une autre espèce dans des modèles dépourvus de système immunitaire mature (modèles immunodéficients ou xénogreffes), ou au contraire, d'utiliser du matériel tumoral provenant de la même espèce (modèles immunocompétents ou syngéniques). Ces derniers sont notamment très utilisés afin d'étudier le rôle du système immunitaire dans la progression du CCA. L'intérêt des xénogreffes repose sur le fait qu'il est possible de dissocier le cœur tumoral, qui est le plus souvent humain, de son MET qui est purement murin ¹⁶³ ;
- Les modèles basés sur les transposons.

Les modèles *in vivo* permettent de surveiller en temps réel le développement de la tumeur et la réponse aux thérapies à l'aide de modalités d'imagerie comme par exemple l'IRM, l'élastographie ou la bioluminescence.

Table 3 : Les différents modèles d'étude du CCA⁵⁰ (modifié). Il existe de nombreux modèles d'étude du CCA, qui présentent chacun leurs avantages et leurs inconvénients. TME, microenvironnement tumoral ; CT scan, *computed tomography* ; MRI, *magnetic resonance imaging* ; TAA, *thioacetamide* ; CCL4, tétrachlorure de carbone ; Alb-Cre: albumine-Cre (modèle permettant de cibler des gènes spécifiquement dans le foie).

Models	Main features	Advantages	Limitations	Examples	Refs
<i>In vitro models</i>					
Cell lines	Devoid of non-neoplastic and necrotic tissues; growth can be synchronized; high number of cells generated; easy assessment of proliferation and cell death; possibility of genetic manipulation (overexpression, silencing) and drug administration	More similar than cell lines to the in vivo situation	Become different from original tumours following in vitro passages; generally representing only advanced tumour; lack of TME (immune cells, stromal cells and blood vessels); genetically unstable; normal cholangiocyte cultures should be used as control	Human (HuCC-T1 Kku-156, Mz-Cha-1, TFK-1, QBC939, etc.); mouse (SBI-SB7); rat (CGCCA) cell lines	155,156,164
Primary cultures	Cell culture system that is formed by culture of cells directly obtained from CCA tissues	Mimic spatial architecture, physiological responses, secretion of soluble mediators, gene expression patterns and drug resistance mechanisms of CCA	Labour-intensive; only generated from surgically resected specimens; lack of realistic cell-cell and cell-matrix interactions	Primary cultures obtained from human or mouse (and rats) resected CCA specimens	165,166
Spheroids	Cell aggregates that are either grown in suspension or embedded in a 3D matrix using 3D culture methods	Accurately mimic genetics, cell organization and behaviour, and response to drugs or mutations, in a setting that resembles the original microenvironment; allow the study of the various phases of carcinogenesis; can be grown from a limited amount of starting material (biopsy samples); useful for gene editing	Long-term culture difficult	Human CCA spheroids in 3D culture; 3D rat CAF-CCA cell co-culture models	157,167,168
Organoids	Simplified and 'miniaturized' version of an organ generated in vitro in 3D and preserving the tissue of origin		Lack of circulation limits their size and accuracy of complexity; accuracy of Organoids of CCA isolated from human or mouse (mice and rats) liver specimens need to be fully validated in these 3D structures		160,161,164
<i>In vivo models</i>					
Chemically- and infestation-induced models	Mice, rats or Syrian hamsters subjected to the administration of chemical carcinogens via various sites and modalities	Enable the identification of natural and occupational carcinogens; tumour onset and progression easy to assess from early stages; presence of chronic inflammation; microenvironment and intact immune system	Different pharmacokinetics and drug metabolism from humans; potential drug toxicity; difficult to identify the driving events; development of metastasis; intestinal metaplasia; natural preceding CCA occurrence in TAA and Furan models; monitoring of carcinogenesis using the same instrumentation as in humans (CT scan, MRI)	TAA Furan <i>Tp53ko-CCL4</i> ; diethylnitrosamine; dimethylnitrosamine; <i>Opisthorchis viverrini</i>	162,169
Genetically-engineered mouse models (GEMM)	Mice whose genome has been altered using genetic engineering techniques	Tumour onset and progression easy to assess from early stages; possible to study gene function to add reporters; amenable to genetic approaches; tumours develop in the presence of an intact immune system and a tumour microenvironment; able to predict the response of human tumours to therapy	Mouse strains do not represent the genetic diversity of the human population; mouse orthologues grow very fast relative to human orthologues; the engineering strategies are complicated and expensive, requiring a dedicated infrastructure; lack of chronic inflammation in the background; monitoring of carcinogenesis using the same instrumentation as in humans (CT scan, MRI)	mouse <i>Alb-Cre;Smad4^{fl};Pten^{fl}</i> ; <i>Alb-Cre;Kras^{LSG120^{fl}}</i> ; <i>Tp53^{fl}</i> ; <i>Alb-Cre;Kras^{LSG120^{fl}}</i> ; <i>Fbxw7^{LSI-R468C}</i> ; <i>Kras^{LSG120}</i> ; <i>Alb-Cre;Notch1C</i> ; <i>Alb-Cre;Tp53^{fl}</i> ; <i>Notch1C</i>	162,169
Implantation models	Mice or rats in which the tumour component from an external source (cell lines, human tissues, etc.) is implanted either in the organ (orthotopic) or a different (ectopic) organ from the original	Easy to generate and recapitulate some of the features	Useful mainly for the study of advanced stages; mainly stable at the genetic level; different tumour microenvironment from the native condition and lack of immune cells	Subcutaneous xenografts of human (Mz-Cha-1, QBC939, etc.) or mouse (SBI-SB7) cell lines in nude or syngeneic mice; patient-derived xenografts in female NOD/SCID mice; bile duct inoculation of tumorigenic cholangiocyte cell lines	162,167,170,171
Transposon-based models	Mice in which a gene or a combination of genes is stably integrated into the hepatocytes integrated using a transposase	Tumour onset and progression easy to assess from early stages; possible to deliver specific mutations to study gene function or to add reporters; easy, inexpensive, fast, and high-throughput genetic screening approaches; develop in the presence of an intact immune system and a proper microenvironment; allow prediction of the response of human tumours to therapy	Mouse tumours grow very fast relative to human tumours; CCA develop from mature hepatocytes or stem cells; monitoring of tumourigenesis using the same instrumentation as in humans (CT scan, MRI)	<i>NRAS^{G12V};hK4A;Agt⁻</i> ; <i>PIK3CA;Yap</i> ; <i>NICD1</i> ; <i>NICD1;myrAKT</i> ; <i>YAP^{S127A};myrAKT</i> ; <i>NRAS^{G12V};myrAKT</i> ; <i>NICD1;KRAS^{G12D}</i> ; <i>JAG1;myrAKT</i> ; <i>YAP^{S127A};myrAKT + IL-33</i> injection	161,162,169

IV. Diagnostic et prise en charge des CCA

Le diagnostic du CCA constitue le premier défi dans sa prise en charge. En effet, en raison de sa nature discrète et silencieuse, ce cancer est souvent détecté à des stades avancés. Le diagnostic du CCA survient généralement lors de la découverte fortuite de masses tumorales pendant le dépistage de sténoses biliaires symptomatiques, ce qui représente environ 20 à 40 % des cas ¹⁵⁵. À des stades avancés, lorsque le cancer devient symptomatique, il se manifeste par un ictère dû à un mauvais écoulement de la bile, des douleurs abdominales, une diminution de l'appétit, une perte de poids et des sueurs nocturnes ⁵⁰. En 2023, l'EASL (*European Association for the Study of the Liver*) et l'ILCA (*International Liver Cancer Association*) ont mis à jour les recommandations pratiques pour la prise en charge du CCA ¹⁷², alignées avec celles de l'AFEF (Association Française pour l'Étude du Foie), renouvelées en Juillet 2024 ¹⁷³.

Le diagnostic du CCA repose principalement sur la réalisation d'une biopsie, qui est essentielle en cas de suspicion. Cette biopsie joue trois rôles majeurs : confirmer ou infirmer le diagnostic du CCA, distinguer la sous-classe spécifique de CCA, et permettre une investigation moléculaire si nécessaire. Sa fonction principale est de différencier le CCA d'autres pathologies telles que le CHC ou des métastases provenant d'adénocarcinomes (notamment du côlon, des poumons, des seins ou du pancréas), afin d'éviter toute erreur de diagnostic. Une évaluation histologique permet de détecter des structures cellulaires caractéristiques du CCA, telles que des structures tubulaires et un stroma fibreux. Si nécessaire, l'IHC peut aider à confirmer l'origine biliaire de la tumeur. Les CCA sont généralement positifs pour les cytokératines 7 et 19, mais négatifs pour la cytokératine 20, contrairement aux CHC ou aux métastases coliques ^{172,173}. Des panels de marquages supplémentaires peuvent être utilisés pour identifier le sous-type précis de CCA. Par exemple, l'iCCA venant des petits canaux biliaires est positif pour S100p (*Calcium-binding protein S100P*) et la mucicarminine, tandis que l'iCCA émanant des grands canaux biliaires est positif pour CD56 et la N-cadhérine. Il est également possible d'effectuer un profilage moléculaire à l'aide de technologies NGS (*Next-Generation Sequencing*) sur la biopsie tumorale pour identifier les mutations génétiques associées à la tumeur, bien que cela ne soit pas obligatoire et soit uniquement recommandé pour les patients présentant un risque élevé de récurrence.

Toutefois, l'analyse histologique seule ne suffit pas pour diagnostiquer le CCA. Elle est généralement complétée par diverses techniques d'imagerie, notamment l'échographie, la tomodensitométrie (TDM), l'IRM (Imagerie par Résonance Magnétique) et, si nécessaire, le PET-Scan. En général, la suspicion initiale de CCA est soulevée par l'échographie, où la tumeur se présente comme une masse solide accompagnée d'une possible dilatation des voies biliaires périphériques. À la TDM, le CCA apparaît hypodense par rapport au parenchyme environnant et montre des bordures irrégulières. Lors des scintigraphies avec injection de produit de contraste, la tumeur de CCA se caractérise par un rehaussement périphérique au stade artériel et un centre plus atténué pendant la phase retardée, quelque temps après l'injection du produit de contraste (**Figure 19**)^{172,173}. La tomographie par émission de positons au [18F]-fluorodésoxyglucose, ou plus communément appelée PET-Scan peut également être utilisée pour compléter le diagnostic, en particulier pour détecter des métastases ou de très petites tumeurs¹⁷⁴. L'endoscopie peut aussi être employée, mais surtout lorsqu'il est nécessaire de recueillir des échantillons histologiques ou cytologiques, ou de procéder à un drainage biliaire préopératoire, notamment pour les pCCA et les dCCA¹⁷³.

Pour compléter le diagnostic du CCA, il est possible d'analyser certains marqueurs sériques spécifiques à ce cancer. En effet, la présence d'un CCA peut être associée à une élévation des taux sanguins de l'antigène carcino-embryonnaire (ACE) et de l'antigène carbohydre 19-9 (CA19-9). Les taux d'AFP (Alpha-fœtoprotéine) et d'immunoglobulines IgG4 peuvent également être considérés pour exclure des diagnostics alternatifs tels qu'un CHC ou une cholangite sclérosante associée à IgG4^{155,175}. Toutefois, ces analyses sériques, bien que utiles, manquent de spécificité et de sensibilité, et doivent être utilisées en complément des méthodes d'imagerie. De plus, l'analyse des anomalies chromosomiques par hybridation de fluorescence *in situ* (ou FISH, pour *Fluorescence In Situ Hybridization*) peut aider à distinguer le CCA des sténoses biliaires non malignes.

Enfin, une fois le diagnostic établi, il est crucial d'évaluer si la tumeur est résécable chirurgicalement afin d'adapter les options thérapeutiques disponibles pour le patient (**Figure 22**).

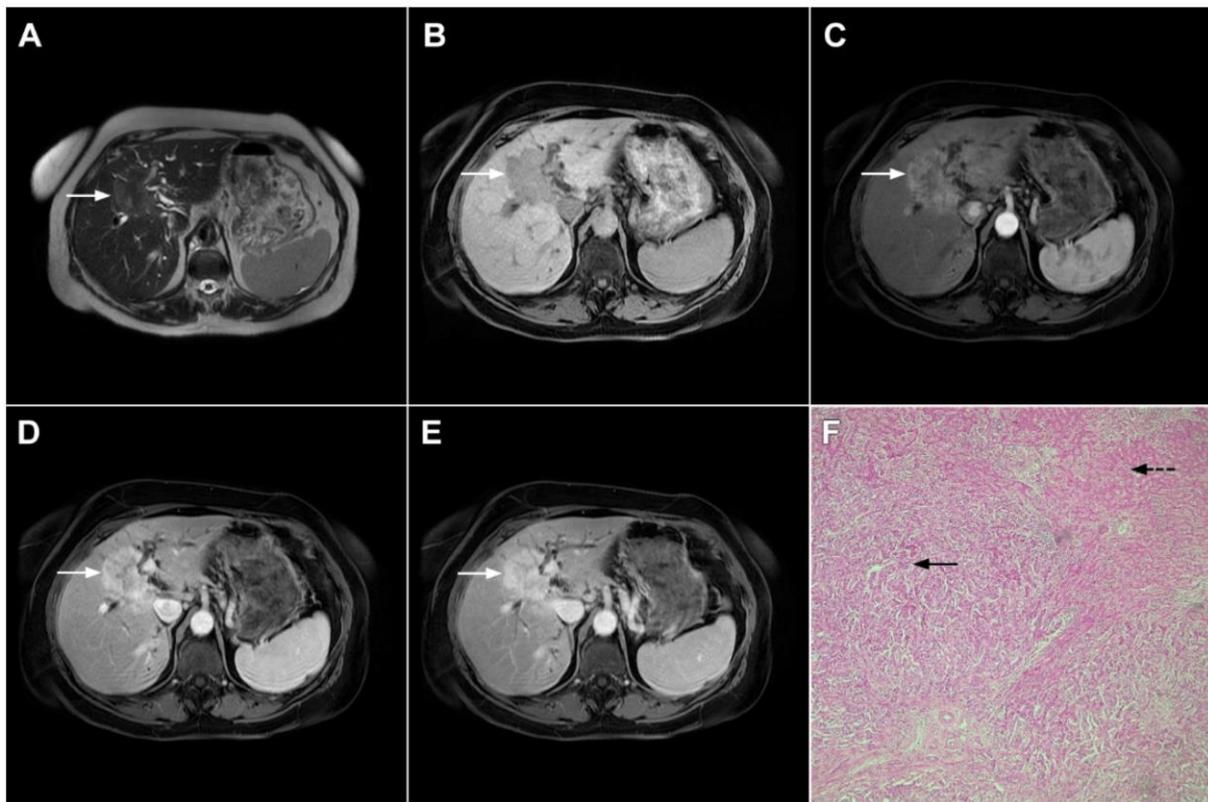


Figure 19 : Diagnostic du CCA par tomodensitométrie et IRM ¹⁷⁶. A La flèche pointe la tumeur de CCA hyperintense qui B devient hypointense C avec des rehaussements annulaires irréguliers dans la phase artérielle D et un rehaussement progressif dans la phase portale E et la phase retardée. On peut d'ailleurs constater la dilatation biliaire à proximité de la tumeur. F Coloration à l'hématoxyline et à l'éosine montrant le tissu tumoral du CCA (flèche pleine) et le parenchyme hépatique normal voisin (flèche en pointillés).

V. Options thérapeutiques disponibles et pronostic du CCA

1. Mécanismes de chimiorésistance

En raison de son diagnostic souvent tardif (environ 70 % des cas), le CCA est une tumeur au pronostic très défavorable. De plus, les options thérapeutiques actuelles pour traiter ce cancer sont très limitées en raison de sa forte chimiorésistance. Les cellules tumorales du CCA ont en effet développé certains mécanismes de chimiorésistance (ou MOCs pour *Mechanisms Of Chemoresistance*), regroupant des protéines aux multiples fonctions ^{50,79}. Ces MOCs constituent ce que l'on appelle le resistome de la cellule tumorale et incluent des protéines régulant le métabolisme des médicaments, intervenant dans la réparation de l'ADN et

contrôlant l'équilibre entre apoptose et prolifération. Sur la base de leurs mécanismes d'action, sept MOCs ont été identifiés (**Figure 20**) :

- **MOC-1** : La régulation des taux intracellulaires des médicaments anticancéreux est médiée par une grande variété de transporteurs membranaires. Dans le CCA, des anomalies d'expression entraînent des dysfonctionnements altérés de ces transporteurs, provoquant une dérégulation des flux entrants et sortants des médicaments. En raison d'une diminution de l'absorption des molécules anticancéreuses (MOC-1a) ou d'une augmentation de leur exportation (MOC-1b), la concentration des drogues dans la cellule tumorale est réduite, ce qui diminue leur efficacité thérapeutique. Par exemple, la sous-expression des transporteurs de nucléosides concentratifs (CNT) et des transporteurs de nucléosides équilibrants (ENT), impliqués dans l'absorption d'analogues de nucléosides comme la gemcitabine et le 5-FU (5-fluorouracile), ou du transporteur de cuivre CTR1 (*Copper Transporter 1*), impliqué dans l'absorption de la cisplatine, réduit la sensibilité des cellules de CCA à ces médicaments ¹⁷⁷. À l'inverse, les pompes de la famille des transporteurs ABC comme MDR1, ainsi que les protéines MRP1 (*Multidrug Resistance-associated Protein 1*) et MRP3, capables d'exporter certaines drogues comme la doxorubicine et le paclitaxel, sont augmentées dans le CCA, ce qui diminue leur concentration intracellulaire et leur efficacité thérapeutique ;
- **MOC-2** : Les protéines de la famille de MOC-2 favorisent la chimiorésistance du CCA en diminuant la métabolisation des médicaments (MOC-2a) et en augmentant leur dégradation (MOC-2b). Par exemple, l'expression de GSTP1 (*Glutathione S-Transferase Pi 1*), qui inactive métaboliquement les dérivés du platine en les conjuguant avec du glutathion, est augmentée dans le CCA, rendant les cellules de CCA résistantes ¹⁷⁸. De même, l'expression de OPRT (*Orotate Phosphoribosyltransferase*), impliquée dans l'activation métabolique du 5-FU, est diminuée dans le CCA ;
- **MOC-3** : La réponse aux agents anticancéreux dépend de l'expression et/ou de la fonction de leurs cibles moléculaires. Plusieurs protéines de la classe MOC-3 sont altérées dans le CCA. Par exemple, la surexpression de la thymidylate synthase est corrélée à l'insensibilité au 5-FU ¹⁷⁹ ;

- **MOC-4** : Plusieurs agents chimiothérapeutiques comme la cisplatine et le 5-FU exercent leurs effets cytotoxiques au niveau de l'ADN en modifiant sa structure. Cependant, les cellules tumorales peuvent réparer ces dommages via différentes voies, la voie de réparation par excision de nucléotides (NER) étant la plus étudiée. Ainsi, la surexpression de ERCC1, une protéine impliquée dans la NER, est observée dans le CCA, contribuant ainsi à la chimiorésistance de ce cancer ;
- **MOC-5** : Les cellules tumorales peuvent développer une chimiorésistance en diminuant l'expression de protéines pro-apoptotiques, comme BAX (*Bcl-2-Associated X*), BAK (*BCL2 Antagonist/Killer 1*) ou FAS (*Fas Cell Surface Death Receptor*) (MOC-5a), et en surexprimant des protéines anti-apoptotiques (MOC-5b) telles que ERK et BCL-2 ;
- **MOC-6** : Le MET peut également jouer un rôle dans la chimiorésistance du CCA. L'hypoxie du stroma tumoral est associée à une efficacité réduite de la chimiothérapie^{64,79}. Certaines protéines de la MEC, comme la laminine, peuvent induire une résistance¹⁸⁰. De même, la cytokine pro-inflammatoire LIF (*Leukemia Inhibitory Factor*), surexprimée dans les CCA, est liée à une résistance à l'apoptose induite par la chimiothérapie¹⁸¹ ;
- **MOC-7** : L'activation de l'EMT joue également un rôle dans la chimiorésistance du CCA⁷⁹. La surexpression de la lipocaline-2 et de HMGA1 (*High Mobility Group AT-Hook 1*) stimule l'EMT et régule négativement certains gènes suppresseurs de tumeurs, entraînant une résistance accrue à la chimiothérapie.

Ainsi, une meilleure compréhension de ces MOCs permettrait le développement de nouveaux médicaments anticancéreux et de stratégies pharmacologiques pouvant améliorer le pronostic du CCA.

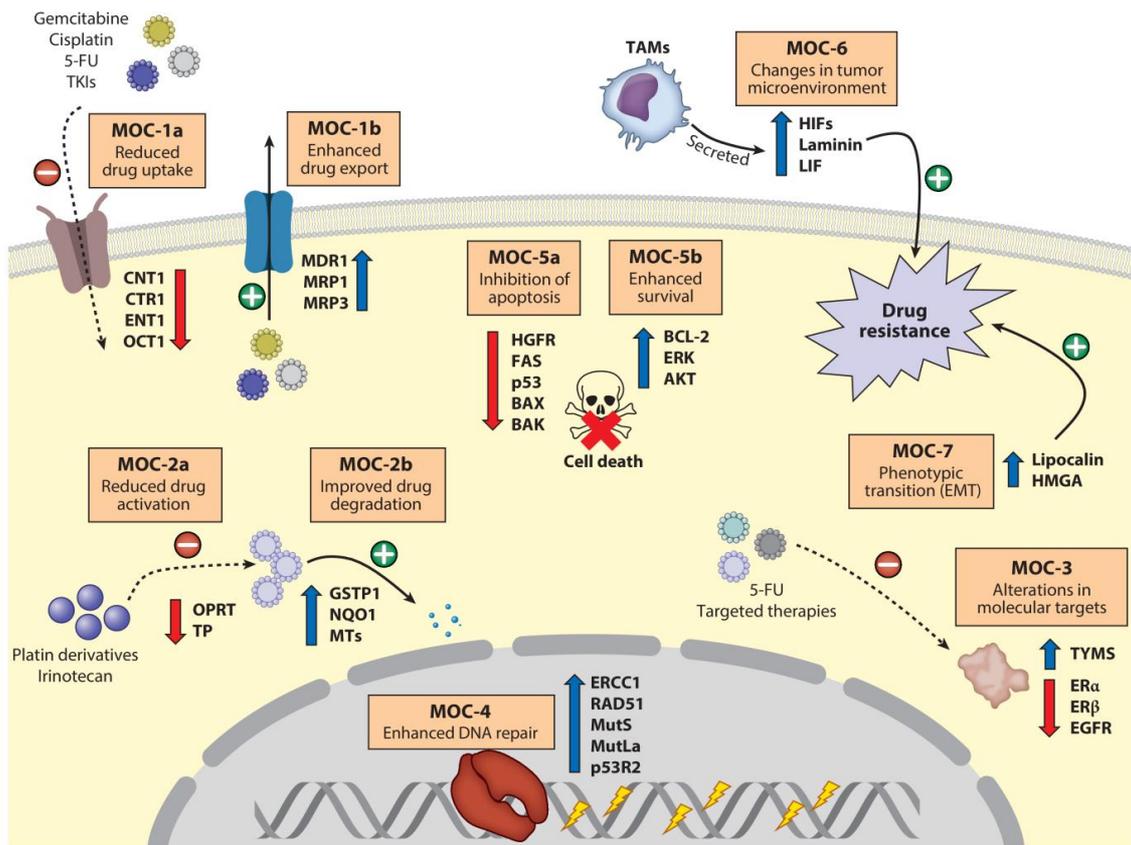


Figure 20 : Mécanismes de chimiorésistance dans le CCA ⁷⁹. Des altérations de l'expression ou de la fonction des transporteurs impliqués dans l'absorption (MOC-1a) ou l'exportation (MOC-1b) des médicaments, une réduction des taux d'enzymes impliquées dans l'activation des médicaments (MOC-2a) et une expression accrue des enzymes de détoxification (MOC-2b) qui modifient la quantité intracellulaire de médicaments actifs, des altérations des cibles moléculaires des agents anticancéreux (MOC-3), une amélioration des mécanismes de réparation de l'ADN induite par les médicaments (MOC-4), une régulation négative des protéines pro-apoptotiques (MOC-5a) et une surexpression des facteurs anti-apoptotiques (MOC-5b) qui pourraient entraîner une inhibition de la mort cellulaire induite par le médicaments, des altérations du MET (MOC-6) et la promotion de l'EMT (MOC-7) pourraient collectivement contribuer à la chimiorésistance du CCA. CNT1, *concentrative nucleoside transporter 1* ; ENT1, *equilibrative nucleoside transporter 1* ; ER, *estrogen receptor* ; HGFR, *hepatocyte growth factor receptor* ; MT, *metallothionein* ; NQO1, *NAD(P)H quinone dehydrogenase 1* ; OCT1, *organic cation transporter 1* ; p53R2, *p53-inducible ribonucleotide reductase small subunit 2-like protein* ; TKI, *tyrosine kinase inhibitor* ; TP, *thymidine phosphorylase* ; TYMS, *thymidylate synthase*.

2. Chirurgie et transplantation hépatique

2.1 Résection tumorale et thérapie adjuvante

En raison de la résistance des cellules de CCA aux traitements chimiothérapeutiques, la résection chirurgicale de la tumeur demeure le seul traitement potentiellement curatif (**Figures 21 et 22**) ^{172,173}. Cependant, du fait d'un diagnostic souvent tardif et de critères

d'inclusion stricts, cette option n'est applicable qu'à une minorité de patients (entre 12 et 40 %) ¹⁷². L'évaluation de la résecabilité de la tumeur, généralement réalisée par TDM, repose sur plusieurs facteurs tels que la présence de métastases ganglionnaires ainsi que la qualité et le volume du futur reliquat hépatique, afin de prévenir l'insuffisance hépatique en phase post-opératoire. Les patients atteints d'un pCCA résecable sont soumis à un drainage biliaire préopératoire pour déterminer avec précision le stade de la tumeur et prévenir l'insuffisance hépatique post-interventionnelle ¹⁷³. Les patients atteints de dCCA subissent généralement des pancréatoduodénectomies, consistant à retirer chirurgicalement la tête du pancréas, une partie du duodénum, la vésicule biliaire et le canal cholédoque.

Cependant, les patients qui subissent un traitement chirurgical présentent un taux élevé de récurrence tumorale, avec une survie à 5 ans comprise entre 22 et 44 % pour l'iCCA, entre 11 et 41 % pour le pCCA, et entre 27 et 37 % pour le dCCA. Pour prévenir les récurrences, le développement de stratégies adjuvantes a été considéré, et trois études cliniques randomisées de phase III basées sur la chimiothérapie ont été entreprises ces dernières années : l'étude BCAT ¹⁸², utilisant la gemcitabine dans le pCCA/dCCA ; l'étude PRODIGE-12 ¹⁸³, administrant à la fois de l'oxaliplatine et de la gemcitabine dans tous les cancers des voies biliaires (NCT01313377) ; et l'étude BILCAP ¹⁸⁴, utilisant la capécitabine pour tous les CCA (NCT00361734). Comparée au groupe de patients en observation seule, l'utilisation de la capécitabine en adjuvant a montré des avantages en termes de survie globale (rapport de risque (HR) de 0,71, survie de 49,6 mois dans le groupe capécitabine contre 36,1 mois dans le groupe témoin) et de survie sans récurrence (HR de 0,75), tandis que les stratégies adjuvantes à base de gemcitabine (études BCAT et PRODIGE-12) n'ont montré aucune amélioration des résultats des patients. Sur la base de l'étude BILCAP, les directives internationales recommandent donc d'administrer la capécitabine comme traitement adjuvant pendant six mois après résection curative du CCA. Un autre essai clinique en cours vise à évaluer l'effet de l'association gemcitabine/cisplatine (GEMCIS) comme adjuvant en post-chirurgical (NCT02170090).

2.2 Transplantation hépatique

La transplantation hépatique (TH) n'est pas une thérapie standardisée pour le traitement du CCA, mais des études rétrospectives sont actuellement menées avec des critères de sélection

stricts pour potentiellement offrir une nouvelle option chirurgicale contre ce cancer (**Figures 21 et 22**). Bien que la TH soit contre-indiquée pour les iCCA avancés en raison des taux élevés de récurrence et de l'invasion microvasculaire typique, le scénario pourrait évoluer pour les iCCA plus précoces. En effet, des études évaluant la TH pour les iCCA précoces survenant dans le cadre d'une cirrhose ont montré des résultats prometteurs. Un taux de survie à 5 ans de 65 % a été signalé pour la première fois chez des patients transplantés présentant de petits iCCA (< 2 cm) et une cirrhose décompensée, et ce résultat a été confirmé par une étude rétrospective internationale plus vaste ^{185,186}. Une autre étude multicentrique rétrospective a également examiné les résultats après TH chez des patients atteints de cirrhose et d'iCCA > 2 cm ¹⁸⁷, et un taux de survie à 5 ans de 69 % a été établi pour des patients présentant une tumeur entre 2 et 5 cm. Les données sur la TH pour iCCA chez les patients atteints de cirrhose sont donc prometteuses, mais nécessitent des essais cliniques prospectifs multicentriques pour être confirmées. Par exemple, l'essai NCT06140134 mené dans le New Jersey est en cours de recrutement afin de déterminer l'efficacité potentielle de la TH chez des patients atteints d'un iCCA non métastatique localement avancé après un traitement systémique néoadjuvant.

La TH est pertinente dans certains cas de pCCA. En particulier, le protocole déployé par la Mayo Clinic permet la TH après un traitement néoadjuvant chez des patients jeunes, sélectionnés et porteurs de tumeurs localisées mais non localement résécables ¹⁸⁸. Ce protocole comprend une chimiosensibilisation au 5-FU, une radiothérapie externe, et enfin la TH, uniquement en l'absence d'envahissement ganglionnaire et avec un diamètre tumoral inférieur à 3 cm. Malheureusement, parmi les patients pour lesquels la TH est indiquée, 24 à 30 % ne subiront finalement pas l'intervention, notamment en raison de la progression tumorale pendant l'attente du greffon. L'approvisionnement en allogreffes hépatiques et l'immunosuppression à vie restent les principales limites de cette stratégie.

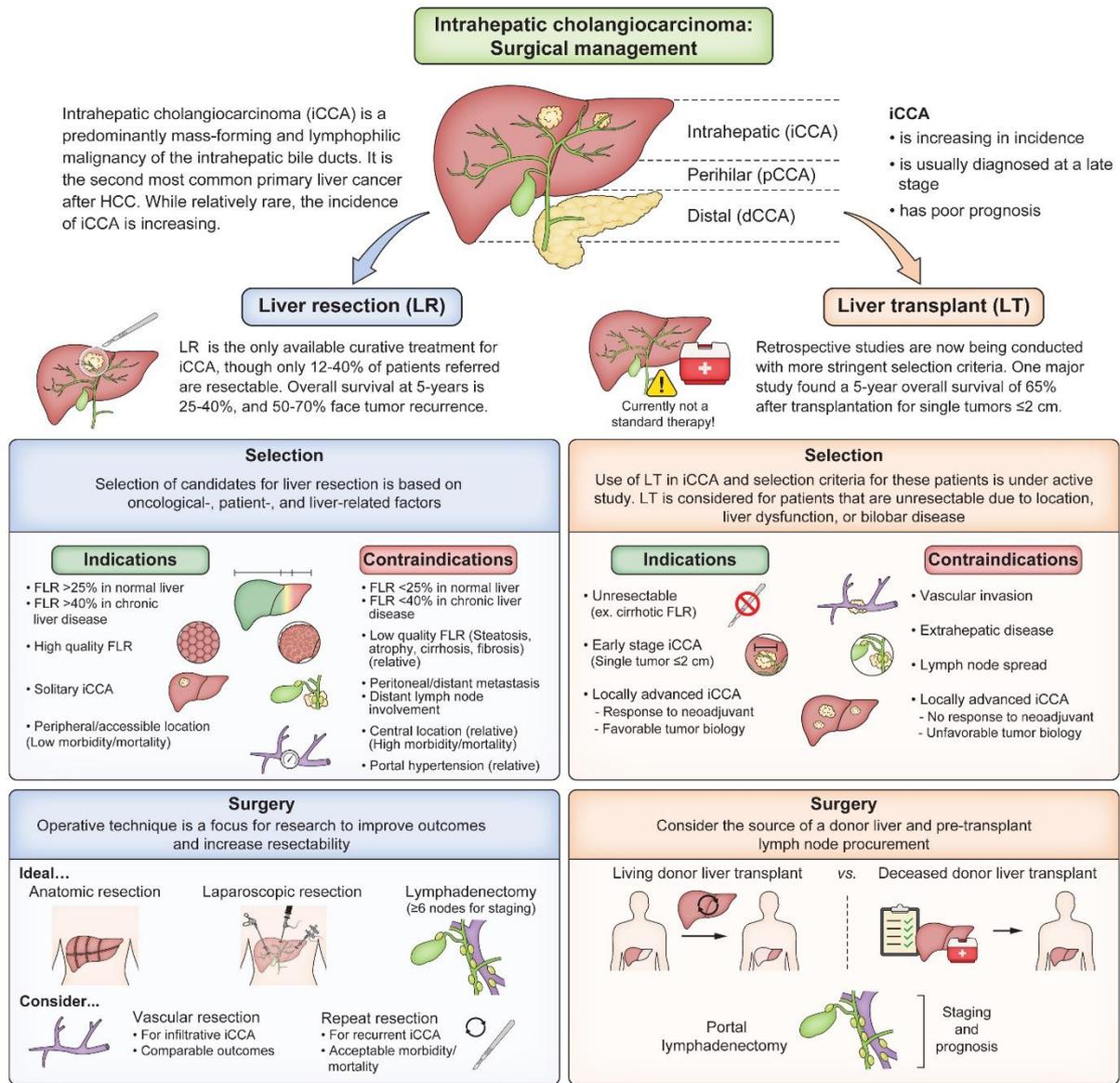


Figure 21 : Prise en charge chirurgicale du CCA ¹⁷². Aujourd'hui la résection chirurgicale de la tumeur de CCA est la seule option thérapeutique curative. Malheureusement, celle-ci n'est applicable que chez une minorité de patients et les critères de sélection sont stricts. La TH n'est pas une thérapie standardisée dans la prise en charge du CCA, mais des études rétrospectives sont en cours et montrent des résultats prometteurs. DDLT, *deceased donor liver transplant* ; FLR, *future liver remnant* ; LDLT, *living donor liver transplant* ; LR, *liver resection* ; LT, *liver transplant* ; R0 resection, *microscopically margin-negative resection*.

Lorsque la résection tumorale n'est pas possible, des traitements palliatifs doivent être mis en place pour endiguer la progression du CCA. Le choix de la stratégie thérapeutique à adopter dépend de la taille de la tumeur et de l'ampleur de son envahissement.

3. Thérapies locorégionales

Dans le cas de tumeurs de CCA non résécables avec un envahissement limité au foie, des thérapies locorégionales peuvent être envisagées pour améliorer le pronostic des patients (**Figure 22**). Ces thérapies comprennent diverses méthodes ablatives, telles que la radiofréquence, les micro-ondes, l'électroporation irréversible, la cryoablation, et, par extension, la radiothérapie stéréotaxique. Elles incluent également des techniques intra-artérielles comme l'embolisation, la chimioembolisation, la radioembolisation ou radiothérapie interne sélective (SIRT), et la chimiothérapie intra-artérielle. Ces options peuvent être employées en première ou en deuxième intention lorsque la chimiothérapie systémique ne parvient pas à stopper la progression tumorale ^{172,173}.

La chimioembolisation transartérielle (ou TACE, pour *Transarterial Chemoembolization*) est une méthode visant à bloquer la circulation sanguine dans l'artère hépatique tout en libérant des agents chimiothérapeutiques pour traiter la tumeur ¹⁸⁹. En parallèle, la radioembolisation transartérielle (ou TARE, pour *Transarterial Radioembolization*) est une forme de radiothérapie interne qui consiste à interrompre l'apport sanguin à une tumeur tout en administrant des microsphères chargées d'isotopes, généralement l'yttrium-90, pour délivrer une dose de radiation directement à la tumeur ¹⁹⁰. Des études rétrospectives ont montré une amélioration de la survie chez des patients atteints d'iCCA non résécable après une TACE associée à de la cisplatine ¹⁹¹. De même, une étude publiée fin 2023 a révélé des taux de survie prometteurs après une TARE combinée à de la cisplatine, de la gemcitabine et de la capécitabine ¹⁹². Une autre étude clinique, actuellement en phase III, vise à démontrer l'efficacité thérapeutique de la TARE associée à la combinaison GEMCIS ¹⁹³. Ces thérapies transartérielles peuvent également être envisagées chez des patients présentant un CCA < 2 cm émanant d'une cirrhose, comme alternative à la TH. De plus, le traitement locorégional du CCA peut être réalisé par radiothérapie externe ¹⁹⁴.

Néanmoins, les preuves concernant l'efficacité et les bénéfices oncologiques des thérapies locorégionales restent modestes, et d'autres études sont nécessaires pour démontrer leur potentiel thérapeutique ¹⁹⁵. Par exemple, l'étude PM-CARE menée en Italie (NCT06375915) vise à évaluer l'efficacité thérapeutique de la TARE combinée à des chimiothérapies (GEMCIS)

et à l'immunothérapie (durvalumab, un anti PD-L1) chez des patients atteints de CCA non résecables.

4. Thérapies systémiques

Des thérapies systémiques doivent être instaurées pour les patients atteints de CCA non résecables avec des atteintes systémiques (**Figure 22**). Actuellement, le traitement systémique standard de première intention repose sur l'association de la cisplatine et de la gemcitabine (GEMCIS). Cette combinaison est devenue le traitement chimiothérapeutique de référence pour le CCA suite aux résultats de l'essai clinique de phase III ABC-02 publiés en 2010 ¹⁹⁶. Cet essai avait montré une amélioration de la survie globale, passant de 8,1 mois à 11,7 mois, grâce à la combinaison des deux médicaments par rapport à la gemcitabine seule. Des études ont montré que l'ajout d'autres molécules cytotoxiques ou d'inhibiteurs de VEGF ou d'EGFR au GEMCIS n'apportait aucun bénéfice supplémentaire ^{197,198}.

Récemment, deux essais cliniques internationaux contrôlés randomisés de phase III ont montré un bénéfice de l'ajout de l'immunothérapie au GEMCIS : TOPAZ-1 avec le durvalumab ¹⁹⁹ et Keynote-966 ²⁰⁰ avec le pembrolizumab. L'ajout d'un anti PD-L1 dans l'essai TOPAZ-1 a amélioré de manière significative la survie globale (12,8 mois contre 11,5 mois) par rapport au placebo plus GEMCIS chez les patients atteints d'un CCA avancé. De même, les patients soumis au pembrolizumab (un anti PD-1) ont montré une survie globale significativement augmentée (12,7 mois contre 10,9 mois) par rapport au groupe placebo plus GEMCIS dans l'essai Keynote-966. Ces résultats ont ainsi permis l'ajout du durvalumab dans le traitement systémique de première intention contre les CCA avancés non résecables, en complément de la combinaison GEMCIS (**Figure 22**).

Il existe également un traitement de seconde ligne pour le CCA lorsque la progression n'est pas contrôlée par les traitements de première ligne. L'essai clinique de phase III ABC-06 a démontré que la chimiothérapie FOLFOX (oxaliplatine/5-fluorouracile) améliorait significativement la survie globale des patients ayant reçu le traitement de première intention GEMCIS par rapport à ceux ayant reçu les meilleurs soins de support ²⁰¹. Cette étude a établi le protocole FOLFOX comme traitement de deuxième intention contre le CCA. Cependant, le bénéfice est modeste (moins d'un mois de survie globale médiane), et d'autres essais cliniques

sont nécessaires pour déterminer un traitement de seconde ligne plus efficace contre le CCA (**Figure 22**).

5. Thérapies ciblées

Avec les avancées technologiques fournies par les techniques de séquençage, des thérapies ciblées ont pu être développées pour attaquer des cibles moléculaires spécifiques en fonction des altérations génétiques propres à chaque patient (**Figure 22**). Actuellement, cinq thérapies ciblées sont approuvées pour le traitement de certaines mutations classiques du CCA ^{173,202} : le pemigatinib, le futibatinib (autorisation de mise sur le marché en France en Août 2024) et l'infigratinib ciblant FGFR2, l'ivosidenib ⁶⁰ ciblant IDH1 et le dabrafenib/trametinib ciblant BRAF V600E. L'utilisation de l'ivosidenib, un inhibiteur de IDH1 muté, repose sur un essai randomisé de phase III (CLarIDHy) ^{59,60} qui a montré un bénéfice clinique avec une survie globale de 10,3 mois pour les patients traités par cet inhibiteur contre 7,5 mois pour les patients sous placebo. Plusieurs essais de phase II sur les inhibiteurs de FGFR ont montré des résultats prometteurs, avec des taux de réponse et de contrôle de la maladie élevés chez les patients atteints de CCA avec des fusions ou des réarrangements de FGFR2 ayant suivi la chimiothérapie de première intention ^{203,204}. D'autres études cliniques de phase II suggèrent un intérêt pour les traitements ciblant BRAF, KRAS ou encore HER2 dans le CCA avancé ²⁰⁵⁻²⁰⁷. Pour les CCA présentant une instabilité des microsatellites, le blocage du point de contrôle immunitaire peut être envisagé ²⁰⁸.

Certaines études en cours cherchent également à élargir la palette d'immunothérapies disponibles pour le traitement du CCA. Par exemple, l'utilisation de cellules CAR-T (*Chimeric Antigen Receptor T cell*), qui sont des lymphocytes modifiés génétiquement pour cibler spécifiquement les cellules cancéreuses, est une approche émergente contre certaines tumeurs solides ²⁰⁹. L'essai NCT06043466, actuellement mené en Chine, vise à démontrer l'efficacité thérapeutique de ces cellules modifiées dans le traitement de tumeurs solides positives au marqueur sérique ACE, incluant le CCA.

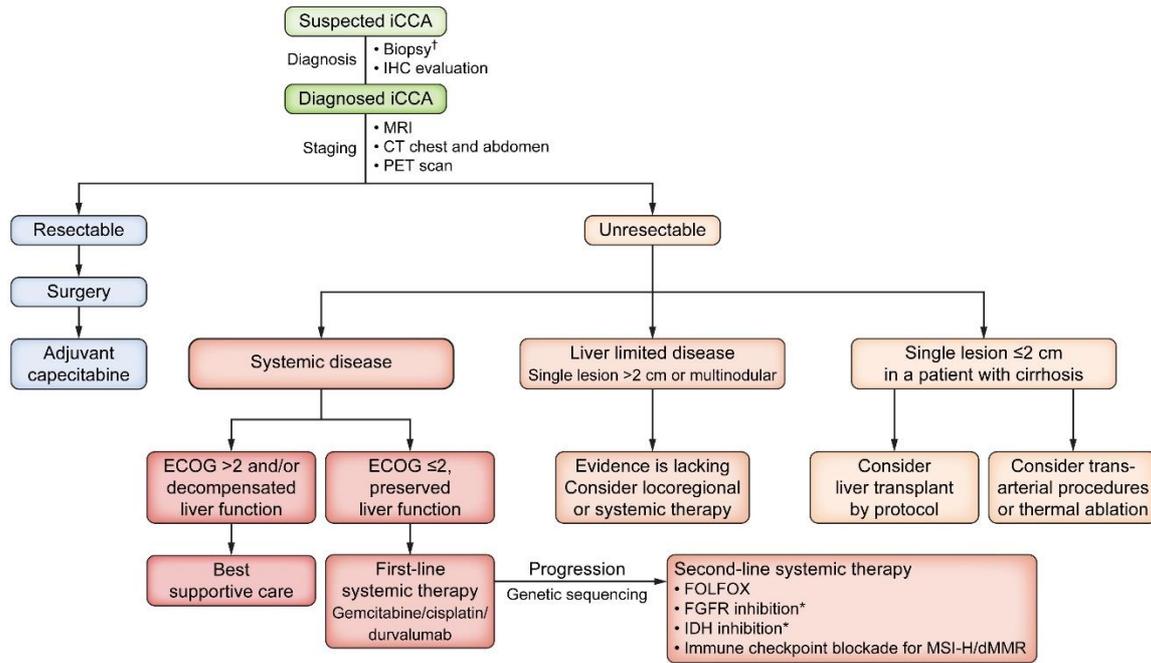


Figure 22 : Diagnostic et options thérapeutiques du CCA ¹⁷². Lorsque la résection de la tumeur n'est pas possible, le traitement dépend du degré d'envahissement du cancer. Dans le cas de tumeurs locales, des traitements locorégionaux doivent être mis en place, tandis que dans le cas d'atteintes systémiques, des traitements de première ligne (GEMCIS + durvalumab) et de seconde ligne (FOLFOX) doivent être considérés. Des thérapies ciblées peuvent également être prescrites. ECOG (*Eastern Cooperative Oncology Group*) est une échelle de statut de performance de 0 à 4 indiquant l'état de santé général du patient (plus il est haut, plus l'état de santé général du patient est mauvais.) †La biopsie pourrait être évitée en cas de suspicion d'iCCA résectable, car une confirmation histologique définitive peut être obtenue à partir des échantillons chirurgicaux. *Pour les patients porteurs de ces mutations ciblables.

Ainsi, le CCA, cancer des voies biliaires, présente de fortes hétérogénéités anatomiques et moléculaires et est caractérisé par un stroma desmoplasique dense peuplé d'une diversité de types cellulaires assurant des fonctions spécifiques. Ce cancer émerge dans un contexte inflammatoire propice aux altérations génétiques et aux dérégulations de voies de signalisation, conditions essentielles pour la cholangiocarcinogénèse. La progression du CCA repose également sur le soutien des populations stromales composant la tumeur. Cependant, en raison de sa nature silencieuse, le diagnostic de ce cancer est très souvent tardif, limitant considérablement les options thérapeutiques disponibles. En raison du pronostic sombre du CCA, de nouvelles thérapies ciblant à la fois la cellule tumorale et le noyau stromal de la tumeur doivent être développées.

Chapitre 3

Le plasma froid atmosphérique : un outil physique prometteur en cancérologie

Le dernier rapport de l'Organisation mondiale de la santé sur l'incidence mondiale du cancer en 2022 présente des chiffres préoccupants ²¹⁰. On estime que 20 millions de nouveaux cas de cancer ont été diagnostiqués cette année-là, avec 9,7 millions de décès attribués à la maladie. Ces données montrent que le cancer demeure une cause majeure de morbidité et de mortalité dans le monde. Les statistiques révèlent qu'environ une personne sur cinq développera un cancer au cours de sa vie. En ce qui concerne la mortalité, un homme sur neuf et une femme sur douze mourront de cette maladie. Ces proportions mettent en évidence l'importance cruciale de la prévention, du dépistage précoce et des avancées thérapeutiques pour combattre cette maladie dévastatrice.

Aujourd'hui, les instituts de santé visent à élaborer de nouvelles stratégies thérapeutiques pour freiner la progression du cancer. Une large part de la communauté scientifique se concentre actuellement sur le développement de thérapies basées sur des principes biologiques, parmi lesquelles les immunothérapies et les thérapies ciblées occupent une place prépondérante. Certains chercheurs ont alors envisagé que l'intégration de thérapies fondées sur des processus physiques pourrait élargir l'arsenal thérapeutique disponible pour le traitement du cancer. Par exemple, la radiothérapie, reconnue comme un traitement locorégional de référence, utilise des rayons X pour cibler les cellules tumorales, et la nanohyperthermie, en plein essor, repose sur l'activation de nanoparticules par des rayonnements infrarouges.

Au cours des quinze dernières années, les chercheurs ont aussi manifesté un intérêt croissant pour l'utilisation du plasma froid atmosphérique (ou CAP, pour *Cold Atmospheric Plasma*) (**Figure 23**), qui présente un fort potentiel thérapeutique en oncologie. Celui-ci possède de

nombreuses caractéristiques physicochimiques applicables à la biologie et fait l'objet de recherches intensives dans de nombreux domaines biomédicaux.

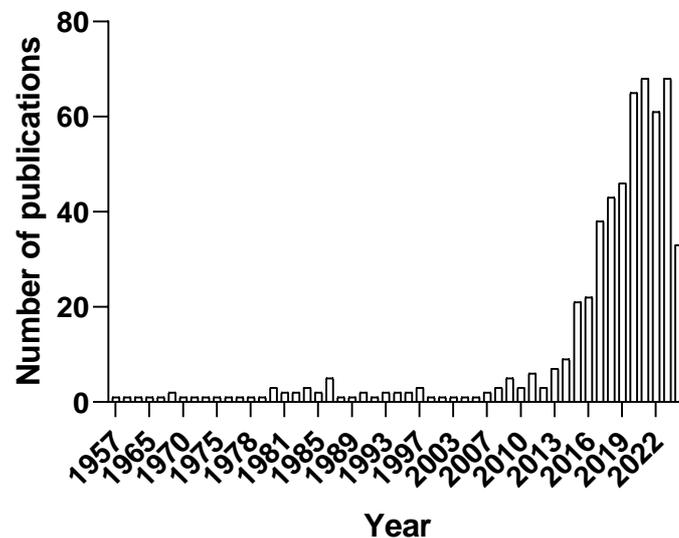


Figure 23 : Évolution annuelle du nombre de publications portant sur l'utilisation du CAP en oncologie. Afin de générer le graphique, les termes « cold atmospheric plasma » et « cancer » ont été utilisés sur Pubmed.

I. Généralités et applications du plasma froid atmosphérique

1. Qu'est-ce qu'un plasma ?

Un état de la matière se caractérise par une organisation plus ou moins structurée de particules (atomes, molécules, ions, électrons) (**Figure 24**). Il est possible de passer de l'un à l'autre sous l'effet d'un apport d'énergie (thermique, électrique...) au cours d'une transformation physique nommée changement d'état. On distingue ainsi :

- L'état solide, composé de particules fixes fermement reliées les unes aux autres par des liaisons chimiques, lui conférant un volume et une forme propres ;
- L'état liquide, un état incompressible de volume propre composé de particules faiblement liées les unes aux autres et capables de se déplacer spontanément mais de manière dépendante ;
- L'état gazeux, composé de particules très faiblement liées les unes aux autres et se déplaçant de manière quasi indépendante. Cet état a tendance à occuper tout le

volume disponible et ne possède ni forme ni volume propre, contrairement aux états solide et liquide ;

- L'état plasma, constitué d'électrons, d'ions, d'espèces atomiques ou moléculaires neutres, et de photons. Cet état est généré par l'apport d'énergie à un gaz, arrachant des électrons aux atomes. Défini comme le quatrième état de la matière, le plasma est généré à partir de l'ionisation d'un gaz. Le terme « plasma » a été proposé pour la première fois en 1928 par le physicien américain Irving Langmuir en raison de sa ressemblance visuelle avec le plasma sanguin ²¹¹.

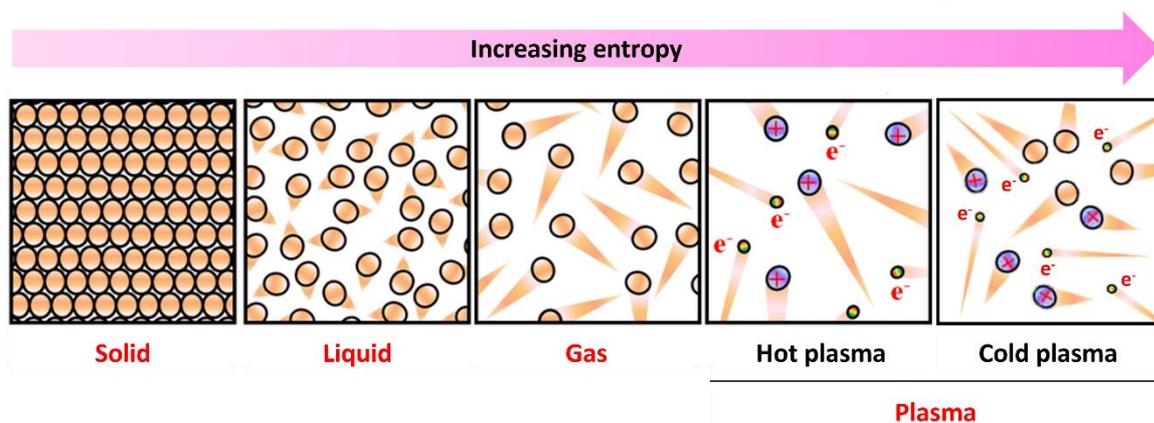


Figure 24 : Les différents états de la matière et la description physique des plasmas ²¹² (modifié). Illustration schématique des quatre états fondamentaux de la matière : solide, liquide, gazeux et plasma. Il existe deux types de plasma : le plasma thermique et le plasma froid. Les queues triangulaires représentent la force du mouvement thermique des particules. Les boules brunes, violettes et irisées représentent respectivement les atomes neutres, les ions chargés positivement et les électrons.

Il existe dans notre univers une grande diversité de plasmas (**Figure 25**), naturels ou artificiels, qui peuvent être classés selon leur densité électronique et la température de leurs espèces (ions, neutres, électrons) ²¹³. La densité électronique d'un plasma peut varier de 10^{-5} cm^{-3} pour les plasmas interstellaires à 10^{30} cm^{-3} pour les plasmas au cœur des étoiles. De même, leur température électronique peut varier de 10^2 à 10^9 Kelvin. Les plasmas artificiels sont le plus souvent générés en chauffant un gaz neutre ou en le soumettant à un champ électromagnétique.

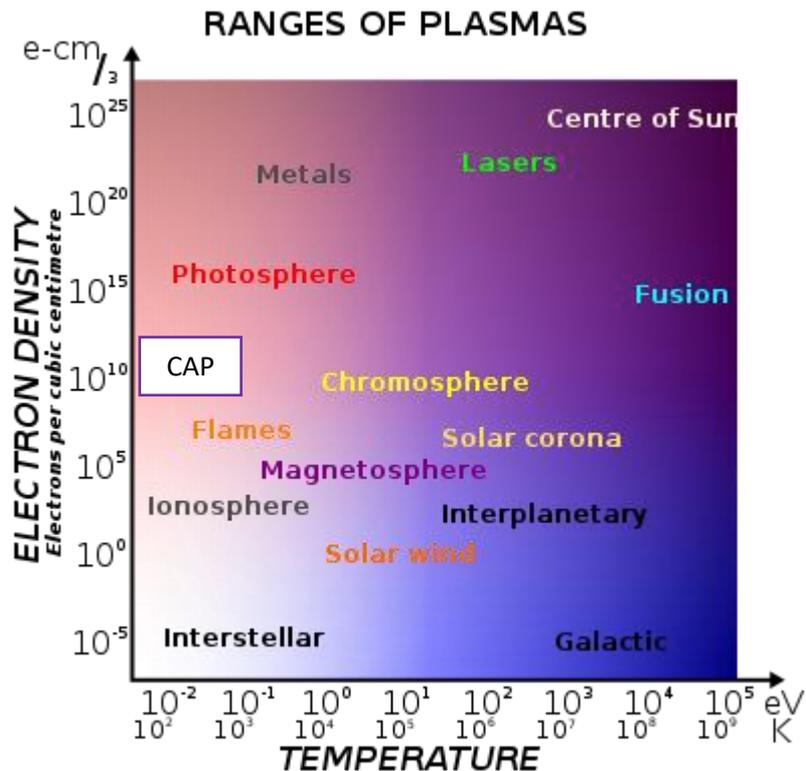


Figure 25 : Les différents plasmas existant dans l'univers ²¹³. Il existe dans l'univers une diversité de plasmas qui peuvent être classés en fonction de leur densité électronique et de leur température. Pour ce doctorat, le plasma qui a été étudié possède une densité électronique comprise entre 10^{10} et 10^{15} cm^{-3} et une température avoisinant quelques centaines de Kelvin (soit une trentaine de degrés Celsius).

Ainsi, selon les domaines de densités et de températures considérés, les plasmas peuvent être classés en deux grandes catégories :

- Les plasmas chauds ou thermiques ($\sim 10^8$ K) (**Figure 24**) : Fortement ionisés, ces plasmas présentent des densités et des températures électroniques élevées. Ils sont principalement utilisés à des fins industrielles (découpe de matériaux durs notamment). Confinés dans des structures spécifiques appelées tokamaks, ils peuvent reproduire la fusion thermonucléaire et générer de grandes quantités d'énergie sans produire de déchets radioactifs. Cependant, malgré leur faible impact écologique, les plasmas chauds nécessitent une grande quantité d'énergie pour leur création, et les installations capables de les produire sont moins nombreuses et moins accessibles ;
- Les plasmas froids ou non thermiques (**Figure 24**) : Ce sont des plasmas faiblement ionisés, créés au sein de réacteurs remplis initialement de gaz neutres et alimentés par une source extérieure d'énergie électromagnétique ²¹⁴. La nature du gaz utilisé pour

former un plasma froid dépend de l'application visée ; les plus couramment employés sont l'argon, le xénon, le dioxygène et l'hélium. Ces plasmas artificiels sont caractérisés par une densité et une température électronique faibles, ce qui les rend applicables dans de nombreux domaines. Par exemple, ils sont utilisés dans la fabrication de téléviseurs, de tubes fluorescents et de composants électroniques.

Il existe donc une différence thermique notable entre les plasmas chauds et les plasmas froids. Dans les plasmas froids, la température des électrons est nettement supérieure à celle des ions ou des espèces neutres, ce qui permet à ce type de plasma de combiner une réactivité chimique élevée, due aux électrons énergétiques, avec une température relativement basse²¹⁴. À l'inverse, dans les plasmas chauds, les électrons et les ions sont à la même température (équilibre thermique). Les plasmas astrophysiques ou spatiaux, représentant plus de 99 % de la matière connue dans l'univers, existent sur des gammes de température et de densité électronique extrêmement larges (**Figure 25**). Principalement présents dans les étoiles, le milieu interstellaire, les aurores boréales et les éclairs, ces plasmas naturels peuvent ainsi être froids ou chauds.

Le plasma froid atmosphérique (CAP) est ainsi un plasma froid produit à pression atmosphérique (**Figure 26**). Il peut être généré avec de faibles quantités d'énergie et possède des propriétés physicochimiques particulières le rendant applicable dans le domaine biomédical. Le CAP utilisé lors de ce doctorat présente des caractéristiques détaillées dans la **Figure 25**.



Figure 26 : Le plasma froid atmosphérique ²¹⁵. Le CAP ressemble à un faisceau de lumière généré à partir de l'ionisation partielle d'un gaz à basse température, ce qui le rend applicable dans de nombreux domaines biomédicaux.

2. Propriétés physicochimiques et applications du CAP

Le CAP présente de nombreuses propriétés physicochimiques susceptibles d'avoir des effets significatifs sur une cible biologique (**Figure 28**). Bien qu'il existe une diversité de sources plasma utilisées dans le domaine biomédical (**voir la partie II.1.1 de ce chapitre**), un consensus scientifique s'est établi concernant les différents mécanismes intervenant lors du traitement d'une cible par du CAP. Comme le CAP est généré à partir d'un champ électrique, il est possible de moduler ses propriétés en ajustant divers paramètres électriques tels que la tension ou la fréquence.

2.1 Production d'espèces réactives de l'oxygène et de l'azote

La caractéristique la plus documentée du CAP, et celle qui semble la plus pertinente dans le domaine biomédical, est sa capacité à produire des espèces réactives de l'oxygène et de l'azote (ou RONS, pour *Reactive Oxygen and Nitrogen Species*) ^{216,217}. En effet, le plasma contient des espèces chargées qui peuvent interagir avec la matière environnante. Dans le cas du CAP, le premier milieu rencontré est l'air atmosphérique, composé majoritairement de

diazote N₂ (78 %) et de dioxygène O₂ (21 %). En réagissant avec ces molécules, les espèces chargées du CAP génèrent des RONS en phase gazeuse, qui peuvent interagir avec une surface solide ou liquide. Ceux-ci incluent des espèces à courte durée de vie (de quelques nanosecondes à quelques heures) telles que HO•, NO• ou ¹O₂, qui réagissent alors avec la cible biologique ou matérielle plus dense. Des réactions secondaires surviennent en fonction de la composition chimique de la cible, permettant la conversion des espèces à courte durée de vie en espèces plus stables, telles que H₂O₂ et les nitrates/nitrites, dont la durée de vie peut atteindre plusieurs jours (**Figure 27**). Bien que ces espèces plus stables aient une plus grande probabilité d'interagir avec les cibles de traitement, les réactions biochimiques impliquant des espèces à courte durée de vie générées par le CAP ne peuvent être négligées. De même, la quantité d'espèces générée dépend de la fréquence et du temps d'exposition du CAP, de la distance de la cible traitée, et de la composition et du niveau d'humidité de l'air ambiant au moment du traitement. Il est également possible que les espèces produites par le CAP interagissent entre elles une fois en phase aqueuse.

Il est établi depuis longtemps que les RONS sont des agents responsables d'un stress oxydatif, qui correspond à un déséquilibre entre la production de radicaux libres et la quantité d'antioxydants disponibles et utilisables par un élément biologique. Ce stress oxydatif peut moduler l'environnement des cellules et affecter leur comportement ^{219,220}. En effet, il peut provoquer une érosion de la paroi cellulaire, une rupture de la membrane (dénaturation des protéines entre autres), des changements de fonctionnalité (oxydation des acides aminés), des dommages à l'ADN et à l'ARN, ainsi que la mort cellulaire, si la quantité de RONS internalisée par la cellule est trop importante ²²¹.

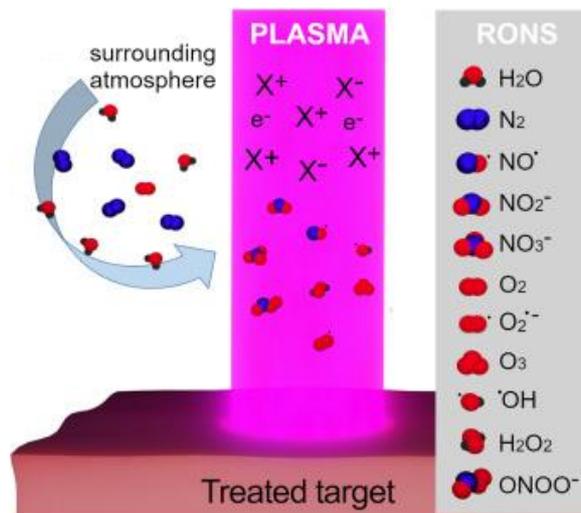


Figure 27 : Production de RONS par le CAP ²¹⁸. Le gaz ionisé formant un plasma, avec ses ions (X^+ , X^-) et ses électrons (e^-), génère un mélange d'espèces réactives de l'oxygène et de l'azote à partir des gaz atmosphériques et de la vapeur d'eau. Ces espèces peuvent ensuite interagir avec la cible du traitement plasma, au niveau de laquelle des réactions secondaires permettent la formation de nouvelles espèces réactives.

2.2 Autres agents du CAP influant sur la cellule

Bien que les RONS aient été identifiés comme jouant un rôle majeur dans le déclenchement des effets des traitements CAP, de nombreuses autres caractéristiques de la décharge plasmatique ne doivent pas être négligées en raison de leur potentiel biomédical. En effet, le CAP est également capable de générer un champ électrique localement important au niveau d'un support biologique, dû au mouvement des espèces chargées.

De faibles quantités d'UV (190-280 nm) sont également produites, ainsi que d'autres rayonnements visibles, dont la longueur d'onde dépend du gaz utilisé pour générer le plasma ^{216,217}.

Il a été supposé que ces propriétés pourraient être impliqués dans la formation de pores dans les membranes cellulaires, ainsi que dans l'induction de dommages à l'ADN et de la mort cellulaire. En effet, l'oxydation des lipides issue des RONS générés par le plasma entraîne une baisse du seuil de champ électrique nécessaire à l'électroporation des cellules. Les pores créés dans la membrane plasmique facilitent la pénétration des espèces plasmatiques réactives à l'intérieur de la cellule, provoquant à terme des dommages oxydatifs ^{221,222}.

2.3 Applications du CAP

Le CAP est aujourd'hui utilisé dans de nombreux domaines, allant de l'agriculture à la médecine (**Figure 28**). Pour des temps d'exposition longs et/ou des intensités élevées, le CAP peut présenter des propriétés oxydantes qui deviennent alors nocives, ouvrant la voie à des applications annexes telles que la stérilisation et la désinfection ^{223,224}. Les espèces réactives générées par le CAP sont capables d'inactiver certains agents pathogènes tels qu'*Escherichia coli*, *Salmonella*, *Aspergillus* et certains virus, ce qui est particulièrement recherché dans l'industrie agroalimentaire ^{223,224}. En effet, le CAP permet de décontaminer les denrées alimentaires potentiellement contaminées ainsi que les semences susceptibles d'être affectées par des déjections animales. Cette capacité antimicrobienne à large spectre (bactéries, bacilles, champignons, virus) du CAP est également utilisée pour décontaminer des surfaces et stériliser le matériel médical.

En agriculture, l'utilisation du CAP a également fait ses preuves. Certaines études ont montré que le CAP pouvait améliorer la germination des semences. Les graines traitées au plasma froid possèdent effectivement un système antioxydant plus performant, absorbent plus d'eau et présentent des taux élevés de polyphénols et de sucre, ce qui facilite leur germination ²²⁵.

En médecine, le CAP est utilisé en dentisterie, notamment pour la désinfection et le traitement des maladies des gencives, telles que la parodontite ²²⁶. Il présente un avenir prometteur dans le blanchiment des dents, l'élimination de la plaque dentaire et l'activation de surface des implants dentaires ²²⁶. En dermatologie, il favorise également la cicatrisation des plaies en créant un environnement cytotoxique autour de la peau pour éliminer les agents pathogènes environnants et en stimulant le processus de régénération des tissus via la synthèse des facteurs de croissance tissulaire. Il a notamment été utilisé avec succès pour traiter des plaies chroniques, des ulcères diabétiques et des plaies infectées, montrant des résultats positifs tant en accélérant la cicatrisation qu'en réduisant les taux d'infection ²²⁷. Le CAP joue également un rôle dans la coagulation sanguine : il favorise la formation de caillots sanguins en stimulant à la fois les facteurs d'agrégation plaquettaire et de coagulation ²²⁸.

Ainsi, la majeure partie des applications du CAP repose sur sa capacité à générer des espèces réactives de l'oxygène et de l'azote. Cependant, il est crucial de noter que ces espèces jouent

également un rôle important dans les fonctions cellulaires normales et la signalisation ²¹⁹. De plus, les RONS peuvent contribuer aux processus de guérison en augmentant la prolifération cellulaire ou en induisant la mort des cellules endommagées. Le CAP peut donc présenter un effet hormétique et devenir toxique au-delà d'un certain seuil de traitement, ce qui soulève des questions quant à la « dose » de plasma à utiliser, un sujet actuellement débattu à l'échelle internationale. En effet, le concept de « dose plasma » est encore mal défini, et il n'existe pas de consensus à ce sujet : certains chercheurs fixent les paramètres électriques (tension, fréquence, rapport cyclique) afin de raisonner sur des temps de traitement, tandis que d'autres modulent les paramètres électriques du plasma pour raisonner en puissance déposée (en mJ) sur la cible. Malgré ces variations, les chercheurs de la communauté plasma observent des effets similaires, en particulier en oncologie, où le CAP montre un potentiel prometteur ²²⁹.

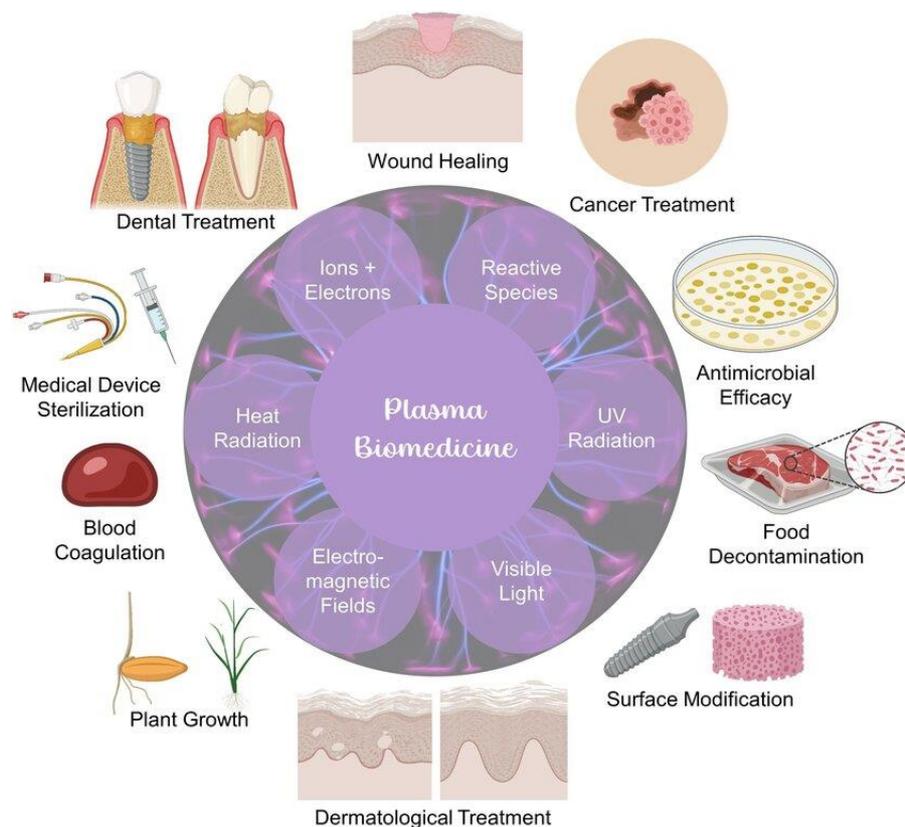


Figure 28 : Propriétés physico-chimiques et applications du CAP ²²⁹. Le CAP présente de nombreuses propriétés physicochimiques (formation de RONS, champ électrique, rayonnement ultraviolet (UV)) qui lui permettent d'être applicable dans de nombreux domaines, allant de l'agriculture à la médecine.

II. Des effets multimodaux prometteurs en cancérologie

1. Différents dispositifs et méthodes de traitement

1.1 Une diversité de dispositifs médicaux

En « plasma médecine », différentes méthodes et équipements de production de CAP ont été développés en fonction des conditions biomédicales spécifiques^{230,231}. En effet, divers types de gaz tels que l'argon, l'hélium, l'azote le dioxygène et même l'air, peuvent être utilisés pour générer du CAP^{231,232}, et deux approches principales ont été développées pour produire du plasma froid sous pression atmosphérique : les décharges à barrière diélectrique (ou DBD, pour *Dielectric Barrier Discharge*) et les dispositifs à jets de plasma (ou APPJ pour *Atmospheric Pressure Plasma Jet*) (**Figure 29.A**). Ces deux configurations plasmatiques reposent sur des principes physiques, des composants et des matériaux similaires, mais possèdent des configurations électroniques distinctes. La DBD est générée en appliquant un courant électrique continu ou alternatif à haute tension (de l'ordre du kV) et à haute fréquence (de l'ordre du kHz) à travers un espace réglable (de quelques dizaines de microns à plusieurs centimètres) entre deux électrodes séparées par une barrière diélectrique isolante. La géométrie des DBD se compose généralement de deux plaques parallèles, disposées de manière plane ou cylindrique, et elles utilisent un matériau diélectrique (quartz, verre, céramique) pour recouvrir au moins une des électrodes afin d'empêcher le passage au régime d'arc électrique. Les APPJ produisent un flux d'espèces chimiques hautement réactives et se composent généralement de deux électrodes cylindriques, avec une électrode interne reliée à une haute tension pour ioniser le gaz de travail. Le gaz est ensuite expulsé par une buse, créant ainsi un « jet » de plasma qui présente typiquement un diamètre de quelques millimètres et une longueur de quelques millimètres à plusieurs centimètres. Les gaz nobles sont fréquemment utilisés pour les APPJ car leur excitation électrique permet de générer des espèces métastables de grande énergie (e.g. une vingtaine d'eV pour l'hélium), pouvant se propager au-delà de l'espace interélectrode. Par ailleurs, l'utilisation des gaz nobles permet de faire fonctionner la décharge à des tensions plus faibles tout en maintenant une température basse.

De nombreux laboratoires ont développé leur propre dispositif à CAP, d'une part pour répondre aux spécificités de la cible biologique ou de la pathologie sur laquelle ils travaillent, et d'autre part en raison de la facilité et du faible coût d'ingénierie que représente la fabrication de tels dispositifs. La diversité de ces sources plasma se fait néanmoins au détriment d'une comparaison objective et sans biais des résultats expérimentaux obtenus par les différents groupes de recherche, car les conditions de traitement sont souvent uniques à chaque laboratoire et difficilement reproductibles. Pour pallier ce problème, ces dernières années ont vu l'émergence de sources plasma standardisées, brevetées et certifiées. Ainsi, dans l'Union européenne, des dispositifs tels que le DBD PlasmaDerm[®] VU-2010 (CINOXY Technologies GmbH), le kINPen[®] MED (INP Greifswald/neoplas tools GmbH), le Steriplas[®] R (Adtec Ltd., Londres, Royaume-Uni), et le dispositif piézoélectrique Piezobrush[®] PZ3 (relyon plasma GmbH) ont été certifiés Conformité Européenne (CE) pour standardiser les sources de plasma disponibles ²³². Ces sources ont principalement été conçues pour un usage en dermatologie et pour la stérilisation de surface. Parmi elles, le dispositif kINPen[®] est le plus largement utilisé en oncologie (**Figure 29.B**), et la portabilité du Piezobrush[®] PZ3 le rend attrayant, incitant de nombreux groupes de recherche à s'y intéresser (**Figure 29.C**). Cependant, chaque fois qu'une nouvelle source plasma est développée, les scientifiques doivent impérativement caractériser ses propriétés physiques et chimiques. Ces sources doivent respecter un ensemble de normes techniques (température, puissance thermique, émission de rayonnement, intensité de rayonnement ultraviolet, émission de gaz et flux de courant), et leurs effets biologiques doivent être évalués pour garantir leur utilisation en biomédecine, notamment en testant leurs effets sur les micro-organismes *in vitro* ²³³. Néanmoins, les normes actuellement imposées sont encore limitées, et d'autres caractéristiques des équipements plasma médicaux devraient être prises en compte, telles que la détection des espèces réactives et l'établissement de normes d'évaluation biologique plus approfondies. Ainsi, pour qu'une source plasma soit pleinement applicable en oncologie, il est essentiel d'évaluer la composition des RONS ainsi que l'effet du pH par des méthodes de détection chimique. De plus, il est essentiel de vérifier la sécurité thermique et électrique de chaque source plasma, afin d'éviter tout risque de brûlure ou d'électrisation.

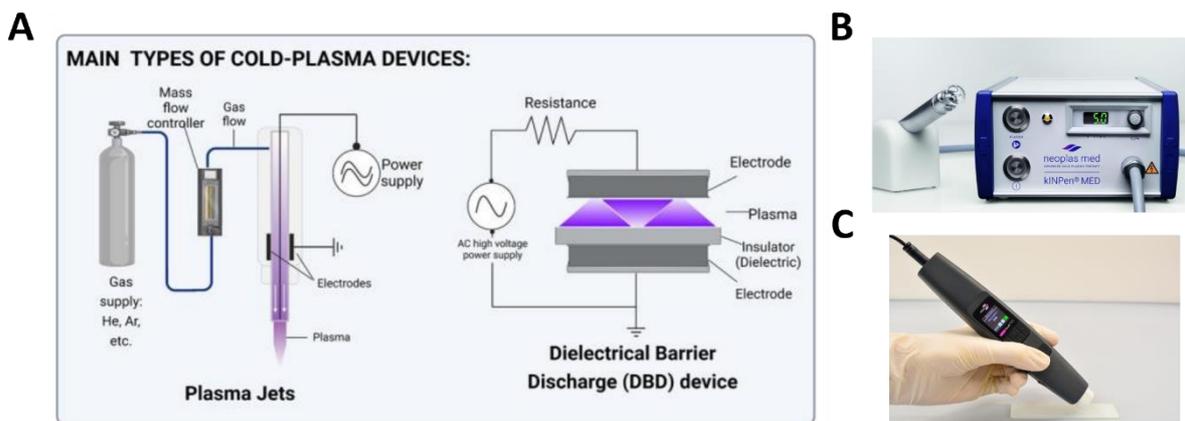


Figure 29 : Les différents configurations électroniques du CAP (modifié). **A.** Il existe deux principaux types de dispositifs CAP utilisés dans la recherche sur le cancer : les jets de plasma (APPJ) et la décharge à barrière diélectrique (DBD) ²³⁰. **B.** Le dispositif breveté et certifié kINPen® est celui le plus utilisé aujourd’hui dans la recherche préclinique en oncologie ²³⁴. **C.** Le dispositif piézoélectrique Piezobrush® PZ3 suscite l’intérêt des chercheurs de par sa portabilité et sa petite taille ²³⁵.

1.2 Différentes méthodes de traitements standardisées

La thérapie par le CAP pour les tumeurs solides n’est pas encore utilisée en clinique ; seules quelques études ont rapporté des applications cliniques du CAP dans le cancer, notamment comme traitement palliatif pour les cancers de la tête et du cou en phase terminale et comme traitement préventif après une résection chirurgicale (**voir partie II.4.2 de ce chapitre**) ^{236,237}. Actuellement, l’utilisation du CAP en oncologie en est encore au stade de la recherche préclinique. Dans ce cadre, deux stratégies de base pour l’utilisation du CAP ont été développées ²³⁰⁻²³². La première consiste à utiliser directement le dispositif plasma pour traiter les cellules en culture ou les tumeurs, ce qui constitue le « traitement direct ». La seconde approche, désignée sous le terme de « traitement indirect », consiste à utiliser des solutions préalablement traitées au CAP, qui sont ensuite mises en contact avec les cellules en culture ou injectées dans les tumeurs *in vivo*. Le milieu activé par le plasma froid, contenant l’ensemble des espèces réactives générées par le CAP, est alors appelé PAM (pour *Plasma-Activated Medium*) ou PCL (pour *Plasma-Conditioned Liquid*) (**Figure 30.A**).

Ces deux modalités de traitement offrent des avantages et des inconvénients distincts. Le traitement direct permet de combiner la composante chimique du CAP, principalement la production d’espèces oxydantes et nitrosantes, avec les propriétés physiques du plasma, telles que le champ électrique. Cette modalité de traitement génère instantanément des

RONs sur l'échantillon cellulaire, ce qui permet d'obtenir des résultats plus précoces comparativement à la méthode indirecte. De plus, l'efficacité du traitement direct dépend grandement du temps d'exposition au CAP, dont l'action est plus localisée par rapport au traitement indirect, qui lui est plus diffus. En parallèle, bien que le champ électrique n'intervienne pas sur la cible biologique ou le sujet lors du traitement indirect, l'un des principaux avantages du PAM réside dans la possibilité de stocker les espèces réactives générées par le plasma. L'approche indirecte utilisant le PAM peut ainsi être appliquée à un plus grand nombre de tumeurs que l'approche directe qui, lorsqu'il s'agit de traiter des modèles murins, est souvent utilisée pour traiter des tumeurs ectopiques, généralement en sous-cutané. Les raisons qui motivent ce choix sont l'encombrement des sources de plasma et la difficulté d'accès aux tumeurs dans les modèles orthotopiques. À l'inverse, le traitement indirect peut être administré par injection dans les tumeurs solides ou dans la circulation systémique des modèles précliniques ²³⁸. Afin d'améliorer la pertinence biomédicale du traitement direct des tumeurs, des modèles précliniques plus imposants, tels que le cochon, et des techniques comme l'endoscopie sont nécessaires (**Figure 30.B**). L'un des principaux inconvénients du traitement indirect réside dans le fait que le PAM est facilement dilué par les fluides corporels, ce qui limite l'apport localisé et concentré d'oxydants à la cible. C'est pourquoi, ces dernières années, des hydrogels traités au plasma (ou PTHs pour *Plasma-Treated Hydrogels*) ont émergé ²³⁹⁻²⁴⁰. Pour préparer un PTH, une solution polymérique est d'abord exposée au CAP pour l'enrichir en RONS, puis celle-ci est réticulée en un hydrogel, de sorte que les RONS restent piégés dans le gel. Une fois que le PTH entre en contact avec une cible biologique, les RONS sont libérés par simple diffusion, permettant une action prolongée et ciblée. Bien que le traitement avec des PTHs concentre moins d'espèces réactives et soit moins précis que le traitement direct, il peut être appliqué à un plus grand nombre de tumeurs par rapport à l'approche directe qui est plus restrictive.

En ce qui concerne la sécurité de la thérapie au plasma, la thérapie directe a été utilisée en toute sécurité dans les applications dermatologiques chez l'Homme et a montré des effets antitumoraux significatifs dans de nombreux modèles précliniques, sans provoquer de lésions dermiques ²⁴¹ (**Table 4**). De même, le traitement indirect ne semble pas présenter d'effets secondaires toxiques notables pour l'organisme. Par exemple, une évaluation de la toxicité menée chez des souris a révélé que l'ingestion prolongée de PAM n'affectait pas

l'homéostasie générale, ne causait pas de changements fonctionnels ou histologiques dans les organes importants comme l'œsophage ou l'estomac, ne modifiait pas les paramètres sanguins hématologiques ou biochimiques et ne favorisait pas l'inflammation ²⁴².

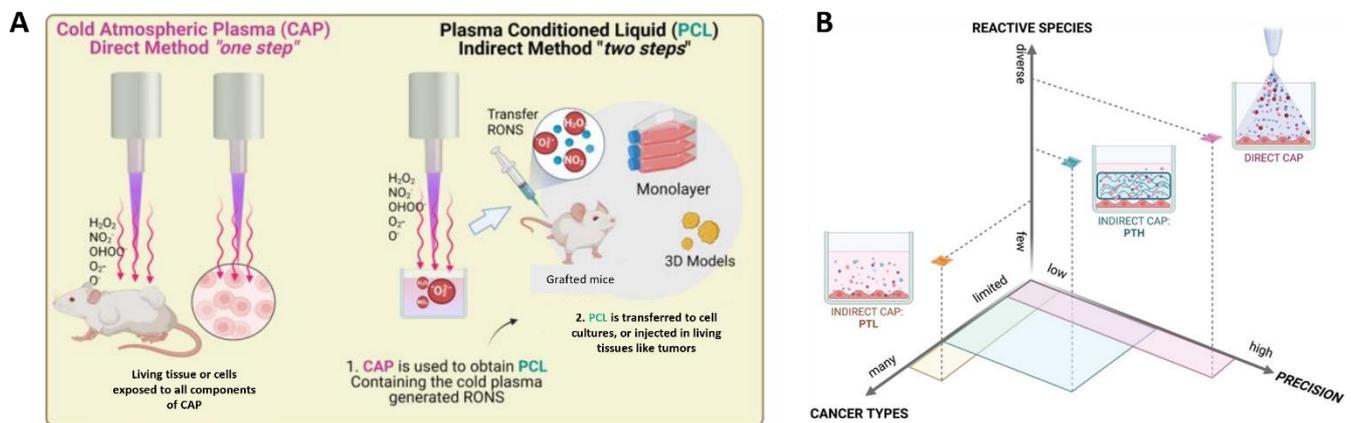


Figure 30 : Les différentes méthodes de traitement au CAP (modifié). A. Les dispositifs plasma peuvent être appliqués aux tissus ou aux cultures cellulaires de deux manières : directement, où tous les composants du plasma agissent, ou indirectement, où un liquide activé par le plasma (PCL pour *Plasma Conditioned Liquid*) contenant les principaux composants cytotoxiques du CAP (RONS) est appliqué au tissu ou aux cellules ²³⁰ B. Les hydrogels traités au plasma (PTHs) constituent une nouvelle modalité de traitement. Ils offrent un moyen de combiner les avantages des modalités de traitement actuelles (direct et indirect, PTL, *Plasma-Treated Liquids*) : une administration de RONS locale élevée et peu invasive. Les PTHs peuvent également être injectables, mais sont plus visqueux et chimiquement complexes que les PTL ²⁴⁰.

2. Mécanismes d'action du CAP contre la cellule tumorale

Selon des recherches récentes sur le traitement direct ou indirect du CAP en oncologie, les effets antitumoraux induits par le plasma froid reposent principalement sur sa capacité à générer un stress oxydatif via la formation de RONS ^{231,243}. Les mécanismes antitumoraux impliquant d'autres composantes actives du CAP, telles que sa capacité à générer un champ électrique local et des rayonnements ultraviolets, n'ont pas encore été étudiés de manière approfondie. Ces aspects nécessitent davantage de recherches pour mieux comprendre leur rôle potentiel dans les traitements oncologiques.

2.1 Balance oxydante des cellules tumorales et innocuité sur les cellules saines

Les RONS produits par le plasma incluent une variété d'espèces réactives, telles que le peroxyde d'hydrogène H_2O_2 , les radicaux hydroxyles OH, les radicaux superoxydes O_2^- , l'ozone O_3 , l'oxygène singulet 1O_2 , ainsi que les nitrites et nitrates. Ces espèces peuvent induire des modifications oxydatives dans toutes les molécules biologiques, entraînant potentiellement des dommages à l'ADN, aux lipides et aux protéines. En réponse au stress oxydatif induit par le CAP, les cellules activent divers mécanismes antioxydants pour prévenir ces dommages. Toutefois, les cellules cancéreuses et les cellules saines réagissent de manière distincte à ce stress en raison de leurs différences structurelles et fonctionnelles ²³¹. Pour les cellules non malignes, les RONS proviennent principalement de la respiration mitochondriale et d'agressions extérieures. Afin de rétablir une homéostasie rédox, les cellules mettent en place un système de défense antioxydant sophistiqué, incluant des enzymes telles que la catalase, la glutathion peroxydase et la superoxyde dismutase, ainsi que des antioxydants non enzymatiques comme les vitamines E et C et l'urate ²⁴⁴. Les cellules malignes, en revanche, exploitent le stress oxydatif à leur avantage. Elles utilisent le peroxyde d'hydrogène, un sous-produit de la dismutation des anions superoxydes générés par la NADPH (*Nicotinamide Adénine Dinucléotide Phosphate*) oxydase, une enzyme souvent surexprimée à leur membrane, comme un signal de prolifération cellulaire. Ce H_2O_2 extracellulaire est ainsi crucial pour leur croissance et leur survie. Les RONS ne se contentent pas de déclencher des signaux de prolifération, ils jouent également un rôle clé dans l'induction de l'apoptose, ou mort cellulaire programmée, en activant des voies de signalisation spécifiques telles que la voie HOCl (hypochlorite) et la voie NO/peroxynitrite ^{245,246}. Pour se protéger contre ces effets pro-apoptotiques, les cellules tumorales doivent surexprimer des enzymes antioxydantes, notamment la catalase associée à la membrane et la superoxyde dismutase. Ces enzymes neutralisent les RONS et inhibent les signaux qui pourraient autrement conduire à leur destruction, permettant ainsi à la tumeur de progresser plus efficacement. Toutefois, ces enzymes antioxydantes peuvent être inhibées par l'oxygène singulet, qui est produit lors de l'interaction entre le nitrite et le peroxyde d'hydrogène ²⁴⁶. Cela facilite l'entrée des RONS générés par le CAP dans les cellules tumorales au cours du traitement (**Figure 31**). Par exemple, il a été démontré que les niveaux d'expression des ARNm des enzymes

antioxydantes, telles que GSTA4 (*Glutathione S-Transferase Alpha 4*), MSRB3 (*Methionine Sulfoxide Reductase B3*), SOD1 (*Superoxyde Dismutase 1*), SOD2, CAT2 (*Catalase 2*) et HMOX1 (*Heme Oxygenase 1*), augmentent significativement dans les hépatocytes primaires humains non malins par rapport à ceux observés dans des lignées de CCA après un traitement au PAM²⁴⁷. Cela illustre la capacité des cellules saines à adapter leurs défenses antioxydantes en réponse au plasma froid, contrairement aux cellules cancéreuses. Ainsi, les RONS supplémentaires introduits par le CAP peuvent submerger le système antioxydant des cellules tumorales, transformant le rôle de la NADPH oxydase de la promotion tumorale à l'inhibition de la tumorigenèse²⁴³. En raison de leur prolifération incontrôlée, les cellules tumorales ont déjà un niveau de RONS intracellulaires proche du seuil limite de leur capacité à gérer ces espèces réactives, ce qui les rend particulièrement vulnérables à l'ajout de RONS supplémentaires induits par le CAP, contrairement aux cellules saines qui peuvent mieux réagir à cette surcharge oxydative.

Certains travaux montrent que cette différence de vulnérabilité pourrait également s'expliquer par la surexpression des aquaporines sur la surface des cellules tumorales, qui sont des protéines transmembranaires formant des canaux clés dans la membrane plasmique (**Figure 31**)^{231,248}. Ces aquaporines permettraient aux cellules cancéreuses d'absorber les espèces réactives générées par le CAP, en particulier le peroxyde d'hydrogène, plus rapidement que les cellules saines. À l'origine, les aquaporines ont été identifiées comme des transporteurs transmembranaires d'eau, mais il a été confirmé qu'elles pouvaient également faciliter le transport de petites molécules comme le glycérol, l'ammoniac, l'urée, ainsi que des radicaux libres. Il existe plusieurs types d'aquaporines de diamètres variables, et actuellement, trois d'entre elles (AQP1, AQP3 et AQP8) sont connues pour être impliquées dans le transport du H₂O₂ dans les cellules²⁴⁹. Par exemple, l'AQP1 a un diamètre de 2,8 Å. Bien que ce diamètre soit trop petit pour transporter efficacement le H₂O₂, il faciliterait néanmoins son entrée par rapport à la barrière formée par la bicouche lipidique de la membrane cellulaire. L'AQP8, quant à elle, présente un diamètre plus grand, de 3,2 Å, une taille de pore suffisamment grande pour permettre un transport efficace du H₂O₂²⁴⁹. Ainsi, la surexpression des aquaporines dans les cellules cancéreuses, par rapport aux cellules saines, améliorerait la pénétration des RONS générés par le CAP, accentuant la vulnérabilité des cellules tumorales au plasma froid. Cette hypothèse reste toutefois débattue aujourd'hui.

De plus, des études ont montré que les RONS produits par le CAP peuvent oxyder les lipides constituant la membrane plasmique cellulaire. Cette oxydation conduit à la formation de pores suffisamment grands ($\sim 15 \text{ \AA}$) pour faciliter la transition des RONS dans les cellules. Ce processus de formation de pores est également facilité par le champ électrique généré par le CAP. Contrairement aux cellules normales, qui possèdent une teneur élevée en cholestérol membranaire assurant la stabilité et la fluidité de leur membrane, les cellules cancéreuses présentent des taux réduits de cholestérol dans leur membrane, ce qui les rend plus fragiles et plus sensibles au stress oxydant induit par un traitement au CAP (**Figure 31**)^{231,250}. Ainsi, la combinaison de la formation de pores, facilitée par l'oxydation lipidique et le champ électrique du CAP, et de la vulnérabilité accrue des membranes cellulaires cancéreuses, en raison de leur faible teneur en cholestérol, renforce l'efficacité du traitement CAP dans le ciblage des cellules tumorales.

2.2 Modes d'action intracellulaires du CAP

Les effets antitumoraux du CAP ont été démontrés dans de nombreux modèles précliniques de cancers et reposent sur des perturbations intracellulaires significatives²³². L'un des mécanismes clés de ces effets est la peroxydation lipidique de la membrane cellulaire tumorale induite par les RONS générés par le CAP. Celle-ci conduit à des altérations structurales de la membrane, déclenchant des cascades de signalisation (**Figure 31**).

Impact sur les organelles

Tout d'abord, de nombreuses études ont montré que l'exposition des cellules tumorales au plasma froid entraîne un stress du réticulum endoplasmique (RE), à l'origine de perturbations calciques intracellulaires^{231,232}. Le RE est un organite crucial pour le bon fonctionnement cellulaire et le contrôle métabolique. Un déséquilibre fonctionnel du RE peut provoquer de multiples dysfonctionnements, notamment au niveau des organites et du métabolisme cellulaire. Ce stress du RE induit par le CAP se traduit par un afflux de calcium intracellulaire, un ion essentiel dans les cascades de signalisation, notamment dans l'apoptose et la sénescence cellulaire. Par exemple, des études sur des cellules de mélanome ont montré qu'une exposition au CAP provoquait une phosphorylation accrue de la protéine eIF2 α (*eukaryotic translation initiation Factor 2A*), un marqueur clé du stress du RE, qui était corrélée

à une libération d'ions Ca^{2+} dans le cytoplasme des cellules tumorales ²⁵¹⁻²⁵³. Le Ca^{2+} est libéré du RE via le récepteur de la ryanodine et le récepteur de l'inositol 1,4,5-triphosphate, puis est capté par les mitochondries à travers les transporteurs de perméabilité transitionnelle (mPTPs), ou bien par le biais des membranes MAMs (*Mitochondria Associated Membranes*) qui relie physiquement les mitochondries au RE et qui permettent les échanges de calcium, de lipides et de métabolites entre les deux organites. Ce déséquilibre calcique provoque à la fois une surcharge du Ca^{2+} dans les mitochondries et une réponse de stress appelée réponse UPR (pour *Unfolded Protein Response*) dans le RE ²⁵⁴. Ces perturbations peuvent conduire à l'activation des voies apoptotiques et contribuer aux effets antitumoraux observés avec le traitement CAP. En effet, le stress oxydant provoqué par le CAP entraîne la dépolarisation des membranes mitochondriales, facilitant ainsi l'ouverture des mPTPs et la libération du cytochrome C, un facteur clé dans l'initiation de l'apoptose mitochondriale ²⁵⁵. Par exemple, des études ont démontré que l'exposition au CAP induit des perturbations mitochondriales significatives dans des cellules cancéreuses du foie et du poumon, ainsi que dans des cellules du cancer du col de l'utérus ^{256,257}. D'autre part, ce déséquilibre calcique dans le RE active également des mécanismes de survie cellulaire, comme la réponse UPR ^{217,258}. Ce mécanisme de défense est une réponse adaptative au stress du RE, coordonnée par trois protéines principales : IRE1 (*Inositol-Requiring Enzyme 1*), PERK (*PKR-like ER Kinase*), et ATF6 (*Activating Transcription Factor 6*). Ces protéines collaborent pour augmenter la capacité de repliement des protéines, améliorer la maturation des protéines et promouvoir la dégradation des protéines mal repliées dans le RE. Ce processus vise à protéger les cellules contre des niveaux modérés de stress oxydatif, mais lorsque l'accumulation de RONS devient excessive, le niveau de stress du RE dépasse les capacités de régulation de la réponse UPR. Dans ce cas, la suractivation de la réponse UPR déclenche ainsi l'apoptose mitochondriale ²¹⁷. Certains chercheurs suggèrent que les espèces réactives générées par le CAP peuvent altérer la structure des biomolécules, entraînant l'accumulation de protéines mal-repliées dans la lumière du RE et stimulant l'activation directe de la réponse UPR ^{231,232}. Parallèlement à cette réponse, un autre mécanisme de défense cellulaire, l'autophagie, peut également être activé suite à un traitement CAP. L'autophagie est un processus de dégradation et de recyclage des éléments cellulaires, comme les organites endommagés ou les protéines mal repliées, par l'intermédiaire de lysosomes. Par exemple, il a été montré que l'exposition de cellules

tumorales endométriales au CAP induisait la formation d'autophagosomes et activait des protéines clés de cette voie, telles que LC3B (*Light Chain 3B*)^{217,231,232}.

Activation de voies de signalisation

Les RONS produits par le CAP peuvent également activer plusieurs cascades de signalisation impliquant les kinases activées par les mitogènes (MAPK)^{231,232}. Les trois principales voies MAPK étudiées sont les voies ERK1/2, JNK et p38. Ces voies sont impliquées dans la régulation de la réponse au stress, de la prolifération cellulaire et de la mort cellulaire. Des recherches ont en effet montré que les RONS dérivés du CAP pouvaient induire la mort des cellules tumorales en activant ces voies de signalisation^{259,260}.

Impact sur l'ADN

Les espèces réactives issues du CAP peuvent aussi induire divers types de dommages à l'ADN dans les cellules tumorales, qui comprennent des cassures simples brins (ou SSBs, pour *Single-Strand Breaks*), des cassures double brins (ou DSBs, pour *Double-Strand Breaks*), des modifications oxydatives des bases azotées, et des liaisons croisées ADN-protéines (ou DPCs, pour *DNA-Protein Crosslinks*)^{231,232}. Certaines études ont évalué les cassures de l'ADN des cellules tumorales causées par le CAP en détectant la forme phosphorylée de l'histone H2AX : γ H2AX, qui est devenue un indicateur clé de l'endommagement et de la réparation de l'ADN^{261,262}. Celle-ci est en effet phosphorylée par la kinase PI3 au cours de la réponse DDR (*DNA Damage Response*), qui est un ensemble de processus cellulaires visant à protéger le génome par le biais de systèmes de contrôle du cycle cellulaire, de détection des cassures d'ADN et de réparation de l'ADN. Les DSBs activent les kinases ATM (faisant partie de la famille des kinases de type PI3), qui phosphorylent l'histone H2AX et activent les voies de signalisation médiées par P53 et TP73, conduisant à l'apoptose. Des augmentations des niveaux d'ATM, P53 et TP73 ont été observées dans diverses cellules tumorales (comme le carcinome épidermoïde de la cavité buccale, le cancer du poumon et le mélanome) traitées directement ou indirectement par le CAP^{261,263,264}. L'induction de DSBs par le CAP dépend de la distance entre la source de plasma et les cellules, ainsi que du temps d'exposition²⁶⁵. Par exemple, un traitement de 30 secondes a induit des DSBs dans 60 % des cellules cancéreuses de la cavité buccale, tandis qu'un traitement de 120 secondes a entraîné des DSBs dans 80 % des cellules. Des résultats similaires ont été observés pour les cellules de glioblastome²⁶⁶, et dans un modèle de

sphéroïde 3D de cancer colorectal ²⁶². Les RONS générés par le plasma froid peuvent également réagir avec des protéines pour former des radicaux libres protéiques, tels que la protéine-C ou la protéine-O ^{231,232}. Ces radicaux sont des structures instables qui peuvent former des liaisons covalentes croisées avec l'ADN ou l'ARN, entraînant la mort cellulaire. En outre, l'exposition au CAP peut provoquer des modifications chimiques des bases de l'ADN, comme la production de 8-oxoguanine, ce qui peut endommager l'ADN et entraîner, à long terme, la mort de la cellule. Cela a notamment été démontré dans un modèle murin immunodéficient de CCA traité avec du plasma froid, dans lequel la production de 8-oxoguanine était corrélée à un ralentissement de la croissance tumorale ²⁴⁷.

Régulation de l'EMT

Une autre conséquence observée après un traitement CAP est la diminution de la migration et de l'invasivité des cellules tumorales ²¹⁷. En effet, des études ont révélé que le CAP bloque l'entrée des cellules dans le processus de l'EMT dans des cancers tels que le glioblastome, le cancer du sein, le cancer de la tête et du cou, et le cancer de la vessie ^{265,267,268}. Ce blocage se manifeste par une diminution de l'expression des marqueurs mésenchymateux et une augmentation des marqueurs épithéliaux. Cependant, ces effets sont partiellement atténués en présence de N-acétylcystéine, une molécule antioxydante qui piège les ROS. Cela souligne que ces processus dépendent en grande partie du stress oxydant induit par le CAP.

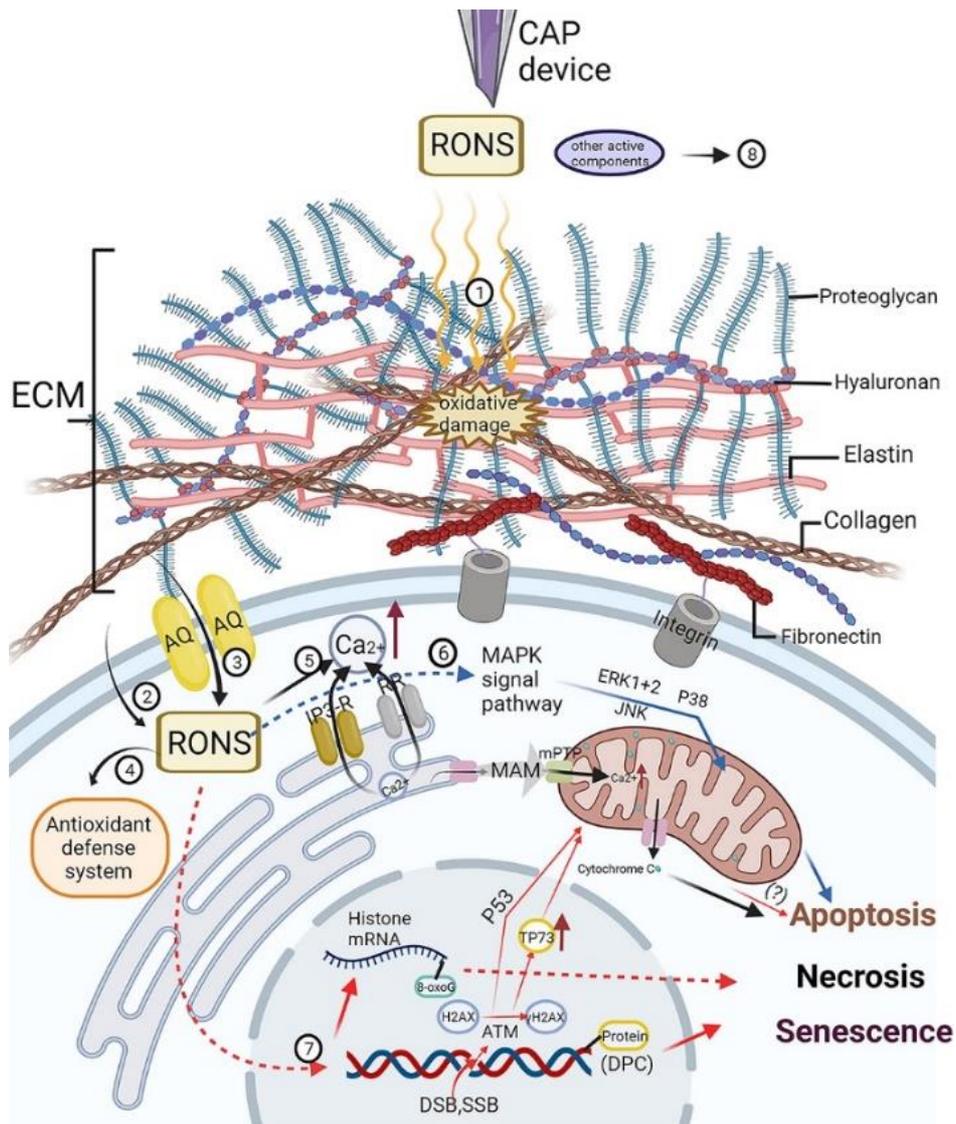


Figure 31 : Effets du CAP sur les cellules tumorales ²³¹. (1) Le CAP peut inhiber la progression tumorale en oxydant ou en détruisant la structure de la MEC, riche en protéines structurales. (2) La teneur en cholestérol de la membrane cellulaire tumorale est inférieure à celle des cellules non malignes, et il est plus facile pour les RONS dérivés du CAP d'oxyder les lipides de la membrane cellulaire pour former des pores et pénétrer dans la cellule. (3) En général, l'expression de l'aquaporine (AQ) dans les cellules tumorales augmente, ce qui est favorable au transfert des RONS dans les cellules. (4) Avec l'augmentation des RONS dérivés du CAP, le système de défense antioxydant des cellules tumorales est débordé, ce qui limite son effet protecteur sur le stress oxydatif. (5) L'augmentation des RONS intracellulaires affecte l'homéostasie intracellulaire du calcium. Grâce à l'interaction avec le récepteur de l'inositol triphosphate (IP3-R) et le récepteur ryanodine (RR), les ions Ca^{2+} s'écoulent dans le cytoplasme à partir du RE, tandis que les pores mPTPs sont ouverts pour permettre aux ions calcium d'entrer dans les mitochondries à travers les membranes du RE associées aux mitochondries (MAMs), ce qui entraîne une apoptose dépendante des mitochondries. (6) L'augmentation des RONS intracellulaires peut activer de nombreuses cascades différentes de protéines kinases activées par les mitogènes (MAPK), entraînant l'apoptose cellulaire. (7) Le CAP induit des dommages à l'ADN et à l'ARN dans les cellules tumorales, notamment des DSBs, des SSBs, des DPCs et une modification chimique des bases de l'ADN et de l'ARN, entraînant l'apoptose, la nécrose et la sénescence. (8) Le mécanisme d'autres composants actifs du CAP tels que les particules chargées, le champ électrique et le rayonnement ultraviolet sur les cellules tumorales doit être étudié plus en détail.

Ainsi, les espèces réactives générées par le CAP sont responsables d'une cascade de signalisation qui conduit à la mort cellulaire lorsque leur concentration est trop élevée.

2.3 Morts cellulaires enclenchées par le CAP

Lorsque les concentrations de RONS deviennent trop élevées, les cellules tumorales ne parviennent plus à les gérer et finissent par mourir. La majorité des recherches a démontré que l'exposition au CAP induit l'entrée des cellules tumorales dans des processus apoptotiques et nécrotiques, principalement dus à des dysfonctionnements mitochondriaux et à des dommages de l'ADN. En effet, de nombreuses études ont montré que la perte de viabilité des cellules tumorales est liée à l'externalisation des phosphatidylsérines du feuillet interne de la membrane plasmique, mise en évidence par des marquages annexine V en cytométrie en flux. L'annexine V se lie aux phosphatidylsérines lors de l'apoptose précoce des cellules, et, grâce à l'ajout d'un intercalant de l'ADN tel que le 7-AAD (*7-Aminoactinomycin D*) ou le PI (*Propidium Iodide*), il est possible de différencier les cellules en apoptose tardive des cellules nécrotiques ^{247,269}.

Apoptose

L'apoptose est un processus de mort cellulaire programmée qui peut être déclenché par des voies de signalisation extrinsèques, via des récepteurs de mort transmembranaires, ou intrinsèques, impliquant la mitochondrie ²⁷⁰. Peu d'études se sont penchées sur l'activation extrinsèque de l'apoptose par le CAP. Cependant, il a été démontré dans des cellules de mélanome que le CAP active la voie de mort cellulaire extrinsèque médiée par Fas/TRAIL ²⁵². La voie apoptotique intrinsèque, la plus documentée, est déclenchée par la perméabilisation de la membrane externe de la mitochondrie ²⁷¹. Cela entraîne la libération dans le cytosol de molécules pro-apoptotiques, telles que le cytochrome C, qui permettent la formation de l'apoptosome. Ce complexe protéique active la caspase 9, induisant ensuite le clivage des caspases exécutrices (CASP3, CASP6 et CASP7) responsables de la mort cellulaire. Ainsi, il a été montré sur des coupes histologiques de tumeurs de CCA provenant d'un modèle murin immunodéficient qu'un traitement CAP induisait le clivage de la caspase 3 ²⁴⁷.

Nécrose

Les expositions prolongées au CAP ont tendance à activer des voies de mort nécrotiques. Par exemple, dans des cellules monocytaires de leucémie humaine, un traitement CAP de faible durée (1 minute d'exposition) induit de la mort cellulaire par apoptose, tandis qu'une exposition plus longue (3 minutes) entraîne une nécrose des cellules ²⁷². Contrairement à l'apoptose, la nécrose est indépendante des caspases et se caractérise par la rupture de la membrane plasmique, provoquant la libération des composants intracellulaires dans le milieu extracellulaire ²⁷³. Les cellules en nécrose présentent des signes distinctifs, tels qu'un gonflement des organites (notamment du RE et des mitochondries), une rupture de la membrane plasmique et une lyse cellulaire. Il a été démontré qu'un traitement CAP utilisant uniquement le champ électromagnétique de la source induisait ces changements morphologiques dans des cellules de glioblastome et des cancers du poumon et du sein ²⁷⁴.

Mort dépendante de l'autophagie

Une exposition au CAP peut également conduire les cellules tumorales dans une voie de mort dépendante de l'autophagie, qui est un mécanisme de survie permettant le maintien de l'homéostasie cellulaire en dégradant les protéines et les organites dysfonctionnels ²⁷⁴. En résumé, le recyclage des éléments cellulaires dégradés se fait par l'intermédiaire des autophagolysosomes, qui sont des complexes formés à la suite de la fusion entre un autophagosome, qui isole les composants à dégrader, et des lysosomes, qui contiennent des hydrolases. Ainsi, les cellules privées de nutriments pendant des périodes prolongées ou trop exposées à des conditions de stress oxydatif peuvent mourir par une voie dépendante de l'autophagie ²⁷⁵. Cela a été observé dans plusieurs lignées cellulaires tumorales exposées au CAP, notamment le mélanome et le mésothéliome ^{276,277}.

Autres voies de mort cellulaire : pyroptose, ferroptose et nécroptose

De récentes études, bien que peu nombreuses, ont également montré qu'un traitement CAP pouvait déclencher d'autres voies de mort cellulaire ²⁷⁴. En particulier, il a été souligné que le CAP pouvait induire la pyroptose des cellules tumorales, une forme de mort cellulaire programmée inflammatoire et nécrotique dépendante des caspases inflammatoires. La pyroptose est principalement régulée par deux voies de signalisation : la voie canonique

médiée par CASP1 et la voie non canonique médiée par CASP11²⁷⁸. Ce processus implique le clivage de divers membres de la famille des gasdermines, qui forment des composants permettant la perforation de la membrane cellulaire, entraînant la libération de médiateurs inflammatoires et la mort cellulaire. Des études publiées en 2020 et en 2024 ont montré que l'exposition au CAP induisait la pyroptose dans des cellules tumorales exprimant la gasdermine E^{279,280}. Le niveau basal de gasdermine E est positivement corrélé à la sensibilité des cellules tumorales à la pyroptose induite par le CAP. Cette sensibilité est en effet associée à l'activation des voies mitochondriales (JNK/cytochrome C/CASP9/CASP3), qui conduisent au clivage de la gasdermine E, déclenchant ainsi la pyroptose. De même, la ferroptose, une autre voie de mort cellulaire caractérisée par une accumulation de lipides peroxydés toxiques pour la cellule, peut également être déclenchée par le CAP. Ce processus repose principalement sur le dysfonctionnement de la protéine antioxydante GPX4 (*Glutathione Peroxidase 4*) et sur la diminution de la synthèse du GSH (*Glutathione*), ce qui empêche la neutralisation des lipides peroxydés et entraîne une toxicité cellulaire, conduisant finalement à la mort cellulaire²⁸¹. Cela a été démontré dans des modèles précliniques de cancer du sein, où une exposition au CAP combinée à l'utilisation de la ferrostatine 1, un inhibiteur de la ferroptose, protégeait les cellules de la mort. Parallèlement, l'utilisation d'un inhibiteur de FSP1 (*Ferroptosis Suppressor Protein 1*), une protéine qui supprime la ferroptose, a permis de renforcer la ferroptose induite par le CAP²⁸². Des études de séquençage menées sur des cellules du cancer de la tête et du cou ont également montré un enrichissement fonctionnel en gènes liés à la ferroptose après un traitement CAP²⁶⁰. Il semble également qu'une exposition au CAP puisse déclencher la nécroptose des cellules, une voie de mort programmée et inflammatoire qui repose sur la formation de pores par l'oligomérisation de la pseudokinase MLKL (*Mixed Lineage Kinase domain Like pseudokinase*) après l'activation des kinases RIPK1 (*Receptor-Interacting serine/threonine-Protein Kinase 1*) et RIPK3²⁸³. Des études de séquençage ont ainsi révélé une signature génétique de la nécroptose dans des cellules de mélanome après un traitement CAP²⁸⁴.

Senescence

Au lieu de mourir, certaines cellules peuvent simplement réduire leur métabolisme et entrer dans un état de sénescence cellulaire à faible consommation d'énergie après un traitement CAP²³¹. Cette phase de sénescence permet aux cellules tumorales de réactiver un

métabolisme cellulaire normal en cas de stress, tant que les organites et l'ADN ne sont pas endommagés au-delà de toute réparation. Il a ainsi été démontré que de faibles doses de CAP induisaient la sénescence dans les cellules de mélanome, comme le confirment des colorations spécifiques du phénotype SASP (*Senescence-Associated Secretory Phenotype*)²⁸⁵. Ce phénomène a également été observé dans des échantillons tumoraux de patients (cancer de la prostate, mélanome, cancer du sein, lymphome et cancer du poumon) à l'aide d'expériences de séquençage²⁸⁶.

Ainsi, le CAP est capable de déclencher diverses voies de mort cellulaire, les voies apoptotiques et nécrotiques étant les plus étudiées à ce jour. La contribution des autres voies de mort cellulaire induites par le CAP reste encore à approfondir. Ces voies de mort cellulaire engendrent des effets antitumoraux significatifs du CAP dans une multitude de modèles de cancers, dont certains sont répertoriés dans la **Table 4**.

Table 4 : Liste des études menées sur les effets antitumoraux du CAP ²³¹ (modifié).

Tumor types	Direct/indirect	Type of study	Plasma source	References
The HNSCC cell lines (JHU-022, JHU-028, JHU-029, SCC25)	Direct	<i>In vitro</i>	Helium-based plasma jet (created by The George Washington University)	287
OSC 19 cell lines and FaDu cell lines	Direct	<i>In vitro</i>	MiniFlatPlaSter® (the Max Planck Institute for Extraterrestrial Physics)	288
B16F10 murine melanoma cell lines and A375 human melanoma cell lines	Direct/indirect	<i>In vitro</i>	Microsecond-Pulsed DBD Plasma (advanced plasma solutions)	289
HuCC11 cell lines and EGI-1 cell lines	Direct/indirect	<i>In vitro/in vivo</i> (mice model)	Helium-based plasma jet (laboratory self-made)	247
MDA-MB-231, SW480, MCF-7, PC3 and NCF3 cancer cell lines	Direct	<i>In vitro</i>	Argon-based plasma jet kINPen 11 (neoplas, Germany)	290
Head and neck squamous cancer	Direct	<i>In vivo</i> (clinical)	Argon-based plasma jet (kINPen MED, neoplas tools GmbH, Germany)	236
Murine melanoma cell lines (B-16)	Direct	<i>In vitro/in vivo</i> (mice model)	Elongated flexible CAPJ (laboratory self-made)	291
Human hepatoma cancer cell lines (HepG2)	Direct	<i>In vitro</i>	Atmospheric pressure room temperature plasma jet (laboratory self-made)	292
Human cancer cell lines glioblastoma (T98G), thyroid carcinoma (SNU80) and oral carcinoma (KB)	Direct	<i>In vitro</i>	Atmospheric pressure non-thermal DBD plasma (laboratory self-made)	293
Murine melanoma tumor cell lines (B16F0)	Direct	<i>In vitro</i>	Single-cellular-level sized microplasma jet (laboratory self-made)	294
Malignant melanoma cell lines (Mel Juso, Mel Im)	Direct/indirect	<i>In vitro</i>	miniFlatPlaSter (the Max Planck Institute for Extraterrestrial Physics)	295
Human cervical cancer HeLa cell lines (ATCC CCL-2) and lung cancer A549 cell lines	Direct	<i>In vitro</i>	Fabricated microplasma jet system (laboratory self-made)	296
Glioblastoma (T98G) and lung adenocarcinoma (A549) cell lines	Direct	<i>In vitro</i>	Soft plasma-jet system (laboratory self-made)	259
Human oral cavity cancer cell lines (MSK QLL1, SCC1483, SCC15, and SCC25)	Direct	<i>In vitro</i>	Spray-type non-thermal atmospheric plasma system (laboratory self-made)	261
Colorectal cancer cells (HCT116)spheroids	Indirect	<i>In vitro</i>	Helium-based plasma jet modified from DBD (laboratory self-made)	262
Murine (B16) and human (SK-MEL-28) melanoma cell lines	Direct	<i>In vitro</i>	Argon-based plasma jet kINPen	297
Human lung adenocarcinoma (A549) cell lines	Indirect	<i>In vitro</i>	Argon-based plasma jet (laboratory self-made)	263
Human melanoma cell lines (Mel007)	Direct	<i>In vitro</i>	Helium-based plasma jet (laboratory self-made)	264
Oral cancer cell lines (SCC-25)	Direct	<i>In vitro</i>	Nitrogen-based plasma jet (laboratory self-made)	265
Glioma cell lines (LN18, LN229 and U87MG)	Direct	<i>In vitro</i>	Surface Micro Discharge (SMD) plasma device	266
Breast cancer cell lines (BT-474, SK-BR-3, MCF-7 and MDA-MB-231)	Direct	<i>In vitro</i>	Canady Helios Cold Plasma™ (CHCP)	298
Human hepatoma cell lines (Hep3B and Huh7)	Indirect	<i>In vitro</i>	s-DBD device (laboratory self-made)	299
Locally advanced cancer of the oropharynx (pT4)	Direct	<i>In vivo</i> (clinical)	Argon-based plasma jet (kINPen MED)	300
Human pancreatic adenocarcinoma cell lines (Colo-357, PaTu8988T) and murine pancreatic cancer cell lines (6606PDA)	Direct	<i>In vitro/in vivo</i> (mice model)	Argon-based plasma jet (kINPen 09)	301
Human ovarian cancer cell lines (OVCAR-3 and SKOV-3)	Direct	<i>In vitro</i>	Argon-based plasma jet kINPen	302
Murine melanoma tumor cell lines (B16F10)	Direct	<i>In vivo</i> (mice model)	Nanosecond pulsed streamer discharge (laboratory self-made)	303
Human glioblastoma multiforme (T98G) and lung adenocarcinoma (A549) cell lines	Direct	<i>In vitro</i>	μ-DBD plasma device (laboratory self-made)	304
Human nasopharyngeal carcinoma (CNE-1) cell lines	Direct	<i>In vitro</i>	Nanosecond pulsed DBD plasma (laboratory self-made)	305
Human lung adenocarcinoma (A549) cell lines	Direct	<i>In vitro</i>	Nanosecond pulsed DBD plasma (laboratory self-made)	306
Human astrocytoma (U251MG and U87MG) cells spheroids	Direct	<i>In vitro/in vivo</i> (mice model)	μ-DBD plasma device (laboratory self-made)	307
Murine pancreatic cancer cell lines (6606PDA)	Indirect	<i>In vivo</i> (mice model)	Argon-based plasma jet (kINPen MED)	308
Human pancreatic cancer cell lines (MIA-Paca-2, PANC-1, BxPC3, and Capan-2)	Indirect	<i>In vitro</i>	Argon-based plasma jet (kINPen MED)	309
Murine melanoma tumor cell lines (B16F10)	Direct	<i>In vitro</i>	Argon-based plasma jet (kINPen 11)	310,311
Murine colon carcinoma (CT26, MC38) and pancreatic cancer (6606PDA) cells spheroids	Indirect	<i>In vitro/in vivo</i> (mice model)	Argon-based plasma jet (kINPen)	312
Murine colon carcinoma (CT26) cell lines	Direct	<i>In vitro/in vivo</i> (mice model)	Nanosecond pulsed DBD plasma (laboratory self-made)	313
Human PDAC (PANC-1) and melanoma (Hmel1 MM, HBL MM) cell lines	Indirect	<i>In vitro</i>	PetriPlas source (designed at INP)	314
Murine colon carcinoma (CT26) cell lines	Direct	<i>In vitro</i>	Argon-based plasma jet (kINPen)	315

3. Effets antitumoraux du CAP sur le stroma tumoral

Lors du traitement d'une tumeur au CAP, ce dernier n'agit pas seulement sur les cellules tumorales. En effet, les composantes physiques et chimiques du CAP affectent également les éléments cellulaires et acellulaires du stroma tumoral ²³¹ (**Figure 32**).

3.1 Impacts du CAP sur les composantes cellulaires du stroma

Des publications ont rapporté des remaniements du MET après une exposition au CAP. Ce traitement induirait des modifications phénotypiques des cellules stromales, y compris les CAFs, les TECs, ainsi que les TAMs et les diverses populations immunitaires présentes dans la tumeur ²³¹ (**Figure 32**). Néanmoins, la majeure partie des travaux portant sur les effets du CAP sur les populations stromales repose sur l'utilisation de modèles non tumoraux, à l'exception des populations immunitaires, où les recherches sont plus nombreuses.

Fibroblastes associés au cancer (CAFs)

Il a été suggéré que le CAP ait un double effet sur les fibroblastes murins : des traitements courts favorisent la viabilité cellulaire et la production de collagène, tandis que les traitements prolongés les inhibent ³¹⁶. Une exposition prolongée à des traitements plasmatiques, associée à des concentrations plus élevées de RONS, peut induire la sénescence ainsi qu'une mort cellulaire nécrotique chez les fibroblastes dermiques humains ³¹⁷. Dans des modèles non tumoraux de sclérodémie localisée, il a été démontré qu'une exposition au CAP réduisait de manière significative les dépôts de collagène par les fibroblastes, ainsi que l'expression de l' α -SMA par les myofibroblastes dermiques. Ces effets pourraient potentiellement être observés dans un contexte tumoral ^{318,319} (**Figure 32**).

L'une des principales fonctions des CAFs est de sécréter des protéines de la MEC, un réseau complexe qui soutient la progression tumorale. Le CAP a montré des effets significatifs sur le remaniement de cette MEC, qui seront détaillés dans la partie **II.3.2 de ce chapitre**.

Cependant, la littérature sur les effets du CAP sur les populations de CAFs (dans un contexte tumoral) reste encore limitée. Étant donné que les CAFs sont reconnus comme des cibles

cruciales dans le traitement du cancer, il est essentiel de mener des études approfondies pour évaluer le potentiel thérapeutique du CAP contre cette composante stromale.

Cellules endothéliales tumorales (TECs)

Le CAP peut également affecter les populations endothéliales présentes dans le stroma tumoral. Des recherches ont montré que des cellules endothéliales aortiques humaines subissaient des niveaux plus élevés de DSBs que des kératinocytes ou des fibroblastes après une exposition au CAP, ce qui entraîne un arrêt du cycle cellulaire et une diminution significative de leur viabilité. En effet, le pourcentage de cellules endothéliales en phase G2/M augmente dans les 24 heures suivant l'exposition au CAP ³²⁰. Le profil angiogénique des cellules endothéliales semble également être affecté. Des études ont effectivement démontré que le CAP inhibe de manière significative la migration et la formation de nouveaux vaisseaux sanguins par les cellules endothéliales ³¹⁹. Ces inhibitions résultent d'une réduction apparente du métabolisme cellulaire et du déclenchement de processus apoptotiques. Des expériences de tubulogénèse en temps réel ont révélé que des cellules endothéliales primaires humaines de la veine ombilicale traitées formaient moins de tubes que les cellules non traitées ³²¹. Ces observations ont également été confirmées dans un modèle *in ovo* de CHC, où le traitement CAP a réduit de manière significative la densité vasculaire intratumorale, tout en augmentant la perméabilité vasculaire et en perturbant la microcirculation ³²² (**Figure 32**).

Ces résultats renforcent l'hypothèse que l'élimination des cellules endothéliales à l'aide du CAP pourrait contribuer à contrôler la progression tumorale.

Macrophages associés aux tumeurs (TAMs)

La progression tumorale et les modifications du MET favorisent la différenciation des TAMs vers un phénotype pro-tumoral de type « M2-like ». Ces macrophages, en sécrétant des cytokines anti-inflammatoires, contribuent à l'immunosuppression, contrairement au phénotype « M1-like » pro-inflammatoire, qui joue un rôle dans l'élimination des cellules cancéreuses. Comme décrit dans le **chapitre 2, partie III.4.3** de ce manuscrit, les TAMs participent à de nombreux mécanismes pro-tumoraux, tels que le remodelage de la MEC et l'angiogenèse. Il a été démontré que les espèces réactives dérivées du plasma influencent le profil de différenciation des monocytes ainsi que le potentiel inflammatoire des macrophages

^{311,323,324}. En particulier, le CAP peut induire la polarisation des macrophages dérivés des monocytes vers un phénotype « M1-like ». Ces macrophages sécrètent alors des cytokines pro-inflammatoires, telles que l'IL-1 α , l'IL-1 β , l'IL-6 et le TNF- α , qui sont capables de détruire les cellules tumorales, et expriment des marqueurs membranaires spécifiques comme CD80 ^{304,307}. Les macrophages activés par le traitement au plasma froid montrent une mobilité accrue ainsi qu'une capacité d'infiltration tumorale améliorée. Cela a été démontré par des expériences de co-culture de lignées cellulaires utilisant des inserts ³⁰⁷, ainsi que dans un modèle immunodéficient de CCA, où l'expression de F4/80 a été augmentée dans les tumeurs des animaux traités au CAP ²⁴⁷. De plus, l'expression de régulateurs clés de la chimiotaxie des monocytes et du trafic des macrophages, tels que CCL2 et CCR2 (*C-C Motif Chemokine Receptor 2*), était également augmentée chez ces animaux ²⁴⁷.

Ces macrophages polarisés vers un phénotype « M1-like » sont capables de réduire la migration et l'invasion des cellules cancéreuses. En effet, ils peuvent retarder le processus de l'EMT et augmenter l'expression de marqueurs épithéliaux comme la E-cadhérine, freinant ainsi l'invasivité des cellules, comme démontré dans des modèles *in vitro* et *in vivo* de gliome ³⁰⁷. Dans des modèles *in vitro* de mélanome, il a également été montré que la polarisation des macrophages par le traitement plasma passe par la voie de signalisation JAK2/STAT1 ³²⁵.

Ainsi, le traitement au plasma froid pourrait lever l'immunosuppression induite par les TAMs, offrant ainsi une promesse thérapeutique significative pour de nombreux cancers (**Figure 32**).

Les autres populations immunitaires

Le CAP peut également avoir des effets significatifs sur d'autres populations cellulaires présentes dans le stroma tumoral ³²⁶.

Les DCs, qui sont des APCs jouant un rôle clé dans le traitement et la présentation des antigènes aux cellules T, peuvent devenir immunosuppressives sous l'influence de facteurs sécrétés par les cellules tumorales. Une étude réalisée sur des tumeurs pancréatiques murines a montré que l'exposition au CAP n'affectait pas le nombre de ces cellules immunosuppressives ³⁰⁸. Cependant, une étude *in vitro* a démontré que les DCs étaient plus aptes à phagocyter les cellules cancéreuses pancréatiques traitées indirectement par le plasma, car ces cellules exprimaient et libéraient des DAMPs (*Damage-Associated Molecular*

Patterns), favorisant ainsi la maturation des DCs ³⁰⁹. En outre, il a été démontré que les traitements au CAP augmentent l'infiltration des cellules T dans les tumeurs pancréatiques de souris exposées au PAM. Il a également été suggéré que les RONS dérivés du CAP pourraient réguler à la hausse l'expression du MHC de type I, améliorant ainsi la présentation des antigènes par les cellules cancéreuses. Cela pourrait entraîner une augmentation du nombre de cellules T CD8⁺ intratumorales ^{310,327}.

Tous ces résultats sont liés à l'induction d'un processus appelé mort cellulaire immunogène par le CAP, qui sera exploré plus en détail dans la partie **II.3.4 de ce chapitre** ³²⁸.

Les neutrophiles recrutés dans le MET par les cellules cancéreuses jouent un rôle immunosuppresseur et sont associés à de mauvais résultats cliniques. Ces TANs sont capables de former des pièges extracellulaires de neutrophiles (ou NETs pour *Neutrophil Extracellular Traps*), qui sont des structures composées de chromatine, de MMP-9, d'élastase, de cathepsine G et d'autres protéines intracellulaires. Ces NETs favorisent la progression tumorale et les métastases, car les protéases qu'ils contiennent dégradent la MEC et facilitent l'invasion des cellules cancéreuses ³²⁹. Des études antérieures sur la cicatrisation des plaies ont montré une formation importante de NETs et une sécrétion accrue d'IL-8 dans les neutrophiles humains sains isolés du sang et traités au plasma, ce qui pourrait poser un risque dans le contexte du traitement du cancer ³³⁰.

Quant aux cellules NK et aux lymphocytes, ces deux types cellulaires sont sensibles au traitement par CAP, bien que les cellules NK activées semblent être résistantes ³³¹ (**Figure 32**).

3.2 Impacts du CAP sur les composantes acellulaires du stroma

Outre son impact sur les cellules tumorales, le CAP peut également ralentir la progression tumorale en oxydant ou en dégradant la MEC, une structure protéique qui restreint la pénétration des molécules chimiothérapeutiques et l'infiltration des cellules immunitaires antitumorales.

Des études *in vitro* ont démontré que le CAP pouvait détruire les molécules de collagène I par oxydation des acides aminés et rupture des liaisons hydrogène, entraînant ainsi un relâchement de la structure collagénique ³³². D'autres recherches ont montré que le CAP

inhibait la sécrétion excessive de collagène et la migration cellulaire des fibroblastes chéloïdes, qui, comme les CAFs, surproduisent du collagène³³³. Le CAP peut également dégrader la structure du collagène lors du traitement de la surface de la dentine. Dans des modèles non tumoraux utilisant du matrigel (préparation composée de protéines matricielles qui se polymérise à l'air ambiant), il a été révélé que des doses élevées de RONS issues du CAP perturbent les interactions cellules/MEC et réduisent la formation osseuse, tandis que des doses plus faibles favorisent la différenciation des chondrocytes, la production de VEGF, et la formation osseuse³³⁴. Par ailleurs, deux études cliniques sur l'utilisation du CAP dans le traitement du cancer de la tête et du cou ont montré que la prolifération du tissu conjonctif, induite par le CAP après le traitement des plaies, était associée à une augmentation des dépôts de collagène, ce qui pourrait être lié à l'effet discuté précédemment (**voir partie II.3.1 de ce chapitre** sur les effets du CAP sur les CAFs)^{300,335}.

Ainsi, ces résultats mettent en évidence le potentiel prometteur du CAP dans la déstructuration de la MEC, mais il reste à déterminer si le CAP affecte spécifiquement la structure des fibres de collagène associées à la tumeur (**Figure 32**).

En parallèle, un effet inhibiteur du CAP sur l'adhésion, la migration et l'invasion des cellules tumorales a également été observé. Par exemple, l'expression de certaines intégrines, qui sont des récepteurs de MEC présents à la surface cellulaire, a été réduite après exposition au plasma froid³³⁶. Cela a été démontré dans le cas du mélanome, où l'expression des intégrines $\alpha 2$, $\alpha 4$ ainsi que de la kinase d'adhésion focale (FAK) s'est avérée inhibée³³⁷. Des résultats similaires ont été rapportés dans des cellules cancéreuses cutanées de souris, où une diminution de l'expression des intégrines $\beta 1$ et αv a été observée. De plus, les RONS produits par le CAP peuvent détruire ou oxyder d'autres composants de la MEC, tels que l'acide hyaluronique et la fibronectine, bien que ces mécanismes nécessitent encore des recherches approfondies, en particulier dans un contexte tumoral.

3.3 Impacts du CAP sur les communications cellulaires

L'effet cytotoxique du CAP sur les cellules cancéreuses ne se limite pas à l'interaction directe des RONS avec les cellules cibles, car son impact peut également être observé dans des

cellules situées au-delà du rayon de diffusion des RONS. Ce phénomène peut être attribué à deux mécanismes distincts : l'effet « bystander » (spectateur) et l'effet abscopal ³¹⁹.

L'effet « bystander » confère aux cellules traitées par le CAP la capacité de transmettre des signaux aux cellules voisines non traitées, induisant ainsi des changements biologiques. Ces signaux peuvent être transmis via diverses voies, notamment par des molécules solubles, des jonctions de communication (comme les canaux ioniques, les jonctions lacunaires et les connexines), des jonctions d'occlusion (telles que les jonctions serrées, les claudines et les occludines), ainsi que des jonctions d'ancrage (comme les adhérentes et les desmosomes) ou des vésicules extracellulaires ³¹⁹. L'expression de signaux solubles, tels que des chimiokines, des cytokines et des facteurs de croissance, est directement influencée par le stress oxydatif induit par le CAP, comme démontré dans les cellules cancéreuses et immunitaires ³³⁸. Ainsi, il a été montré que le traitement des cellules humaines de carcinome gastrique par le CAP pouvait entraîner la mort des cellules voisines via la génération secondaire de $^1\text{O}_2$ et l'inactivation de la catalase liée à la membrane ³³⁹. De plus, certaines études ont rapporté que les jonctions lacunaires pouvaient propager des signaux de mort cellulaire en transférant des ions Ca^{2+} des cellules cancéreuses apoptotiques aux cellules voisines non apoptotiques, ce qui pourrait également contribuer à l'effet antitumoral du CAP ³¹⁹. Malgré les preuves croissantes de l'impact fonctionnel des vésicules extracellulaires sur le développement du cancer, en facilitant l'échange de métabolites potentiellement pro-oncogènes entre les cellules tumorales, il reste encore à déterminer si le CAP peut modifier le contenu de ces vésicules sécrétées et ainsi inhiber la progression tumorale.

L'effet abscopal permet aux cellules traitées par le CAP d'initier des réponses dans des cellules éloignées de la zone directement exposée, impliquant ainsi une réponse systémique qui engage le système immunitaire ³⁴⁰. Il a notamment été démontré que le CAP pouvait inhiber la croissance de tumeurs de mélanome situées à distance de la zone traitée chez la souris, suggérant une participation de la réponse immunitaire lors du traitement ³⁰⁴. Cet effet repose sur l'induction d'une mort cellulaire immunogène (ou ICD, pour *Immunogenic Cell Death*) par le CAP, un mécanisme qui sera détaillé dans la section suivante.

Ainsi, le CAP montre de nombreux effets prometteurs en oncologie, non seulement sur les cellules tumorales, mais aussi sur les composantes cellulaires et acellulaires du stroma

tumoral. Les diverses contributions du CAP à l'inhibition de la croissance tumorale sont illustrées dans la **Figure 32**.

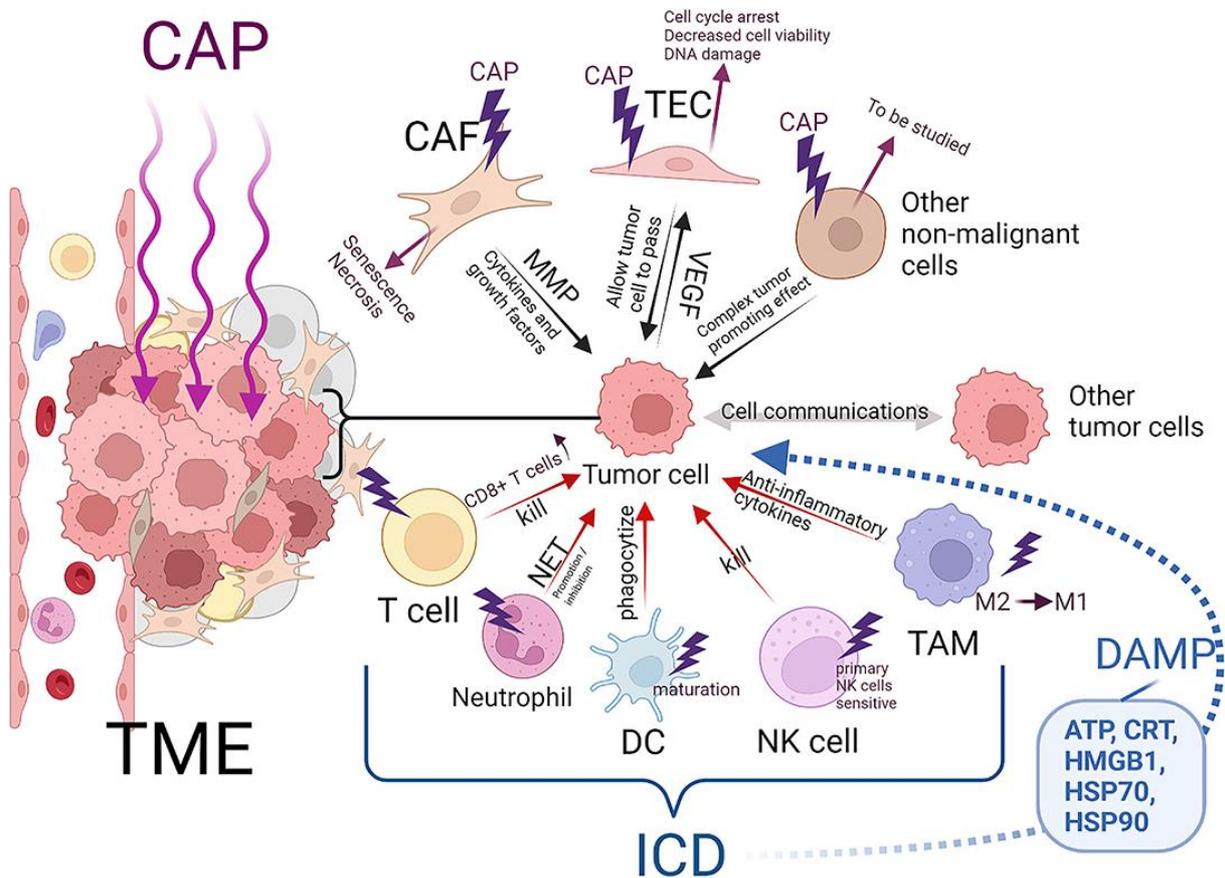


Figure 32 : Effets du CAP sur les cellules non malignes du MET²³¹. Les effets du CAP peuvent impacter à la fois les cellules tumorales, mais peuvent également induire des modifications phénotypiques des populations stromales tumorales, telles que les CAFs, les TECs, les TAMs et les autres populations immunitaires. Il a également été démontré que l'exposition au CAP induisait la mort cellulaire immunogène des cellules tumorales.

3.4 Mise en place d'une mort cellulaire immunogène

La majeure partie des études portant sur l'application thérapeutique du CAP en oncologie ont révélé que l'exposition des tumeurs au CAP induisait un mécanisme systémique appelé mort cellulaire immunogène (ICD)³⁴¹. En effet, après la destruction des cellules tumorales par le plasma froid, une immunité antitumorale systémique se met en place.

Lorsque les cellules tumorales subissent l'ICD, elles expriment divers signaux endogènes, connus sous le nom de DAMPs, qui agissent comme des adjuvants pour faciliter le recrutement et la maturation des cellules immunitaires locales (**Figure 33**)³⁴¹⁻³⁴³. Ces DAMPs

peuvent être sécrétés activement ou passivement par la cellule, ou être transférés de l'intérieur de la cellule vers la membrane cellulaire. Les marqueurs clés de l'ICD associés au traitement par le CAP les plus documentés sont :

- La calréticuline (CRT) : cette protéine résidente du RE est externalisée à la surface de la membrane plasmique (ecto-CRT) après une exposition au CAP. Elle agit comme un signal « mange-moi » (*eat-me signal*), en facilitant la phagocytose des cellules tumorales par les DCs, ce qui déclenche une réponse immunitaire adaptative ;
- L'ATP : libérée par les cellules en cours de mort, l'ATP crée un gradient chimique qui attire les DCs vers le site tumoral, jouant le rôle de signal « trouve-moi » (*find-me signal*). De plus, l'ATP se lie au récepteur purinergique P2Y2 sur les monocytes et macrophages pour faciliter la clairance des cellules apoptotiques. Lorsqu'elle se lie au récepteur P2X7 sur les DCs, elle déclenche la libération d'IL-1 β , essentielle pour l'activation des lymphocytes T ;
- L'HMGB1 (*High Mobility Group Box 1 protein*) : cette protéine nucléaire est libérée dans l'espace extracellulaire grâce à la perméabilisation de la cellule tumorale induite par le CAP. HMGB1 agit comme une « alarmine » en déclenchant la maturation des DCs par sa liaison au récepteur TLR4 (*Toll-Like Receptor 4*) exprimé par les DCs immatures, ce qui active la voie de signalisation MyD88 (*Myeloid Differentiation primary response 88*) et favorise la réponse immunitaire.

D'autres marqueurs de l'ICD incluent la libération de protéines de choc thermique (HSPs), généralement localisées dans le cytosol, le RE, les mitochondries et le noyau. Ces HSPs, en particulier HSP70 et HSP90, agissent comme des signaux d'alerte, activant les cellules immunitaires³⁴¹⁻³⁴³. L'annexine A1, quant à elle, est soit sécrétée, soit exposée à la surface des cellules tumorales durant l'ICD, et guide les DCs vers les cellules cancéreuses mourantes en se liant à son récepteur FPR1 (*Formyl Peptide Receptor 1*). De plus, l'interféron de type I, libéré par les cellules en voie de mourir, stimule les DCs via la signalisation IFNAR (*Interferon Alpha and Beta Receptor*) et induit la sécrétion de CXCL10 par les cellules tumorales, ce qui peut ensuite activer les lymphocytes T dans le MET. Ces marqueurs sont cependant moins étudiés dans les recherches sur l'oncoplasmathérapie. Toutes ces molécules peuvent être exposées ou sécrétées par des cellules subissant des processus comme l'autophagie, le stress du RE, ou encore le stress oxydatif induit par les RONS³⁴⁴.

Une fois activés, les DCs activés migrent vers les ganglions lymphatiques drainant la tumeur, où elles présentent les antigènes tumoraux pour activer les lymphocytes T. Ces derniers se dirigent ensuite vers le site tumoral pour y exercer leurs actions cytotoxiques, principalement par le relargage d'interféron gamma (IFN γ) (**Figure 33**). L'ensemble de ces étapes vise à rétablir une immunité antitumorale et peut être résumé sous le terme de « cancer-immunity cycle »³⁴⁵.

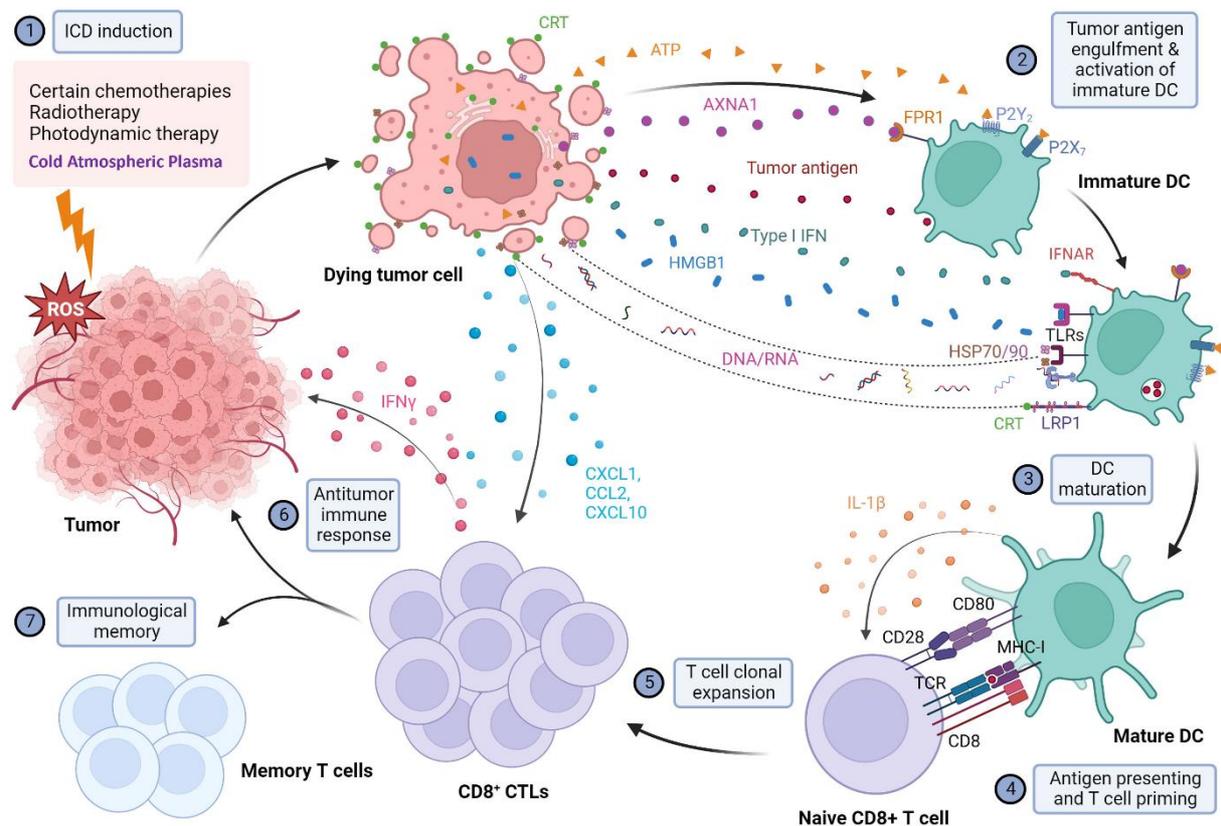


Figure 33 : Mécanisme de la mort cellulaire immunogène et de l'activation de la réponse immunitaire antitumorale³⁴² (modifié). Lorsqu'elles sont exposées à différents inducteurs de l'ICD, les cellules cancéreuses sont soumises à un stress du RE extrême et subissent une ICD. Les cellules tumorales mourantes expriment divers DAMPs, notamment la libération de HMGB1 à partir du noyau, la translocation et l'exposition de la CRT à la surface cellulaire et la sécrétion extracellulaire d'ATP, de cytokines et de chimiokines. L'exposition aux DAMPs sert de signal « trouve-moi » qui recrute des DCs immatures vers le MET et induit la maturation des DCs. Ecto-CRT fournit un signal pro-phagocytaire qui favorise la phagocytose des antigènes par les DCs. De plus, HMGB1 aide à favoriser le traitement de la cargaison phagocytaire en se liant aux récepteurs TLR, augmentant ainsi l'absorption, le traitement et la présentation de l'antigène aux cellules T dans les ganglions lymphatiques drainant la tumeur pour médier la réponse immunitaire spécifique à la tumeur et la mémoire immunologique protectrice. Cela se définit comme étant le « cancer-immunity cycle ». LRP1, *low density lipoprotein receptor-related protein 1* ; CTLs, *cytotoxic T lymphocytes*

De nombreuses études ont montré que la majorité des DAMPs sont libérés à la suite d'une exposition au CAP. Par exemple, l'externalisation de la CRT a été observée par cytométrie en flux, la libération de HMGB1 a été détectée par des tests ELISA, et celle d'ATP par des tests colorimétriques dans divers types de cellules tumorales, notamment celles du cancer du pancréas, du cancer colorectal, du cancer du poumon, et du mélanome ^{268,289,305,309,311,313,314,335}. Une étude de 2024 portant sur l'ostéosarcome a également mis en évidence cette libération de DAMPs, ainsi que l'activation des DCs *in vitro* après un traitement des cellules tumorales avec un PTH ²³⁹. De plus, une augmentation des niveaux de HMGB1 dans le sérum de souris exposées directement au CAP dans un modèle sous-cutané de rhabdomyosarcome a été signalée dans une étude de 2020 ³⁴⁶. Une autre recherche, menée sur un modèle *vivo* de mélanome, a montré une externalisation significative de la CRT à la surface des cellules tumorales, une infiltration accrue de DCs dans la tumeur et le ganglion lymphatique drainant, ainsi qu'une réponse renforcée de l'interféron après exposition au CAP ³⁴⁷. Enfin, des études de séquençage multi-cohortes ont révélé un enrichissement des voies de l'interféron et des cascades des TLR après un traitement au CAP des cellules et tissus tumoraux humains ²⁸⁶.

Cependant, la plupart des études publiées sur l'induction de l'ICD par exposition au CAP sont basées sur des expériences *in vitro* en monoculture ou en co-culture avec des cellules immunitaires. Or, la méthode de référence pour évaluer les thérapies induisant l'ICD repose sur des expériences de vaccination (**Figure 34.A**) ³⁴⁸.

Dans des études précliniques, cette expérience consiste à créer un vaccin composé principalement de cellules tumorales murines mourantes ou mortes (entre 50 et 70 %), traitées *in vitro* par un potentiel inducteur de l'ICD. Ce vaccin est ensuite injecté à des souris syngéniques, tandis que le groupe témoin reçoit une injection de PBS. Une semaine plus tard, les souris des deux groupes sont exposées à des cellules cancéreuses vivantes et non traitées, implantées dans une zone différente du site de vaccination. La croissance tumorale est ensuite suivie attentivement au fil du temps. Si les souris vaccinées montrent une protection accrue contre le développement des tumeurs par rapport au groupe témoin, la thérapie est alors considérée comme un inducteur de l'ICD, capable de stimuler une immunité antitumorale spécifique et systémique (**Figure 34.A**). L'inverse est également possible : implanter d'abord une tumeur chez les animaux, puis injecter le vaccin antitumoral dans une autre zone pour

observer son éventuel impact sur la croissance tumorale. Pour que le test de vaccination soit concluant, il est crucial que les cellules cancéreuses injectées soient complètement inactivées et incapables de former des tumeurs au site de vaccination. Ainsi, très peu d'études ont démontré *in vivo* l'induction d'une ICD par une expérience de vaccination : une étude publiée en 2018 a montré cette induction dans un modèle murin de cancer colorectal (**Figure 34.B**), en utilisant la cisplatine comme contrôle négatif ³¹³, et deux autres études de 2019 et 2020 l'ont démontrée dans un modèle murin de mélanome ^{289,349}.

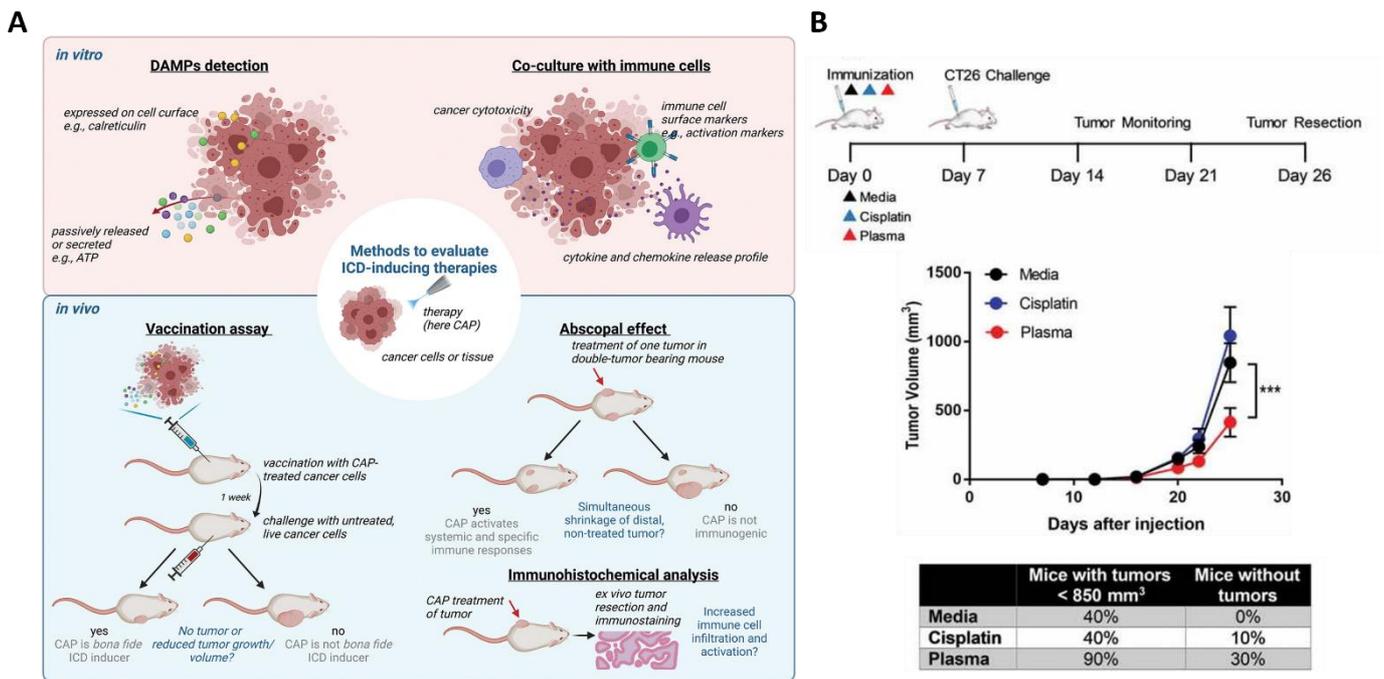


Figure 34 : Différentes méthodes *in vitro* et *in vivo* de caractérisation de l'ICD et résultats obtenus dans le cancer colorectal dans une étude *in vivo* (modifié). A. La caractérisation de l'ICD induite par le CAP peut se faire *in vitro* en détectant les DAMPs caractéristiques de ce procédé ou via des co-cultures avec des cellules immunitaires, mais la méthode de référence reste tout de même le test de vaccination *in vivo* ²⁴⁰. **B.** Résultats obtenus lors du test de vaccination par le CAP dans un modèle murin de cancer colorectal ³¹³. Le design de l'expérience est montré, avec trois groupes de souris : un groupe contrôle (*Media*), un groupe vacciné avec des cellules traitées à la cisplatine (contrôle négatif) et un groupe vacciné avec des cellules traitées au CAP. On constate ainsi que la vaccination avec les cellules traitées au CAP a pour conséquence une croissance tumorale limitée (volume tumoral significativement réduit par rapport au contrôle), et que ces souris présentent moins de tumeurs (30 % des souris vaccinées au CAP ne montrent pas de tumeurs, contre 0 % pour le groupe contrôle).

D'autres effets thérapeutiques peuvent également être considérés comme des indicateurs de la capacité du CAP à induire une ICD, tels que l'activation et l'infiltration accrues de cellules immunitaires dans la tumeur traitée, ainsi que l'immunomodulation et les effets abscopaux. L'effet abscopal fait référence à l'inhibition de la croissance d'une tumeur non exposée au

CAP, suite à l'exposition d'une autre tumeur située à distance au plasma froid (**Figure 34.A**). Cet effet est probablement dû à l'induction de l'ICD dans la tumeur traitée, ce qui favorise la présentation des antigènes et l'activation du système immunitaire adaptatif, capable ainsi de reconnaître et de cibler des tumeurs distantes non traitées. Ce phénomène a été notamment démontré dans un modèle murin de cancer du sein ³⁵⁰. De plus, même le traitement de tissus normaux avec du CAP a conduit à une réduction du carcinome colorectal à distance chez la souris ³⁵¹.

Ainsi, le CAP montre un potentiel thérapeutique important pour le traitement du cancer, car il serait capable de lever l'immunosuppression en activant des populations immunitaires antitumorales via la voie de l'ICD.

4. Perspectives d'étude possibles en oncoplasmathérapie

4.1 Sensibilisation de la tumeur aux médicaments

Bien que le CAP seul montre des effets prometteurs sur la progression tumorale, de nombreuses études récentes se sont orientées vers des approches combinatoires en oncologie. Ces recherches investiguent l'utilisation du CAP en combinaison avec d'autres agents thérapeutiques pour augmenter la sensibilité des cellules ou des tissus cancéreux à la cytotoxicité des médicaments. Bien que les mécanismes par lesquels le CAP pourrait surmonter la résistance aux médicaments dans les cellules tumorales ne soient pas encore complètement compris, certaines preuves suggèrent son efficacité dans ce domaine.

Le CAP a tout d'abord démontré des effets antitumoraux renforcés lorsqu'il est utilisé en combinaison avec des chimiothérapies dans divers types de tumeurs ^{230,352}.

Le glioblastome, un cancer du cerveau particulièrement agressif, est notoirement résistant aux traitements chimiothérapeutiques ³⁵³. Des études menées sur des modèles murins de glioblastome ont montré que le CAP pourrait améliorer l'efficacité thérapeutique du témozolomide, un agent chimiothérapeutique de première ligne couramment utilisé pour traiter ce cancer. En effet, l'utilisation du CAP en combinaison avec ce médicament inhibe la croissance tumorale de manière dose-dépendante, en induisant des dommages à l'ADN *in vitro* dans des lignées humaines de glioblastome, qu'elles soient sensibles ou résistantes au

témazolomide ^{266,354}. Cet effet a également été observé dans des modèles de sphéroïdes 3D de glioblastome sensibles et résistants à la chimiothérapie ³⁵⁵. Il est important de noter que ces résultats ont été reproduits dans des tumeurs intracrâniennes chez la souris, avec un traitement chimiothérapeutique de faible dose ³⁵⁶. Des résultats similaires ont été observés avec la doxorubicine, un agent chimiothérapeutique largement utilisé pour traiter diverses tumeurs, notamment les sarcomes, la leucémie aiguë lymphoblastique/myéloblastique, le neuroblastome, ainsi que les cancers du sein et du poumon. Cependant, la doxorubicine est associée à une toxicité systémique importante et à l'apparition de clones tumoraux résistants après son administration ³⁵⁷. Étant donné que cette chimiothérapie induit un stress oxydatif dans les cellules cancéreuses, certaines études ont proposé d'utiliser le CAP comme source secondaire de RONS pour submerger les défenses antioxydantes des cellules tumorales en combinaison avec ce médicament. Ces recherches ont démontré un effet synergique cytotoxique puissant dans différents types de tumeurs, tels que le sarcome ³⁵⁸, le cancer du sein ³⁵⁹, le mélanome ²⁹⁷ et le cancer métastatique des os ³⁶⁰. En effet, la combinaison des deux thérapies entraîne une augmentation de l'absorption de la doxorubicine par les cellules tumorales, en régulant à la baisse les défenses antioxydantes (CAT1, SOD2, GPX1) et en réduisant l'expression des pompes d'efflux de médicaments (ABCC1, ABCB1, ABCG2) associées à la résistance à la doxorubicine. Cet effet a également été observé dans un modèle 3D de cancer de la prostate ³⁶⁰. Un autre exemple notable est celui de la cisplatine, un autre médicament anticancéreux couramment utilisé pour traiter de nombreuses tumeurs solides. Tout comme les résultats prometteurs obtenus avec la doxorubicine, la combinaison du CAP et de la cisplatine a démontré un puissant effet synergique dans le traitement du cancer de la tête et du cou, sans nuire aux cellules fibroblastiques saines ³⁶¹. Cette étude a ainsi prouvé qu'il est possible de réduire la durée d'exposition au CAP et la concentration de cisplatine tout en maintenant des effets synergiques prometteurs qui éliminent les cellules cancéreuses sans affecter leurs homologues saines. De même, dans le CHC, il a été montré que le CAP renforçait l'effet de la cisplatine en induisant sélectivement la mort cellulaire dans les sous-populations de CHC avec des caractéristiques de cellules souches, souvent associées à une plus grande résistance à la chimiothérapie, mais pas celle des cellules hépatiques saines ³⁶².

Avec l'essor de l'immunothérapie, des recherches récentes ont examiné l'efficacité thérapeutique de la combinaison du CAP avec des inhibiteurs des points de contrôle immunitaire.

Une étude publiée en 2024 a révélé des effets synergiques entre le CAP et un inhibiteur du point de contrôle immunitaire PD-1. En utilisant un modèle murin syngénique de cancer de la tête et du cou, il a été montré que la combinaison des deux traitements ralentissait la croissance tumorale de manière plus marquée que l'utilisation individuelle de chacune des thérapies. Cette approche combinée a significativement amélioré la survie globale des souris, en favorisant une infiltration accrue de lymphocytes T CD4⁺ et T CD8⁺ dans la tumeur ²⁶⁰. De plus, une autre étude publiée en 2020 a exploré cet effet synergétique dans un modèle murin ectopique de mélanome ³⁶³. Le CAP a été administré à l'aide de micro-aiguilles pour favoriser la pénétration transdermique des composants plasmatiques. La combinaison du CAP avec un anti-PD-1 a ainsi conduit à un ralentissement notable de la croissance tumorale par rapport aux thérapies administrées séparément. Cette approche combinée a également entraîné une augmentation de l'infiltration des cellules immunitaires antitumorales (lymphocytes T CD8⁺) et une réduction significative des cellules Tregs immunosuppressives. Les cellules antitumorales présentaient un métabolisme cytotoxique renforcé, avec une sécrétion accrue de granzyme B et d'IFN γ . L'étude a également révélé un effet abscopal de la combinaison thérapeutique. De plus, l'utilisation de micro-aiguilles perforant l'épiderme a renforcé les effets thérapeutiques du CAP seul, sans provoquer d'effets notables sur la peau des souris. Enfin, une autre recherche publiée en 2023 a examiné cette combinaison dans le même modèle de mélanome, mais cette-fois-ci, les effecteurs du plasma et l'inhibiteur de PD-1 étaient administrés localement sous forme de gel ³⁶⁴. Cette étude a montré que l'emploi du gel permettait de concentrer les effets de la combinaison thérapeutique sur la tumeur, sans altérer d'autres organes comme le cœur, les poumons ou le foie. L'utilisation d'un anti-PD-1 bioluminescent a permis de suivre sa biodistribution, révélant que le gel ciblait exclusivement la tumeur. Grâce aux injections intratumorales de ce gel, une infiltration accrue des cellules immunitaires antitumorales a été observée dans la tumeur (TAMs de type « M1-like », lymphocytes T CD8⁺), accompagnée d'une diminution des populations immunosuppressives telles que les macrophages de type « M2-like ». Un effet abscopal a également été mis en évidence dans cette recherche.

Le CAP peut aussi être associé à d'autres agents thérapeutiques. Par exemple, il a été démontré que la combinaison du CAP avec le tréhalose, un disaccharide naturel induisant la phosphorylation de eIF2 α et donc le stress du RE, entraîne une croissance tumorale diminuée et une infiltration accrue de cellules immunitaires antitumorales dans un modèle murin de cancer colorectal ³⁶⁵. Ces effets sont encore renforcés par l'ajout d'un inhibiteur de PD-1, la combinaison triple montrant un effet abscopal significatif dans ce modèle. D'autres études *in vitro* ont également exploré la combinaison du CAP avec des nanoparticules, qu'elles soient chargées d'un agent chimiothérapeutique ou activées par photodynamique ³⁶⁶⁻³⁶⁸. Il a été constaté que cette combinaison limitait l'expression de gènes associés aux métastases et favorisait les processus de mort cellulaire.

Une étude publiée en 2023 est la seule à avoir examiné la possibilité de développement d'une résistance aux expositions répétées au CAP ³⁶⁹. Cette recherche, réalisée dans un modèle *in vitro* de mélanome, a révélé que les cellules exposées de manière continue au CAP développaient une résistance au fil des ensemencements. Elle a aussi montré que ces cellules résistantes avaient une préférence pour la glycolyse aérobie et étaient plus sensibles à la peroxydation lipidique et à la ferroptose. Cependant, la question de la résistance potentielle des cellules tumorales au CAP reste ouverte et nécessite encore des investigations approfondies.

Ainsi, l'utilisation du CAP comme traitement locorégional offre la possibilité de sensibiliser les tumeurs aux traitements chimiothérapeutiques ou immunothérapeutiques, renforçant ainsi leur effet antitumoral. Aucune étude publiée sur l'oncoplasmathérapie n'a signalé d'effets secondaires associés au CAP pour le moment. Par exemple, dans un modèle immunodéficient de CCA, l'utilisation du CAP n'a pas influencé les taux sériques des transaminases hépatiques, confirmant ainsi son innocuité au niveau systémique ²⁴⁷. Cette approche combinatoire présente un intérêt clinique majeur, car elle pourrait permettre de réduire les doses nécessaires de médicaments anticancéreux, atténuant ainsi les effets secondaires indésirables des thérapies systémiques. De plus, l'utilisation du CAP pourrait résoudre certains problèmes liés à l'immunothérapie en activant les cellules immunitaires par le biais de la voie de l'ICD.

4.2 Avancée vers la clinique ?

À ce jour, trois études cliniques ont été menées sur le traitement CAP chez des patients atteints de cancer. Les deux premières, pionnières en oncoplasmathérapie, se concentrent sur le traitement locorégional du cancer de la tête et du cou. La troisième, qui représente la première étude clinique de phase I approuvée par la FDA dans ce domaine, a impliqué une cohorte de patients atteints de diverses tumeurs, dont un atteint de CCA métastasé.

Les deux premières études, impliquant respectivement des cohortes de six et douze patients, ont utilisé le dispositif breveté kINPen® MED dans un contexte de traitement palliatif ^{236,300,335}. Le protocole consistait en des cycles de trois séances de traitement par semaine, suivis d'une semaine sans exposition au CAP. Le CAP a été appliqué en scannant la zone tumorale pendant 1 à 3 minutes par cm² de surface, à une distance de 8 mm au-dessus du tissu humide. Pour les patients présentant de grandes ulcérations dépassant 30 cm², la durée totale du traitement dépassait 30 minutes. Ces études ont révélé que le traitement CAP avait des effets bénéfiques, notamment une réduction de la viabilité des populations bactériennes dans les ulcères infectés, une diminution des mauvaises odeurs dues à la nécrose des tissus ainsi qu'une réduction des besoins en analgésiques. De plus, une observation approfondie a montré une rémission partielle chez deux patients pendant au moins neuf mois (**Figure 35**). Les cellules tumorales prélevées des tumeurs traitées étaient d'ailleurs plus apoptotiques. Cependant, certains effets secondaires ont été observés après l'exposition au CAP, tels que de la fatigue, un goût désagréable dans la bouche, des douleurs mineures, et parfois des saignements au niveau de la zone traitée.

Ces deux études ont ainsi démontré que le CAP a été globalement bien accueilli en tant que nouvelle approche palliative, et qu'il montre un potentiel prometteur en oncologie. Cependant, elles sont sujettes à des critiques sur le plan statistique en raison du nombre limité de patients inclus. De plus, les patients présentaient des tumeurs très avancées, ce qui pourrait les rendre potentiellement moins réceptifs au traitement plasma.

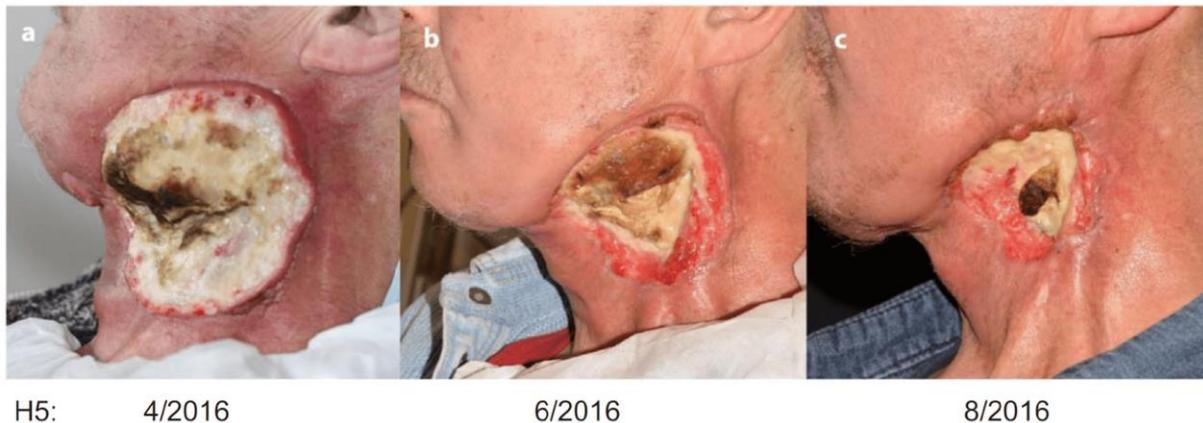


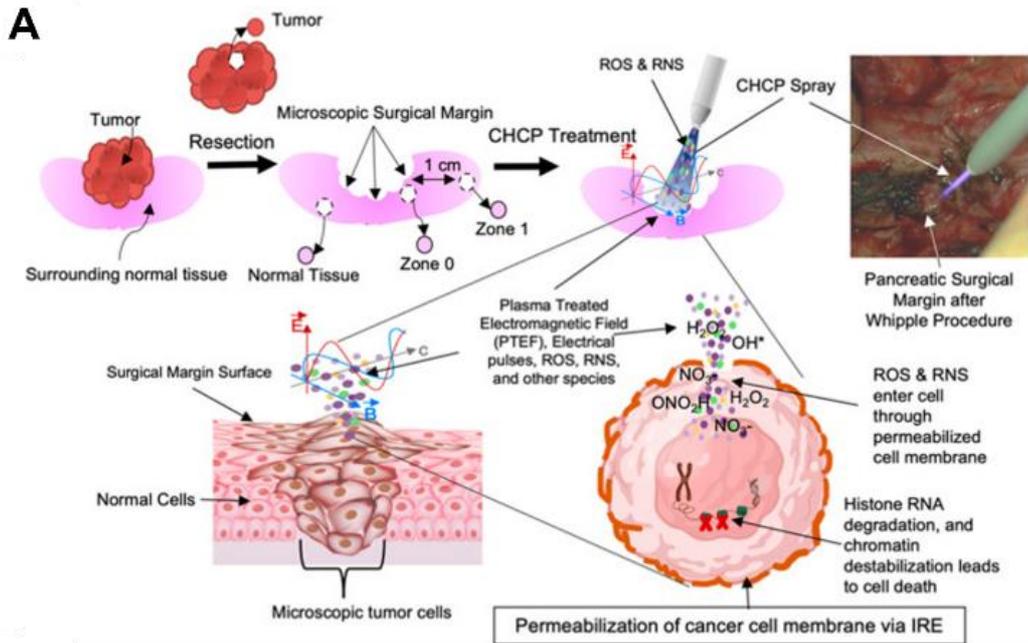
Figure 35 : Évolution de la tumeur d'un patient atteint d'un cancer de la tête et du cou et soumis à des expositions de CAP³⁰⁰. Les photos ont été prises au cours du temps le long de l'année 2016. On voit bien la diminution de la masse tumorale sur ce patient.

Une autre étude, menée entre Mars 2020 et Avril 2021 et dont les résultats ont été publiés l'an dernier, constitue le premier essai clinique de phase I approuvé par la FDA pour l'utilisation du CAP en oncologie (NCT04267575)²³⁷. Dans cette étude, vingt patients atteints de tumeurs solides de stade IV ou récurrentes (cancer colorectal, CHC, mésothéliome, poumon, et CCA, entre autres) ont subi une résection chirurgicale combinée à un traitement peropératoire au CAP, utilisant un dispositif breveté nommé Canady Helios. Le traitement CAP a été appliqué directement au niveau du site d'implantation de la tumeur (zone 0) ainsi qu'à une zone marginale située à 1 cm de celle-ci (zone 1) pour prévenir toute récurrence pouvant provenir des cellules tumorales résiduelles (**Figure 36.A**). Des prélèvements histologiques ont été effectués à partir de la tumeur, des zones 0 et 1, ainsi que du tissu normal environnant, et ont été traités au CAP *ex vivo* pour évaluer les effets antitumoraux du CAP et démontrer son innocuité sur les tissus sains.

Les résultats ont montré que le CAP n'avait aucun impact sur les données physiologiques peropératoires et n'a provoqué aucun effet indésirable associé. Les taux de réponse globale à 26 mois pour les patients avec résection R0 et ceux avec résection R0 avec marge microscopique (R0-MPM) étaient respectivement de 69 % et 100 %. Les taux de survie à 28 mois pour les patients R0, R0-MPM, R1 et R2 étaient respectivement de 86 %, 40 %, 67 % et 0 % (R étant le degré de réussite de la résection chirurgicale : R0 signifie une résection complète avec des marges de sécurité de tissu sain, et R2 désigne une résection microscopiquement incomplète). Le taux de survie globale cumulé était de 24 % à 31 mois. Les études

histologiques, utilisant la coloration à l'hématoxyline et à l'éosine, ont montré que le CAP induisait la mort cellulaire dans 15 échantillons sur 15, sans provoquer de dommages histologiques ou thermiques dans les tissus normaux (0 échantillon sur 15). Parmi les patients, cinq sur neuf présentaient des cellules tumorales dans la zone 0, et aucun patient sur six n'en présentait dans la zone 1 (**Figure 36.B**). La culture primaire *ex vivo* des échantillons de patients a révélé que la survie des cellules tumorales traitées par le CAP était significativement réduite dans 80 % des cas par rapport aux tissus tumoraux non traités : aucune cellule cancéreuse n'a survécu dans 30 % des cas, et un nombre significativement réduit de cellules a survécu dans 50 % des cas. Le traitement CAP des cellules tumorales a induit des processus apoptotiques ainsi qu'un stress oxydant, entraînant la perte du marqueur de cellules souches CD44. Cependant, dans 20 % des cas, le CAP n'a pas réduit de manière significative la survie des cellules cancéreuses, en raison de doses de traitement sous-optimales.

Ainsi, cet essai clinique a mis en évidence des résultats très prometteurs concernant l'utilisation du plasma en oncologie. Le traitement CAP associé à la chirurgie s'est révélé sûr, sélectif envers les cellules tumorales, et a démontré un contrôle exceptionnel de la progression tumorale. Une étude préclinique publiée en 2021 a également exploré l'association de la chirurgie avec des expositions au CAP. Les résultats ont montré que le traitement local des cellules tumorales résiduelles dans les cavités chirurgicales par le CAP induisait significativement la mort de ces cellules, tout en contribuant à l'activation du système immunitaire antitumoral, conduisant ainsi à une prolongation significative de la survie globale des animaux ³⁷⁰. L'ensemble de ces résultats souligne le potentiel intérêt du plasma froid en clinique.



B

	UNTREATED	CHCP-TREATED
Tumor		
Zone 0		
Zone 1		
Normal		

Figure 36 : Procédure expérimentale et résultats histologiques de la première étude clinique de phase I approuvée par la FDA sur l'utilisation du CAP en oncologie ²³⁷ (modifié). A. Description schématisée de la chirurgie et de la procédure de traitement au CAP : résection de la tumeur à l'aide de procédures chirurgicales standard, collecte d'échantillons (tumeur, zone 0, zone 1 et tissu normal) et application du CAP (CHCP, *Canady Helios Cold Plasma*) sur la marge chirurgicale, qui est illustrée avec une photographie (IRE, *Irreversible Electroporation*). **B.** Colorations à hématoxyline et à l'éosine des échantillons de tissu tumoral, de la zone 0, de la zone 1 et normal d'un patient inclus dans cette étude clinique, avec ou sans traitement CAP. Les flèches noires et les flèches jaunes indiquent respectivement les cellules tumorales non traitées et les cellules tumorales traitées mortes.

Ainsi, le plasma froid atmosphérique, quatrième état de la matière généré par l'ionisation partielle d'un gaz à basse température, s'est révélé prometteur dans le traitement du cancer. Bien qu'une multitude de dispositifs et de méthodes de traitement existent au sein de la communauté plasma, la majorité des études montre des effets similaires sur diverses tumeurs. Le CAP dérégule la balance oxydative des cellules malignes, induit des processus de mort cellulaire, et provoque des modifications phénotypiques notables du MET, renforçant ainsi son effet antitumoral. En outre, il est capable d'activer le système immunitaire antitumoral et montre des résultats encourageants lorsqu'il est utilisé en combinaison avec d'autres thérapies, ce qui constitue une véritable avancée dans les traitements actuels contre le cancer. Étant donné que les cellules tumorales sont plus sensibles au stress oxydant induit par le CAP que les cellules saines, ce dernier représente un intérêt considérable en oncologie.

HYPOTHÈSES ET OBJECTIFS

Hypothèses et objectifs

Le CCA est un cancer au pronostic défavorable, avec un arsenal thérapeutique limité. À ce jour, la résection chirurgicale constitue la seule option curative disponible, mais elle n'est applicable qu'à un nombre restreint de patients et offre des chances de survie relativement faibles (survie de 5 ans de 30 %) en raison d'un diagnostic généralement tardif. Parallèlement, les patients non éligibles à l'ablation de la tumeur sont soumis à des traitements chimiothérapeutiques et immunothérapeutiques auxquels ils répondent généralement mal. Cette résistance aux thérapies antitumorales peut s'expliquer, en partie, par la présence d'un stroma desmoplasique dense et fibreux, qui forme une barrière physique limitant la pénétration des molécules thérapeutiques. Représentant près de 2 % de la mortalité annuelle mondiale par cancer et avec une incidence en augmentation, il est donc impératif de développer de nouvelles options thérapeutiques pour freiner la progression du CCA, et notamment des traitements locaux capables de cibler non seulement les cellules tumorales, mais aussi leur microenvironnement.

C'est de ce constat qu'est née une collaboration étroite entre le Centre de Recherche Saint-Antoine (CRSA) et le Laboratoire de Physique des Plasmas (LPP), avec pour objectif commun d'explorer l'utilisation du CAP en tant que nouvelle thérapie locorégionale potentielle pour le traitement du CCA. Cette synergie entre biologistes et physiciens a conduit à la publication d'un article scientifique en 2020, dans lequel un effet antitumoral significatif du CAP a été démontré dans un modèle murin immunodéficient de CCA ²⁴⁷. Sur le plan mécanistique, il a été montré que le stress oxydant induit par le CAP déclenchait des processus apoptotiques, tant *in vivo* qu'*in vitro*, sans toutefois affecter la viabilité des cellules saines. De plus, il a été suggéré que les effets antitumoraux du CAP pourraient également résulter de possibles remodelages du stroma tumoral.

C'est donc à partir de ces observations qu'a émergé l'hypothèse selon laquelle le CAP pourrait exercer un effet direct sur les cellules tumorales en induisant une mort cellulaire immunogène, tout en ayant également des effets indirects sur la tumorigenèse par le biais de modifications phénotypiques des cellules stromales, en particulier des CAFs, des TECs et des cellules immunes.

À la suite de cette publication, le désir de créer et de breveter un nouveau dispositif plasma est également apparu, correspondant à une version miniaturisée de celui utilisé dans l'étude précédente (nommé Plasma Tesla Jet). En effet, le CRSA et le LPP envisagent une utilisation endoscopique du CAP, permettant ainsi de traiter les patients directement *in situ* en clinique.

Première étude :

Le premier objectif de cette thèse, qui est au cœur de ce doctorat, est d'étudier les effets antitumoraux de ce nouveau dispositif endoscopique, dénommé « cathéter à plasma », dans des modèles *in vitro* et *in vivo* de CCA. Cette recherche se concentre sur les impacts du CAP non seulement sur les cellules tumorales, mais aussi sur les cellules stromales. Démontrer l'applicabilité et la faisabilité biologique de ce nouveau dispositif à plasma constitue également un objectif de cette étude.

Deuxième étude :

Un autre objectif de ce doctorat est de démontrer la faisabilité et la sécurité de l'utilisation de ce nouveau dispositif à plasma en endoscopie. Ce travail, principalement axé sur des concepts physiques et d'ingénierie et essentiellement porté par les physiciens, vise à évaluer les performances et les limites de l'endoscopie au plasma froid en termes de sécurité pour le patient et le clinicien. Pour ce faire, des modèles couramment utilisés par les endoscopistes, tels que des modèles porcins, ont été employés.

Troisième étude :

Parallèlement, avec l'émergence de nouveaux dispositifs à plasma plus portables et moins encombrants, une autre perspective de ce doctorat est d'étudier les effets antitumoraux d'un nouveau dispositif portatif, appelé « plasma piézoélectrique », sur des modèles *in vitro* de CCA. L'un des objectifs de ce projet est de différencier les effets physiques du plasma, principalement le champ électrique, de ses composantes chimiques.

TRAVAUX DE RECHERCHE

Résultats obtenus au cours de la thèse

Article 1 : Preventing Cholangiocarcinoma Progression via a stromal dysregulation and an immune infiltration triggered by Cold Atmospheric Plasma

Article en préparation

L'objectif de cette étude est de démontrer l'applicabilité et la faisabilité biologique du cathéter à plasma, ainsi que d'évaluer ses effets antitumoraux dans des modèles *in vitro* et *in vivo* de CCA. La caractérisation physicochimique de la source plasma a confirmé la génération de RONS caractéristiques des plasmas froids et la possibilité d'utiliser ce dispositif en milieu liquide sur les cellules en culture, ainsi qu'*in vivo* sur un modèle syngénique sous-cutané de CCA, sans effets indésirables liés à la température. Pour les études *in vitro*, des modèles cellulaires de CAFs et de TECs ont été utilisés pour examiner les modifications phénotypiques induites par l'exposition au CAP. L'utilisation de modèles 3D, tels que des sphéroïdes, a révélé des signatures immunogènes déclenchées par le traitement au plasma froid. *In vivo*, des résultats préliminaires ont montré un effet antitumoral du CAP sur les tumeurs sous-cutanées de CCA, accompagné d'un infiltrat immunitaire antitumoral. D'autres expériences sont nécessaires pour approfondir l'étude de ces effets antitumoraux, notamment sur la dureté de la tumeur, la vascularisation et l'infiltrat immunitaire. De plus, l'induction d'une ICD a été confirmée par une expérience de vaccination prophylactique sur notre modèle tumoral, et les mécanismes de ce processus ont été prouvés *in vitro* sur des lignées humaines de CCA. Enfin, une nouvelle approche thérapeutique utilisant le CAP et basée sur des vaccinations, a été proposée, et un effet antitumoral associé à une infiltration accrue de cellules immunitaires a été observé.

Ainsi, cette étude a démontré que le CAP exerce des effets antitumoraux à la fois sur les cellules tumorales, mais également au travers des populations stromales. L'induction de l'ICD et ses mécanismes ont également été prouvés. Cependant, les études *in vivo* nécessitent encore des compléments et sont en cours de réalisation.

Preventing Cholangiocarcinoma Progression via a stromal dysregulation and an immune infiltration triggered by Cold Atmospheric Plasma

Allan Pavy¹, Manon Soulier², Mirko Minini¹, Bouchra Lekbaby¹, Marion Janona¹, Lynda Aoudjehane^{3,4}, Henri Decauchy², Korentin Geraud², Haquima El Mourabit¹, Romain Morichon⁵, Jérémy Augustin^{6,7}, Jonathan Pol⁸, Thierry Dufour² & Laura Fouassier¹

¹ Sorbonne Université, Inserm, Centre de Recherche Saint-Antoine (CRSA), Paris, France

² LPP, UMR 7648, Sorbonne Université, CNRS, Ecole Polytechnique, Paris, France

³ ICAN BioCell-Human Liver Biology core, IHU- Foundation for innovation in Cardiometabolism and Nutrition (IHU-ICAN), F-75013 Paris, France

⁴ Sorbonne Université, INSERM, UMRS 1166/IHU-ICAN, F-75013, Paris, France

⁵ CRSA Cytométrie Imagerie Saint-Antoine, Sorbonne Université, 75012 Paris, France

⁶ Department of Pathology, Henri Mondor University Hospital, Assistance Publique - Hôpitaux de Paris, Créteil, France

⁷ INSERM U955 Team 18, Université Paris Est Créteil - Faculté de Médecine, Créteil, France

⁸ Centre de Recherche des Cordeliers, Inserm, Université de Paris, Sorbonne Université

Corresponding author

Laura Fouassier, Ph.D.

CRSA, Sorbonne Université, Faculté de Médecine, Site Saint-Antoine,

27 rue Chaligny, 75571 Paris cedex 12, France.

E-mail: laura.fouassier@inserm.fr Phone: +33-698 774 001

ABSTRACT

Cholangiocarcinoma (CCA) is a cancer with a poor prognosis and limited therapeutic options. With an increasing incidence and accounting for 2 % of global cancer mortality, it is crucial to develop new therapies, including local treatments targeting tumor cells and their microenvironment, for the treatment of this cancer. In this line, Cold atmospheric plasma (CAP), a source of cell-damaging reactive oxygen and nitrogen species (RONS), appeared as a novel promising antitumor approach. This research explored the antitumor effects of a custom-made plasma source on *in vitro* and *in vivo* models of CCA, distinguishing the direct effects of plasma on tumor cells from indirect effects on tumorigenesis, mediated by phenotypic modifications of stromal cells, including cancer-associated fibroblasts (CAFs) and tumor endothelial cells (TECs). The results revealed pleiotropic antitumor effects of CAP, which was capable of modulating both the immunogenicity of tumors and also their

desmoplastic stroma, highlighting the fact that CAP should be recognized as a promising antitumor therapy. A new approach in the utilization of CAP in oncology and based on antitumor vaccinations was also proposed in this research.

INTRODUCTION

Cholangiocarcinoma (CCA) is a rare tumor of the bile ducts that can develop at any point along the biliary tree ¹. As the second most common malignant liver tumor, CCA is divided into intrahepatic (10-20 %) and extrahepatic (80-90 %) types. Despite advancements in detection and diagnosis, the incidence of CCA is rising globally, and its prognosis remains poor. The early stages of CCA are often asymptomatic, complicating its diagnostic and treatment. This tumor's aggressive nature hinders the effectiveness of the only curative option, surgical resection, which is feasible in only 25 % of cases. For patients ineligible for surgery, the standard first-line treatment involves palliative chemotherapy (GEMCIS) combined with immunotherapy (Durvalumab). Second-line treatments primarily consist of chemotherapy (FOLFOX) and targeted therapies ^{2,3}. However, the therapeutic options for this highly desmoplastic tumor are limited and have only moderate efficacy. It is therefore urgent to develop new therapeutic strategies, in particular local treatments targeting both the tumor and its microenvironment, which plays a crucial role in cancer progression.

Cold atmospheric plasma (CAP) is a partially ionized gas that can be generated in ambient air and which shows great potential in medicine, especially in oncology ⁴. This promising technology produces high levels of reactive oxygen and nitrogen species (RONS) and displays distinct physical properties (electric, radiative, and thermal) that can interact effectively with biological samples. Over the past fifteen years, the growing interest in using CAP for cancer treatment has led to the development of various plasma source configurations, which have been tested across a range of preclinical cancer models, whether *in vitro*, *in ovo* or *in vivo* ⁴⁻⁶. Two types of plasma sources are commonly used: dielectric barrier discharges (DBD) and atmospheric pressure plasma jets (APPJ). Both have shown promising results in oncology, indicating their potential to trigger cell death and inhibit tumor growth ⁷. The main benefit of CAP over chemotherapy remains in its absence of systemic side effects and its selective action on malignant cells ⁴. Even if recent studies have highlighted promising synergistic effects when

combining CAP with immunotherapy^{8,9}, there are still obstacles in implementing plasma treatments in clinical settings. In 2023, the results of the first FDA-approved clinical trial using CAP in oncology were published, but the trial involved an invasive intraoperative CAP treatment of tumor sites¹⁰. This highlights the need to develop endoscopic plasma sources to provide new treatment options.

Furthermore, the current literature on the effects of CAP on the stromal populations remains limited¹¹. Cancer-associated fibroblasts (CAFs), tumor-endothelial cells (TECs), and immune cells are crucial contributors to cancer progression. CAFs produce a dense extracellular matrix (ECM) that impedes the penetration of chemotherapeutic agents into the tumor, TECs facilitate tumor vascularization and metastasis, and immune cells play a role in preventing the immune system from recognizing and attacking tumor cells.

Our research work explored the therapeutic efficiency of a plasma catheter engineered at laboratory and that can be inserted into the operating channel of a duodenoscope in order to achieve plasma-assisted endoscopic retrograde cholangiopancreatography (PA-ERCP)¹². Here, the device has been utilized as part of *in vitro* and *in vivo* experiments to investigate its therapeutic efficiency on both tumor and stromal components of CCA. The study first demonstrated the biological feasibility of the plasma catheter, focusing on its chemical and thermal properties. Then, it focused on the phenotypic changes induced by CAP-derived oxidative stress on stromal cells, particularly CAFs and TECs. Finally, we have highlighted the effects of CAP on the desmoplastic stroma and the potential recruitment of immune cells to the tumor site *in vivo*. Since the ability of plasma to induce immunogenic cell death (ICD) and attract immune cells to the tumor site has been established in numerous studies¹³⁻¹⁵, this aspect was also analyzed in both *in vivo* and *in vitro* settings. Finally, the study proposed a novel cancer treatment approach based on the injection of CAP-generated vaccines.

MATERIALS & METHODS

1. Cold atmospheric plasma

1.1 Plasma setup

The endoscopic plasma source has been engineered as a flexible dielectric barrier capillary device, 1 meter in length, 2 mm in inner diameter and 3 mm in outer diameter. This capillary contained a long electrode in copper, totally sheathed by a dielectric layer, so that the resulted embedded electrode presented a diameter as low as 1 mm. Then, helium gas was injected in the capillary at 1 slm while the electrode was powered by a high voltage generator (Nanogen1 model from French RLC company) at an amplitude of 7.7 kV, repetition frequency of 5 kHz and duty cycle of 1 %.

The physico-chemical characterizations of the plasma phase have been achieved in *in vitro* conditions, i.e. while the plasma plume was interacting with the liquid interface either in 24-well or 6-well culture plates. 24-well plates were filled with 700 μ L of culture medium, and 6-well plates with 2 mL. For all plasma treatments, the device was fixed on a holder so as to maintain a 5-10 mm gap between the distal end of the plasma source and the liquid interface of the culture medium.

1.2 RONS production

In plasma phase

The emissive species from the cold plasma phase have been identified using an optical emission spectrometer (OES – Andor SR-750-B1-R) operating in Czerny Turner configuration, with a focal length of 750 mm, a 1 200 grooves mm^{-1} grating, blazed at 500 nm. This device was coupled to an ICCD camera (Andor Istar DH340T) and an optical fiber (Leoni fiber optics SR-OPT-8014) of 100 μ m diameter. Measurements were taken perpendicularly to the plasma plume, and optical plasma emission was collected using a lense collimator device so as to target the plasma plume region located 1 mm above the liquid interface.

In culture medium

Nitrite and hydrogen peroxide concentrations have been assessed in phenol-red free culture medium by colorimetric titration using an absorption spectrophotometer (Biotek Cytation 3 instrument), at 548 nm for nitrite species and at 409 nm for hydrogen peroxide. Nitrite (NO_2^-) quantification has been realized using Griess reagent (Sigma Aldrich, Saint-Quentin Fallavier, France). 25 μL were transferred from each treated sample in a 96-well plate with 175 μL of culture medium and 50 μL of Griess reagent. Absorbance was measured at 548 nm. Hydrogen peroxide (H_2O_2) concentrations have been measured using Titanium Oxysulfate IV TiOSO_4 (Sigma-Aldrich, Saint-Quentin Fallavier, France). 200 μL of the samples were transferred in a 96-well plate with 50 μL of titanium oxysulfate IV. Absorbance was recorded at 409 nm.

1.3 Temperature and evaporation measurement

Thermal measurements of the cell layer have been performed by an infrared camera (Jenoptik & Infratec VarioCAM® HD head 680/30) coupled with a macro-lens (Converter Jenoptik x0.2, 60 mm in focal length). Kinetics acquisitions have been taken during plasma treatments from the bottom of the plates filled with culture medium. Temperature data was collected every 30 seconds during 5 min for 4 conditions: no helium flow, non-ionized helium flow, ionized helium flow upon plasma treatment and after. Temperature measurements were radially resolved in each well of the culture plate so as to obtain a thermal distribution. Evaporation measurements have also been performed by filling 2 wells of the plates with culture medium, and by weighing it before and after plasma exposure on an analytical scale (Sartorius ENTRIS 124i-1S). Two wells were filled to get a statistical estimation for one well considering low mass variations if filling only one well directly. Evaporation was then calculated as the percentage of mass loss.

Thermal measurements have also been acquired on mice skin in order to show the innocuity of the CAP treatment. Temperature data was collected every 30 seconds for: 3 min without plasma or helium flow, 10 min during plasma exposure and for 3 min after plasma and helium extinction.

1.4 Cold Atmospheric Plasma Treatment

Both the *in vivo* and *in vitro* experiments utilized the identical plasma source as detailed in **1.1** and illustrated in **Figure 1.A**.

In the *in vitro* experiments, the cell lines were exposed to direct CAP treatment 24 h post-plating in 24, 96 or 6-well plates. This treatment involved different durations: 0 min (Control), 1 min, 2 min, 3 min, and 5 min for the 24 and 96 well-plates; 0 min (Control), 10 min, 12 min 30 sec and 15 min for the 6-well plates, while ensuring a 5-10 mm gap between the CAP source and the culture medium, as illustrated in **Figure 1.B**. Prior to treatment, the medium was replaced with fresh culture medium (700 μ L for 24-well plates, 200 μ L for 96-well plates and 2 mL for 6-well plates). In the case of 96-well plates, CAP treatment was performed on every other well in order to mitigate possible edge effects. To treat the 3D cultures, spheroids from identical conditions were combined after centrifugation within the same well of a 24-well flat-bottom ultra-low attachment (ULA) plate (Corning). Subsequently, they were suspended in 700 μ L of medium to ensure uniform conditions comparable to those of the 2D cell treatment (**Fig. 4B**).

In the *in vivo* experiments, murine CCA were subjected to CAP exposure for 10 min, maintaining a gap of 5-10 mm between the plasma catheter and the skin of the mouse. Treatments were administered to the mice every 2-3 days, with each animal receiving a total of 7 treatments. The mice were sacrificed the day after the last CAP treatment.

2. Biological resources

2.1 Cell lines and culture conditions

The following cell lines were maintained in standard culture conditions, which included a temperature of 37 °C, 5 % CO₂, and humidity exceeding 90 %. Routine screening for mycoplasma contamination was conducted to ensure the integrity of the cell cultures.

2.1.1 Tumor cell lines

Two human CCA cell lines, HuCCT1 (derived from intrahepatic CCA) and EGI-1 (derived from extrahepatic CCA), were generously provided by Dr. G. Gores (Mayo Clinic, Rochester, MN, USA) and by the German Collection of Microorganisms and Cell Cultures (DSMZ, Germany),

respectively. SB1-JP4 murine cells, originating from a CCA tumor of SB1 (Rizvi et al., 2017)¹⁶, were kindly provided by Dr. J.G. Pol (Centre de Recherche des Cordeliers, Paris, France) (Paillet et al., 2021)¹⁷. HuCCT1 and EGI-1 human cell lines were cultured in DMEM supplemented with 1 g/L glucose, while the murine CCA cell line SB1-JP4 was cultured in DMEM containing 4.5 g/L glucose. Additionally, all CCA cell lines were cultured in a medium supplemented with 10 mmol/L HEPES, antibiotics (100 UI/mL penicillin and 100 mg/mL streptomycin), antimycotic (0.25 mg/mL amphotericin B; Invitrogen), and 10 % fetal calf serum (FCS).

2.1.2 Stromal cell lines

Human myofibroblastic hepatic stellate cell (HSC) lines, hTERT-HSC and LX2-HSC, employed as models of cancer-associated fibroblasts (CAFs) in this investigation were graciously provided by Dr. L. Aoudjehane (ICAN, Paris, France). These cell lines were cultured in DMEM supplemented with 4.5 g/L glucose, along with antibiotics (100 UI/mL penicillin and 100 mg/mL streptomycin), antimycotic (0.25 mg/mL amphotericin B; Invitrogen), and 10 % FCS.

Human umbilical vein endothelial cells (HUVEC) (Merck), serving as a model of tumor-endothelial cells (TECs), were cultivated in a specialized medium (EndoGRO™-VEGF Complete Media Kit, Millipore), supplemented with 2 % FCS, antibiotics (100 UI/mL penicillin and 100 mg/mL streptomycin) and antimycotic (0.25 mg/mL amphotericin B; Invitrogen).

2.1.3 Spheroids formation

Spheroids of human CCA were generated by co-culturing a human CCA cell line (HuCCT1 or EGI-1) with hepatic myofibroblasts hTERT-HSC and HUVEC endothelial cells at a ratio of 4:1:1. In brief, the human cells were seeded at a density of 3 000 cells per well to form individual spheroids in a 96-well round-bottom ultra-low attachment microplate (Corning). These spheroids were cultured in the same medium as used for the CCA cell lines and were harvested three days after seeding for subsequent analyses.

2.2 Allograft tumor model of CCA

Animal experiments were conducted in accordance with the guidelines set forth by the French Animal Research Committee, and all procedures were approved by a local ethics committee (Approval Number: APAFIS #34367-2021121516378449). For the allograft tumor model, 3 ×

10⁶ SB1-JP4 cells were suspended in 100 µL of PBS and injected subcutaneously into the flank of eight-week-old female B6(Cg)-*Tyr^{c-2l}*/JRj mice (Janvier Labs, Le Genest-Saint-Isle, France). Mice were housed in individually ventilated cages with nesting material under standard conditions, maintaining a temperature of 22 °C and specific pathogen-free environment. Lighting conditions followed a cycle of 12 h of light and 12 h of darkness, with access to food and tap water ad libitum. Tumor growth was monitored upon appearance by measuring tumor volume (V_{tumor}) every 2-3 days using a caliper, calculated as follows: $V_{\text{tumor}} = \frac{x \times y^2}{2}$ where x and y are the longest and shortest lateral diameters respectively. Once tumor volume reached approximately 200 mm³, CAP treatments were initiated, as described in **Section 1.4**. Endpoint criteria included tumor size exceeding 2 000 mm³, tumor ulceration, weight loss exceeding 20 % compared to baseline, and deterioration in overall body condition.

3. Biological procedures

3.1 Cell viability and death assays

3.1.1 Crystal Violet staining

The viability of the 2D cell cultures was assessed 24 h following exposure to CAP using crystal violet staining. After washing, the cells were stained with crystal violet (C0775, Merck) for 15 min and subsequently rinsed with water. After drying, the crystal violet was dissolved in 10 % SDS. The plates were then incubated at 37 °C for 2 h, and the absorbance was measured using a spectrophotometer (Tecan, Lyon, France) at a wavelength of 595 nm.

3.1.2 Annexin V/7-AAD apoptosis assay

To ascertain the timepoint at which a mortality rate of 50-80 % is attained upon exposure to CAP for the *in vivo* vaccination assays, the viability of the SB1-JP4 cell line was assessed by double staining with Annexin V/7-AAD. The cells were treated with CAP in 6-well plates in order to prepare *in vitro* the tumor cell vaccine. The apoptotic state of the murine CCA cell line was assessed 24 h post-CAP exposure using the Pacific Blue™ Annexin V Apoptosis Detection Kit with 7-AAD (Biolegend) and flow cytometry. Briefly, both the floating and adherent cells were collected with Trypsin (0.05 %) without EDTA, washed twice in cold Biolegend's Cell Staining Buffer and resuspended in cold Annexin V Binding Buffer. The cells

were then incubated with Pacific Blue™ Annexin V and 7-AAD for 15 min in the dark at room temperature, and analyzed using a flow cytometer (Cytoflex, Beckman Coulter) within 1 h. The results were analyzed using FlowJo analysis software (BD Biosciences).

3.1.3 LDH cytotoxicity assay on 3D spheroids

Viability assessment of the 3D cell cultures was performed by quantifying the release of lactate dehydrogenase (LDH) using a luminescence kit (LDH-Glo™ Cytotoxicity Assay, Promega) following the guidelines provided by the manufacturer. For this assay, 30 spheres were used for each experimental condition. LDH release from damaged cells served as an indicator of cellular integrity 24 h after CAP exposure. Briefly, supernatants from both treated and untreated spheroids were collected 24 h post-CAP exposure, diluted at a ratio 1:25 with LDH Storage Buffer and mixed with the LDH detection reagent provided in the kit. Following a 1-hour incubation at room temperature in the dark, luminescence was measured using a spectrophotometer (Tecan, Lyon, France) in a 96-well white plate with a clear bottom. As a positive control for the assay, 0,2 % Triton X-100 was employed.

3.1.4 Live/Dead staining of 3D spheroids

The viability of 3D spheroid cultures was additionally evaluated by confocal microscopy using the LIVE/DEAD™ Viability/Cytotoxicity Kit (Invitrogen). 24 h after exposing the spheroids to CAP, they were washed and incubated for 45 min at room temperature and protected from light in a staining solution comprising PBS containing 2µM calcein AM and 4µM EthD-1. Finally, samples were mounted on slides and observed under an Olympus FV3000 confocal microscope and the proportion of dead cells was quantified using ImageJ software (version 1.53c).

3.2 ROS determination in cell lysates

ROS production was assessed using the 2',7'-dichlorofluorescein diacetate (H2DCFDA; Abcam cat number ab113851) according to the manufacturer's instructions. Briefly, the cells were seeded in black-walled, clear-bottom 96-well microplates and then incubated for 24 h at 37 °C. Subsequently, the cells were incubated with CM-H2DCFDA (25 µM) in PBS for 45 min at 37 °C, followed by treatment with CAP in complete medium. 30 min post-treatment, the cells

were washed and the fluorescence was measured at 485/535 nm (Tecan, Lyon, France). Normalization was performed using the crystal violet method.

3.3 Immunofluorescence (IF)

3.3.1 Immunofluorescence of 2D cell cultures

Cells were fixed with PFA 4 % during 15 min and permeabilized in Triton X-100 0.2 % for 15 min 24 h post-CAP exposure. Cells were incubated in a blocking solution containing PBS with 1 % BSA and 10 % goat serum for 1 h at room temperature and then incubated overnight at 4 °C with a primary antibody (listed in **Table 1**). The next day, cells were incubated for 1 h at room temperature with a secondary fluorescent antibody, washed in PBS and the nuclei were then counterstained with DAPI. Cell observations were carried out using an Olympus IX83 microscope and the images were analyzed using ImageJ software (version 1.53c).

3.3.2 Immunofluorescence of 3D cell cultures

The immunofluorescence staining of spheroids was performed following a recently developed protocol established by L. Aoudjehane (Couteau et al., 2024) ¹⁸. Briefly, the spheroids were fixed with 4 % PFA during 45 min under agitation, washed in PBS, and then permeabilized and blocked in a solution containing 1 % BSA and Triton X-100 (1:50 dilution) for 3 h at room temperature. Following washing, the spheroids were incubated overnight with the primary antibody (refer to **Table 1**) diluted in a solution containing Triton X-100 (diluted in 1 % BSA at 1:100). The following day, the spheroids were washed and incubated with DAPI and the secondary antibody (if required) diluted at 1:200 in PBS containing 1 % BSA and Triton X-100 (diluted at 1:100) for 1 h. Subsequently, the spheres were collected and mounted onto slides with Dako fluorescence mounting medium (S3023, Dako). The images were captured using an Olympus FV3000 confocal microscope.

3.4 Western blot analysis

Proteins were collected 24 h after CAP-exposure using RIPA buffer (Merck) supplemented with a protease and phosphatase inhibitor cocktail (ThermoFisher Scientific). The protein concentrations were determined using the bicinchoninic acid (BCA assay kit –Thermo Fisher Scientific) and by measuring the absorbance with a Tecan Microplate Reader at 570nm. A

protein extract of 10 µg was suspended in Laemmli buffer, boiled, subjected to SDS-PAGE and transferred to nitrocellulose membranes. The blots were blocked with TBS, 0.1 % Tween-20 containing 5 % BSA, and incubated with primary antibodies (refer to **Table 1**) overnight at 4 °C. The membranes were washed three times with TBS, 0.1 % Tween-20 and then incubated with a secondary HRP-linked antibody for 1 h at room temperature. Signal detection was carried out using the ECL Prime kit (Thermofisher), and the bands were visualized with an iBright Imager. For relative quantification, β-actin was used as the internal reference.

Table 1. Primary antibodies and probes used for western blot and immunofluorescence.

Name	Species	Clone	Reference	Manufacturer	Dilution
γH2AX	R	20E3	9718	CST	1:1000 (WB) 1:200 (IF)
β-actin	M	AC-15	A5441	Sigma	1:5000 (WB)
α-SMA	M	1A4	A2547	Sigma	1:500 (WB)
CK19 (Alexa Fluor® 647 conjugated)	R	EP1580Y	ab192980	Abcam	1:100 (IF)
α-SMA (Alexa Fluor® 488 conjugated)	M	1A4	53-9760-82	Thermofisher	1:100 (IF)
CD31 (Alexa Fluor® 594 conjugated)	M	WM59	303126	Biolegend	1:50 (IF)
Live/Dead			L3224	Thermofisher	1:2000 for calcein AM 1:500 for EthD-1

M, mouse; R, rabbit; WB, western blot; IF, immunofluorescence.

3.5 RNA isolation and RT-qPCR

Total RNA was extracted from cells 24 h after CAP exposure using the Nucleospin RNA kit (Macherey-Nagel). For spheroids, RNA extraction was performed 24 h post-CAP treatment using the RNeasy Micro kit (Qiagen). RNA quantity and quality were assessed spectroscopically with a Nanodrop (ThermoFisher), and 500 ng of RNA was used to synthesize cDNA. This synthesis was conducted using random primers, a dNTP mix, and M-MLV reverse transcriptase (ThermoFisher) according to the manufacturer's protocol. The cDNA samples were then used in duplicate for RT-qPCR, utilizing SYBR Green reagent (Roche) and specific primers (refer to **Table 2**) on a LightCycler 96 Roche Instrument. Relative gene expression was analyzed using the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method, with GAPDH serving as the internal reference.

Table 2. Human primers used for quantitative real-time PCR.

Gene	Protein	Forward (5'→3')	Reverse (5'→3')
<i>ACTA2</i>	α -SMA	GACAATGGCTCTGGGCTCTGTAA	CTGTGCTTCGTCACCCACGTA
<i>CAT2</i>	CAT2	TGGAGCTGGTAACCCAGTAGG	CCTTTGCCTTGGAGTATTTGGTA
<i>COL1A1</i>	COL1A1	AGTTCGAGTATGGCGG	CAGTGACGCTGTAGGT
<i>COL4A1</i>	COL4A1	CCGCTGCGAAGGGTGG	CCCTTTGTCCTGGTGGTCCC
<i>GSTA4</i>	GSTA4	ACAGTTGTACAAGTTCAGGATG	AATTTCAACCATGGGCACTT
<i>THBS1</i>	TSP-1	ATGCGACTTACCACTGCAAA	ACAGGCATCACCAATTCCAT
<i>SOD2</i>	SOD2	GGAAGCCATCAAACGTGACTT	CCCGTTCCTTATTGAAACCAAGC
<i>CD105a</i>	ENG	CACTAGCCAGGTCTCGAAGG	CTGAGGACCAGAAGCACCTC
<i>GAPDH</i>	GAPDH	AGCCACATCGCTCAGACAC	GCCCAATACGACCAAATCC

3.6 Wound healing assay

hTERT-HSC cells were seeded to confluency in 24-well plates and subjected to scraping using a 200 μ L pipette tip to create wounds the following day. Subsequently, the medium was replaced with fresh medium, and the cells were exposed to CAP in quadruplicate. Immediately after the treatment, cell migration was monitored for 24 h using an Olympus IX83 microscope equipped with a motorized stage and a 37 °C 5 % CO₂ thermostat chamber (Pecon; CellVivo, Inc). The acquired images were analyzed using ImageJ software (version 1.53c).

3.7 Angiogenesis proteome profiler

A Human Angiogenesis proteome profiler kit (Catalog Number ARY007; R&D Systems) was used to assess the relative levels of 55 human angiogenesis-related proteins in HUVEC cells 24 h after CAP exposure. A total of 150 μ g of proteins was used and the array was handled according to the manufacturer's instructions.

3.8 Tube Formation Assay

The tube formation assay was performed according to the manufacturer's instructions. μ -Slide 15 Well 3D plates (#81501, Ibidi) were used and pre-coated with 10 μ L of Matrigel[®] growth factor reduced, phenol red-free (#356231, Corning) and were allowed to polymerize at 37 °C for at least 30 min. Subsequently, 10 000 HUVEC cells were seeded into each well and allowed to attach to the basement membrane during a 1-hour incubation in the incubator. The cells were then treated with CAP in triplicate, and a time-lapse video was recorded for 24 h to monitor the formation of the tubules. An Olympus IX83 inverted microscope equipped with a motorized stage and a 37 °C 5 % CO₂ thermostat chamber (Pecon; CellVivo, Inc) has been used,

and the acquired images were analyzed using ImageJ software (1.53c) along with the Angiogenesis Analyzer plugin (version 1.0c).

3.9 Vaccination assays

To prepare the whole-cell vaccine, 150 000 SB1-JP4 murine CCA cells were seeded within 6-well plates and exposed to CAP in complete medium for 10 min the day after. After a 24-hour incubation period, the plasma-generated vaccine was prepared by resuspending 3×10^5 cells in 100 μ L of PBS. For both experiments, Control mice were injected subcutaneously with PBS for each rechallenges.

3.9.1 Prophylactic vaccination

Eight-week-old female B6(Cg)-*Tyr^{c-2J}*/JRj mice (Janvier Labs, Le Genest-Saint-Isle, France) were initially subcutaneously inoculated into the left flank with either the plasma-generated vaccine or PBS (Control), as outlined in **Section 3.9**. Seven days later, all mice were rechallenged by subcutaneously injecting 3×10^6 live SB1-JP4 cells into the right flank of the animals. The emerging tumors were measured three times per week with a caliper and all the mice were euthanized on day 47.

3.9.2 Therapeutic vaccination

Eight-week-old female B6(Cg)-*Tyr^{c-2J}*/JRj mice (Janvier Labs, Le Genest-Saint-Isle, France) were initially subcutaneously inoculated with 3×10^6 SB1-JP4 cells on their right flank. Once the tumors reached a volume between 50 and 100 mm³, the mice were randomly assigned to receive injections of either PBS (Control) or the plasma-generated vaccine (as described in **Section 3.9**) into their left flank (= PRIME). Eight days post-tumor challenge, the mice were again immunized via subcutaneous injection with either PBS or the plasma-generated vaccine (= BOOST) into their left flank. Tumor volumes were monitored using a caliper throughout the experiment and all the mice were sacrificed five days post-BOOST.

3.10 Flow Cytometry

3.10.1 Tumor immunophenotyping

Tumors were resected, weighed, and approximately 200 mg of tissue was mechanically dissociated using scalpels. The fragments were transferred to Eppendorf tubes containing 1 mL of DMEM medium with 1 mg/mL collagenase P (Sigma), 5000 U/mL hyaluronidase (Sigma), and 100 µg/mL DNase I (Roche), followed by enzymatic dissociation at 37 °C for 30 min. The resulting tumor homogenates were filtered through 70 µm and 40 µm cell strainers to obtain cell suspensions. To stop the enzymatic reaction, the cells were washed with pure FCS, centrifuged, and the pellets were rinsed with PBS. Red blood cells were lysed using ACK lysis buffer for 5 min at room temperature, after which the cells were resuspended in PBS and filtered through a 40 µm strainer. Following centrifugation, the cell pellets were transferred to FACS tubes and stained for immunophenotyping using the “Lymphoid cells,” “Myeloid cells,” and “Non-immune cells” panels (see **Table 3**).

Cell staining was carried out as follows: cell viability was assessed with LIVE/DEAD Fixable Aqua Dye (ThermoFisher). Fc receptors were blocked with anti-mouse CD16/CD32 (ThermoFisher) before surface staining with fluorescent antibodies (see **Table 3**). Then, the cells were fixed and permeabilized either with Cyto-Fast™ Fix/Perm Buffer (Biolegend) or with True-Nuclear™ Transcription Factor Buffer (Biolegend) when intranuclear staining of the transcription factor FoxP3 was required, following the manufacturer’s guidelines. Intracellular markers were then stained with additional fluorescent antibodies. Three panels of fluorescent antibodies were used for phenotyping immune and non-immune cells. Finally, the stained samples were analyzed using a BD LSRFortessa X20 flow cytometer (BD Biosciences), and the data were processed with FlowJo software.

Table 3. Fluorescent antibodies used for the immunophenotyping of the tumors.

Lymphoid cells panel					
Protein	Dye	Clone	Reference	Manufacturer	Dilution
CD45	PerCP-Cy5.5	30-F11	103132	Biologend	1/500
CD31	BV510	390	740124	BD Biosciences	1/100
CD3	FITC	17A2	1002204	Biologend	1/200
CD4	AF700	GK1.5	100430	Biologend	1/200
CD8a	BV785	53-6.7	100750	Biologend	1/100
B220	PE-Cy7	RA3-6B2	103222	Biologend	1/100
CD19	APC-Cy7	1D3/CD19	152412	Biologend	1/100
NK1.1	PE	PK136	108708	Biologend	1/100
CD25	BV650	PC61	102038	Biologend	1/100
PD-1	AF647/APC	29F.1A12	135230	Biologend	1/100
CK19	/	10H7	bsm-33057M	Thermofisher	1/100
FoxP3	BV421	MF-14	126419	Biologend	1/100
AbII	BV510	/	405331	Biologend	1/200
Myeloid cells panel					
Protein	Dye	Clone	Reference	Manufacturer	Dilution
CD45	PerCP-Cy5.5	30-F11	103132	Biologend	1/500
CD31	BV510	390	740124	BD Biosciences	1/100
CD11b	FITC	M1/70	101206	Biologend	1/500
Ly6C	BV785	HK1.4	128041	Biologend	1/100
Ly6G	APC	1A8	127614	Biologend	1/200
CD19	APC-Cy7	1D3/CD19	152412	Biologend	1/100
CD11c	PE-Cy7	N418	117318	Biologend	1/100
CD68	BV605	FA-11	137008	Biologend	1/100
CD206	PE	C068C2	141706	Biologend	1/100
MHC II	BV711	M5/114.15.2	107643	Biologend	1/200
CD80	PE-Dazzle594	16-10A1	104738	Biologend	1/100
CD86	BV421	GL-1	105032	Biologend	1/100
CK19	/	10H7	bsm-33057M	Thermofisher	1/100
AbII	BV510	/	405331	Biologend	1/200
Non-immune cells panel					
Protein	Dye	Clone	Reference	Manufacturer	Dilution
CD45	BV510/Aqua	30-F11	103138	Biologend	1/500
CD31	PE-Cy7	390	102418	Biologend	1/100
CD29	APC-Cy7	HM β 1-1	102225	Biologend	1/100
FAP	DyLight550	983802	FAB9727L	NovusBio	1/100
PD-L1	BV421	10F.9G2	124315	Biologend	1/100
a-SMA	AF594	1A4	ab202368	Abcam	1/100
CK19	PerCP-Cy5.5	10H7	bsm-33057M-PerCP-Cy5.5	Thermofisher	1/100

3.10.2 Calreticulin (CRT) externalization

Both floating and adherent HuCCT1 and EGI-1 cells were collected 24 h after CAP treatment and washed twice with cold PBS. Cells were then incubated with LIVE/DEAD™ Fixable Aqua dye (L34965, Invitrogen) at a 1:200 dilution at 4 °C in the dark for 20 min. Then, cells were washed and stained with Alexa Fluor 488-conjugated anti-CRT antibody (#62304, Cell Signaling Technology) at a 1:50 dilution in FACS buffer (PBS + 1 % BSA) for 30 min at 4 °C in the dark. Cells were washed with FACS buffer, fixed with 4 % PFA and analyzed using a flow cytometer (Cytoflex, Beckman Coulter).

3.11 Extracellular ATP

CCA tumor cells (HuCCT1, EGI-1) were exposed to CAP in 96-well white plates with clear bottoms, and extracellular ATP levels were assessed using the RealTime-Glo™ Extracellular ATP Assay Kit (GA5010, Promega) 10 min post-treatment. All steps of the bioluminescent assay were conducted, and reagents were prepared in accordance with the manufacturer's instructions. Luminescence readings were obtained using a spectrophotometer (Tecan, Lyon, France). For CCA spheroids, one sphere per condition was used and ATP release was measured within 30 min following treatment.

3.12 HMGB1 release

The supernatants of HuCCT1 and EGI-1 cells were collected 48 h after CAP treatment. A volume of 10 µL of the conditioned medium was utilized, and HMGB1 Express ELISA (30164033, IBL International, Tecan) was conducted following the manufacturer's instructions. The acquired data were normalized by measuring the quantity of proteins from the remaining adherent cells using the bicinchoninic acid (BCA assay kit, Thermo Fisher Scientific) and by measuring the absorbance with a Tecan Microplate Reader at 570nm.

3.13 Histology

Formalin-fixed paraffin-embedded tissue samples from mice tumors were cut in 4 µm sections, deparaffined, and stained with hematoxylin and eosin, as well as Sirius red to observe tissue histology.

3.14 RNA-Seq analysis

Total RNA was extracted from 4 replicates of CAP-treated and untreated spheroids (16 samples in total) using Qiagen RNeasy micro kit according to the manufacturer's guidelines, 24 h after CAP exposure. RNA integrity (RIN) was assessed using the RNA 6000 Nano kit (Agilent) and a Bioanalyzer 2100 system (Agilent). RNA with a RIN above 6 were used to establish the sequencing libraries.

PolyA mRNA selection, cDNA libraries preparation and sequencing were conducted by Novogene (Munich, Germany) using the Illumina NOVAseq X Plus platform. Sequencing depth ranged from 51 025 206 to 67 741 690 reads per sample. Raw data (raw reads) of fastq format were firstly processed through in-house perl scripts. In this step, clean data (clean reads) were obtained by removing reads containing adapter, reads containing poly-N and low-quality reads from raw data. At the same time, Q20, Q30 and GC content of the clean data were calculated. All the downstream analyses were based on the clean data with high quality. Clean reads were mapped on the *Homo Sapiens* hg38 reference genome using HISAT2 v2.0.5 and featureCounts v1.5.0-p3 was used to count the reads numbers mapped to each gene. Then, FPKM of each gene was calculated based on the length of the gene and reads count mapped to this gene. FPKM, expected number of Fragments Per Kilobase of transcript sequence per Millions base pairs sequenced, considers the effect of sequencing depth and gene length for the reads count at the same time, and is currently the most commonly used method for estimating gene expression levels.

Differential expression analysis of two conditions/groups (four biological replicates per condition) was performed using the DESeq2 R package (1.20.0). DESeq2 provides statistical routines for determining differential expression in digital gene expression data using a model based on the negative binomial distribution. The resulting p-values were adjusted using the Benjamini and Hochberg's approach for controlling the false discovery rate. Genes with an adjusted p-value ≤ 0.05 and a $|\log_2(\text{FoldChange})| \geq 2$ found by DESeq2 were assigned as differentially expressed. Gene Ontology (GO) enrichment analysis of differentially expressed genes was implemented by the cluster Profiler R package, in which gene length bias was corrected. GO terms with corrected p-value less than 0.05 were considered significantly enriched by differential expressed genes. KEGG is a database resource for understanding high-

level functions and 3 utilities of the biological system, such as the cell, the organism and the ecosystem, from molecular-level information, especially large-scale molecular datasets generated by genome sequencing and other high-through put experimental technologies (<http://www.genome.jp/kegg/>). Cluster Profiler R package has been used to test the statistical enrichment of differential expression genes in KEGG pathways.

The figures were designed performed using NovoMagic, a free Novogene platform for data analysis.

3.15 Statistical analysis

The obtained results were analyzed using GraphPad Prism 8.0 statistical software (GraphPad Software, San Diego, CA, USA). The data were presented as means \pm standard error of the mean (SEM). For comparisons between two groups, nonparametric Mann–Whitney tests were used. For comparisons involving more than two groups, a parametric one-way ANOVA test followed by Sidak’s multiple comparisons test was utilized. For survival analysis, Kaplan–Meier methods and associated log-rank (Mantel–Cox) tests were conducted to estimate rates of tumor incidence over time and compare across groups. The statistical significance was accepted for $p < 0.05$. Symbols: * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$; **** $p < 0.0001$.

RESULTS

Physicochemical and thermal properties of the plasma catheter

First, a physicochemical and thermal characterization of the plasma catheter source was conducted to demonstrate its biological applicability and technical feasibility.

As illustrated in **Fig. 1A**, CAP was generated using a helium flow of 1 slm passing through the plasma catheter, with pulses of 7.7 kV at 5 kHz and a 1 % duty cycle. As expected for a CAP supplied with helium and interacting with ambient air, the optical emission spectrum is dominated by the second positive system of molecular nitrogen (**Fig. 1A**), with, for instance, the (0,0) rovibrational band headed at 337.2 nm. The plasma catheter was employed for both *in vitro* and *in vivo* experiments, directly treating various cell lines or murine ectopic CCA tumors, with a maintained gap of 5-10 mm between the distal end of the plasma source and the biological target, as depicted in **Fig. 1B**.

Thermal and chemical characterization of the CAP source was conducted while interacting with culture medium in 24- and 6- well plates. The culture medium in the wells was exposed to plasma for varying durations, ranging from 0 to 5 min for the 24-well plates (**Fig. 1C-E**) and from 0 to 15 min for the 6-well plates (**Supp. Fig.1**). **Fig. 1C** illustrates the spatial temperature distribution along the radius of a well in a 24-well plate, measured from the center to the edge, at different plasma exposure times. If no significant difference in well temperature was observed across these CAP exposure times, a notable evaporation rate was detected, particularly with longer treatment durations (**Fig. 1D**). Hence, for 700 μL culture medium samples, approximately 56 μL were evaporated after 5 min of plasma exposure, which corresponded to a maximum evaporation rate of 8 %: a value that overall remained low. Similar results were observed using 6-well plates with longer CAP exposure times, where a localized thermal effect, characterized by an approximate 3 $^{\circ}\text{C}$ increase at the treatment site compared to the control (**Supp. Fig. 1A**), was consistently observed across all treatment durations. Additionally, a maximum evaporation rate of 15 % was recorded for the longest CAP exposure (**Supp. Fig. 1B**). Given that the cells were treated in 2 mL of medium under these conditions, this evaporation rate corresponded to a loss of approximately 300 μL , which was still low as the cells remained immersed in a substantial volume of culture medium. Regarding the chemical properties induced by the plasma catheter, a significant increase in the

concentrations of hydrogen peroxide (H₂O₂) and nitrites (NO₂⁻) were observed in the culture medium (**Fig. 1E** and **Supp. Fig. 1C**). Shorter CAP exposures tended to increase the concentration of NO₂⁻, with significant increases observed after 1 min of exposure in 24-well plates and 10 min in 6-well plates. Longer treatment durations resulted in higher concentrations of H₂O₂ in the culture medium, becoming significant after 2 min in 24-well plates and 15 min in 6-well plates. Notably, a relevant increase in hydrogen peroxide (H₂O₂) was still observed with just 1 min of CAP exposure in 24-well plates (47.68 ± 8.98 μM compared to 18.22 ± 7.44 μM in untreated wells) and 10 min of exposure in 6-well plates (157.98 ± 59.35 μM compared to 0 μM for the untreated well). To evaluate the thermal safety of the plasma catheter, infrared imaging tomography was achieved to monitor the skin temperature of mice (**Fig. 1F**, left panel). During a 10-minute CAP treatment, an increase as low as 2-3 °C was observed on the mouse's skin (**Fig. 1F**, right panel). Interestingly, the temperature reached a plateau, remained stable throughout the CAP exposure, and immediately returned to its baseline once the plasma catheter was turned off.

In summary, these data demonstrated that the plasma catheter source was technically applicable to various biological substrates without posing any thermal hazards and that it was capable of generating significant amounts of RONS, thus being able to impact biological targets.

CAP affected the activation state and migratory phenotype of CAFs

To examine the phenotypic changes induced by CAP on stromal populations in CCA, human hepatic myofibroblast cell lines were initially utilized as CAFs models.

First, the viability of hTERT-HSC cells was assessed 24 h after CAP exposure and a significant reduction in cell survival was noticed (**Fig. 2A**). It turned out that the IC₅₀ was reached after approximately 2 min of treatment: a value that has been selected for further investigation.

In the cells, CAP induced an oxidative stress, as indicated by a significant increase in intracellular ROS levels measured 30 min post-exposure (**Fig. 2B**). This resulted in DNA breaks as attested by the phosphorylation of histone H2AX (γH2AX), a marker of DNA damage, observed in hTERT-HSC cells 24 h after CAP exposure. While γH2AX was not detectable by

Western blot or IF in untreated cells, a significant elevation of γ H2AX expression was found in CAP-treated cells under IC50 conditions (**Fig. 2C**). Indeed, foci of γ H2AX were prominently visible in nearly all CAP-treated cells compared to the control cells (**Fig. 2D**). The observed DNA breaks were associated with a significant decrease in the mRNA expression levels of specific antioxidant defenses in hTERT-HSC cells, such as *CAT2* and *GSTA4*, indicating the cells' reduced ability to manage the oxidative stress induced by CAP (**Fig. 2G**). Interestingly, despite this decrease, the expression of *SOD2* was increased following CAP exposure.

Additionally, CAP-derived oxidative stress led to notable phenotypic changes in hTERT-HSC cells. The CAP-treated myofibroblasts appeared less activated, as demonstrated by Western blot (**Fig. 2E**) and IF (**Fig. 2F**) analysis of α -SMA. The conditions fixed by the IC50 led to a significant decrease in the expression of α -SMA compared to the untreated controls, both at the protein and mRNA levels (*ACTA2*) (**Fig. 2G**). Furthermore, CAP-treated myofibroblasts exhibited a decreased tendency to secrete collagen, evidenced by significant reductions of *COL1A1* and *COL4A1* expression, which could be beneficial for ECM remodeling *in vivo*. Similar results were observed with LX2-HSC cells, another model of human CAFs (**Supp. Fig. 2**). Indeed, these cells also exhibited a significant decrease in cell viability (**Supp. Fig. 2A**) associated with a marked increase in intracellular ROS levels (**Supp. Fig. 2B**). However, no change in γ H2AX was detected by Western Blot in LX2-HSC cells 24 h post-CAP exposure (**Supp. Fig. 2C**). Nonetheless, similar to hTERT-HSC cells, LX2-HSC myofibroblasts displayed reductions in certain antioxidant defenses (*CAT2* and *GSTA4*), as well as decreased expression of α -SMA and collagens (**Supp. Fig. 2D-E**). Interestingly, the expression of *SOD2* was increased following CAP exposure, as for hTERT-HSC cells.

Additionally, the migratory phenotype of hTERT-HSC cells was assessed following CAP treatment. CAP exposure resulted in a significant inhibition of cell migration (**Fig. 2H**). Indeed, CAP-treated cells exhibited a lower migration speed compared to untreated cells, with the scratch area remaining notably wider 24 h post-exposure. Interestingly, a dose-response effect was observed: longer CAP treatments corresponded to slower migration, indicating that increased CAP exposure duration further impaired the migratory ability of hTERT-HSC cells.

Altogether, these data demonstrated that CAP-derived oxidative stress could modulate the activation profile of human CAFs models and inhibit their recruitment to the treatment site by altering their migratory phenotype.

CAP restricted the proliferation and angiogenic profile of TECs

To further investigate the phenotypic changes induced by CAP on the stromal populations of CCA, research has been conducted using human HUVEC cells, which served as a model for TECs.

First, the assessment of cell viability 24 h after CAP exposure of HUVEC cells revealed a significant reduction in cell survival (**Fig. 3A**). Therefore, a 2-minute exposure time, corresponding to the IC₅₀ of HUVEC cells, was chosen for further investigations. The CAP-treated cells showed a significant increase of intracellular ROS levels, as measured 30 min post-exposure (**Fig. 3B**). This increase in ROS levels also led to DNA damage, as evidenced by the phosphorylation of histone H2AX (γ H2AX), detected by IF 24 h post-CAP exposure (**Fig. 3C**). Moreover, CAP exposure caused a notable decrease in the mRNA expression levels of key antioxidant defenses in HUVEC cells, including *CAT2*, *GSTA4* and *SOD2* (**Fig. 3E**), highlighting their inability to effectively manage the oxidative stress induced by CAP.

To gain deeper insights into the phenotypic changes induced by CAP-derived oxidative stress on TECs, a proteome profiler targeting selected angiogenesis-related proteins was conducted on HUVEC cells 24 h post-CAP exposure (**Fig. 3D**). The results revealed that CAP treatment led to the downregulation of several pro-angiogenic proteins, including ET-1 (Endothelin-1), ANGPT2 (Angiopoietin 2), and Endostatin. Notably, ENG (Endoglin) and TSP-1 (Thrombospondin-1) showed the most significant variations on the blots. Interestingly, growth factors, such as EGF and VEGF, were upregulated in the cell lysates of CAP-treated cells compared to control cells. The expression levels of Endoglin (*CD105 α*) and Thrombospondin-1 (*THBS1*) were further validated at the mRNA level (**Fig. 3E**), confirming the findings from the proteome profiler.

Finally, the angiogenic profile of HUVEC cells following CAP treatment was evaluated using a tubulogenesis assay. The results showed that CAP-treated HUVEC cells lost their ability to form a complex vascular network compared to untreated cells (**Fig. 3F**). 8 h after CAP exposure, untreated cells reached their peak in tube formation, displaying a significantly higher number of segments compared to CAP-treated cells. Interestingly, no significant difference in the number of tubes was observed across the various CAP exposure times, indicating that even a small amount of RONS was sufficient to inhibit tubulogenesis in HUVEC cells.

In conclusion, these findings demonstrated that CAP served as a potent inhibitor of the angiogenic profile in human TECs models by restricting their proliferation.

CAP decreased the integrity of a pluricellular spheroid model of CCA

The antitumor effects of CAP were also explored using a more advanced model of CCA that better recapitulated the cellular interactions between tumor cells, CAFs and TECs, as well as the 3D structure typically found *in vivo*. This model provided a more accurate representation of the tumor microenvironment, allowing for a deeper understanding of how CAP influences these complex cellular dynamics in CCA.

In this study, human CCA spheroids were generated combining CCA tumor cells (HuCCT1 or EGI-1), hTERT-HSC (modeling CAFs) and HUVEC cells (modeling TECs) in a 4:1:1 ratio. The spheroids formed with HuCCT1, hTERT-HSC and HUVEC cells were designated as HHH spheroids, while those formed with EGI-1, hTERT-HSC and HUVEC cells were named EHH spheroids.

Immunofluorescence characterization of the spheroids revealed that the different cell types organized effectively to form cohesive 3D structures. Specifically, CCA tumor cells, labeled with CK19, clustered around myofibroblasts, which were positive for α -SMA, and these myofibroblasts, in turn, surrounded an endothelial core stained with CD31. This cellular arrangement was observed in both HHH spheroids (**Fig. 4A**) and EHH spheroids (**Supp. Fig. 3A**). Notably, the EHH spheroids exhibited greater compactness, likely due to EGI-1's more epithelial nature compared to HuCCT1 (Lobe et al., 2021)¹⁹.

To study the effects of CAP on these pluricellular 3D models, as shown in **Fig. 4B**, the spheroids were collected 3 days after plating and were pooled by condition into ULA 24-well plates. This configuration allowed treatment with the same volume of culture medium and CAP exposure times as those used for 2D cell lines. To assess spheroid integrity, the release of lactate dehydrogenase (LDH) into the supernatant was measured 24 h post-exposure, as LDH is released when cells are damaged. As anticipated, CAP treatment resulted in high cytotoxicity in HHH and EHH spheroids, as well as an expected and significant reduction of the diameter of the spheroids (**Fig. 4C** and **Supp. Fig. 3B**). Interestingly, HHH spheroids exhibited greater

resistance to CAP compared to EHH spheroids (**Supp. Fig. 3B**). Indeed, after only 2 min of treatment, it was impossible to collect EHH spheroids conversely to the HHH spheroids. Consequently, a CAP exposure time of 2 min was selected for further investigation to explore the underlying biological mechanisms affected by CAP.

Cell death induced by CAP was assessed using LIVE/DEAD® staining 24 h post-exposure. In this assay, EthD-1 (Ethidium Homodimer-1, fluorescent red marker) stained the cells with damaged membranes while calcein-AM (fluorescent green marker) identified the live cells. Fluorescence imaging revealed that the CAP-treated HHH spheroids contained a higher number of dead cells compared to the untreated spheroids ($28.59 \pm 4.59\%$ vs $12.36 \pm 2.94\%$) (**Fig. 4D**). This cell death was correlated with the phosphorylation of histone H2AX (γ H2AX), as shown by IF, indicating significant DNA damage in the CAP-treated HHH spheroids (**Fig. 4E**). Similar results were observed in EHH spheroids (**Supp. Fig. 3C-D**). The fluorescent images, captured at the center of the spheres using confocal microscopy, indicated that CAP could effectively modify – whether directly or indirectly - cells within the deeper layers of the spheroids (at least in a radius of 150 μ m, as the diameter of the untreated spheroids was around 300 μ m), and not just those on the surface.

In summary, these findings demonstrated that CAP significantly impacted the integrity and viability of advanced CCA models. CAP's cytotoxic effects were capable of disorganizing complex 3D structures, with the treatment's effects appearing to be uniformly distributed throughout the spheroids.

CAP caused stromal dysregulations and immunogenic responses in CCA spheroids

To further investigate the impact of CAP on CCA spheroids, a RNA-Seq analysis was conducted, followed by a differential gene expression analysis comparing CAP-treated spheroids to untreated HHH and EHH spheroids. Quality control of the sequencing data is illustrated in **Supp. Fig. 6**, which showed a uniform distribution of gene expression across samples (**Supp. Fig. 6A-B**) and robust clustering according to PCA analysis (**Supp. Fig. 6C**).

Heatmaps and volcano plots displaying the results are shown in **Fig. 5A** for HHH spheroids and **Supp. Fig. 4A** for EHH spheroids. In HHH and EHH spheroids treated for 2 min with CAP, 6 306

and 6 976 differentially expressed genes were identified, respectively. Gene Ontology (GO) enrichment analysis indicated that these genes were involved in a variety of pathways: CAP treatment resulted in the overexpression of 178 and the underexpression of 313 biological processes in HHH spheroids, and 128 overexpressed and 88 underexpressed biologic processes in EHH spheroids. The analysis of down-regulated pathways highlighted CAP's effect on genes related to extracellular matrix organization, tube formation, endothelial cell proliferation, and cell growth regulation, supporting the previous findings. Additionally, CAP treatment affected other metabolic pathways, such as Wnt signaling and MAP kinase activity (**Fig. 5B**). Notably, the down-regulation of collagens like *COL1A1*, *COL3A1*, and *COL5A1*, metalloproteinases including *MMP1*, *MMP11*, and *MMP15*, and genes from the LOXL family such as *LOXL2* suggested that CAP might influence fibrosis associated with CCA (**Fig. 5C**). Furthermore, genes related to tube formation and endothelial cell proliferation, such as *VANGL2*, *SOX4*, *ANG*, and *NRP1*, were down-regulated following CAP treatment. Proliferation of epithelial CCA tumor cells was also inhibited in CAP-treated HHH spheroids, evidenced by the underexpression of *TP63* and *ERBB2*. Similar effects were observed in CAP-treated EHH spheroids, where morphogenesis of branching epithelium and cell-cell adhesion through plasma-membrane adhesion molecules were also disrupted (**Supp. Fig. 4B-C**).

Regarding the up-regulated pathways induced by CAP treatment, RNA-Seq data revealed the activation of numerous immunogenic biologic processes in both HHH and EHH spheroids. CAP treatment triggered a PERK-mediated unfolded response (i.e., ER stress), which activated pathways associated with leukocyte chemotaxis and differentiation, thus modulating an inflammatory response (**Fig. 5D-E**). Specifically, CAP-treated spheroids exhibited an overexpression of chemotaxis-related genes, such as *CCL3*, *CXCL10*, and *CXCL12*, as well as genes involved in differentiating recruited immune cells, including *NLRP3*, *TNF*, *CSF3*, interferons like *IFNA1* and *IFNB1*, and interleukins such as *IL-11*, *IL-20*, and *IL-34*. Additionally, other interleukins involved in immune regulation, like *IL-12B* and *IL-17B*, were also up-regulated following CAP treatment. These findings were consistent in EHH-treated CCA spheroids as well (**Supp. Fig. 4D-E**). Notably, an up-regulation of *CD274* (encoding PD-L1) was observed exclusively in HHH-treated spheroids. KEGG enrichment analysis results, presented in **Supp. Fig. 5A-B**, further indicated that the differentially expressed genes were associated

with pathways related to the extracellular matrix, cell cycle, apoptotic processes, and immune response activation.

These RNA sequencing results offered valuable insights for our upcoming experiments. They confirmed that CAP treatment could significantly affect the stromal populations in CCA, and suggested the potential activation of an immune response against CCA.

CAP reduced CCA progression in a murine syngeneic model by remodeling the tumor microenvironment

To demonstrate the antitumor effects of the plasma catheter *in vivo* and to validate our RNA-Seq data findings, SB1-JP4 CCA cells were injected into the flanks of immunocompetent B6(Cg)-*Tyr^{c-2J}*/JRj mice to induce tumors. Once the tumors reached an approximate volume of 200 mm³, CAP was applied directly on the tumor by sweeping its surface every 2-3 days for 10 min per session, totaling 7 treatments (**Fig. 6A**). CAP treatment significantly reduced tumor growth compared to untreated mice (**Fig. 6B** and **Supp. Fig. 7A**). However, despite this reduction in growth, only a trend was observed in tumor mass, likely due to the small sample size used in the experiment (**Fig. 6C**). Importantly, no significant difference in body weight was observed throughout the experiment, highlighting the non-toxic nature of CAP treatment (**Supp. Fig. 7B**). To further assess CAP's impact on CCA allografts, histological analysis of the tumors was conducted (**Fig. 6D-E**). **A detailed analysis (HE and Sirius red) is currently being performed by Jérémy Augustin, a pathologist, as I write this manuscript.**

Flow cytometry analysis was conducted to assess the potential activation of the antitumor immune system by CAP treatment. Previous RNA-Seq data indicated that CAP might promote the recruitment of immune cells to the tumor site. As shown in **Fig. 6F**, CAP treatment led to the recruitment of antitumor NK cells to the tumor site, and a trend in the increase in CD8⁺ TILs was also observed post-treatment. Interestingly, these infiltrating T cells displayed higher surface expression of PD-1, but were not activated (CD25⁻) (**Supp. Fig. 7C**). No significant difference was found in the number of CCA tumor cells (CK19⁺), but those sorted from CAP-treated tumors displayed a trend toward increased PD-L1 expression, aligning with our RNA-Seq findings (**Supp. Fig. 7D**). Regarding myeloid immune cells, preliminary data indicated that

CAP treatment prompted the recruitment of active phagocytic DCs to the tumor site (CD80⁺/CD86⁺) compared to untreated tumors (**Fig. 6G**). There was also a trend toward an increase in M1-like TAMs, which are associated with antitumor activity, along with a trend toward a decrease in immunosuppressive M2-like TAMs. Although no significant changes were noted in MDSCs (both monocytic and polymorphonuclear), there was a trend toward a reduction in the proportion of regulatory T cells (Tregs) in CAP-treated tumors compared to untreated ones (**Supp. Fig. 7E**). Concerning non-immune stromal cells, a significant increase in the proportion of CAFs was observed in CAP-treated tumors (**Fig. 6H**). However, these CAFs showed a trend toward reduced expression of α -SMA and FAP, suggesting that CAP may influence the activation state of CAFs (**Supp. Fig. 7F**). Additionally, these CAFs, like the tumor cells, displayed a trend toward increased expression of PD-L1 on their surface. A slight decrease in the proportion of TECs was also noted (**Fig. 6H**), and similar to CAFs, these cells displayed a trend toward increased PD-L1 expression (**Supp. Fig. 7G**). The suggested upregulation of PD-L1 across CCA tumor cells, CAFs and TECs was consistent with the *CD274* upregulation observed in the RNA-Seq data from the spheroids.

In summary, these data demonstrated that CAP treatment had a significant antitumor effect on CCA tumor growth, particularly through remodeling the tumor microenvironment. Notably, CAP treatment led to a substantial infiltration of antitumor immune cells, including NK cells, activated DCs and PD1⁺/CD8⁺ TILs, which supported the RNA-Seq findings in spheroids. These results suggested that CAP might induce immunogenic cell death (ICD) in CCA tumor cells, further enhancing its potential as a therapeutic strategy.

These data are still preliminary. Upcoming experiments aim to increase the number of mice to validate our findings and achieve statistical significance. To assess the safety of CAP treatment, we plan to measure serum levels of ASAT, ALAT and LDH. Additionally, RNA extracted from the tumors will be sent for RNA-Seq analysis. To further investigate the effects of CAP on the tumor stroma, we also plan to perform second harmonic generation (SHG) imaging and immunohistological staining.

Vaccination with CAP-treated cells provided protection against tumor challenge in mice through the induction of an ICD

To ascertain the induction of ICD by CAP, a prophylactic vaccination assay was performed. To create a plasma-generated vaccine primarily composed of dead and dying cells, SB1-JP4 CCA cells were treated with CAP in 6-well plates under various exposure durations (0 min, 10 min, 12 min 30 sec, and 15 min). The proportion of dying and dead cells was evaluated 24 h post-exposure using flow cytometry with Annexin V/7-AAD staining. CAP treatment significantly increased the proportion of early and late apoptotic cells compared to untreated SB1-JP4 cells (**Supp. Fig. 8A**). A 10-minute exposure was selected for the CAP-generated vaccine, as it produced a significant amount of early apoptotic cells, which were more likely to induce an immune response.

Mice were immunized with murine CCA cells treated *in vitro* with CAP under ICD-inducing conditions, which were injected into the left flank of the animals to initiate an immune response. In comparison, control mice were injected with PBS into their left flank. One week later, all animals were rechallenged with live SB1-JP4 CCA tumor cells on the opposite flank, and tumor growth was monitored three times a week until day 47 (**Fig. 7A**). Tumors in the PBS group grew rapidly, while mice that received the CAP-vaccine exhibited significantly reduced tumor growth (**Fig. 7B-C**). On the day of sacrifice, the mean tumor volume in the CAP-immunized group was significantly smaller than that in the PBS group ($306.57 \pm 48.82 \text{ mm}^3$ vs $666.36 \pm 108.16 \text{ mm}^3$), indicating partial protection by the vaccine. Mice that received the CAP-vaccine also showed significantly higher progression-free survival compared to the PBS group, based on a tumor volume threshold of 100 mm^3 , beyond which tumor growth becomes exponential in this CCA model (**Fig. 7D**). No significant loss in body weight was observed throughout the assay (**Supp. Fig. 8B**). Additionally, tumors extracted from CAP-generated mice were significantly lighter and smaller compared to those from the control group (**Fig. 7E**).

In summary, ICD was induced by CAP *in vivo*, validating the immune infiltration observed during the direct treatment of CCA tumors.

CAP induced emission of surrogate markers of ICD in vitro

To further investigate ICD in CCA tumor cells, cell viability and the release of DAMPs (Damage Associated Molecular Patterns) were assessed in CAP-treated CCA human cell lines *in vitro*. As shown in **Supp. Fig. 9A**, when tumor cells undergo ICD, death is associated with the release of specific DAMPs, including ATP, HMGB1 and CRT. For instance, ATP acts as a “find-me” signal that attracts immune cells to the site of treatment, HMGB1 promotes the maturation of DCs, and CRT, typically located on the ER membrane, acts as an “eat-me” signal when externalized on the tumor cell plasma membrane, facilitating tumor cell phagocytosis. Once activated, DCs migrate towards the tumor-draining lymph node to activate T cell by cross-presenting tumor antigens. These activated T cells then migrate to the tumor site, initiating an antitumor immune response.

As shown in **Fig. 8A**, the viability of both CCA cell lines (HuCCT1 and EGI-1) decreased significantly in a duration-dependent manner following CAP treatment. This reduction in viability was associated with a significant increase in intracellular ROS levels observed 30 min post-CAP treatment in both cell lines (**Fig. 8B**), resulting in toxic oxidative stress. Regarding hallmarks of ICD, a significant release of ATP was detected in the supernatant of CCA tumor cells 10 min post-treatment for exposure durations exceeding 3 min (**Fig. 8C**). This ATP release was also observed in the supernatants of CAP-treated HHH and EHH spheroids 30 min post-exposure (**Supp. Fig. 9B**). The release of HMGB1 was measured in the supernatant of CCA tumor cells 48 h after CAP treatment, with a significant release observed only at the maximum exposure duration, although a notable increase was still evident at shorter exposure times (**Fig. 8D**). Lastly, the surface exposure of CRT in response to CAP was assessed 24 h after treatment using flow cytometry. The results demonstrated that the emission of ecto-CRT on CCA tumor cells increased in a CAP-duration-dependent manner, suggesting that plasma might enhance the immunogenicity of CCA tumor cells (**Fig. 8E**). Interestingly, the tumor cells exhibiting the highest levels of ecto-CRT were those undergoing cell death (Live/Dead⁺) following the longest CAP exposures (**Supp. Fig. 9C**).

In summary, CAP successfully induced ICD in CCA tumor cells by triggering the release of DAMPs, which, as previously noted, were capable of generating an antitumor immune response.

Vaccinations using CAP-treated CCA cells as a novel therapeutic approach to combat tumor progression

Finally, to determine whether the CAP-generated vaccine could serve not only as a prophylactic measure but also as a therapeutic option against CCA progression, a therapeutic vaccination assay was conducted. This approach could represent a novel use of CAP for the local treatment of neoplasia.

Briefly, mice were inoculated with SB1-JP4 CCA cells into their right flank to induce tumor growth. Once tumors became palpable (21 days post-injection), the mice were randomized into two groups: one group received an injection of PBS (control group), while the other group was injected in the left flank with the CAP-generated vaccine described in **Supp. Fig. 8A**, aiming to activate an antitumor immune response. This initial injection, termed PRIME, was followed 8 days later by a second injection, termed BOOST, under the same conditions to amplify the potential immune response against the tumors. Tumor growth was monitored throughout the experiment, and all animals were sacrificed 5 days after the BOOST injection to study immune cell recruitment within the tumors (**Fig. 9A**).

Mice that were vaccinated twice with the CAP-vaccine exhibited significantly reduced tumor growth compared to those injected twice with PBS (**Fig. 9B** and **Supp. Fig. 10A**). Throughout the entire experiment, no significant difference in body weight was observed between the groups (**Supp. Fig. 10B**). Upon sacrifice, tumors extracted from the vaccinated mice showed a markedly reduced mass and appeared smaller in size compared to those from the control group (**Fig. 9C**). To further evaluate the impact of the CAP-vaccine on CCA allografts, histological analysis of HE-stained tumors was performed (**Fig. 9D**). **A detailed analysis of these histological findings is currently being conducted by Jérémy Augustin, a pathologist.**

Finally, flow cytometry analysis of the tumors revealed significant remodeling of the immune microenvironment following exposure to the CAP-vaccine. A substantial recruitment of antitumor CD8⁺ TILs was observed in the tumors of mice that received two injections of the CAP-generated vaccine, compared to the control group (**Fig. 9E**). The proportion of infiltrated CD8⁺ T cells was inversely correlated with tumor volume, indicating that the effectiveness of the CAP-vaccine diminished as tumor size increased. These T cells were also significantly more activated (CD25⁺) in the vaccinated mice and showed higher surface expression of PD1 (**Supp.**

Fig. 10C). Furthermore, the activation and infiltration of these specific T cells were negatively correlated with tumor volume. In contrast, no significant difference in the infiltration of B cells and CD4⁺ TILs was observed between the two groups of mice (**Supp. Fig. 10D**). Similarly, the infiltration of regulatory T cells remained unchanged between the groups (**Supp. Fig. 10E**). However, the CD8⁺ TILs/Tregs ratio was significantly increased in tumors from the CAP-vaccinated mice, suggesting a better prognosis for these animals. This ratio was also negatively correlated with tumor volumes. Additionally, compared to the control mice that received PBS injections, the CAP-vaccinated mice exhibited a greater infiltration of NK cells in their tumors (**Fig. 9F**). NK cell infiltration increased fourfold following injections of the CAP-generated vaccine (27.94 ± 7.24 % vs 6.34 ± 1.61 %), which could explain the significant reduction of tumor growth. Similar to CD8⁺ TILs, the proportion of NK cells in the tumors was negatively correlated with tumor volumes, indicating that the CAP-vaccine might be less effective if administered to mice with larger tumors during the PRIME injection. These NK cells were also significantly more activated (CD25⁺) in the CAP-vaccinated group compared to the PBS-injected mice.

Altogether, these promising data unveiled a novel therapeutic approach using CAP to create CAP-generated vaccines that can enhance antitumor immune responses. However, the efficacy of these vaccines appeared to be limited by tumor volume, suggesting that this strategy might be most effective when applied to small tumors.

CONCLUSION

CCA is an aggressive and rare cancer of the biliary tract, characterized by high mortality rates and increasing incidence. Currently, surgical resection is the only curative treatment available, and it is limited to a subset of eligible patients. Therefore, developing new therapeutic strategies to prevent CCA progression is crucial, particularly those that can effectively target not only the tumor cells but also the surrounding stromal populations that contribute to tumor growth and progression.

This study investigated the pleiotropic antitumor effects of an endoscopic CAP source in the context of CCA, using both *in vitro* and *in vivo* models. CAP has shown promise in oncology over the past 15 years, with numerous studies demonstrating strong antitumor effects in

various preclinical cancer models. Here, we proposed the use of a custom-made endoscopic CAP device, with the potential for future use in endoscopy for the *in situ* treatment of CCA.

Initially, we demonstrated that this CAP device was fully compatible with the treatment of biological targets, posing no electrical or thermal risks to the models used in this study. The device generated significant amounts of RONS, which were capable of triggering various biological processes. *In vitro* studies using human models of CAFs and TECs showed that CAP-induced oxidative stress led to stromal dysregulation, including alterations in CAF activation and a reduction in their migratory phenotype, as well as inhibition of the angiogenic profile of TECs. Using mixed spheroids as more relevant *in vitro* models of CCA, we observed that CAP treatment significantly impacted the integrity and viability of these models, with uniform effects throughout the spheroids.

RNA-Seq analysis of CAP-treated spheroids, followed by functional enrichment analysis, confirmed these findings by showing downregulation of stromal processes such as extracellular matrix organization and tube formation. Conversely, upregulated pathways indicated that CAP could trigger inflammatory responses, including leukocyte chemotaxis and differentiation. *In vivo*, a preliminary study demonstrated that CAP treatment of murine ectopic tumors resulted in significantly reduced tumor growth and increased infiltration of antitumor immune lymphoid and myeloid populations, suggesting that CAP can induce ICD in tumor cells.

To validate this ICD process, an *in vivo* prophylactic vaccination assay was performed using a homemade CAP-generated vaccine. The results showed that vaccination led to a significant reduction in tumor growth and improved progression-free survival compared to control individuals, indicating that CAP could indeed recruit immune cells to the tumor site. *In vitro*, CAP-treated CCA human cells exhibited the hallmark signs of ICD, including ATP and HMGB1 release and CRT externalization on the plasma membrane of damaged cells.

Finally, to assess whether the CAP-generated vaccine could serve not only as a prophylactic measure but also as a therapeutic option against CCA progression, we explored the use of CAP-treated cells in a vaccination-based approach. This novel application of CAP in oncology, not previously described in the literature, showed promising results in this study. Specifically, after two vaccine inoculations, a significant reduction in CCA tumor growth was observed,

which was associated with a substantial infiltration of antitumor immune cells, particularly NK cells. These findings suggest that CAP-generated vaccines could be a viable new therapeutic strategy for treating CCA.

In conclusion, this study demonstrated that the antitumor effects of CAP were multi-faceted, targeting not only tumor cells but also the surrounding stromal populations. In the long term, the custom-made endoscopic CAP device could be utilized in endoscopic procedures to treat patients with CCA *in situ*, as well as other malignancies sensitive to CAP. Additionally, combining CAP with other therapies, such as immunotherapy, could be a promising approach, given CAP's ability to recruit immune populations to the tumor site.

DISCUSSION

This study investigated the potential of a custom-made CAP source as a cancer therapy, focusing on both *in vitro* and *in vivo* models of CCA, a highly desmoplastic tumor of the biliary tract. Given the challenges in treating this type of tumor, it became necessary to develop new therapeutic options that can target not only tumor cells but also the surrounding stromal components that aid in cancer progression. In this study, CAP was being explored as a dual-action therapy that addressed both the tumor and its complex microenvironment.

Little is known about how CAP affects stromal populations in a tumor setting. CAP has been predominantly used in dermatology and wound healing, so its effects on tumor-associated fibroblasts and endothelial cells are not well-documented. For instance, in non-tumor models like localized scleroderma, CAP exposure has been shown to significantly reduce collagen production by fibroblasts and decrease α -SMA expression in dermal myofibroblasts—effects that could potentially extend to tumor contexts ^{11,20}. Regarding TECs, a few studies have shown CAP's cytotoxicity in tumor models. A 2020 study on hepatocellular carcinoma demonstrated that CAP inhibited blood vessel formation in an *in ovo* model ²¹. Another study published in June 2024 on pancreatic cancer, using plasma-treated hydrogels made of alginate and hyaluronic acid, found that CAP-treated tumors had reduced glycosaminoglycans (as indicated by Alcian blue staining) but increased collagen (shown by Masson's Trichrome staining) in the tumor extracellular matrix ²². These findings raised the hypothesis that CAP's oxidizing species may modify the chemistry of hyaluronic acid in the gel, potentially affecting

signaling pathways. To understand how CAP influences tumor collagen, further investigation is needed to examine structural changes. RNA-Seq analysis of multicellular spheroids in this study revealed changes in extracellular matrix organization following CAP treatment. Future work should focus on using second harmonic generation to analyze collagen structure in tumor sections and linking these findings to proteomic data to confirm oxidative modifications in the extracellular matrix components.

Our RNA-Seq data also revealed that CAP exposure induced immunogenic responses, prompting an investigation into its effects on the immune microenvironment *in vivo*. Numerous studies have shown that CAP induces the release of pro-immunogenic DAMPs like CRT, HMGB1 and ATP. These DAMPs can activate cytotoxic T cells, triggering antitumor immune responses. However, the gold standard for confirming ICD is an *in vivo* prophylactic vaccination assay²³, which has rarely been performed in the context of CAP therapy. To date, only three studies have conducted this assay after *in vitro* treatment of cancer cells. In one study on an ectopic colorectal cancer model, 90 % of mice immunized with CAP-treated cells had reduced tumor volumes compared to the control group, suggesting partial protection¹³. Two other studies using a melanoma model showed similar slowdowns in tumor growth in vaccinated mice^{15,24}. Nevertheless, many researchers assume ICD induction based on *in vitro* DAMPs release from 2D tumor cell lines, though some go further by demonstrating dendritic cell activation via co-culture experiments, as observed in osteosarcoma models²⁵. However, this alone is insufficient to confirm ICD induced by CAP. In this present study, we conducted an *in vivo* prophylactic vaccination assay on an ectopic model of CCA and validated ICD induction by our custom-made CAP device. Preliminary results also showed that direct CAP treatment of CCA tumors *in vivo* led to the recruitment of antitumor immune cells, such as CD8⁺ TILs and NK cells, reinforcing CAP's potential to induce ICD. Additionally, flow cytometry revealed that certain cells from CAP-treated CCA tumors expressed higher levels of PD-1 (on CD8⁺ TILs) and PD-L1 (on tumor cells, CAFs and TECs). This suggests a potential synergy between CAP and immune checkpoint inhibitors. With the growing prominence of immunotherapy, combining CAP with immune checkpoint inhibitors is an emerging area of interest. A 2024 study demonstrated synergistic effects between CAP and a PD-1 immune checkpoint inhibitor. Using a syngeneic mouse model of head and neck cancer, a combination of these two elements demonstrated more effective tumor growth inhibition compared to

either therapy alone ²⁶. This combined treatment notably increased survival rates by promoting greater infiltration of CD4⁺ and CD8⁺ T cells into the tumor. Similarly, a 2020 study on an ectopic melanoma model confirmed the synergistic effects of CAP and anti-PD-1 therapy. In this case, CAP was delivered via microneedles to enhance transdermal penetration, leading to a significant tumor growth reduction ⁸. This combination therapy also enhanced antitumor immune responses, increasing CD8⁺ T lymphocyte infiltration while reducing immunosuppressive regulatory T cells. Furthermore, the infiltrated T cells exhibited a more cytotoxic metabolic profile, with increased secretion of granzyme B and IFN γ , strengthening the antitumor response.

Building on these findings, we explored a novel approach by introducing a CAP-generated vaccine early in tumor development. This vaccine, designed to enhance antitumor immune responses, showed promising results, recruiting CD8⁺ TILs and NK cells at the tumor site and leading to reduced tumor growth. However, translating this method to clinical practice requires the use of clinically approved fluids and careful evaluation of their efficacy and safety. A 2019 study tested six clinically approved fluids for their stability and antitumor effects after CAP treatment, with sodium chloride (0.9 %) showing the highest RONS stability and consistent antitumor effects in human colorectal cancer cells ²⁷. Additionally, the clinical application of CAP-based tumor vaccines depends on early cancer detection, which is especially challenging in CCA, a disease often diagnosed at advanced stages. Furthermore, ethical concerns around the use of inactivated tumor cells in vaccines could deter patients from accepting such treatments. These hurdles suggest that while CAP-generated vaccines hold potential, alternative and more widely acceptable cancer treatment strategies are necessary for broader clinical use.

In conclusion, our custom-made CAP source demonstrated significant antitumor effects in both *in vitro* and *in vivo* models of CCA. CAP not only impacted tumor cells but also remodeled the tumor microenvironment, including modifications to the extracellular matrix and tumor vascularization. These effects were further reinforced by the recruitment of antitumor immune cells, enhancing CAP's potential to control CCA progression. Additionally, combining CAP with chemotherapies or immunotherapies, while personalizing treatment doses for each patient, could present a highly effective strategy for future cancer therapies involving CAP.

FIGURES

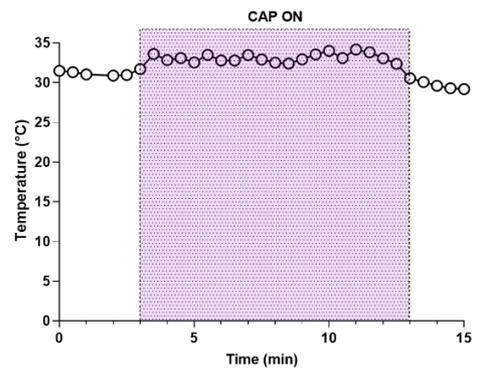
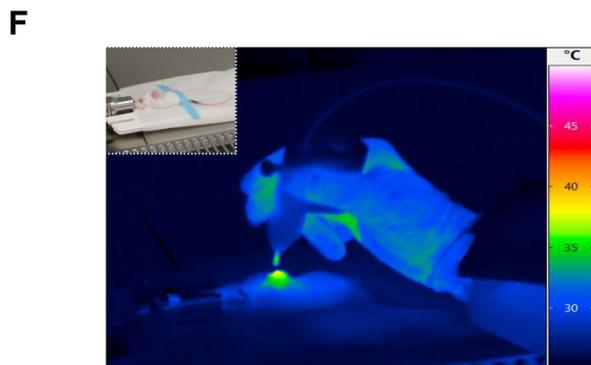
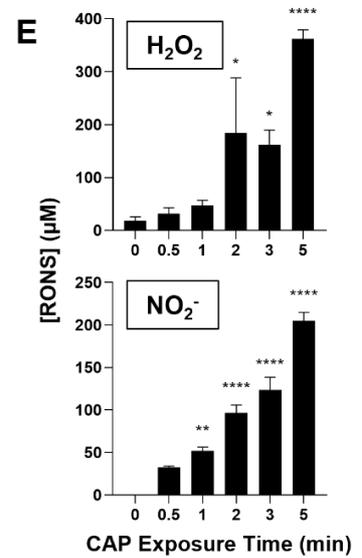
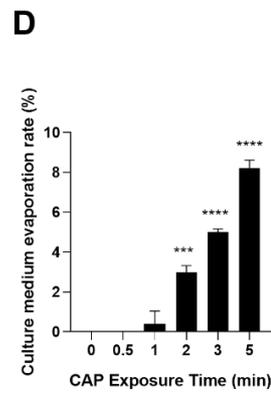
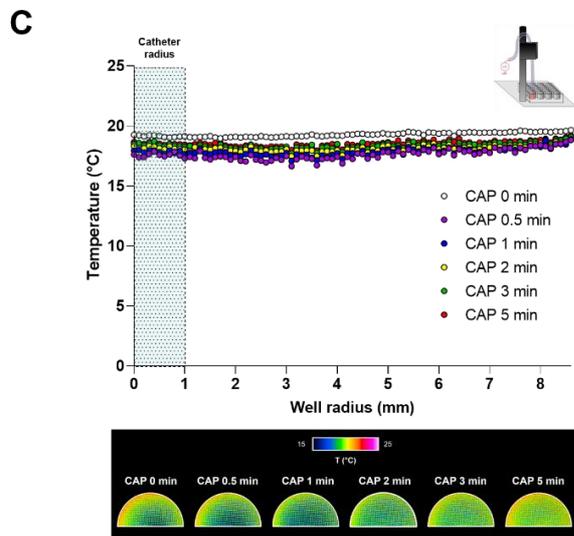
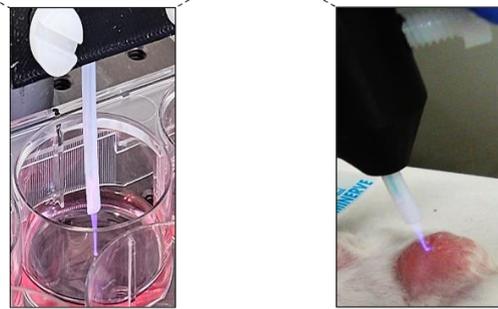
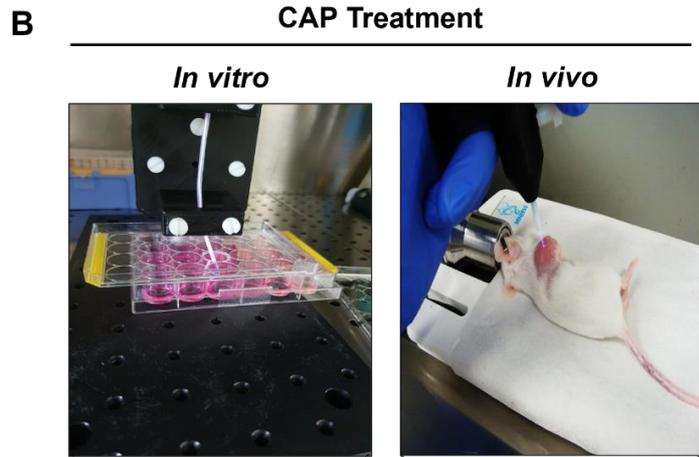
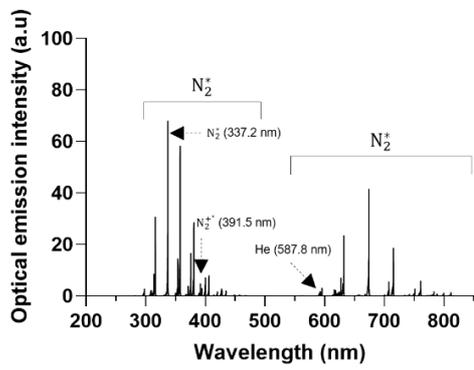
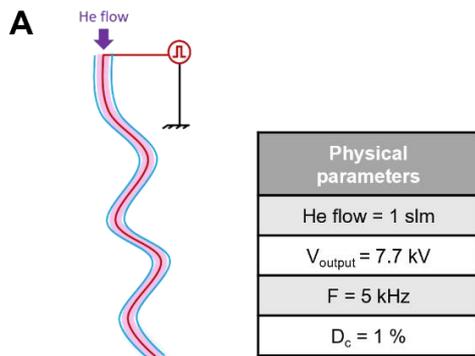


Figure 1: Overview of the CAP device, its biological applicability and its physicochemical properties. (A) Diagram illustrating the CAP device used in this study, detailing its primary physical parameters and showcasing its optical emission spectrum. The spectrum predominantly features nitrogen species. (B) Detailed illustrations of the CAP treatment methods, both *in vitro* and *in vivo*, highlighting the target areas. In both scenarios, the CAP device was positioned 5-10 mm away from the target. (C) Radial temperature distribution in a 24-well plate as a function of treatment time (0, 0.5, 1, 2, 3, and 5 min). The data is derived from infrared images, which are aligned beneath the graph. The catheter's radius is also indicated on the graph. (D) Evaporation of the culture medium in a well of a 24-well plate immediately after CAP treatment. (E) Concentration of hydrogen peroxide (H₂O₂) and nitrites (NO₂⁻) in the culture medium of a 24-well plate following CAP exposure for durations ranging from 0 to 5 min. (F) Infrared image of a mouse undergoing treatment with the CAP device (left panel) and quantification of the mouse's skin temperature throughout the treatment (right panel). The CAP was switched on during 10 min and temperature was also monitored before and after CAP exposure. Values are expressed as means ± SEM from at least three replicates. Significance levels are indicated as follows: *, p < 0.05; **, p < 0.01; ***, p < 0.001; ****, p < 0.0001, compared to untreated medium (0 min).

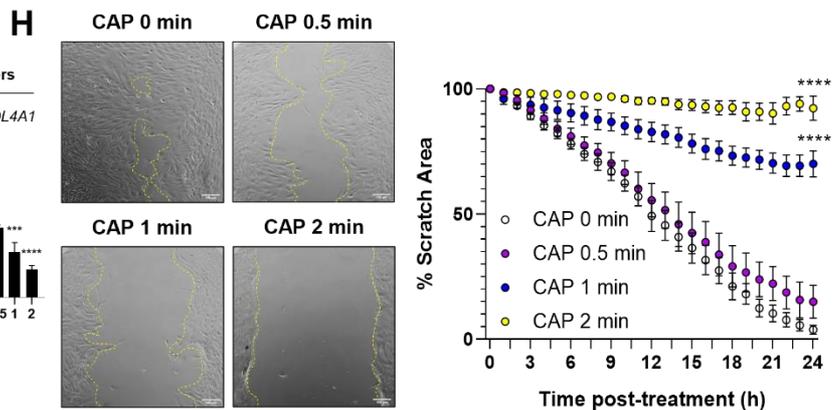
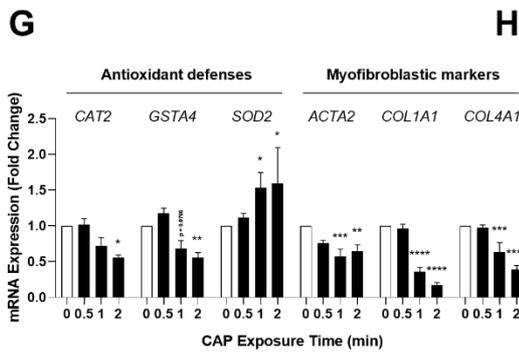
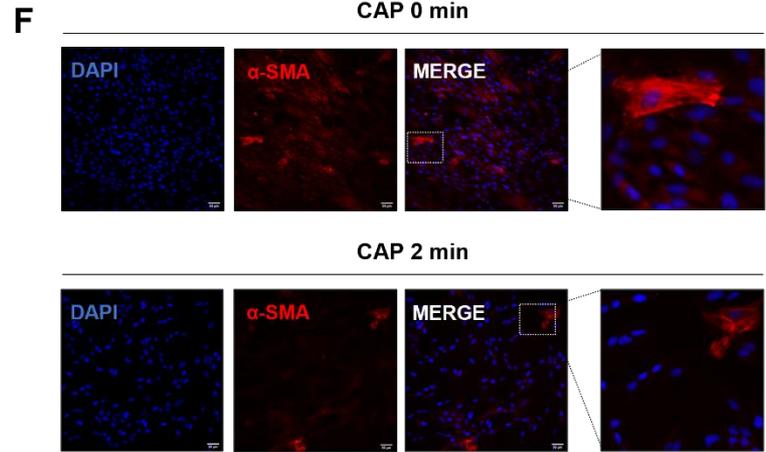
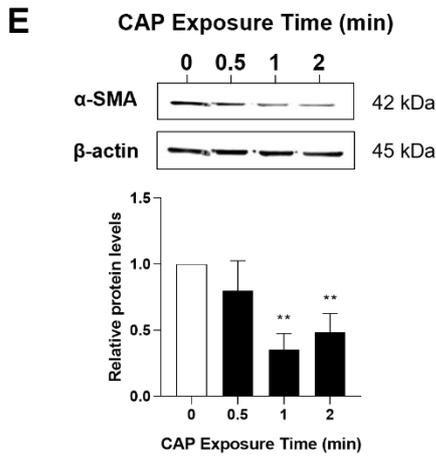
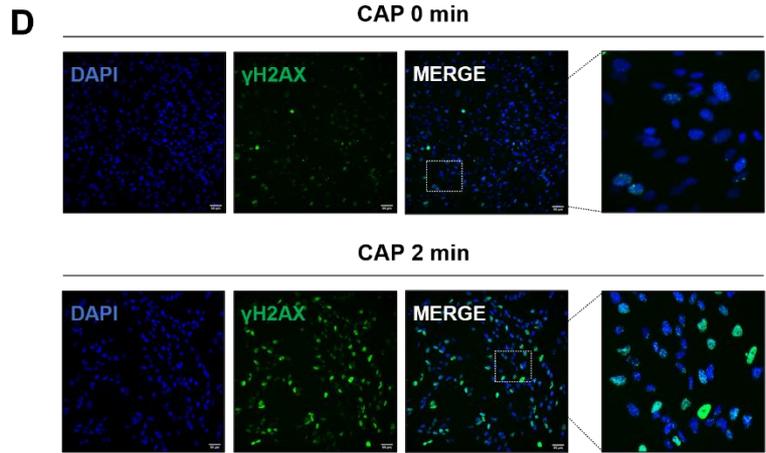
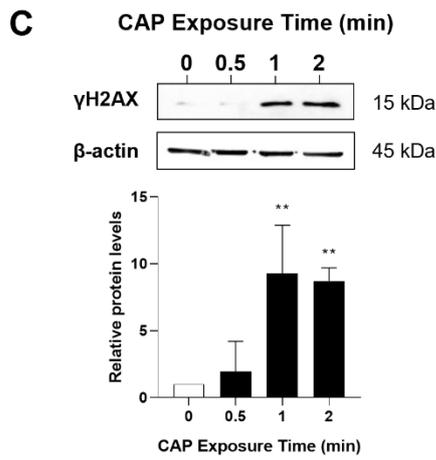
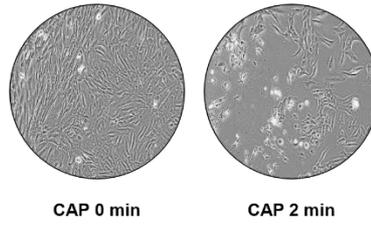
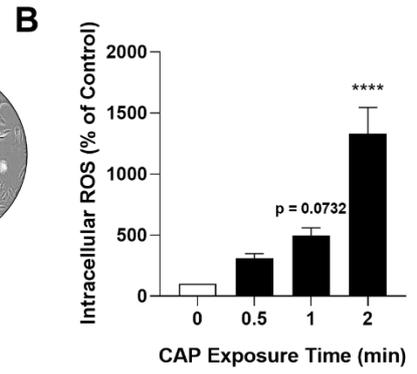
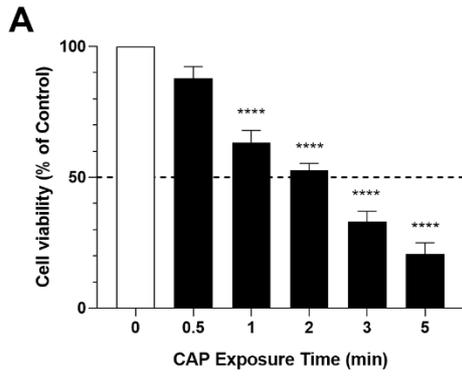


Figure 2: CAP-derived oxidative stress led to a loss of myfibroblastic activity in a cellular model of CAFs. (A) Effect of CAP on the viability of hTERT-HSC cells and representative images of the CAP-treated cells. The cells were treated for 0, 0.5, 1, 2, 3 and 5 min and their viability was assessed 24 h post-exposure by the crystal violet assay. A dotted line highlights the IC50. **(B-H)** For the analysis, the framework set by the IC50 of the cells, i.e., 2 min of treatment was deeper studied. **(B)** Intracellular ROS concentration in hTERT-HSC cells, measured 30 min after CAP exposure. **(C)** Representative Western Blot (quantified below) and **(D)** immunofluorescence images of phosphorylated H2AX (γ H2AX) in hTERT-HSC cells, 24 h post-CAP exposure. **(E)** Representative Western Blot (quantified below) and **(F)** immunofluorescence images of α -SMA in hTERT-HSC cells, 24 h post-CAP exposure. **(G)** Expression of *CAT2*, *GSTA4*, *SOD2* (antioxydant defenses) and *ACTA2*, *COL1A1* and *COL4A1* (myfibroblastic markers) at mRNA level in hTERT-HSC cells by RT-qPCR 24 h post-CAP exposure. **(H)** Scratch assay carried out on hTERT-HSC cells during 24 h post-CAP exposure using real-time live microscopy. Representative brightfield images (left panel) are showing a decreased migration speed of the CAP-treated cells compared to the untreated cells, the yellow lines highlighting the edges of the cellular mat at the end of the acquisition. Quantification of the wound closure (right panel) as the remaining area uncovered by the cells. Values are expressed as means \pm SEM from at least three cultures. Significance levels are indicated as follows: *, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$; ***, $p < 0.001$; ****, $p < 0.0001$, compared to untreated cells (0 min).

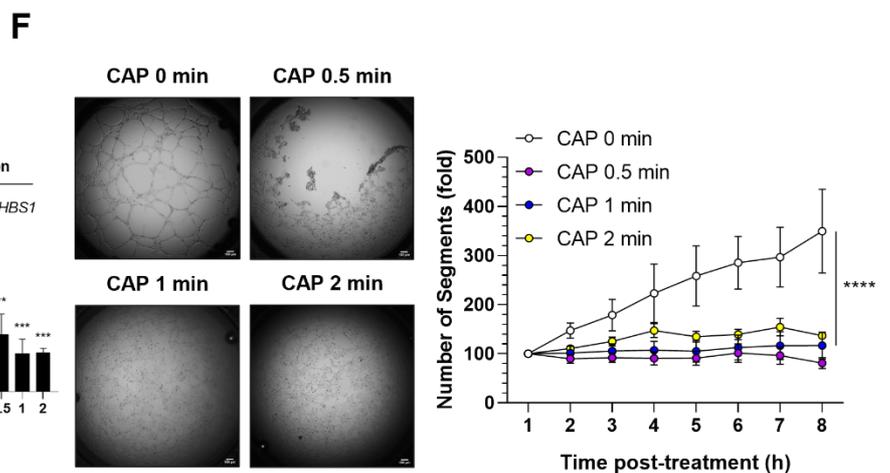
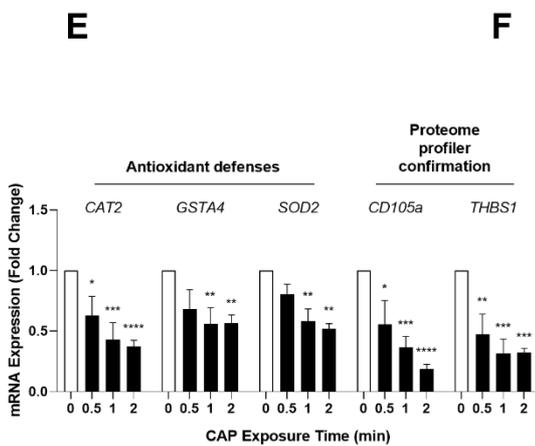
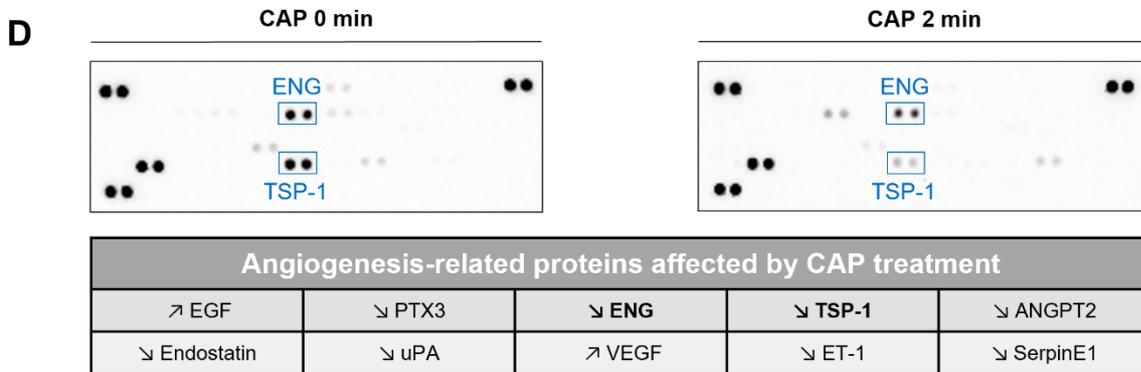
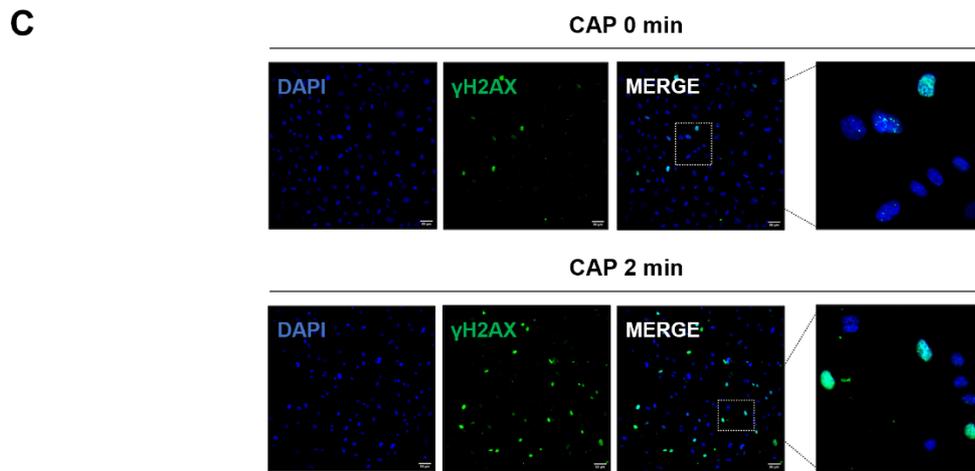
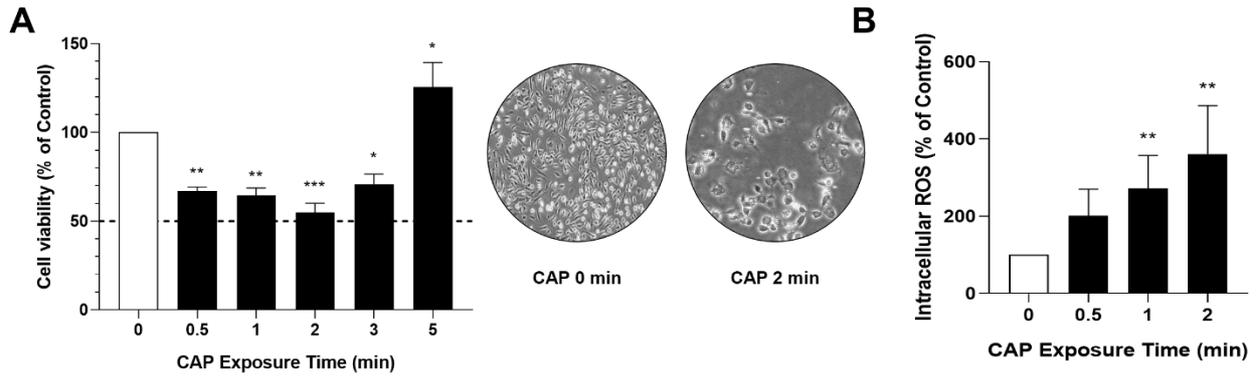


Figure 3: CAP-derived oxidative stress resulted in the inhibition of the angiogenic profile in a cellular model of TECs. (A) Effect of CAP on the viability of HUVEC cells and representative images of the CAP-treated cells. The cells were treated for 0, 0.5, 1, 2, 3 and 5 min and their viability was assessed 24 h post-exposure by the crystal violet assay. A dotted line highlights the IC50. **(B-F)** For the analysis, the framework set by the IC50 of the cells, i.e., 2 min of treatment was deeper studied. **(B)** Intracellular ROS concentration in HUVEC cells, measured 30 min after CAP exposure. **(C)** Immunofluorescence images of phosphorylated H2AX (γ H2AX) in HUVEC cells, 24 h post-CAP exposure. **(D)** Representative images of a human angiogenesis proteome profiler array carried out on untreated and CAP-treated HUVEC cells 24 h post-CAP exposure. The two proteins with the most visually significant variations have been highlighted on the blots. Underneath, the table shows all the angiogenesis-related proteins affected by the treatment. **(E)** Expression of *CAT2*, *GSTA4* and *SOD2* (antioxidant defenses), *CD105a* and *THBS1* at mRNA level in HUVEC cells, measured by RT-qPCR 24 h after CAP exposure, confirming the results of the proteome profiler array. **(F)** Tubulogenesis assay conducted on HUVEC cells for 24 h post-CAP exposure using real-time live microscopy. The results presented here were obtained 8 h post-CAP exposure. Representative brightfield images (left panel) illustrate the inability of CAP-treated cells to form a complex vascular network compared to untreated cells. Quantification over time of the number of segments formed is shown in the right panel. Values are expressed as means \pm SEM from at least three cultures. Significance levels are indicated as follows: *, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$; ***, $p < 0.001$; ****, $p < 0.0001$, compared to untreated cells (0 min).

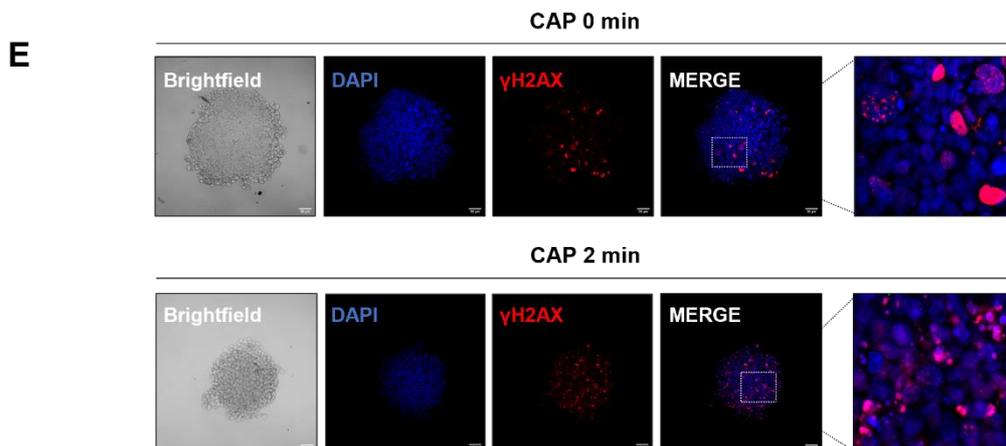
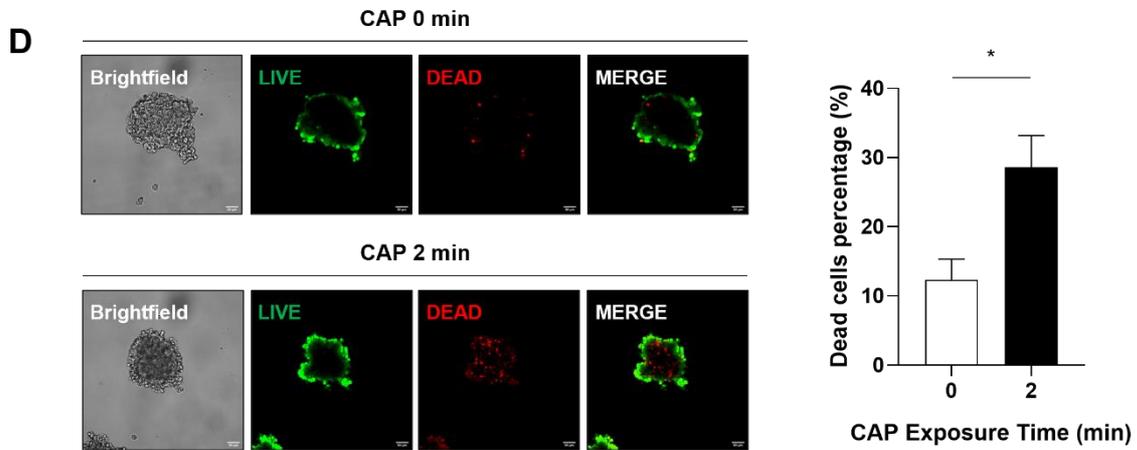
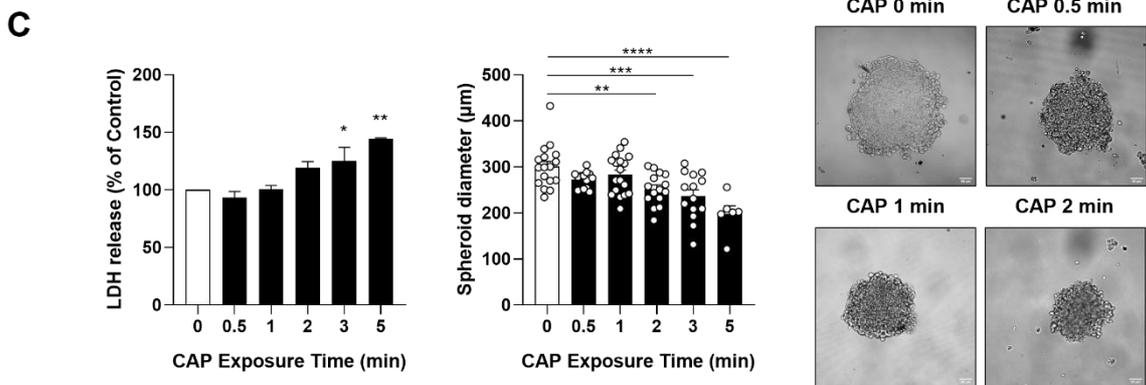
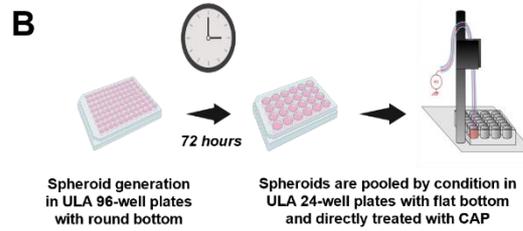
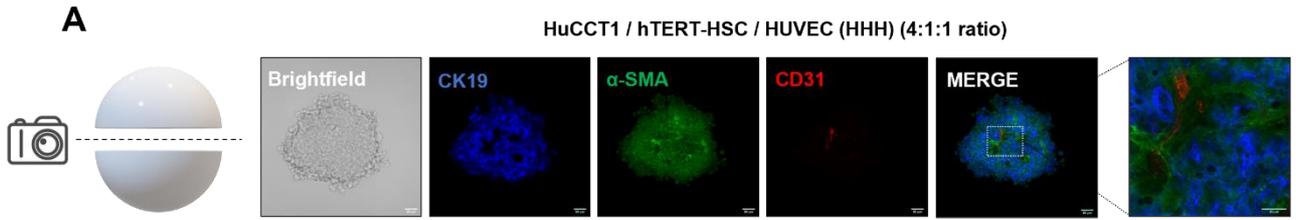
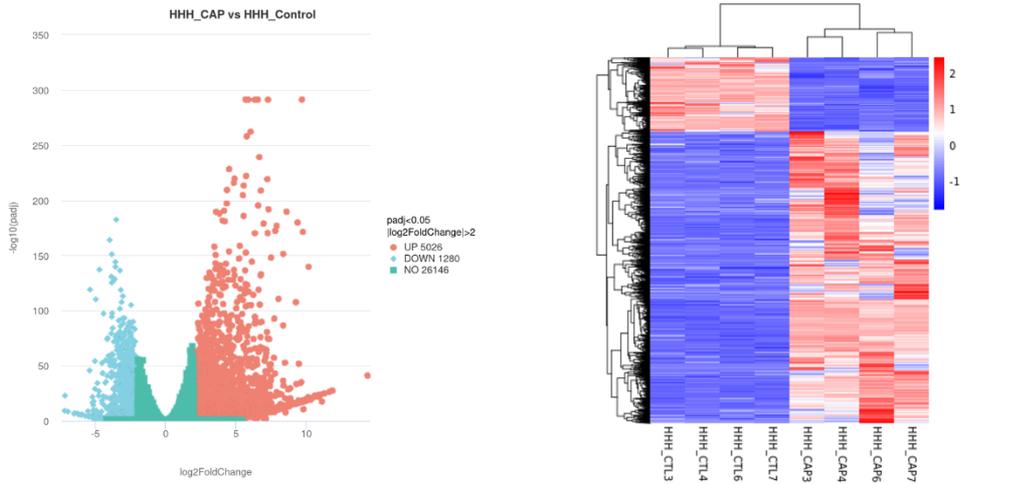
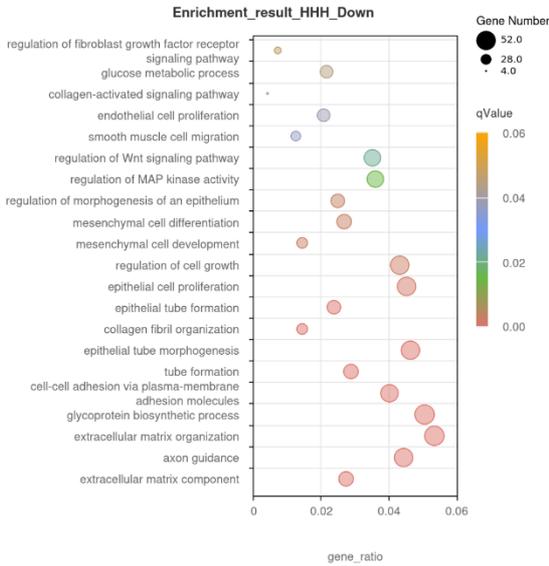


Figure 4: CAP decreased the integrity of a pluricellular 3D spheroid model of CCA. (A) Immunofluorescence characterization of a 3D spheroid model of CCA, composed of HuCCT1, hTERT-HSC, and HUVEC cells (called HHH) in a 4:1:1 ratio. The cells were stained with CK19, α -SMA, and CD31, respectively, and the images were captured by confocal microscopy at the center of the spheroid. **(B)** Method used for the preparation of spheroids for CAP treatment. Briefly, the spheres were collected 3 days post-seeding and pooled in a 24-well ULA plate with flat bottom in order to be treated by CAP. **(C)** LDH release quantification, spheroid diameter measurements and representative brightfield images of CAP-treated HHH spheroids, 24 h post-exposure. **(D-E)** For the analysis, a CAP exposure of 2 min was deeper studied and the fluorescence images were obtained by confocal microscopy at the center of the spheroids. **(D)** Live/dead staining images of CAP-treated HHH spheroids 24 h post-exposure and relative quantification of the percentage of dead cells. **(E)** Immunofluorescence images of phosphorylated H2AX (γ H2AX) in HHH spheres, 24 h post-CAP exposure. Values are expressed as means \pm SEM from at least three cultures. Significance levels are indicated as follows: *, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$; ***, $p < 0.001$; ****, $p < 0.0001$, compared to untreated spheroids (0 min).

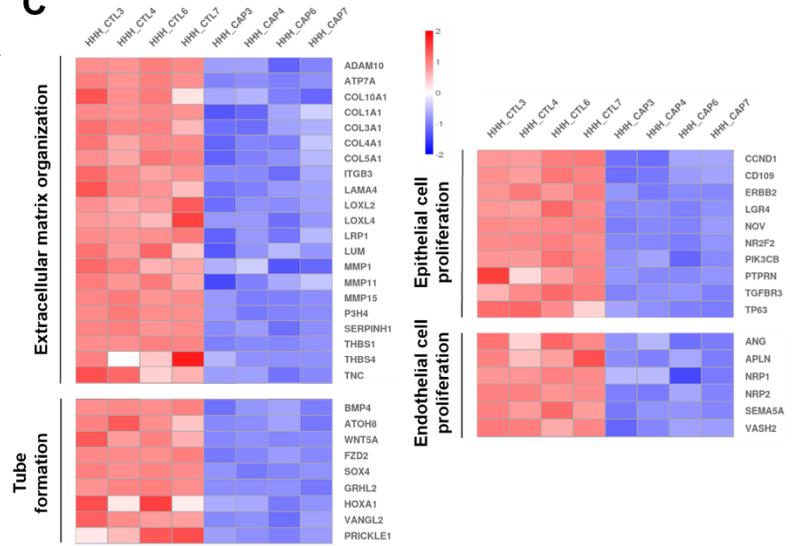
A HuCCT1 / hTERT-HSC / HUVEC (HHH)



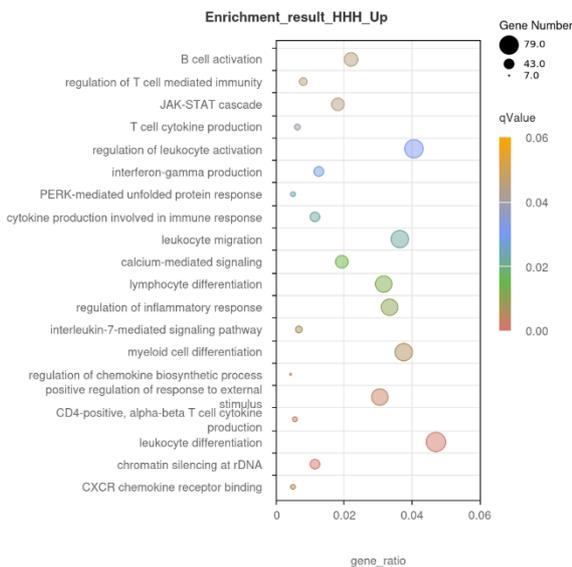
B Enrichment_result_HHH_Down



C



D



E

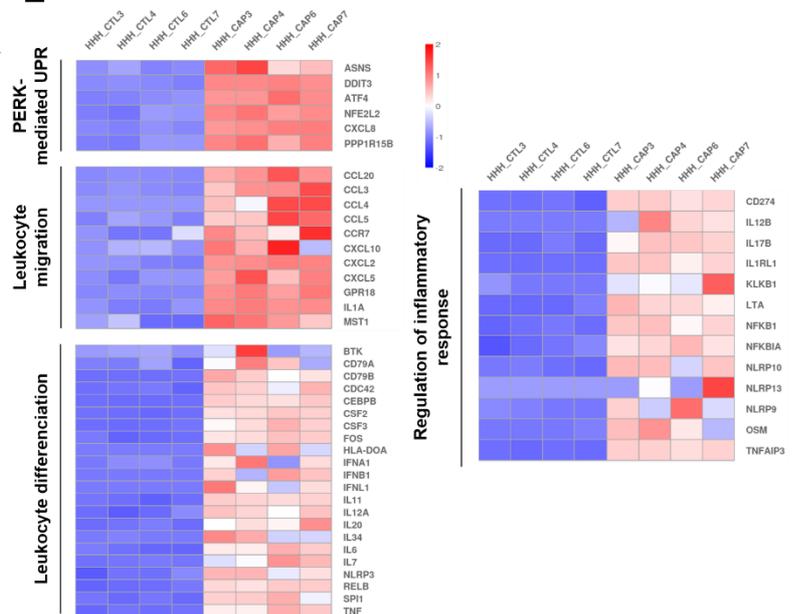


Figure 5: Functional enrichment analysis of CAP-treated CCA spheroids obtained from RNA-Seq. (A) Volcano plot and heatmap of differentially expressed genes in CAP-treated and untreated CCA spheroids composed of HuCCT1, hTERT-HSC and HUVEC cells (named HHH spheroids). A $|\log_2(\text{FoldChange})| \geq 2$ and an adjusted p-value < 0.05 have been maintained to pursue the analysis. **(B-C)** Signaling pathways affected by CAP treatment based on GO enrichment analysis using down-regulated DEGs **(B)** and heatmaps showing DEGs representative of the most relevant pathways **(C)**. **(D-E)** Signaling pathways affected by CAP treatment based on GO enrichment analysis using up-regulated DEGs **(D)** and heatmaps showing DEGs representative of the most relevant pathways **(E)**. CTL means Control and CAP means CAP-treated. DEGs, Differentially-Expressed Genes.

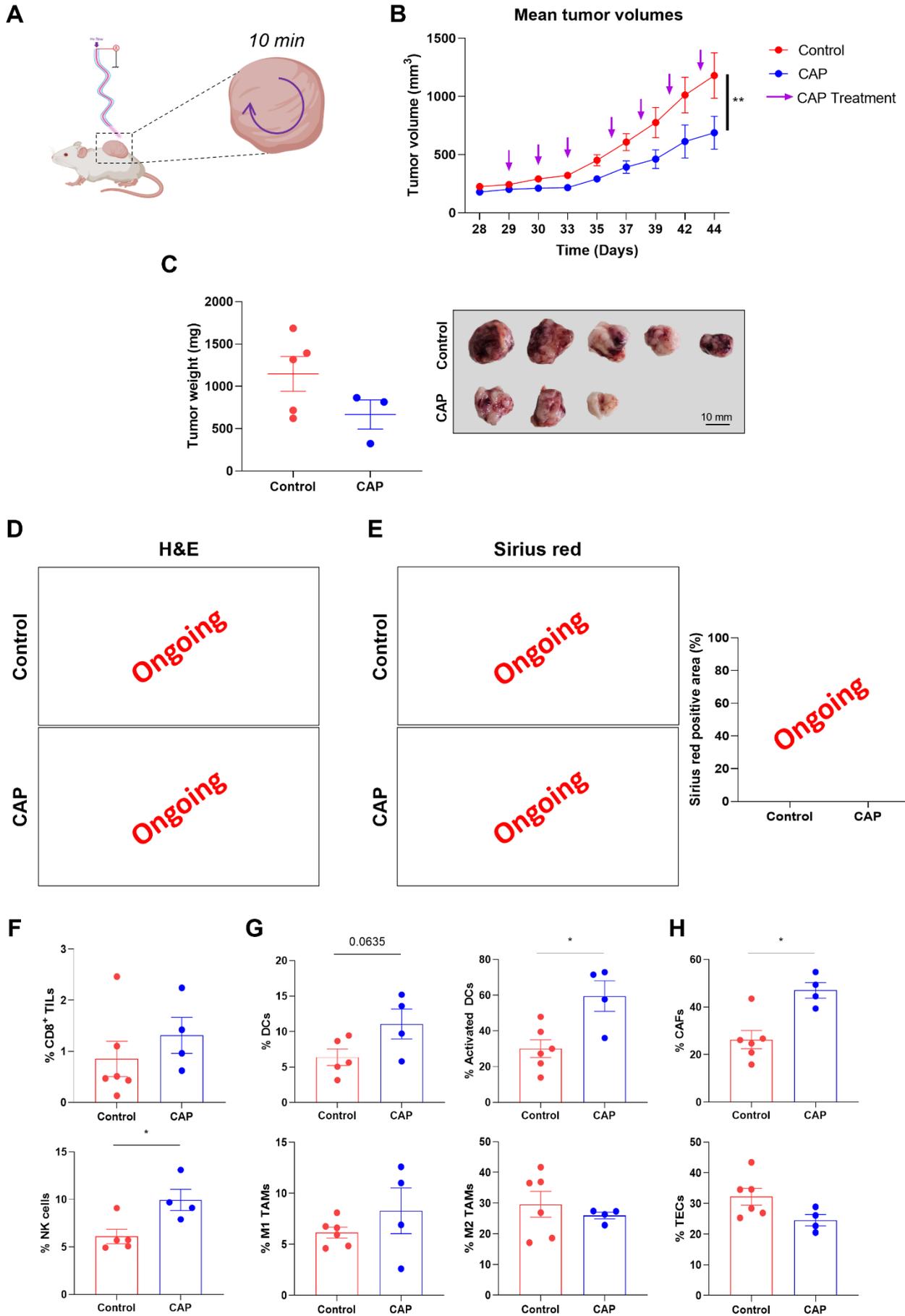


Figure 6: CAP reduced CCA progression by remodeling tumor microenvironment in a murine syngeneic model. (PRELIMINARY RESULTS) (A) Experimental treatment of ectopic CCA tumors using the CAP device. CAP has been administered by sweeping the tumors for 10 min. The mice have been treated every 2-3 days, with a total of 7 treatments. (B) Tumor volume of mice bearing CCA developed from SB1-JP4 cells treated with CAP or untreated (Control). Purple arrows indicate treatments points with CAP (n=3-5 per group). (C) Tumor weight and representative image of tumors from each group at sacrifice (day 44). (D-E ONGOING) (D) Representative HE staining of the CCA tumors extracted from control or CAP-treated mice. (E) Representative images and relative quantification of Sirius red staining of the CCA tumors extracted from control or CAP-treated mice. (F) Infiltration of CD8+ TILs and NK cells in the tumors extracted from the control or CAP-treated mice. (G) Flow cytometry analysis of the infiltration of DCs, activated (CD80+/CD86+) DCs, M1-like and M2-like TAMs in the tumors extracted from control or CAP-treated mice. (H) Proportion of CAFs and TECs in the tumors extracted from control or CAP-treated mice. Values are expressed as means \pm SEM. Significance levels are indicated as follows: *, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$, compared to untreated mice. TILs, Tumor-Infiltrating Lymphocytes; DCs, Dendritic Cells; TAMs, Tumor-Associated Macrophages.

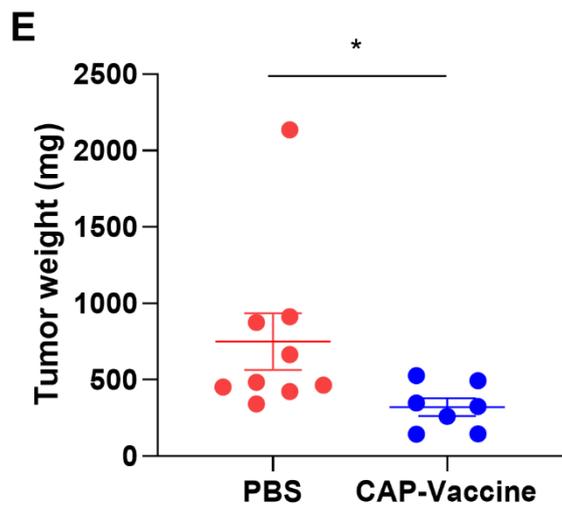
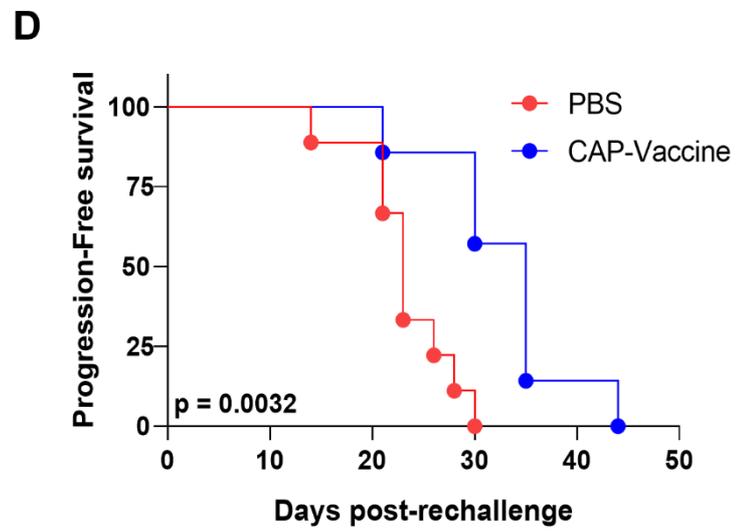
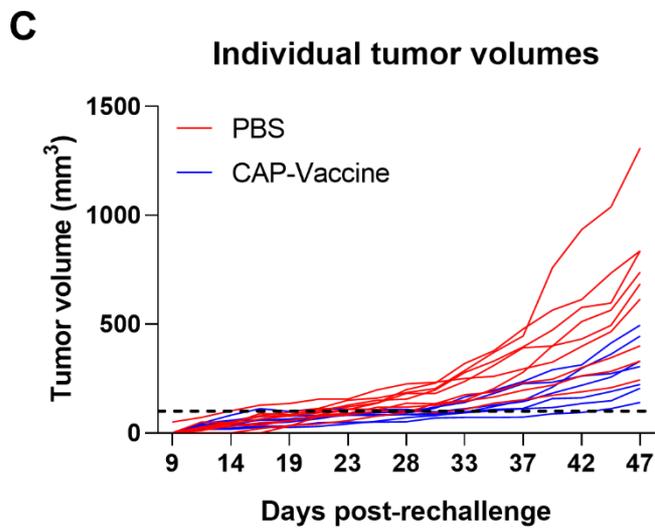
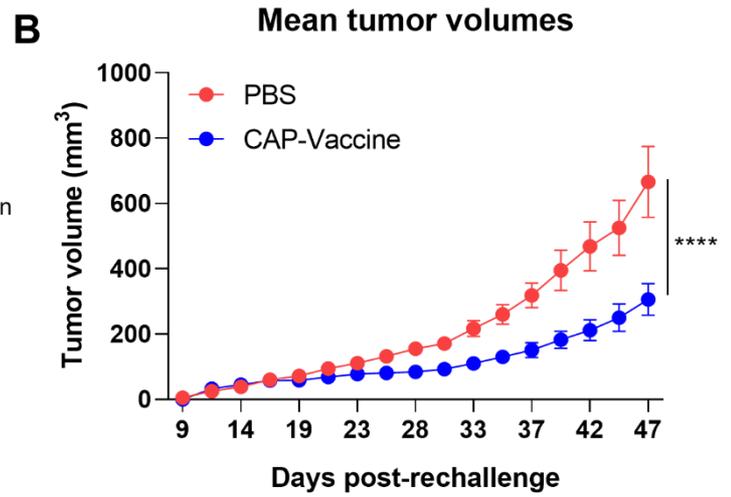
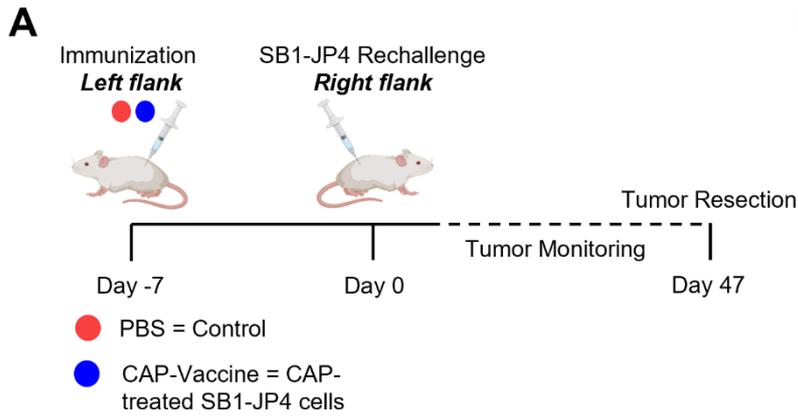


Figure 7: Immunization of mice with CAP-treated cancer cells under ICD-inducing conditions reduced the growth rate in challenge CCA tumors. (A) Experimental procedure of the prophylactic vaccination assay. Briefly, B6(Cg)-*Tyr^{c-2J}*/JRj mice were subcutaneously injected with PBS (= Control) or the CAP-Vaccine (CAP-treated SB1-JP4 cells) into the left flank (n=7-9 per group). One week later, the mice were rechallenged with live SB1-JP4 cells on the opposite flank and monitored for 47 days. Challenge tumors grew more rapidly in mice immunized with PBS compared to those immunized with CAP-treated cells **(B)**. **(C)** Tumor growth of each mouse. A dotted line is plotted to indicate a tumor volume of 100 mm³, used in order to determine the progression-free survival **(D)**. **(E)** Tumor weight and representative image of tumors from each group at sacrifice (day 47). Values are expressed as means ± SEM. Significance levels are indicated as follows: *, p < 0.05; ****, p < 0.0001, compared to mice injected with PBS.

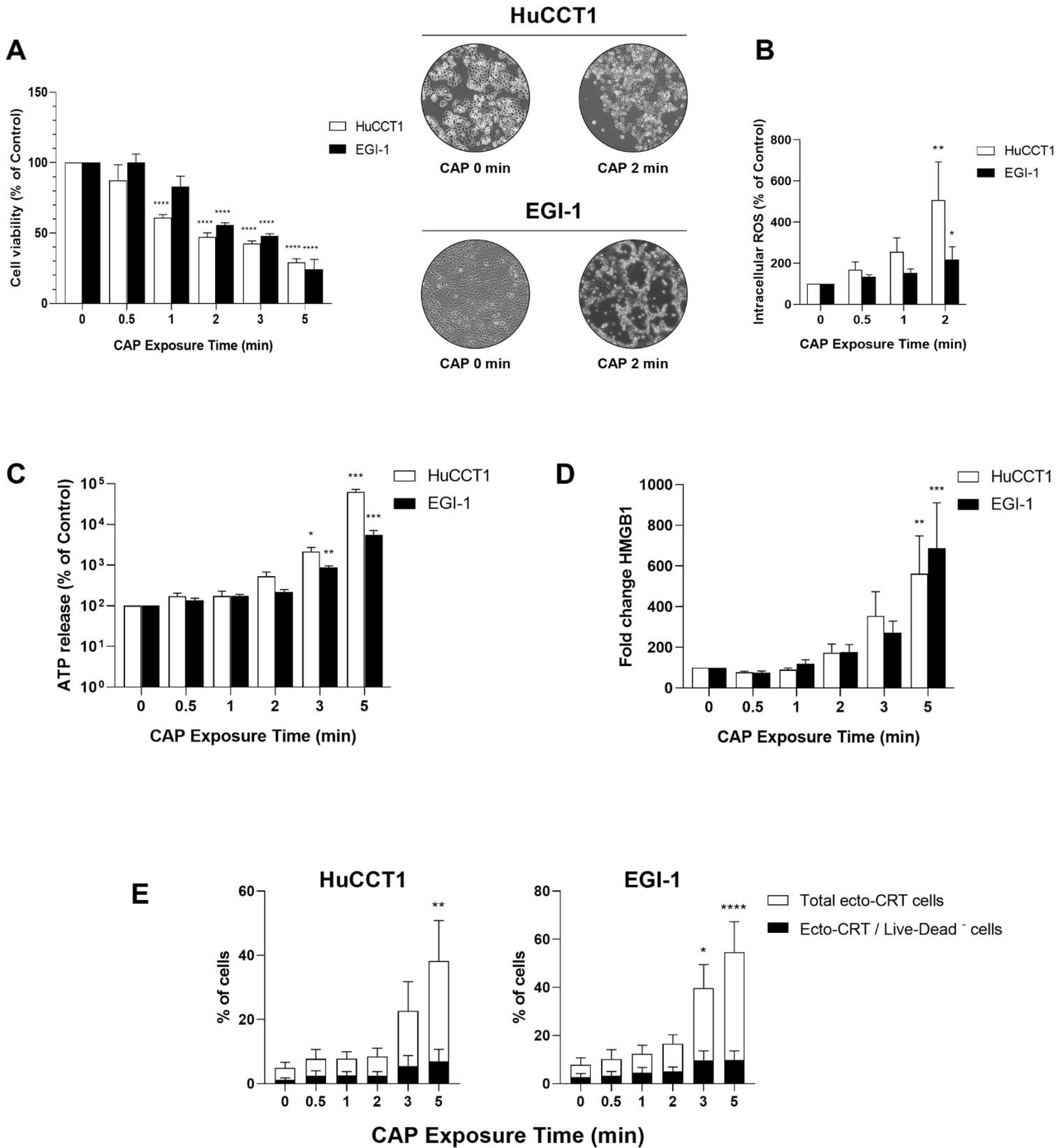


Figure 8: CAP-induced *in vitro* presentation of ICD-characteristic DAMPs by CCA cells. (A) Effect of CAP on the viability of HuCCT1 and EGI-1 CCA cells and representative images of the CAP-treated cells. The cells were treated for 0, 0.5, 1, 2, 3 and 5 min and their viability was assessed 24 h post-exposure by the crystal violet assay. **(B)** Intracellular ROS concentration in HuCCT1 and EGI-1 CCA cells, measured 30 min after CAP exposure. **(C)** ATP release quantification by HuCCT1 and EGI-1 CCA cells in the medium, 10 min post-CAP exposure. **(D)** HMGB1 release quantification by HuCCT1 and EGI-1 CCA cells in the medium, 48 h post-CAP exposure. **(E)** CRT externalization (ecto-CRT) on the surface of HuCCT1 and EGI-1 CCA cells 24 h post-CAP exposure. Live/Dead staining has been used as a viability marker. Values are expressed as means \pm SEM from at least three cultures. Significance levels are indicated as follows: *, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$; ***, $p < 0.001$; ****, $p < 0.0001$, compared to untreated cells (0 min).

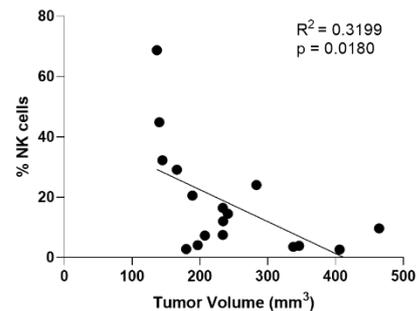
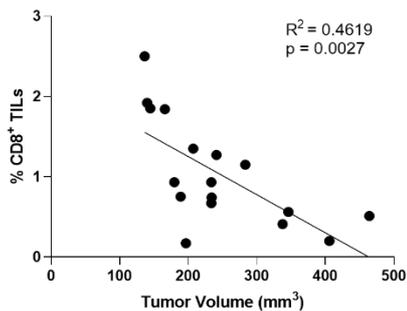
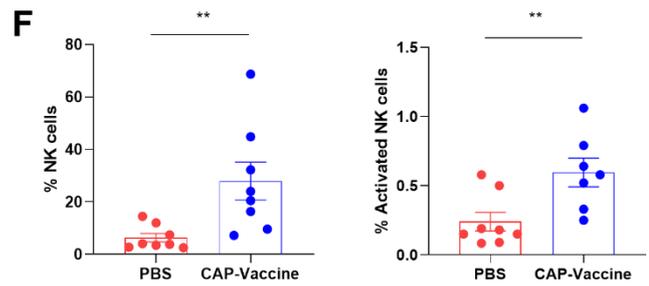
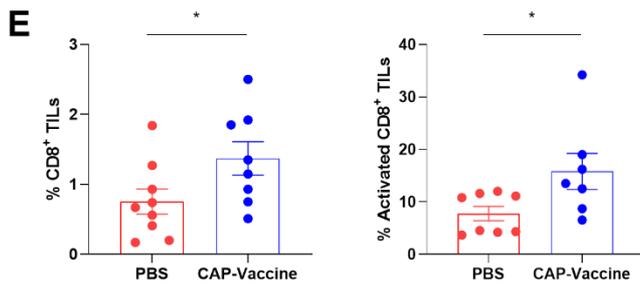
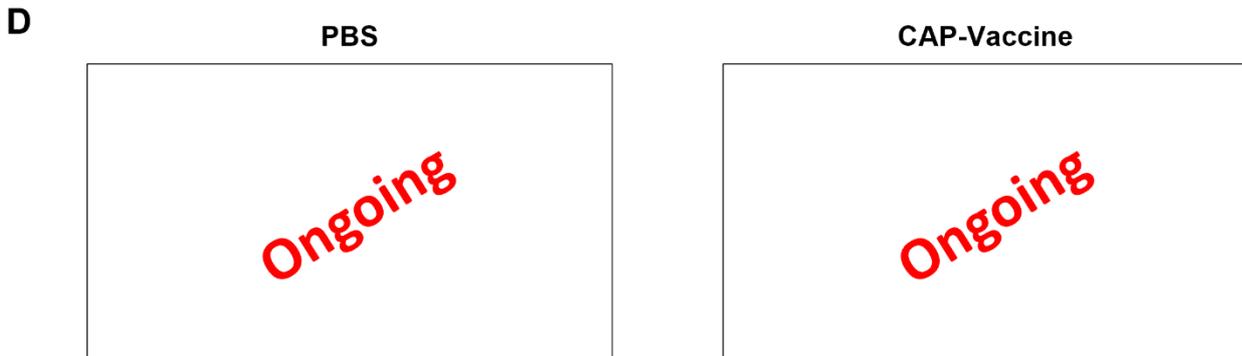
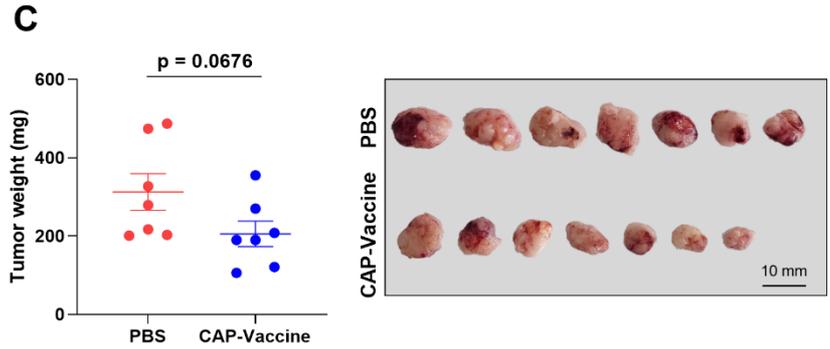
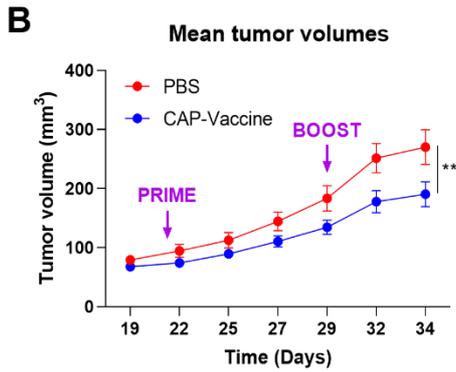
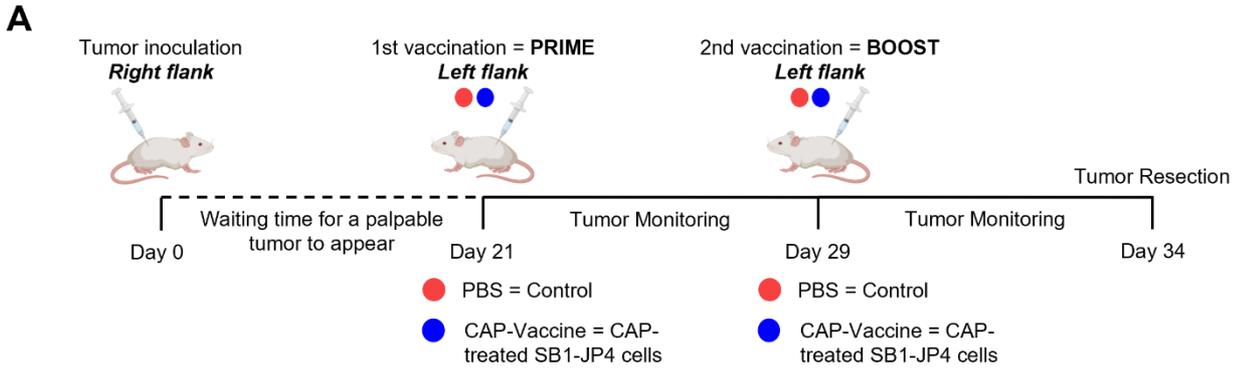
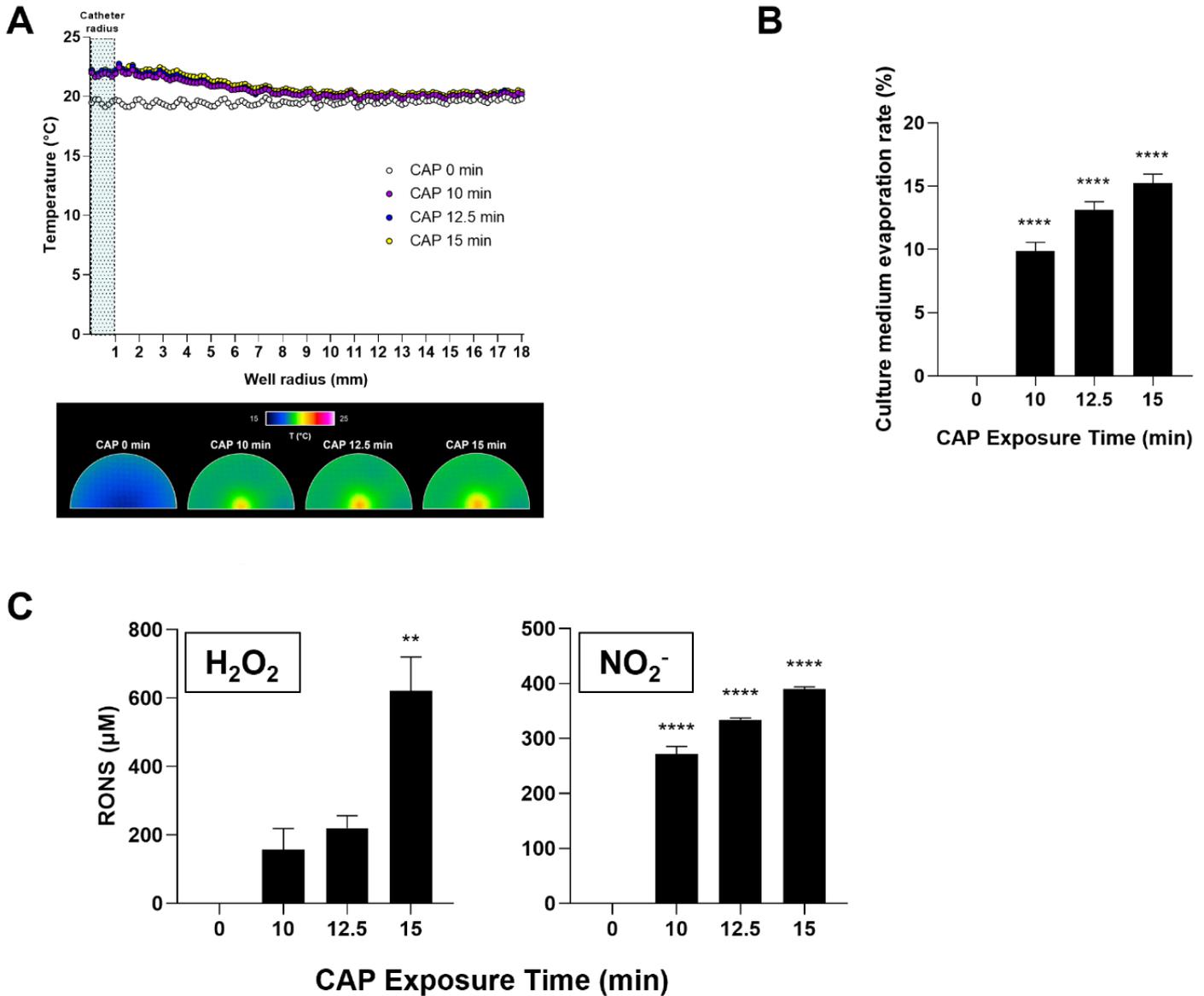
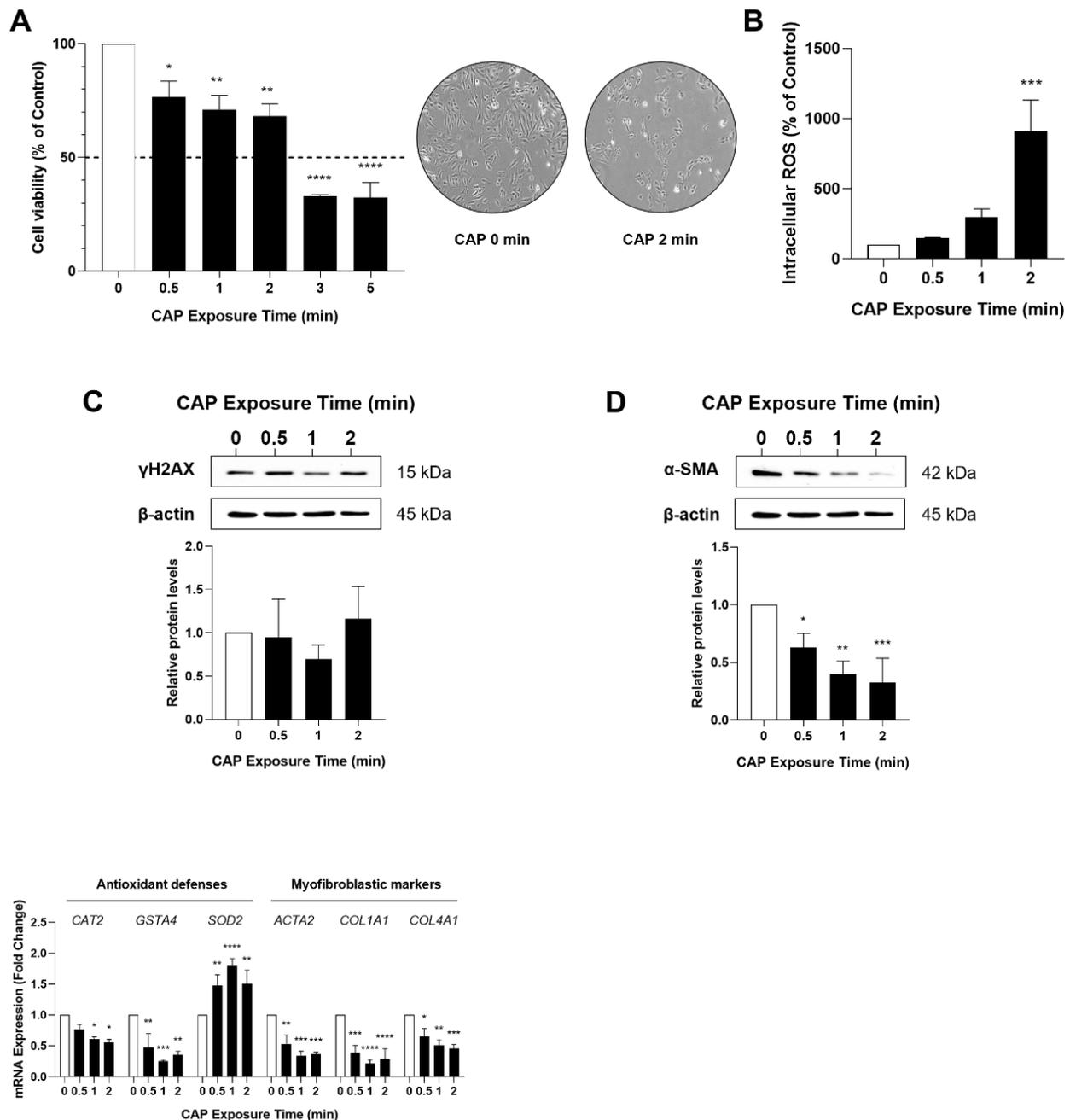


Figure 9: Vaccinations with CAP-treated cells under ICD conditions reduced CCA progression through an antitumor immune response. **(A)** Experimental procedure of the therapeutic vaccination assay. Briefly, B6(Cg)-*Tyr^{c-2J}*/JRj mice were subcutaneously injected with live SB1-JP4 CCA cells into the right flank (n=7-9 per group). Once the tumors became palpable, the mice received an initial injection (PRIME) with either PBS (Control) or the CAP-Vaccine (CAP-treated SB1-JP4 cells) into the left flank. A second injection (BOOST) was administered 8 days later, and the mice were sacrificed 5 days after the BOOST to study the immune infiltration of the tumors. **(B)** Tumor volume of mice injected twice with PBS or with the CAP-Vaccine. Purple arrows indicate the injections of PBS or CAP-treated SB1-JP4 cells. **(C)** Tumor weight and representative image of tumors from each group at sacrifice (day 34). **(ONGOING)** **(D)** Representative HE staining of the CCA tumors extracted from mice injected twice with PBS (left panel) or with the CAP-Vaccine (right panel). **(E)** Flow cytometry analysis showed a higher infiltration of CD8⁺ and activated CD8⁺ (CD25⁺/CD8⁺) TILs in the tumors extracted from mice injected twice with the CAP-Vaccine compared to the ones injected with PBS. This CD8⁺ TILs infiltration is negatively correlated with the tumor volume (bottom panel). **(F)** Flow cytometry analysis showed a higher infiltration of NK and activated NK (CD25⁺) cells in the tumors extracted from mice injected twice with the CAP-Vaccine compared to the ones injected with PBS. This NK cell infiltration is negatively correlated with the tumor volume (bottom panel). Values are expressed as means ± SEM. Significance levels are indicated as follows: *, p < 0.05; **, p < 0.01, compared to mice injected twice with PBS.

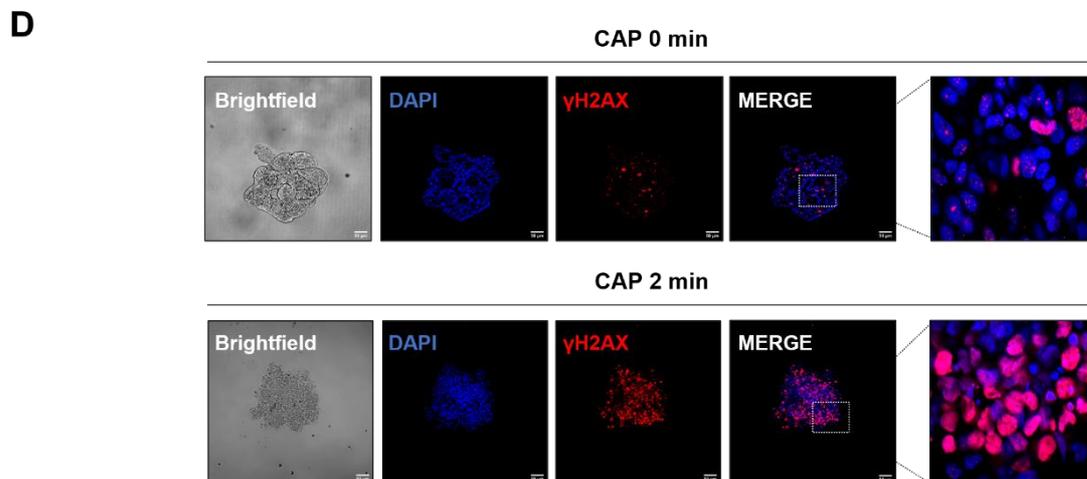
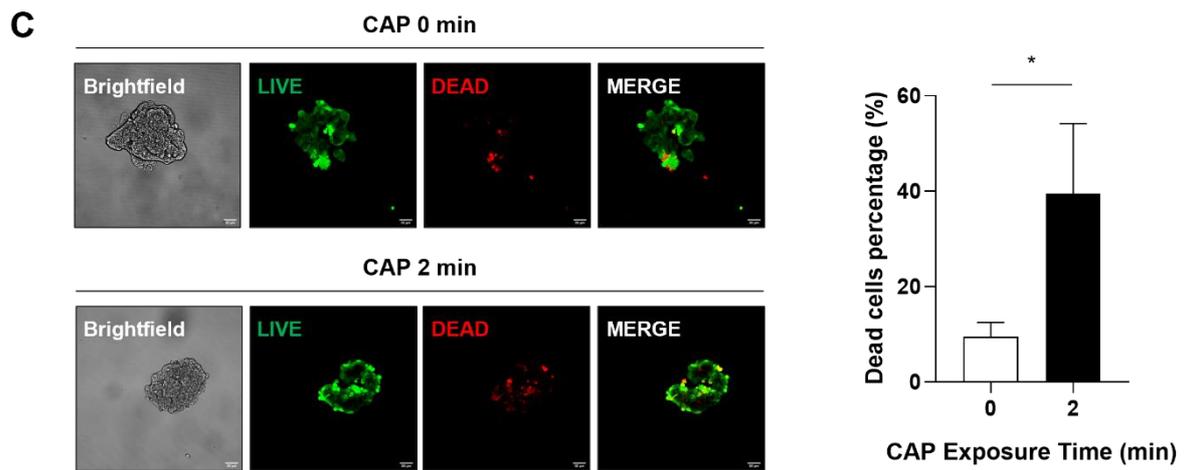
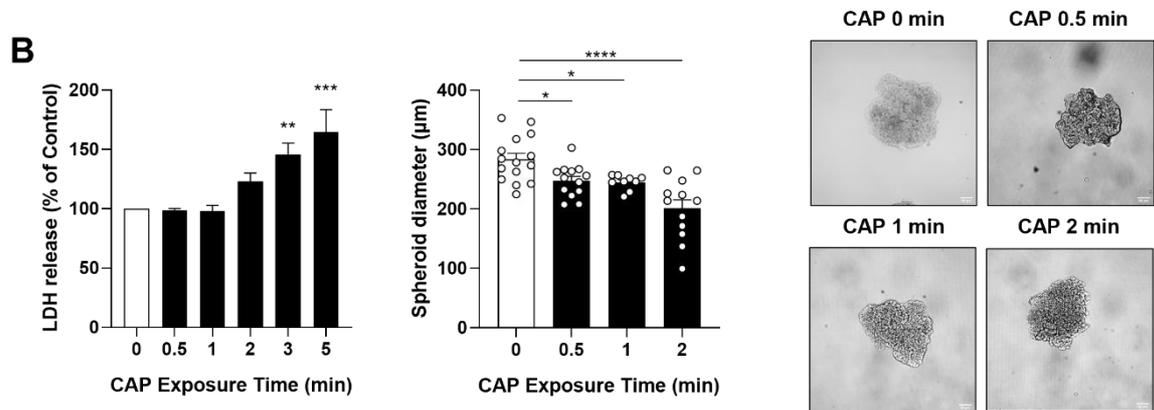
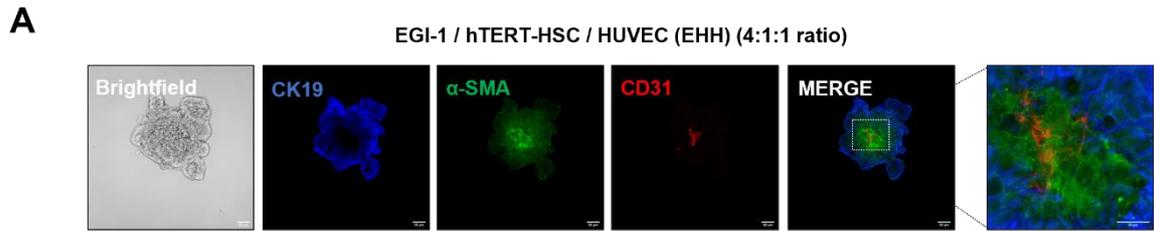
SUPPLEMENTARY FIGURES



Supplementary Figure 1: Physicochemical properties of the CAP device in 6-well plates. (A) Radial temperature distribution in a 6-well plate as a function of treatment time (0, 10, 12.5 and 15 min). The data is derived from infrared images, which are aligned beneath the graph. The catheter's radius is also indicated on the graph. **(B)** Evaporation of the culture medium in a well of a 6-well plate immediately after CAP treatment. **(C)** Concentration of hydrogen peroxide (H_2O_2) and nitrites (NO_2^-) in the culture medium of a 6-well plate following CAP exposure for durations ranging from 0 to 15 min. Values are expressed as means \pm SEM from at least three replicates. Significance levels are indicated as follows: **, $p < 0.01$; ****, $p < 0.0001$, compared to untreated medium (0 min).

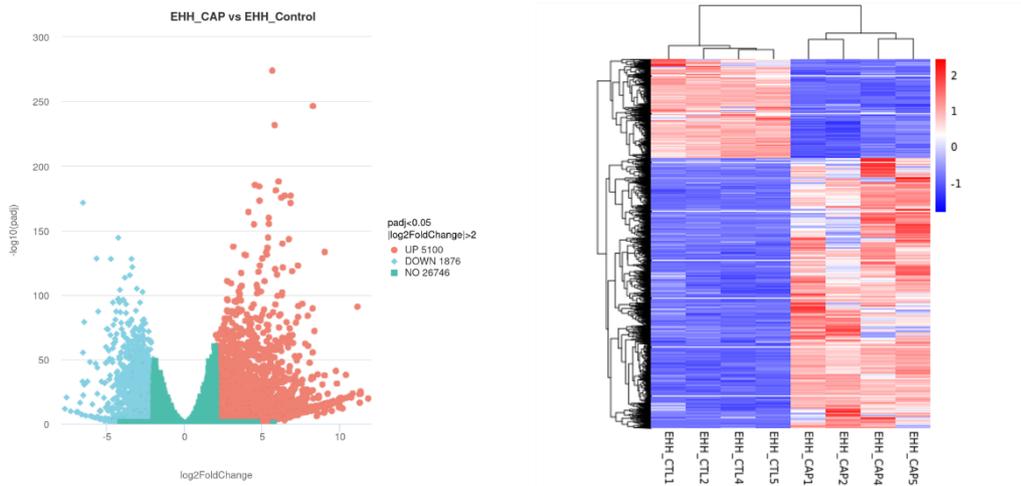


Supplementary Figure 2: Effects of CAP on another human hepatic myofibroblast cell line, used as a model of CAFs. (A) Effect of CAP on the viability of LX2-HSC cells and representative images of the CAP-treated cells. The cells were treated for 0, 0.5, 1, 2, 3 and 5 min and their viability was assessed 24 h post-exposure by the crystal violet assay. A dotted line highlights the IC50. **(B-E)** For the analysis, the framework set by the IC50 of the cells, i.e., 2 min of treatment was deeper studied. **(B)** Intracellular ROS concentration in LX2-HSC cells, measured 30 min after CAP exposure. **(C)** Representative Western Blot images and relative quantification of phosphorylated H2AX (γ H2AX) in LX2-HSC cells, 24 h post-CAP exposure. **(D)** Representative Western Blot images and relative quantification of α -SMA in LX2-HSC cells, 24 h post-CAP exposure. **(E)** Expression of *CAT2*, *GSTA4*, *SOD2* (antioxidant defenses) and *ACTA2*, *COL1A1* and *COL4A1* (myofibroblastic markers) at mRNA level in LX2-HSC cells by RT-qPCR 24 h post-CAP exposure. Values are expressed as means \pm SEM from at least three cultures. Significance levels are indicated as follows: *, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$; ***, $p < 0.001$; ****, $p < 0.0001$, compared to untreated cells (0 min).

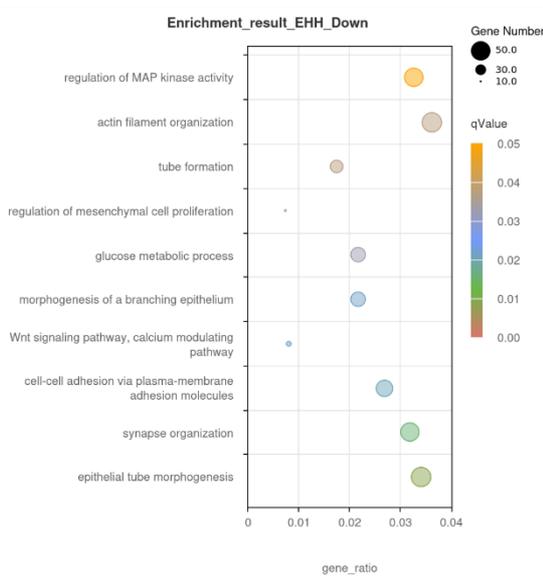


Supplementary Figure 3: Effects of CAP on the integrity of another pluricellular 3D spheroid model of CCA. (A) Immunofluorescence characterization of a 3D spheroid model of CCA, composed of EGI-1, hTERT-HSC, and HUVEC cells (called EHH) in a 4:1:1 ratio. The cells are stained with CK19, α -SMA, and CD31, respectively, and the images were captured by confocal microscopy at the center of the spheroid. **(B)** LDH release quantification, spheroid diameter measurements and representative brightfield images of CAP-treated EHH spheroids, 24 h post-exposure **(C-D)** For the analysis, a CAP exposure of 2 min was deeper studied and the fluorescence images were obtained by confocal microscopy at the center of EHH spheroids. **(C)** Live/dead staining images of CAP-treated EHH spheroids 24 h post-exposure and relative quantification of the percentage of dead cells. **(D)** Immunofluorescence images of phosphorylated H2AX (γ H2AX) in EHH spheres, 24 h post-CAP exposure. Values are expressed as means \pm SEM from at least three cultures. Significance levels are indicated as follows: *, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$; ***, $p < 0.001$; ****, $p < 0.0001$, compared to untreated spheroids (0 min).

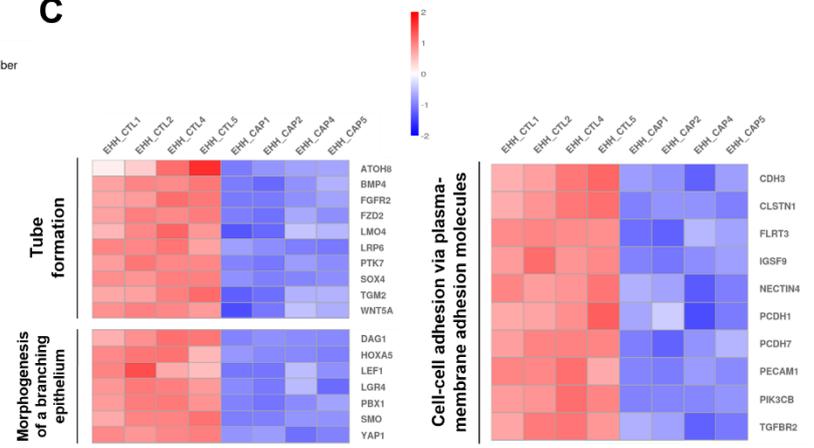
A EGI-1 / hTERT-HSC / HUVEC (EHH)



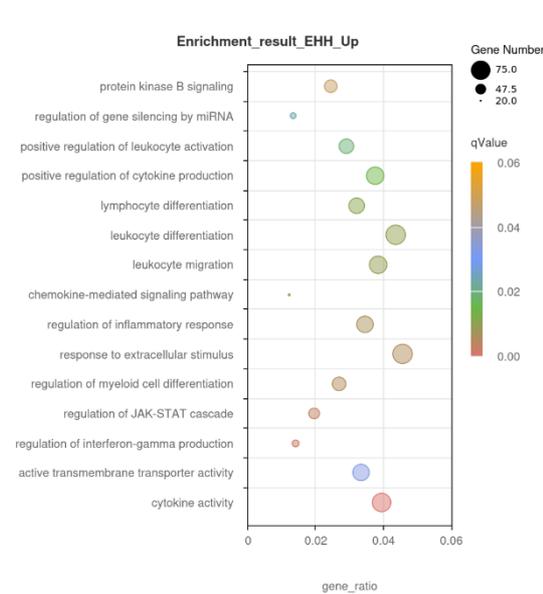
B Enrichment_result_EHH_Down



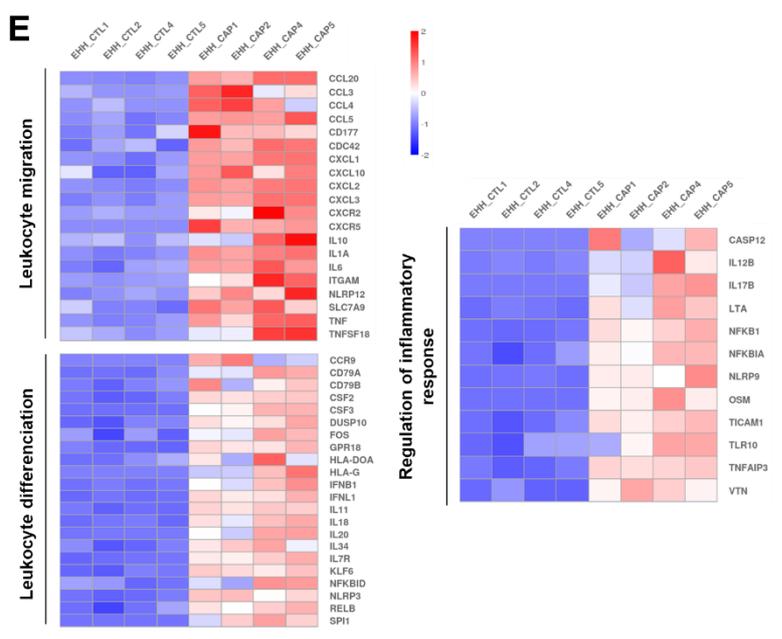
C



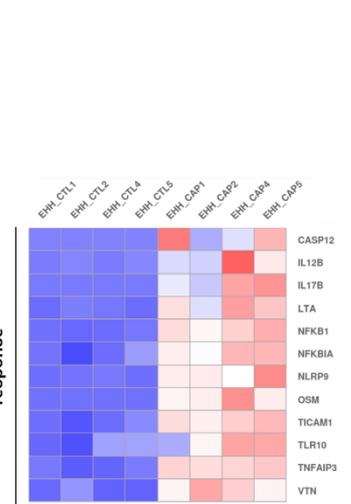
D Enrichment_result_EHH_Up



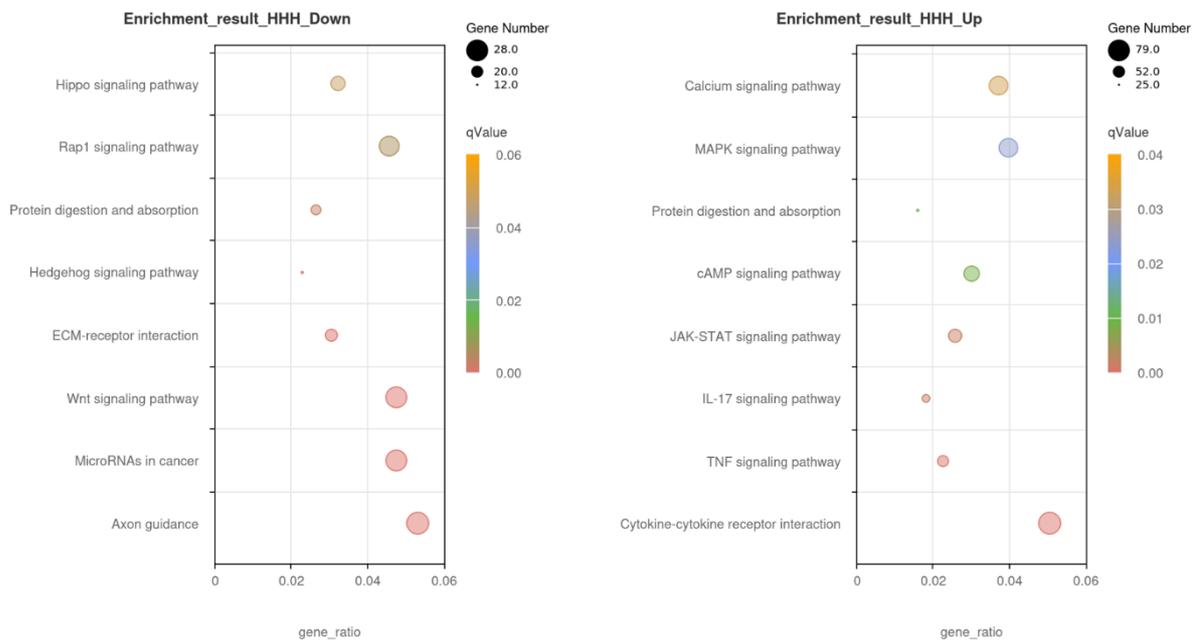
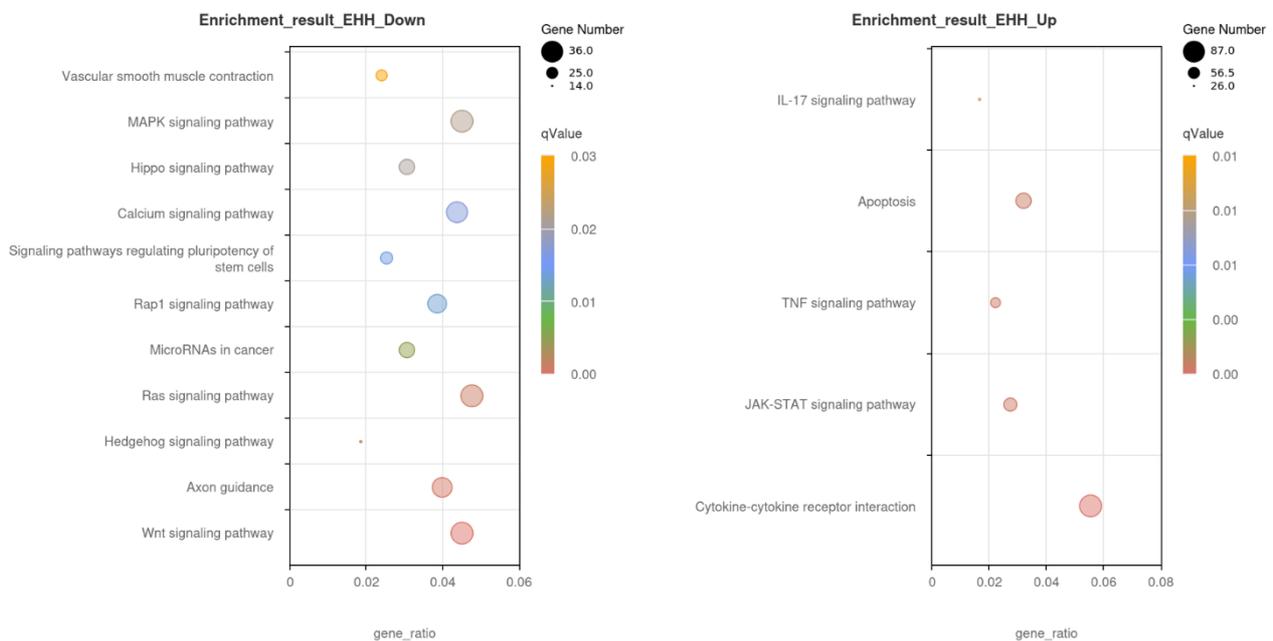
E



F Regulation of inflammatory response



Supplementary Figure 4: Functional enrichment analysis of CAP-treated EHH CCA spheroids obtained from RNA-Seq. (A) Volcano plot and heatmap of differentially expressed genes in CAP-treated and untreated CCA spheroids composed of EGI-1, hTERT-HSC and HUVEC cells (named EHH spheroids). A $|\log_2(\text{FoldChange})| \geq 2$ and an adjusted p-value < 0.05 have been maintained to pursue the analysis. **(B-C)** Signaling pathways based on GO enrichment analysis using down-regulated DEGs **(B)** and heatmaps showing DEGs representative of the most relevant pathways **(C)**. **(D-E)** Signaling pathways based on GO enrichment analysis using up-regulated DEGs **(D)** and heatmaps showing DEGs representative of the most relevant pathways **(E)**. CTL means Control and CAP means CAP-treated. DEGs, Differentially-Expressed Genes.

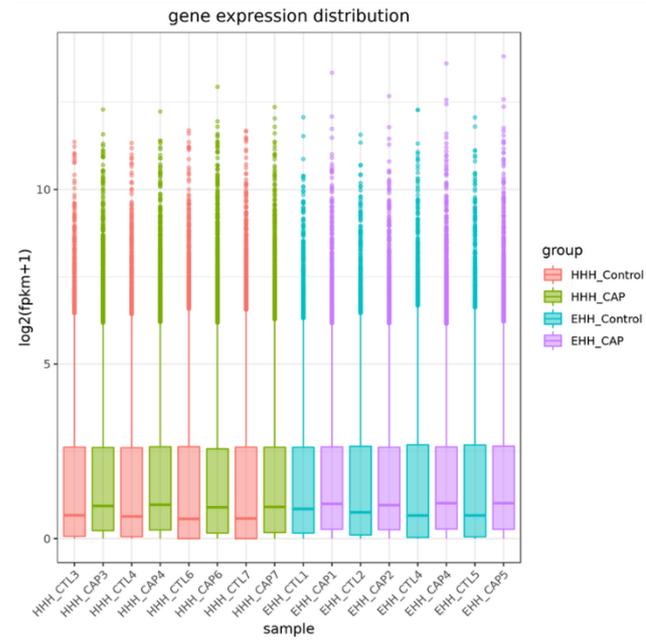
A**HuCCT1 / hTERT-HSC / HUVEC (HHH)****B****EGI-1 / hTERT-HSC / HUVEC (EHH)**

Supplementary Figure 5: Signaling pathways based on KEGG enrichment analysis of CAP-treated CCA spheroids obtained from RNA-Seq. (A) Signaling pathways based on KEGG enrichment analysis using down (left panel) and up-regulated DEGs (right panel) affected by CAP treatment in HHH spheroids. **(B)** Signaling pathways based on KEGG enrichment analysis using down (left panel) and up-regulated DEGs (right panel) affected by CAP treatment in EHH spheroids. CTL means Control and CAP means CAP-treated.

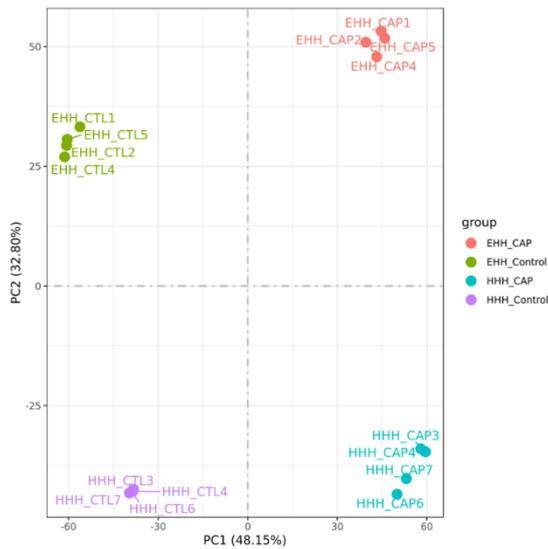
A

sample	library	raw_reads	raw_bases	clean_reads	clean_base_s	error_rate	Q20	Q30	GC_pct
HHH_CTL3	MRRA24000 2306-1a	55309972	8.3G	51418564	7.71G	0.01	98.24	94.61	51.36
HHH_CAP3	MRRA24000 2307-1a	53984618	8.1G	53865238	8.08G	0.01	98.1	94.27	50.98
HHH_CTL4	MRRA24000 2308-1a	54955384	8.24G	54864318	8.23G	0.01	98.16	94.39	51.96
HHH_CAP4	MRRA24000 2309-1a	67741690	10.16G	62654130	9.4G	0.01	98.2	94.56	49.9
HHH_CTL6	MRRA24000 2310-1a	54581268	8.19G	51059902	7.66G	0.01	98.17	94.4	50.92
HHH_CAP6	MRRA24000 2311-1a	58784280	8.82G	54709748	8.21G	0.01	97.94	93.93	51.93
HHH_CTL7	MRRA24000 2312-1a	54953042	8.24G	50752524	7.61G	0.01	98.25	94.67	52
HHH_CAP7	MRRA24000 2313-1a	64555958	9.68G	59066840	8.86G	0.01	97.94	93.98	52.08
EHH_CTL1	MRRA24000 2314-1a	59134834	8.87G	54135000	8.12G	0.01	98.3	94.87	50.7
EHH_CAP1	MRRA24000 2315-1a	55457746	8.32G	52862278	7.93G	0.01	98.02	94.07	50.87
EHH_CTL2	MRRA24000 2316-1a	54517180	8.18G	50203114	7.53G	0.01	97.6	93.39	52.57
EHH_CAP2	MRRA24000 2317-1a	59226440	8.88G	55576822	8.34G	0.01	98.13	94.37	50.86
EHH_CTL4	MRRA24000 2318-1a	54818108	8.22G	50991804	7.65G	0.01	97.52	93.28	52.52
EHH_CAP4	MRRA24000 2319-1a	58326018	8.45G	52877150	7.93G	0.01	97.39	93	51.73
EHH_CTL5	MRRA24000 2320-1a	51025206	7.65G	50888728	7.63G	0.01	97.56	93.35	53.23
EHH_CAP5	MRRA24000 2321-1a	57973974	8.7G	53850094	8.08G	0.01	97.34	92.9	51.72

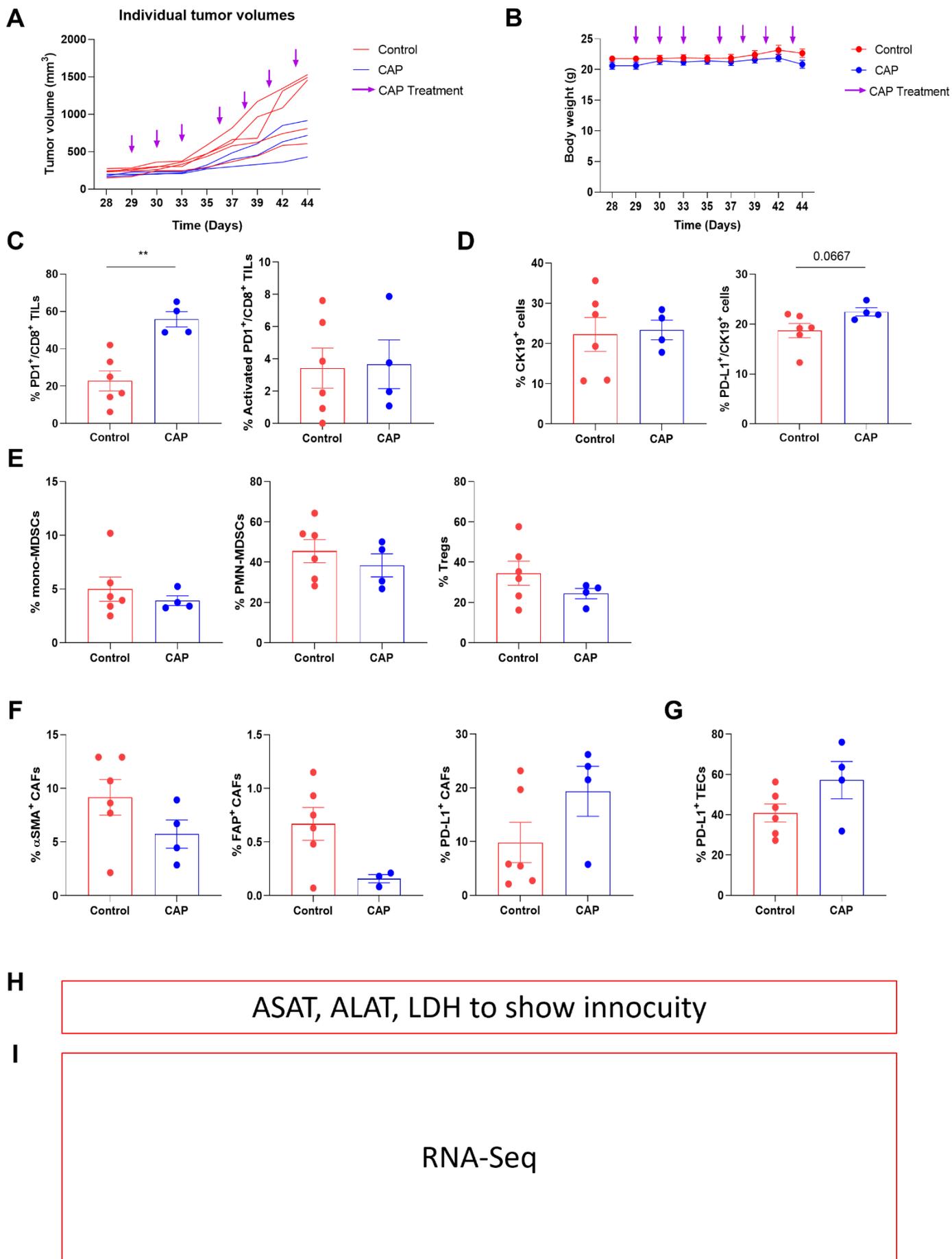
B



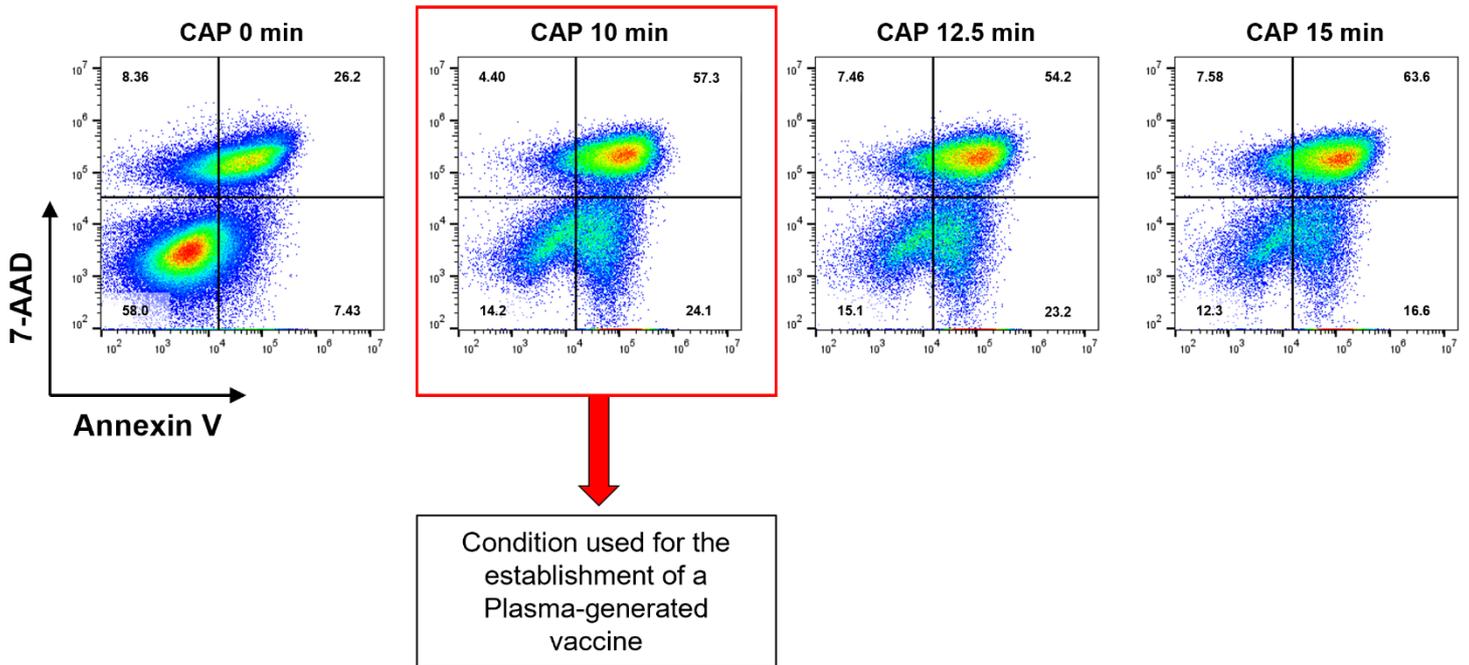
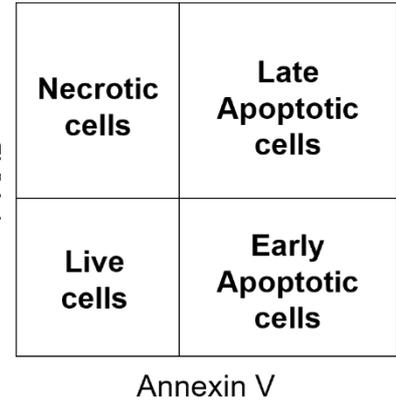
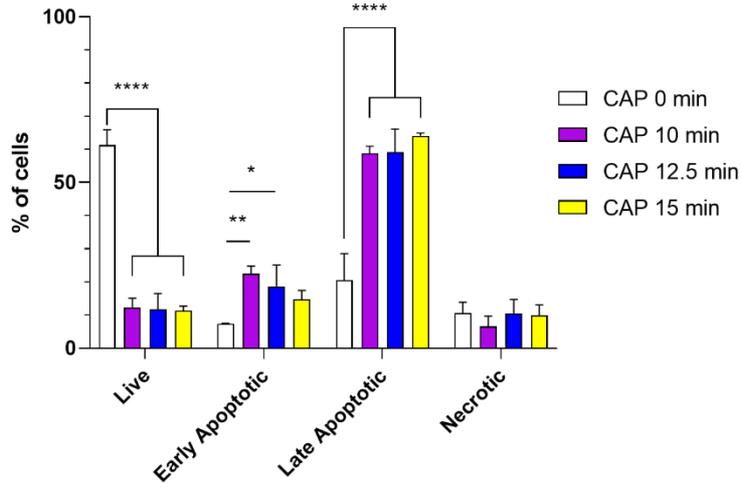
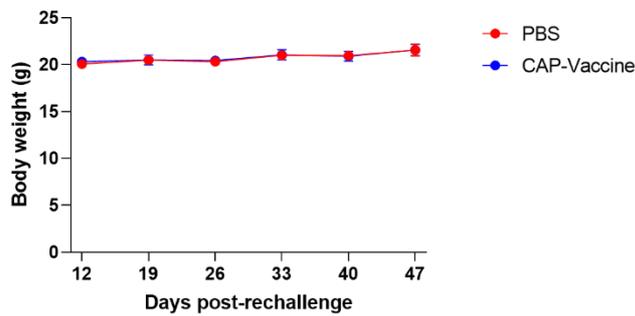
C



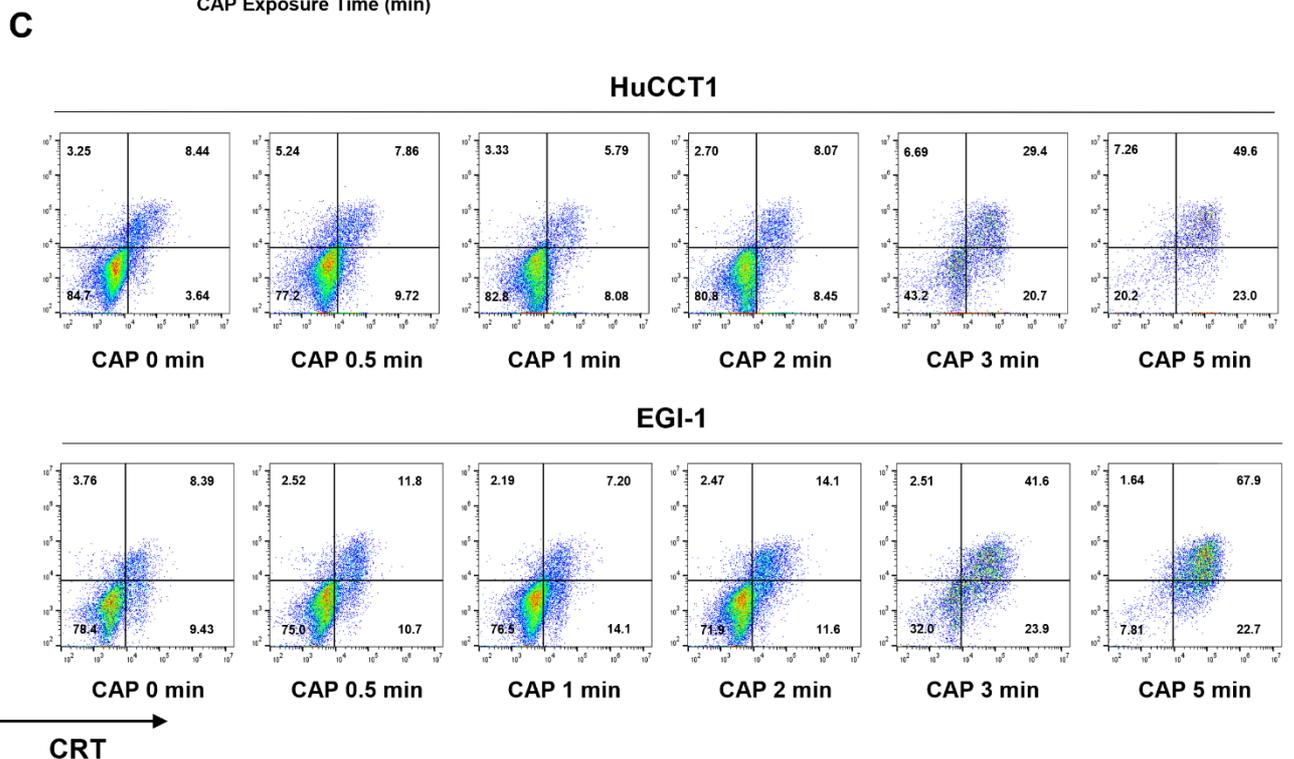
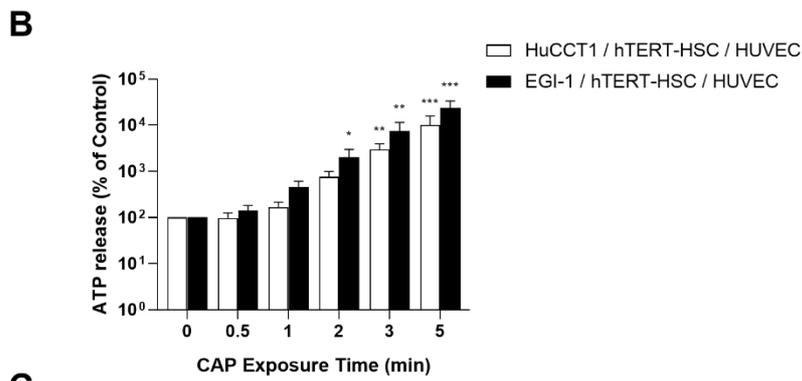
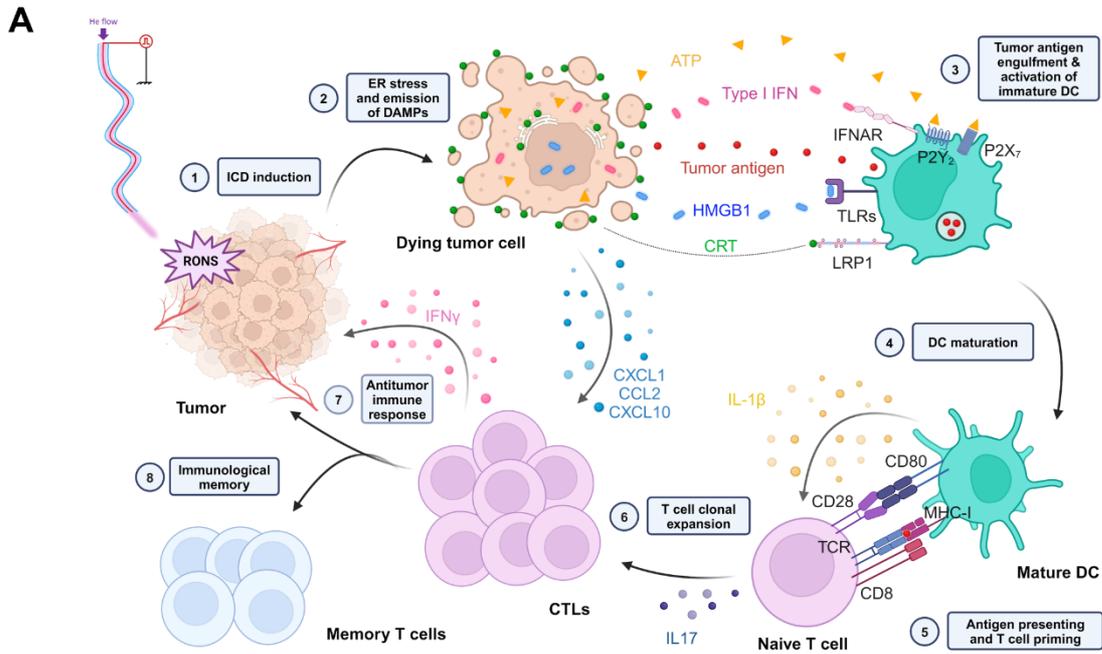
Supplementary Figure 6: RNA sequencing quality control and reads processing. (A) QC stats and number of clean reads for each replicate before alignment. **(B)** Gene expression distribution across samples. **(C)** Principal component analysis between replicates. CTL means Control and CAP means CAP-treated.



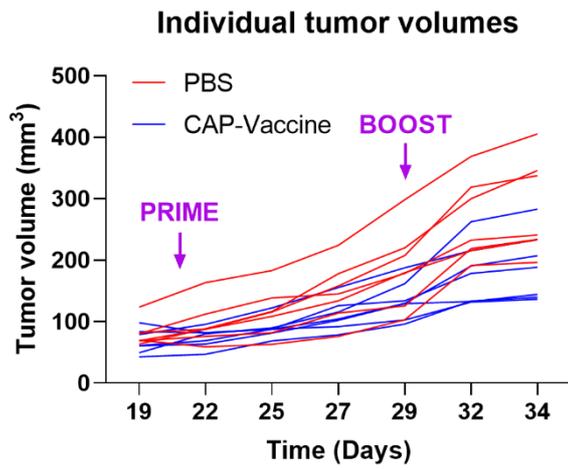
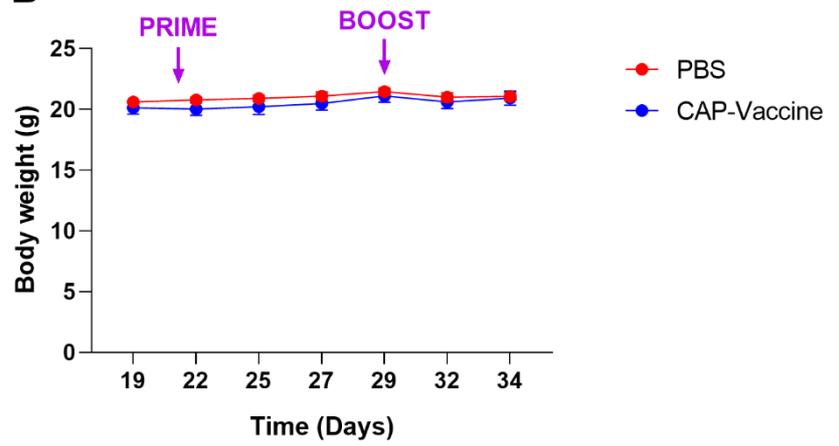
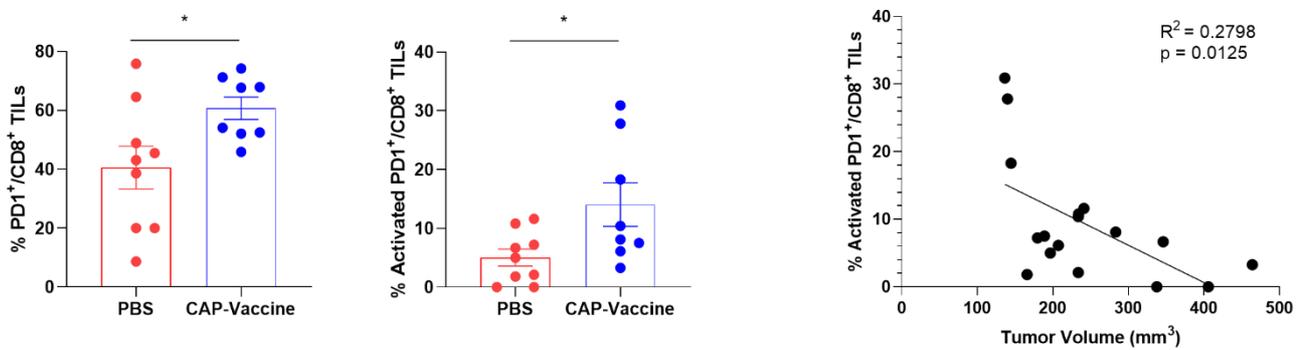
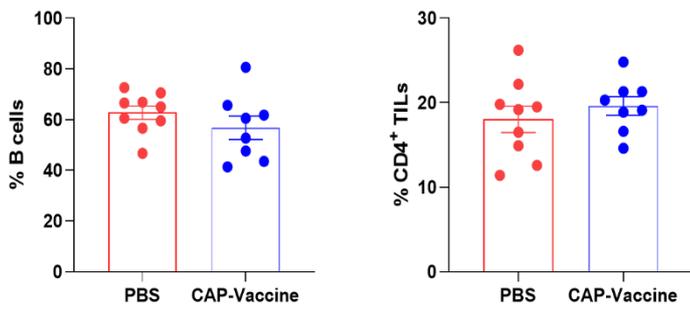
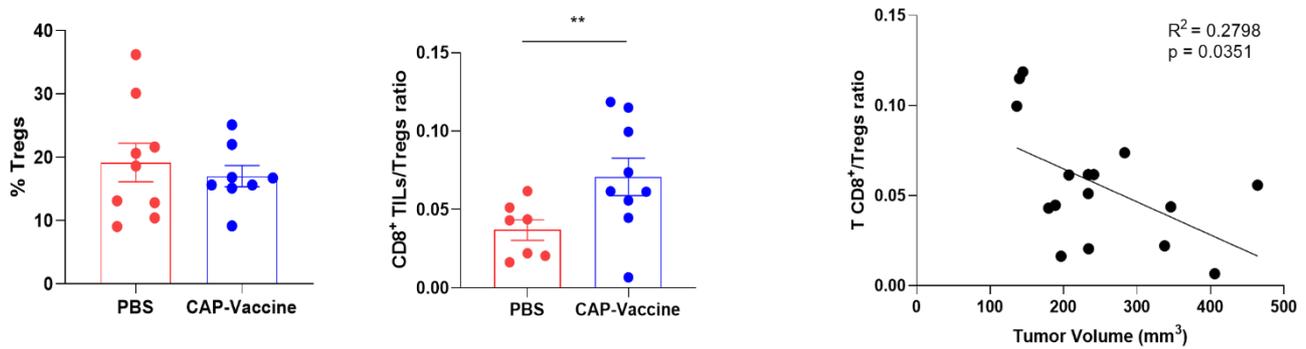
Supplementary Figure 7: CAP reduced CCA progression by affecting stromal cells in a murine syngeneic model. (PRELIMINARY RESULTS) (A) Tumor growth of each mouse. Purple arrows indicate treatments points with CAP. (B) Monitoring of the body weight of the mice during the experiment. (C) Flow cytometry analysis showed a higher infiltration of PD1⁺/CD8⁺ TILs in the tumors extracted from CAP-treated mice compared to the untreated ones. The proportion of activated PD1⁺/CD8⁺ (CD25⁺/PD1⁺/CD8⁺) TILs was not affected by the treatment. (D) Tumor cell composition of the CCA tumors from untreated or CAP-treated mice. (E) Infiltration of immunosuppressive cells (mono-MDSCs, PMN-MDSCs and Tregs) in the tumors extracted from untreated or CAP-treated mice analyzed by flow cytometry. (F) Proportion of α -SMA⁺, FAP⁺, and PD-L1⁺ CAFs in the tumors extracted from untreated or CAP-treated mice. (G) Proportion of PD-L1⁺ TECs in the tumors from each group of mice. (H-I **ONGOING**) Plasmatic concentrations of ALAT, ASAT and LDH from each group of mice (H) and RNA-Seq analysis of the tumors (I). Values are expressed as means \pm SEM. Significance levels are indicated as follows: **, $p < 0.01$, compared to untreated mice.

A**B**

Supplementary Figure 8: Preparation of the CAP-Vaccine for the prophylactic vaccination assay and monitoring of the body weight. (A) Quantification of apoptosis by flow cytometry analysis of Annexin V/7-AAD in SB1-JP4 cells 24 h after CAP-exposure. The representative images are shown below the quantification. The Plasma-generated vaccine was made using SBA-JP4 cells exposed to CAP for 10 min and collected 24 h post-treatment. **(B)** Monitoring of the body weight of the mice during the prophylactic vaccination assay. Values are expressed as means \pm SEM. Significance levels are indicated as follows: *, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$; ****, $p < 0.0001$, compared to untreated cells (0 min).



Supplementary Figure 9: Presentation of ICD and CAP-induced *in vitro* presentation of ICD-characteristic DAMPs by CCA cells. (A) Mechanism of ICD and activation of the antitumor immune response. **(B)** ATP release quantification by HuCCT1/hTERT-HSC/HUVEC (HHH) and EGI-1/hTERT-HSC/HUVEC (EHH) spheroids in the medium, 30 min post-CAP exposure. **(C)** Representative flow cytometry images of CRT externalization on the surface of HuCCT1 and EGI-1 CCA cells, 24 h post-CAP exposure. Live/Dead staining has been used as a viability marker. Values are expressed as means \pm SEM from at least three cultures. Significance levels are indicated as follows: *, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$; ***, $p < 0.001$ compared to untreated cells/spheroids (0 min).

A**B****C****D****E**

Supplementary Figure 10: Vaccinations with CAP-treated cells under ICD conditions reduced CCA progression through an antitumor immune response. (A) Tumor growth of each mouse. Purple arrows indicate the injections of PBS or CAP-treated SB1-JP4 cells. **(B)** Monitoring of the body weight of the mice during the therapeutic vaccination assay. **(C)** Flow cytometry analysis showed a higher infiltration of PD1⁺/CD8⁺ and activated PD1⁺/CD8⁺ (CD25⁺/PD1⁺/CD8⁺) TILs in the tumors extracted from mice injected twice with the CAP-Vaccine compared to the ones injected with PBS. This TILs infiltration is negatively correlated with the tumor volume (right panel). **(D)** Infiltration of B cells and CD4⁺ TILs in the tumors extracted from the mice injected twice with PBS or the CAP-Vaccine. **(E)** Infiltration of Tregs and CD8⁺ TILs/Tregs ratio of the tumors extracted from the mice injected twice with PBS or the CAP-Vaccine. The CD8⁺ TILs/Tregs ratio is negatively correlated with the tumor volume (right panel). Values are expressed as means ± SEM. Significance levels are indicated as follows: *, p < 0.05; **, p < 0.01, compared to mice injected twice with PBS.

Keywords

Cholangiocarcinoma, cold atmospheric plasma, tumor microenvironment, immunogenic cell death

Financial support

The confocal microscope Olympus FV3000 was acquired with financial support from ITMO Cancer of Aviesan and INCa on funds administered by Inserm.

Author contributions

A.P, T.D, L.F: Conceptualization. **A.P, M.S, B.L, M.M, L.A, H.EM:** Methodology. **A.P, M.S, M.M:** Data curation. **A.P, L.F, T.D:** Writing- Original draft preparation. **A.P, M.S, B.L, H.D:** Visualization, Investigation. **L.F, T.D:** Supervision. **L.F, T.D:** Funding acquisition **A.P, M.S, M.M, M.J, L.A, J.P, J.A, L.F, T.D:** Writing- Reviewing and Editing.

Acknowledgements

We acknowledge Tatiana Ledent and her team from the Housing and Experimental Animal Facility (Centre de Recherche Saint-Antoine [CRSA]) and Aurélien Corneau from the flow cytometry-imaging platform LUMIC (CRSA). We thank Sophie Berissi and her team from the histology platform from Necker Hospital as well as NOVOGENE for the RNA-Seq analysis.

Conflict of interest

The authors declare that they have no affiliation with or involvement in any organization or entity with any financial and non-financial interests in the subject matter or materials discussed in this manuscript.

REFERENCES

1. Banales, J. M. et al. Cholangiocarcinoma 2020: the next horizon in mechanisms and management. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 17, 557–588 (2020).
2. Alvaro, D. et al. EASL-ILCA Clinical Practice Guidelines on the management of intrahepatic cholangiocarcinoma. *Journal of Hepatology* 79, 181–208 (2023).
3. Neuzillet, C. et al. Management of intrahepatic and perihilar cholangiocarcinomas: Guidelines of the French Association for the Study of the Liver (AFL). *Liver International* n/a,.
4. Min, T. et al. Therapeutic Effects of Cold Atmospheric Plasma on Solid Tumor. *Front. Med.* 9, (2022).
5. Vaquero, J. et al. Cold-Atmospheric Plasma Induces Tumor Cell Death in Preclinical In Vivo and In Vitro Models of Human Cholangiocarcinoma. *Cancers (Basel)* 12, 1280 (2020).
6. Limanowski, R., Yan, D., Li, L. & Keidar, M. Preclinical Cold Atmospheric Plasma Cancer Treatment. *Cancers (Basel)* 14, 3461 (2022).
7. Murillo, D., Huergo, C., Gallego, B., Rodríguez, R. & Tornín, J. Exploring the Use of Cold Atmospheric Plasma to Overcome Drug Resistance in Cancer. *Biomedicines* 11, 208 (2023).
8. Chen, G. et al. Transdermal cold atmospheric plasma-mediated immune checkpoint blockade therapy. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 117, 3687–3692 (2020).
9. Fang, T., Cao, X., Shen, B., Chen, Z. & Chen, G. Injectable cold atmospheric plasma-activated immunotherapeutic hydrogel for enhanced cancer treatment. *Biomaterials* 300, 122189 (2023).
10. Canady, J. et al. The First Cold Atmospheric Plasma Phase I Clinical Trial for the Treatment of Advanced Solid Tumors: A Novel Treatment Arm for Cancer. *Cancers* 15, 3688 (2023).
11. Privat-Maldonado, A., Bengtson, C., Razzokov, J., Smits, E. & Bogaerts, A. Modifying the Tumour Microenvironment: Challenges and Future Perspectives for Anticancer Plasma Treatments. *Cancers* 11, 1920 (2019).

12. Decauchy, H., Pavy, A., Camus, M., Fouassier, L. & Dufour, T. Cold plasma endoscopy applied to biliary ducts: feasibility risk assessment on human-like and porcine models for the treatment of cholangiocarcinoma. *J. Phys. D: Appl. Phys.* 55, 455401 (2022).
13. Lin, A. G. et al. Non-thermal plasma induces immunogenic cell death in vivo in murine CT26 colorectal tumors. *OncImmunology* 7, e1484978 (2018).
14. Förster, S. et al. Modulation of the Tumor-Associated Immuno-Environment by Non-Invasive Physical Plasma. *Cancers* 15, 1073 (2023).
15. Bekeschus, S. et al. Medical Gas Plasma Jet Technology Targets Murine Melanoma in an Immunogenic Fashion. *Advanced Science* 7, 1903438 (2020).
16. Rizvi, S. et al. YAP-associated chromosomal instability and cholangiocarcinoma in mice. *Oncotarget* 9, 5892–5905 (2017).
17. Paillet, J. et al. Autoimmunity affecting the biliary tract fuels the immunosurveillance of cholangiocarcinoma. *The Journal of Experimental Medicine* 218, (2021).
18. Couteau, M. & Aoudjehane, L. Immunofluorescent Staining of Human Hepatic Multicellular Spheroids: A Model for Studying Liver Diseases. in *Liver Carcinogenesis: Methods and Protocols* (eds. Kroemer, G., Pol, J. & Martins, I.) 143–152 (Springer US, New York, NY, 2024). doi:10.1007/978-1-0716-3694-7_11.
19. Lobe, C. et al. ZEB1 promotes cholangiocarcinoma progression through tumor dedifferentiation and tumor-stroma paracrine signaling. *Hepatology* 74, 3194–3212 (2021).
20. Arndt, S., Unger, P., Bosserhoff, A.-K., Berneburg, M. & Karrer, S. The Anti-Fibrotic Effect of Cold Atmospheric Plasma on Localized Scleroderma In Vitro and In Vivo. *Biomedicines* 9, 1545 (2021).
21. Haralambiev, L. et al. Inhibition of Angiogenesis by Treatment with Cold Atmospheric Plasma as a Promising Therapeutic Approach in Oncology. *International Journal of Molecular Sciences* 21, 7098 (2020).
22. Espona-Noguera, A. et al. Unlocking Novel Anticancer Strategies: Bioactive Hydrogels for Local Delivery of Plasma-Derived Oxidants in an In Ovo Cancer Model. *Macromolecular Bioscience* n/a, 2400213.

23. Humeau, J., Lévesque, S., Kroemer, G. & Pol, J. G. Gold Standard Assessment of Immunogenic Cell Death in Oncological Mouse Models. *Methods Mol Biol* 1884, 297–315 (2019).
24. Lin, A. et al. Non-Thermal Plasma as a Unique Delivery System of Short-Lived Reactive Oxygen and Nitrogen Species for Immunogenic Cell Death in Melanoma Cells. *Adv Sci (Weinh)* 6, 1802062 (2019).
25. Živanić, M. et al. Injectable Plasma-Treated Alginate Hydrogel for Oxidative Stress Delivery to Induce Immunogenic Cell Death in Osteosarcoma. *Advanced Functional Materials* 34, 2312005 (2024).
26. Wang, Y. et al. Cold atmospheric plasma sensitizes head and neck cancer to chemotherapy and immune checkpoint blockade therapy. *Redox Biology* 69, 102991 (2024).
27. Freund, E. et al. In Vitro Anticancer Efficacy of Six Different Clinically Approved Types of Liquids Exposed to Physical Plasma. *IEEE Transactions on Radiation and Plasma Medical Sciences* 3, 588–596 (2019).

Article 2 : Cold plasma endoscopy applied to biliary ducts: feasibility risk assessment on human-like and porcine models for the treatment of cholangiocarcinoma

Article publié dans *Journal of Physics D: Applied Physics*

Cette seconde étude vise à évaluer les performances et les limites de l'endoscopie au plasma froid avant de procéder à des essais cliniques. Il est en effet crucial de garantir que le « cathéter à plasma » ne présente aucun risque thermique ou électrique pour le patient et le clinicien. Pour ce faire, la première étape de ce travail a consisté à utiliser le cathéter sans duodéroscope, en l'insérant directement dans un modèle artificiel reproduisant la topographie et la réponse électrique de l'arbre biliaire. Ce modèle, employé par les endoscopistes, a permis de valider la faisabilité technique du dispositif et de confirmer l'absence de risques électriques et thermiques. Dans une seconde étape, le cathéter a été inséré dans un duodéroscope, et l'ensemble a été testé dans un modèle anatomique post-mortel porcin. Après avoir traversé l'œsophage, l'estomac et le duodénum, la partie distale du duodéroscope a été positionnée à l'entrée de la papille pour permettre au cathéter de pénétrer dans le canal cholédoque. Il a ainsi été démontré que le plasma pouvait être généré au sein des voies biliaires porcines sans affecter thermiquement ou électriquement le tissu sain. Enfin, dans une troisième étape, l'efficacité thérapeutique du cathéter a été confirmée sur des modèles expérimentaux *in vitro* de CCA humain.

Ainsi, cette étude a validé la pertinence de l'endoscopie au plasma froid comme traitement locorégional potentiel pour le CCA et a facilité la transition entre la recherche fondamentale et les applications cliniques.

Cold plasma endoscopy applied to biliary ducts: feasibility risk assessment on human-like and porcine models for the treatment of cholangiocarcinoma

Henri Decauchy¹, Allan Pavy², Marine Camus^{2,3}, Laura Fouassier^{2,4,*} and Thierry Dufour^{1,4,*}

¹ LPP, Sorbonne Université, CNRS, Ecole Polytech., Paris, France

² Sorbonne Université, INSERM, Centre de Recherche Saint-Antoine (CRSA), Paris, France

³ Centre d'Endoscopie Digestive, AP-HP, Hôpital Saint-Antoine, Paris, France

E-mail: thierry.dufour@sorbonne-universite.fr and laura.fouassier@inserm.fr

Received 20 May 2022, revised 6 August 2022

Accepted for publication 24 August 2022

Published 16 September 2022



Abstract

For the past 12 years, cold plasmas (i.e. weakly ionized gas) have been positioned as a breakthrough technology for treating cancer thanks to their antitumor properties. The innovation of ad hoc plasma sources and personalized protocols appears crucial to treat cancers with a very poor prognosis. This is the case for cholangiocarcinoma (CCA), a biliary tract cancer, whose treatment with cold plasma is envisioned but requires the innovation of catheters and endoscopic devices for local therapies. Before conducting clinical trials, the performances and limitations of cold plasma endoscopy (CPE) must be evaluated in terms of safety for both the patient and clinician as well as in terms of therapeutic efficacy. These objectives are pursued in the present work, in which a transferred plasma catheter is used, powered by 8–10 kV, 1–2 μ s wide, 5–10 kHz repeated pulses, allowing guided streamers to be transferred over lengths of at least 2 m. In a first step, the catheter is utilized without the duodenoscope and directly inserted into an artificial model reproducing the topography and the electrical response of the biliary tree. This model allows to validate the technical feasibility of the technology and to demonstrate the absence of electrical and thermal risks. Indeed, the voltage and current deposited are as low as 3.98 V and 1.19 mA (RMS values) respectively, while the temperature locally increases from 23 °C to 27 °C. In a second step, the catheter is inserted into the duodenoscope, the whole being applied to a porcine anatomical model. After passing through the esophagus, stomach and duodenum, the distal part of the duodenoscope is placed at the entrance to the papilla so that the catheter can easily enter the choledoc and then the common bile duct. Interestingly, the electrical power values deposited are of the order of 100 mW especially because the current values are at least ten times higher. These more elevated values of electrical parameters but also electromagnetic effects are discussed considering physical aspects like eddy currents. The absence of electrical and thermal risks is demonstrated and consolidated by the medical devices

⁴ Share co-senior authorships.

* Authors to whom any correspondence should be addressed.



Original content from this work may be used under the terms of the [Creative Commons Attribution 4.0 licence](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/). Any further distribution of this work must maintain attribution to the author(s) and the title of the work, journal citation and DOI.

standards fixed by the International Electrotechnical Commission (IEC). In a third time, we demonstrate that the cold plasma catheter can induce antitumor effects on *in vitro* experimental models of human CCA. The methodology proposed in this article validates the relevance of CPE as a potential local treatment for CCA and allows bridging cognitive and patient-oriented research.

Keywords: ventricular fibrillation, cold plasma endoscopy, cancerology, porcine model, biliary ducts, plasma medicine, cholangiocarcinoma

(Some figures may appear in colour only in the online journal)

1. State of art

1.1. Cholangiocarcinoma (CCA): a rare cancer with poor prognosis

1.1.1. Cancer prognosis. Cancer is one of the leading causes of death in all countries. In 2020, there were 19.3 million new cases and 10.0 million cancer-related deaths worldwide [1]. By 2040, the number of new cancer cases per year is expected to rise to 29.5 million and the number of cancer-related deaths to 16.4 million [2]. In general, the countries with the highest cancer rates are those where populations benefit from a high life expectancy, a high level of education and a high standard of living. However, there are some exceptions such as cervical cancer whose incidence rate is higher in low-GDP countries [3]. Besides, within the same country, the survival rate of patients can highly change depending on the type of cancer. Hence, in France, the standardized net survival which considers the effect of age by standardization at five years varies from 96% for thyroid cancers to 10% for mesothelioma of the pleura. Cancers with an unfavorable prognosis represent, in terms of incidence, 32% of solid tumors in men and 19% in women, as well as 7% of hematological malignancies in men and 9% in women [4, 5]. Conversely, cancers with a favorable prognosis represent 40% of solid tumors in men and 55% in women, as well as 45% of hematological malignancies in both men and women [6].

Among cancers of poor prognosis, the rare and aggressive ones present often tough challenges that make them more difficult to treat than common tumor types. For a rare cancer case, doctors may not have a standard Food and Drug Administration (FDA)-approved (and/or a European Medicines Agency (EMA)-approved) therapy to help guide them in clinical decision-making. In aggressive cancer cases, cancer cells can often become resistant to standard treatment options, and patients may therefore exhaust these options very quickly. For these reasons, finding new treatments is an absolute emergency for patients with rare and/or aggressive cancers such as CCA: the cancer of the biliary ducts.

1.1.2. CCA: a biliary tract cancer. As sketched in figure 1, the biliary tree is a series of gastrointestinal ducts allowing modification and transport of bile primarily synthesized by hepatocytes in the liver to be concentrated and stored in the gallbladder, prior to release into the duodenum at mealtime. The bile canaliculi gives rise to the canals of Herring, at the origin of

the bile ducts, then to the intrahepatic bile ducts from which the right and left hepatic ducts join outside the liver to form the common bile duct, then the cystic duct and the choledoc which empties into the duodenum through the great caruncle via the ampulla of Vater and the sphincter of Oddi [7].

CCA corresponds to a cluster of highly heterogeneous malignant tumors that can develop at every point of the biliary tree, regardless to their size or location: in the liver (intrahepatic, iCCA), at the hilum (perihilar, pCCA) or distally (distal, dCCA). Their occurrences are 10%, 50% and 40% for iCCA, pCCA and dCCA respectively. According to the new nomenclature, these last two sites are considered as extrahepatic CCAs (eCCAs). The mutational profile of CCAs also varies:

- iCCA have genetic alterations in IDH-1 (15%–20%) and FGFR-2 (fusion) (10%–15%) that can be targeted by inhibitors, currently approved by the FDA and/or the EMA. Phase II and III clinical trials are currently being conducted with pemigatinib and ingratinib (FGFR-2 inh), and ivosidenib (IDH-1 inh) [8, 9]. Pemigatinib is now approved for advanced CCA patients with *FGFR2* rearrangements previously treated with GEMCIS.
- eCCA also have genetic alterations, some of which are known to be targeted by inhibitors already present on the drug market [10].

CCA is the second type of primary liver cancer (~15% of all cases) and currently accounts for about 3% of gastrointestinal carcinomas [11]. To date, this rare and aggressive cancer represents nearly 2% of annual global cancer mortality. The main risk factors of this malignancy are chronic inflammatory diseases of the bile ducts, parasitic infections (in Asia), alcohol consumption, and infections with hepatitis B and C viruses. However, in 50% of cases, there is no risk factor identified. One of the main histological features of CCA is its extremely fibrous stroma creating a physical barrier and thereby decreasing the ability of chemotherapies or targeted therapies to reach tumor cells [11]. CCA malignancies are asymptomatic and only suspected due to the occurrence of jaundice or abnormalities on liver function tests, consequences of defective bile flow caused by tumor obstruction in the bile ducts. In consequence, the diagnosis comes at an advanced stage, locally advanced or metastatic, hence contributing to the dark prognosis of CCA, with a five-year overall survival rate less than 30% [12]. CCA continues to have a poor prognosis, with little improvement

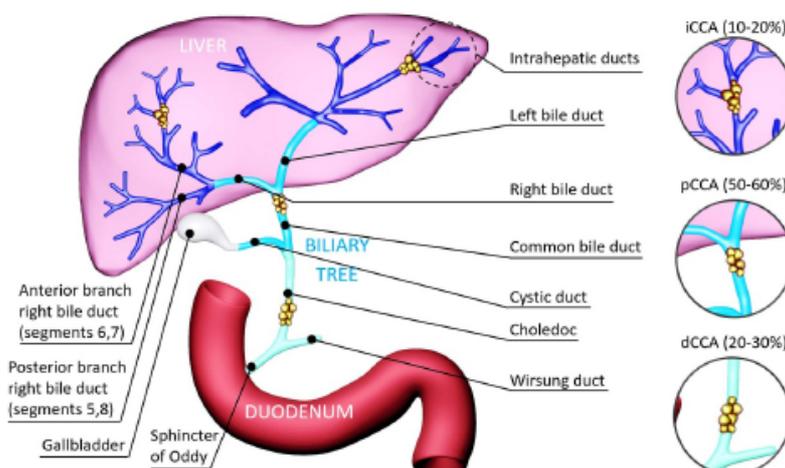


Figure 1. Anatomical representation of the biliary tree, its environment (liver and duodenum) and the cholangiocarcinoma sites (intrahepatic, perihilar and distal).

over the past 30 years in terms of resectability or early diagnosis, with relative survival rates at one, three and five years of 25%, 10% and 7%.

1.1.3. CCA conventional treatments. Today, CCA is treated following different medical approaches and depending on tumor progress stages, not all of them are relevant. While some treatments are well established to provide curative care (resection, adjuvant chemotherapies) and palliative care (chemotherapies), a panel of optional treatments can also be proposed, as reported in table 1.

Endoscopically applied plasma therapy has multiple advantages over the approaches presented in table 1. First, it is minimally-invasive and can therefore address a greater number of patients, unlike surgery and liver transplantation. While biliary drainage does not induce an antitumor effect, cold plasma endoscopic (CPE) therapy can induce tumor cell apoptosis without inducing harmful systemic effects on the rest of the human body as is the case with chemotherapy or targeted drug therapy. Moreover, its therapeutic action is not only based on the exploitation of a single physical property as proposed by photodynamic therapy (radiation property) or endobiliary thermal ablation (temperature property). Cold plasma can effectively simultaneously induce pulsed electric fields for cell permeation and produce radicals/reactive oxygen species (ROS) for oxidative stress enhancement but also generate UV radiation for bacteria/virus decontamination. Furthermore, CPE therapy can activate immune cells from the tumor microenvironment just as conventional immunotherapy would. Finally, the combination of all these properties within cold atmospheric plasma (CAP) can drive therapeutic synergies that none of the conventional approaches can implement alone.

1.2. Plasma oncology: a disruptive technological approach

1.2.1. What is cold plasma? Cold plasma are weakly ionized gases composed of active species (electrons, ions, metastables, radicals) that present energetic, radiative, chemical, gas dynamics and electric field properties. Today, their interaction with biological systems (cells, tissues, tumors) is studied to address medical issues such as blood clotting, wound healing, dentistry, repair surgery, cosmetics, infectious/inflammatory diseases and oncology [21, 22].

1.2.2. Antitumor effects induced by cold plasma. *In vitro* studies have brought to light several biological mechanisms induced by cold plasma. One of the most important is to trigger apoptosis in cancer cells, primarily by supplying radicals and ROS, with the advantage to deliver them several millimeters into tissues [23]. Hence, in the case of malignant melanoma cells, the plasma-generated ROS can release TRX1 from ASK1 which then phosphorylates p38 and drives to apoptosis after activation of signaling cascade [24]. These *in vitro* studies are also supported by *in vivo* campaigns (preclinical models) although such works represent roughly 5% of the articles published in the field of cold plasma/oncology so far [25]. Recently, anti-neoplastic effects of plasma have been demonstrated on murine subcutaneous tumor models of melanoma [26], breast [27], prostate [28] and bladder [29]. Interestingly, cold plasma appears as a selective treatment, i.e. able to reduce the viability of malignant epithelial cells without altering healthy ones. Hence, in the case of prostate cancer, non-tumor cells P69 are less sensitive to cold plasma (cell viability = 67%) compared to tumor cell lines LNCaP and PC3 (cell viability of 29% and 23% respectively) [28]. Overall, this selectivity seems determined by the cells or tissues properties

Table 1. Therapeutic options for treating cholangiocarcinoma, either routinely or as part of clinical trials at hospital.

	Principle	Limitations
Surgery	<ul style="list-style-type: none"> For very small bile duct cancers, surgery involves removing part of the bile duct and joining the cut ends. For more-advanced bile duct cancers, nearby liver tissue, pancreas tissue or lymph nodes may be removed as well. 	Surgical intervention is the only curative treatment but only possible on 20%–30% of patients. Relapse rates are high and range from 40% to 70% [13].
Chemo-therapy	<ul style="list-style-type: none"> Chemotherapy is an option for people with advanced CCA to help slow the disease and relieve signs and symptoms. Chemotherapy drugs can be infused into a vein so that they travel throughout the body. The drugs may also be administered in a way so that they are delivered directly to the cancer cells (intra-arterial chemoembolization). First-line treatment (GEMCIS) and second-line treatment (POLFOX) [13]. 	<ul style="list-style-type: none"> This approach remains palliative. This systemic approach is not a cure and only allows a temporary control of the disease: survival rate is increased by only a few months, with non-negligible side-effects.
Liver trans-plantation	Surgery to remove the liver and replace it with one from a donor may be an option for people with iCCA (combined to neoadjuvant chemotherapy) [14] and pCCA [15].	<ul style="list-style-type: none"> Curative treatment with restrictive patient selection. Risk of recurrence.
Immuno-therapy	Immunotherapy may be an option for CCA of advanced cancer if other treatments have failed. Treatments targeting immune checkpoint inhibitors such as PD-1, PD-L1, CTLA-4 or a combination of them are currently investigated in clinical trials [16].	Body's disease-fighting immune system may not attack cancer because cancer cells produce proteins that help them to escape from the immune system. As part of clinical trials, monotherapies with immune checkpoint inhibitors show poor efficacy to date [16]. Therapy that is not systematically effective against CCA as it depends on genetic alterations (personalized medicine). Survival rate is increased of only a few months [17].
Targeted drug therapy	Focus on molecular abnormalities present within cancer cells. By inhibiting these abnormalities, targeted drug treatments cause cancer cells to die.	Although commercially available, radiofrequency has not been conclusively proven to be of current use in the therapeutic arsenal of CCA, as the human studies are retrospective, nonrandomized and of small scale.
Radiation therapy	Therapy which relies on high-powered energy beams from sources such as x-rays and protons to kill cancer cells. Radiation beams can be focused onto the body (external beam radiation). It may also involve placing radioactive material inside the body near the site of CCA (brachytherapy).	Biliary drainage is used as a preoperative treatment [19]. Signs and symptoms of CCA are relieved but remain uncured.
Endobiliary thermal ablation	Radiofrequency currents locally confined are used to thermally ablate tumor tissues of the bile duct without damaging its structural walls thereof. This procedure can be achieved either endoscopically or percutaneously. It contributes to biliary draining by setting stents (biliary prostheses) that can lift the biliary stenosis [18]. Medical devices marketed by Boston Scientific and Taewong companies.	Multiple treatments are required. Today, PDT is no longer performed [20].
Biliary drainage	Biliary drainage is a procedure to restore the flow of bile. This may involve placing a thin tube in the common bile duct to drain bile or performing bypass surgery to redirect bile around the cancer and stents to hold open a collapsed bile duct caused by cancer.	
Photodynamic therapy (PDT)	A light-sensitive chemical is injected into a vein and accumulates in the fast-growing cancer cells. Laser light directed at the cancer causes a chemical reaction in the cancer cells, killing them.	

(e.g. membrane composition, antioxidant system) rather than by plasma treatment [30].

1.2.3. Cold plasma applied to CCA. So far, very little work has been devoted to the treatment of CCA by cold plasma. The LPP and the CRSA laboratories (Paris, France) have worked on this tumor model since 2018. First, the two teams have

utilized a cold plasma jet (Plasma Tesla Jet, PTJ [31]) to treat ectopic models of CCA subcutaneously inoculated into mice [32]. In addition to inducing significant antitumor effects, this plasma source has not induced toxic effects of skin tissues (no burnings, no tissue necrosis and no alteration of epithelial cells or collagen structure). Hence, two local applications of cold plasma (1 min each) on the tumor reduces by 30% its volume compared to non-treated mice. Consistently, tumors

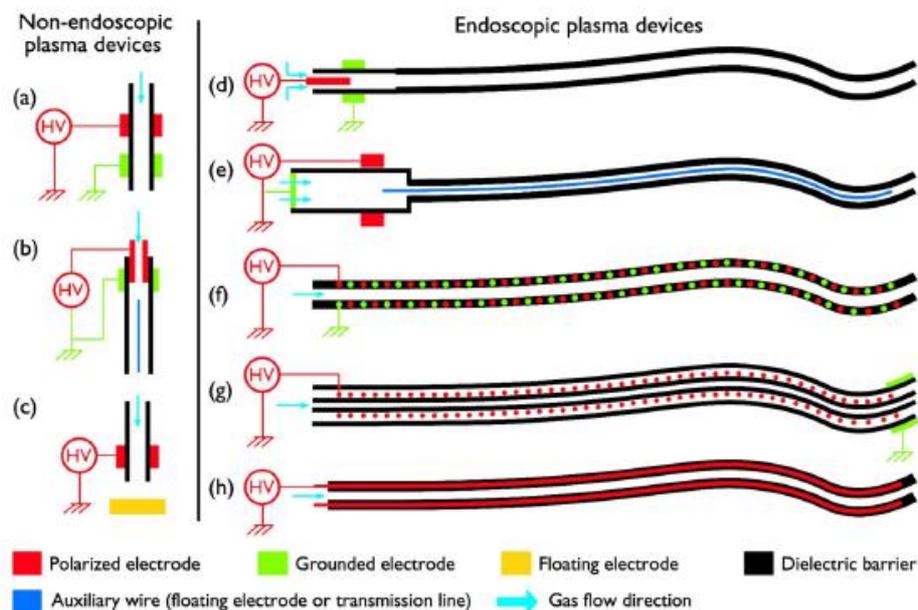


Figure 2. Schematics of non-endoscopic and endoscopic plasma devices (a) plasma Tesla jet, (b) transferred atmospheric pressure plasma jet, (c) floating electrode plasma jet, (d) plasma gun catheter, (e) transferred plasma catheter, (f) bifilar helix electrode catheter, (g) dual gas channel catheter, (h) confined electrode catheter.

from the control group exhibit larger size and vascularization features while tumors from the plasma group appear smaller and undamaged [32]. Analysis of tumor microenvironment (from mice origin) shows a higher mRNA expression of *Agre1* (coding for F4/80 macrophage protein) in plasma group, indicating an enhanced recruitment and/or proliferation of tumor-associated macrophages (TAMs). Besides, cold plasma enhances the mRNA expression of two major regulators of monocyte chemotaxis and macrophage trafficking: *CCL2* and *CCR2* (receptor of *CCL2*) respectively [31]. *CCL2* and *CCR2* rates exhibit an increased recruitment of TAM in the plasma group compared with the control group [31]. These results suggest that exposure to cold plasma stimulates the differentiation of monocytes into macrophages. More recently, Jones *et al* demonstrated the interest of combining cold plasma with conventional FOLFIRINOX: a systemic chemotherapeutics used to treat CCA. They show that FOLFIRINOX can be administered at lower doses to reduce its toxicity burden while cold plasma is combined to obtain the same therapeutic efficiency [33].

Due to its location in the bile ducts, cold plasma treatment of CCA can only be envisioned if an endoscopic approach is feasible. With a view to transferring technology from the bench to the patient's bedside, the LPP and CRSA teams have adapted and miniaturized the PTJ device to adapt it to the operating channel of a conventional duodenoscope. This therapeutic approach is primarily aimed at treating eCCA for

at least two reasons: (a) its prevalence is 85%–90% compared to only 10%–15% for iCCA, (b) eCCA is implanted in the bile ducts of larger diameter, namely hilar bile ducts, cystic duct, common bile duct and common hepatic duct, which facilitates the delivery of cold plasma on tumor sites. Besides, it is worth notifying that CPE therapy offers several advantages over targeted systemic therapies: (a) it is minimally invasive, (b) it allows direct locoregional treatments under imaging, regardless the mutational status of the tumor, hence minimizing secondary systemic effects, (c) it can be combined with systemic therapy whether chemotherapy or targeted therapy as part of a neoadjuvant or adjuvant treatment.

1.2.4. From cold plasma jets to cold plasma catheters. Cold plasma can be easily generated in ambient air using atmospheric pressure plasma jets (AAPJs): devices supplied with a gas flow (typically a noble gas with/without reactive gas) to ensure the propagation of the ionized gas several centimeters away from the interelectrode space. Most AAPJs have two electrodes whose electrical potentials are known and fixed: an electrode polarized at high voltage and a counter-electrode that is grounded. As an example, figure 2(a) shows an APPJ where electrical energy is delivered through two outer ring-electrodes so that plasma is never in direct contact with them. This type of APPJ has been successfully used for pre-clinical applications [31, 32]. In some AAPJ devices, cold plasma is only in

contact with a single electrode, the other one being covered by a dielectric barrier as sketched in figure 2(b). In this particular configuration, an auxiliary wire can be added into the capillary to propagate plasma over long distances. In 2018, it has been successfully applied and combined with pulsed electric fields technology to treat phosphate-buffered saline so as to reduce the viability of lung fibroblasts and malignant melanoma cells [34, 35]. In 2020, Nascimento *et al* have developed a flowing dielectric barrier device composed of an auxiliary floating electrode placed equidistant from four high voltage electrodes to generate a plasma jet [36]. The following year, the team upgraded its technology to a ‘transferred atmospheric pressure plasma jet’—like the one developed by Maho *et al* to identify the OH and NO radicals resulting from a supply in helium mixed with molecular oxygen [34, 37]. In other APPJ configurations, the counter-electrode can be non-metallic and external to the APPJ device, as shown in figure 2(c). Although the electrical risks associated with this configuration are more difficult to control than in the previous configurations, this floating electrode plasma jet has been successfully utilized in dermatology to stimulate wound healing [38, 39].

An APPJ can be considered as a cold plasma catheter if it satisfies the following criteria: (a) its capillary is flexible, (b) the maximum value of its outer diameter is lower than the inner diameter of the operating channel of a conventional endoscope, whether for duodenoscopy, gastroscopy, bronchoscopy or colonoscopy, i.e. typically lower than 4.2 mm and (c) the thermal and electrical hazards are controlled whether the cold plasma catheter is used alone or placed inside a conventional endoscope. Technological miniaturizations and incrementations of the aforementioned APPJ devices have led to the development of cold plasma catheters that are now discussed:

- (a) The plasma gun device (figure 2(d)) is composed of an inner rod electrode and an outer ring electrode that are polarized and grounded respectively. One of its main features is that cold plasma is in direct contact with the polarized electrode. The guided streamers can propagate inside a flexible capillary, up to 60 cm in length if the voltage generator delivers pulses higher than 30 kV in magnitude with a width of a few microseconds [40]. This configuration offers the ability to propagate pulsed atmospheric plasma streams over longer distances by providing higher voltage values. Although this device has been successfully used as an APPJ in oncology applications [41], its utilization as a catheter remains limited if it is inserted into a hospital endoscope. Since the standard length of an endoscope is 2 m, it would be necessary to apply voltages of the order of 100 kV for the propagation of plasma: a value that appears too high for the safety of both the practitioner and the patient.
- (b) The transferred plasma catheter (figure 2(e)) is composed of an outer ring electrode polarized at high voltage, a grounded plate electrode and a long auxiliary wire distinct from these two electrodes [34, 42]. The ground electrode is far enough away from the polarized electrode (e.g. 20 cm) so that it does not influence the properties of the plasma generated in the device. An interesting characteristic of the

transferred plasma catheter is that cold plasma is formed in three regions: (a) between the HV electrode and the proximal end of the auxiliary wire, (b) along the auxiliary wire itself and (c) from the auxiliary wire to the target (biological tissue, metal surface, ...). Paradoxically, this auxiliary wire is both a strength and a limitation: if it allows the propagation of plasma over long distances, greater than 2 m, the value of its voltage remains unknown during operation.

- (c) The bifilar helix electrode catheter (figure 2(f)) is composed of a dielectric tube along which two wire electrodes (a polarized electrode and a grounded electrode) are wound helically and equidistant from each other. An external dielectric tube is coaxially superimposed on this arrangement to isolate the electrodes from the gaseous environment [43]. Such a catheter remains flexible and offers the possibility of delivering plasma several meters away within the capillary, as with the transferred plasma catheter. If the interelectrode space is greater than 2 mm, then a significant electric field is created inside the capillary and cold plasma is generated there. Interestingly, if this interelectrode space becomes lower than 2 mm, then narrow electrode winding forms a quasi-equipotential surface around the capillary, resulting in the absence of plasma generated within the capillary and therefore the advantage of not altering the inner walls of the capillary. The main drawback of this bifilar helix electrode is that a repeated utilization can modify the equidistant space separating the two wound electrodes and lead to plasma inhomogeneities. For this reason, the manufacture of this configuration requires resources and time.
- (d) The dual gas channel catheter (figure 2(g)) comprises two flexible dielectric capillaries, coaxially centered and forming two separate gas channels. The polarized electrode is a metal wire that is twisted around the inner tube while a grounded electrode is placed at the distal end of the outer tube [44].
- (e) The confined mono-electrode catheter (figure 2(h)) is composed of a small-diameter dielectric capillary whose outer wall is covered by a metal deposit. Then, a dielectric capillary of larger diameter is coaxially placed all along the first one. The metal deposit is totally embedded by the two dielectric capillaries; it is biased to the high voltage and therefore plays the role of a polarized electrode [45]. This type of catheter may rise some concerns for endoscopic applications especially because it does not possess any grounded electrode while this requirement is a mandatory for the certification of the device either by the FDA in United-States or by the Scientific Committee on Consumer Safety in European union.

1.2.5. Endoscopic utilization of cold plasma catheters. In the 1990s, cold plasma catheters were designed to deliver ionized argon gas onto injured tissues to induce blood coagulation [46]. Argon plasma is supplied by a high frequency current so that a high frequency electric field is confined between the electrodes of the applicator and the tissue. Since the energy

has a penetration depth of 3 mm maximum, the process is both simple and risk-free [47]. The powerful but superficial heating of the tissue is responsible for closing the small blood vessels (coagulation) and for destroying the areas of pathological tissue (tissue devitalization). As an alternative to argon gas, carbon dioxide can also be supplied, as proposed by Kurosawa *et al* for achieving hemostasis in cases of gastrointestinal bleeding [48].

Cold plasma catheters can also be considered for tumor resection although only non-endoscopic plasma jets have been utilized to date. Hence, a first proof of concept has shed light on the possibility of targeted ablation of bladder tumors grafted subcutaneously in nude mice [49]. Other works from Wang *et al* show the ability of cold plasma approach for a selective ablation of metastatic BrCa cells *in vitro* without damaging healthy mesenchymal stem cells at the metastatic bone site [50].

In addition to blood coagulation and tumor ablation, another challenge that cold plasma catheters could meet is the induction of antitumor effects through cell cycle arrest and cell apoptosis. Contrarily to the two previous applications, such approach does not rely on thermal effects but rather on a synergy resulting from plasma reactive chemical properties and electric field properties, the latter being able for example to induce cell oxidative stress and cell permeabilization respectively. This therapeutic strategy could be quite relevant to treat CCA, especially eCCA for at least two reasons. First because it has a much higher frequency (85%–90%) than that of iCCA (10%–15%). Second because it is implanted in the larger diameter bile ducts (cystic duct, bile duct, common hepatic duct) which facilitates the deposition of cold plasma on tumor sites.

No pre-clinical or clinical trial has been carried out so far to demonstrate antitumor effects obtained through standard endoscopic procedures. Therefore, and upstream of these objectives, it is necessarily to demonstrate the safety of a plasma catheter approach on models as close as possible to humans, for example on alive animals showing morphological similarities with human digestive system (e.g. anesthetized pig) or at least on human-like post-mortem anatomical models. This feasibility study can be achieved by demonstrating that CPE does not imply any electrical or thermal hazards both for the patient and for the practitioner.

2. Materials and methods

2.1. Duodenoscope and cold plasma catheter

In these research works, a digital video duodenoscope from Pentax Medical Company (model ED-3480TK) is used, as sketched in figure 3(a). Thanks to its combination with Pentax DSP Technology and High Resolution colour CCD Chips, endoscopic images of brilliant quality are obtained regarding resolution and color reproduction in the unique full screen size. Its insertion tube (11.6 mm of outer diameter and 125 cm of working length) possesses an operation channel with an inner diameter of 4.2 mm as highlighted in the cross-section view of figure 3(a). It is completed by an optical system with a field of

view as high as 100° while its angulation is 120° up, 90° down, 100° right and 90° left [51].

Here, the transferred plasma catheter is selected to deliver cold plasma into biliary ducts models. This choice results from a benchmarking on the configurations presented in figure 2 and which is based on the following motivations:

- Plasma gun catheter: to propagate the cold plasma all along the insertion tube of a conventional duodenoscope, i.e. 2 m long, it would be necessary to use a generator capable of delivering voltages higher than 30 kV. However, our nanoinpulse generator is limited to 10 kV and cannot propagate the plasma over distances greater than 60 cm in this catheter configuration.
- Transferred plasma catheter: its design is based on technical means that are easy and quick to implement. This catheter allows the cold plasma to be propagated over distances of up to 5 m only if a metal auxiliary wire runs along the capillary.
- Bifilar helix electrode catheter: this configuration is the most difficult to implement for at least two technical reasons. First, it requires to wind two wire electrodes in the form of a double helix while maintaining a regular and precise inter-electrode gap (<0.5 mm). Second, it is mandatory to cover these two wire electrodes by an external dielectric layer to prevent any electrical contact with biological tissues or with the internal walls of the duodenoscope. Other constraints apply to these specifications, notably the flexibility that the catheter must maintain to facilitate its passage through the working channel of duodenoscope as well as the inter-electrode distances that must remain as equidistant as possible. These constraints are all the more challenging to satisfy that the catheter is submitted to twisting and bending but also to repeated use (except if the catheter is intended for single use).
- Confined electrode catheter: this configuration, at first sight aesthetically simple, requires the ability to isolate the polarized electrode by a double dielectric barrier (internal and external) like the previous configuration. This device does not have a ground electrode, hence limiting further commercialization for clinical purposes since all medical electrical devices must meet this criterion.

As sketched in figure 3(b), this plasma source is composed of two organs: (a) a main chamber supplied with helium gas at a flow rate of 1 slm in which cold plasma is primarily generated and (b) a long flexible capillary which allows the plasma to be propagated over long distances. This capillary is made of polytetrafluoroethylene, has an internal diameter of 1 mm, a thickness of 0.5 mm and a length of 2 m. The main chamber has two electrodes: a flat electrode connected to the nanopulse high voltage generator device (model Nanogen 1 from RLC Electronic company) and an outer ring electrode that is grounded. A 1 mm thick dielectric barrier covers the polarized electrode to prevent any passage to the thermal arc regime. An auxiliary copper wire (0.3 mm in diameter) is coaxially centered in the main chamber and runs along the flexible capillary. Its length

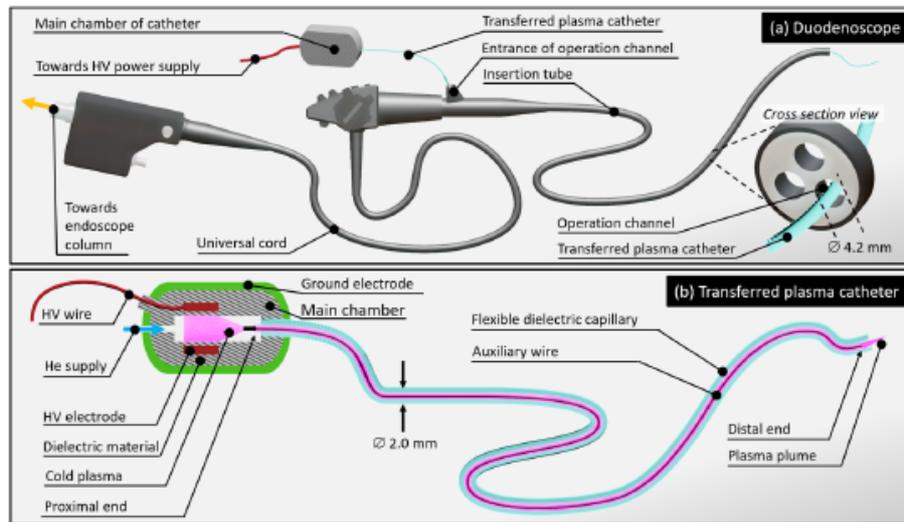


Figure 3. (a) Schematics of a conventional duodenoscope with a cold plasma catheter inserted in the operation channel, (b) schematics of the transferred plasma catheter.

is 0.5 cm shorter than the length of the flexible capillary so that it remains confined in the capillary and cannot be in contact with living tissue. In this configuration, cold plasma is formed between the polarized electrode and the auxiliary wire, then propagates all along the auxiliary electrode and finally exits the capillary as a plume of several millimeters long.

2.2. Biliary tree models

To validate the relevance of CPE to bile ducts diseases, experiments are successively carried out on two models of biliary trees: an artificial human biliary tree (AHBT) model and a post-mortem porcine biliary tree (PPBT) model. All procedures with an endoscope have been performed by MC, endoscopist.

2.2.1. The AHBT model. The AHBT model is made from two elements:

- (a) A biliary endoscopy trainer from Chamberlain Group company (model 2101) utilized in routine by apprentices to simulate endoscopic retrograde cholangiopancreatography (ERCP) on fictive patients placed either in lateral or prone position. Access is gained through a long tube that simulates passage of a scope through the esophagus, the stomach and the duodenum. The trainer also includes a port for fluid injection to enhance the realism of the training experience. As shown in figure 4(a), the biliary tree features the lumen of the common bile duct, cystic duct, hepatic ducts and pancreatic duct. It can be confined from ambient air by a transparent protective cover. Furthermore, it can be completed by stricture inserts and/or tumor

volume inserts (figure 4(b)) to represent the diversity of the pathological cases encountered at hospital.

- (b) A tumor insert exhibiting the same electrical response as a real tumor. For this, a thin aluminum layer is deposited on a tumor volume insert, as shown in inset of figure 4(a). Then, it is connected to a resistor and a capacitor in parallel, the whole being grounded (figure 4(b)). Their values ($R_{eq} = 1.5 \text{ k}\Omega$, $C_{eq} = 100 \text{ pF}$) are chosen to mimic the electrical parameters of the human body and are based on our previous research works [52].

The figure 4(c) is a photograph of the resulting AHBT model where cold plasma is generated at the distal end of the common bile duct.

2.2.2. The PPBT model. Three specimens of the PPBT model are purchased at LEBEAU company, specialized in the transport and trade of animal anatomical parts for research and education. As shown in figure 5, the model is composed of esophagus, stomach, duodenum, biliary tree, liver and gallbladder. The PPBT is placed in a dedicated plastic structure shape and size resembling the human peritoneal cavity. This structure, known as Erlangen Active Simulator for Interventional Endoscopy (EASIE) has been utilized under its EASIE-R™ version from ENDOSIM company. EASIE-R™ is an excellent educational tool for interventional endoscopy with a high level of acceptance, whether for endoscopic ultrasound procedure, natural orifice transluminal endoscopic surgery or CPE as demonstrated in this article. All experiments on PPBT models have been carried out at the surgical school of AP-HP, Fer à Moulin, Paris.

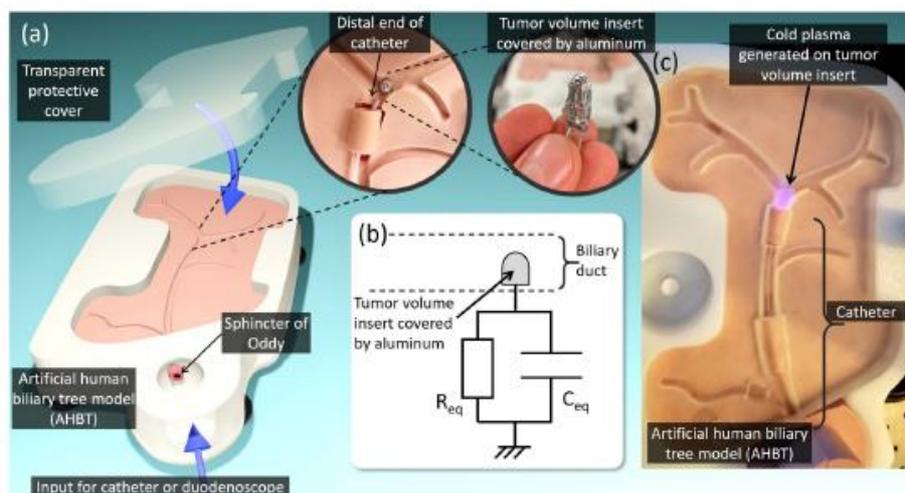


Figure 4. (a) Diagram of the ERCP trainer with enlarged photo of the distal end of the catheter and enlarged photo of the tumor volume insert, (b) equivalent electrical model of tumor, (c) transferred plasma catheter in operation inside the ERCP trainer. Cold plasma is observed through the transparent protective cover at the extremity of the common bile duct.

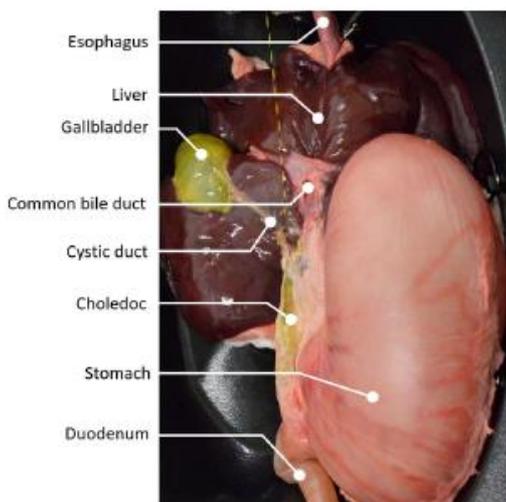


Figure 5. Anatomical description of the post-mortem porcine biliary tree (PPBT) model with adjacent organs (esophagus, stomach, liver, duodenum) placed in EASIE-R™.

2.3. Plasma diagnostics

2.3.1. Electrical parameters. The electrical parameters of cold plasma are monitored using an analog oscilloscope (Wavesurfer 3054, Teledyne LeCroy). Voltages are measured with a high-voltage probes (Tektronix P6015A 1000:1, Teledyne LeCroy PPE 20 kV 1000:1, Teledyne LeCroy PP020

10:1) while current peaks are analyzed using a current transformer (Pearson company, model 2877). Electromagnetic radiation (EMR) from the high voltage generator is removed from the currents and voltages measured using a Butterworth filter [53].

2.3.2. Radiative species. Optical emission spectroscopy is utilized to identify the radiative species from plasma. The spectrometer (SR-750-B1-R model from Andor company) is equipped with an intensified charge-coupled device (ICCD) camera which operates in the Czerny Turner configuration (IStar Model). Its focal length is 750 mm while diffraction is achieved with a 1200 grooves mm^{-1} grating in the visible range. The following parameters are selected for all experiments: exposure time = 0.1 s, number of accumulations = 50, readout rate = 3 MHz, gate mode = 'CW ON', intensification factor = 2000, insertion delay = 'ultra fast'.

2.3.3. Temperature measurements. Temperature measurements of material surfaces or biological tissues exposed to plasma are performed using thermographic infrared imaging. The camera from JENOPTIK & INFRATEC is equipped with a VarioCAM® HD head 680/30 and allows real-time analysis, transfer and processing of information. Its spectral range is 7.5–14 μm , its thermal measurement range is -40 °C to 1200 °C, its thermal resolution at 30 °C is down to 30 mK, and its measurement accuracy is $\pm 1.5\%$ from 0 °C to 100 °C.

2.4. Biological diagnostics

2.4.1. Cell culture and CAP treatment. HuCCT-1 cells, derived from intrahepatic biliary tract, were kindly provided by Dr G. Gores (Mayo Clinic, MN). EGI-1 cells, derived

from extrahepatic biliary tract, were obtained from the German Collection of Microorganisms and Cell Cultures (DSMZ, Germany). Cells were cultured in DMEM supplemented with 1 g l^{-1} glucose, 10 mmol l^{-1} HEPES, 10% fetal bovine serum, antibiotics (100 UI ml^{-1} penicillin and 100 mg ml^{-1} streptomycin), and antimycotic (0.25 mg ml^{-1} amphotericin B). Cell lines were routinely screened for the presence of mycoplasma and authenticated for polymorphic markers to prevent cross-contamination.

The cells were treated directly with the catheter described in figure 3(b). It was supplied with helium gas (Alphagaz 1 standard from Air Liquide company) at a flow rate of 1 slm and powered with a nanopulse high voltage generator device (model Nanogen 1) from RLC Electronic company. Electrical parameters were fixed as follows: 8 kV of amplitude, 1% of duty cycle and 5 kHz of repetition frequency.

2.4.2. Cell viability. 20 000 cells/well were plated in 24-well plates. Twenty-four hours later, the medium was replaced by fresh culture medium and the cells were exposed directly to plasma during 0.5, 1, 2, 3 and 5 min. Cells were then incubated for 72 h before determining the viability by the crystal violet method. Absorbance was quantified with a spectrophotometer (Tecan) at 595 nm.

3. Results and discussion

This section starts with a physical characterization of the transferred plasma catheter to explain how cold plasma is successfully propagated over long distances despite voltages of a few kV. In a second step, the catheter is applied directly to the AGBT model, without being inserted into the duodenoscope. This study aims at validating the absence of electrical and thermal risks likely to invalidate the selected configuration. In a third step, the transferred plasma catheter is introduced into the operating channel of the duodenoscope, the whole being inserted into the PPBT model. This anatomical porcine model, closer to a real patient case, is the subject of a new feasibility-risk study. In a fourth step, the therapeutic efficacy of CPE is demonstrated on CCA cells as part of an *in vitro* experimental campaign. As a reminder, the antitumor efficacy is not demonstrated in alive porcine models, as such approach does not exist in the case of CCA.

3.1. Deciphering the role of the auxiliary wire in the transferred plasma catheter

Of the different configurations shown in figure 2, only the transferred plasma catheter (e) has a long auxiliary wire running along its capillary, one end being in contact with the plasma in the main chamber and the other with the plasma plume. It is worth stressing that the auxiliary wire is not an option but a mandatory to propagate cold plasma over long distances. Without the auxiliary wire, the guided streamers can only propagate less than 10 cm along the 2 m long flexible capillary. Figure 6(a) shows the voltage profiles measured at the proximal and distal ends of the auxiliary wire

during plasma operation ($V_{\text{Generator}} = 10 \text{ kV}$, $D_{\text{Cycle}} = 1\%$, $f_{\text{rep}} = 10 \text{ kHz}$, $\Phi_{\text{He}} = 1 \text{ slm}$). The amplitudes are quite different with values as high as 1400 V and as low as 350 V at the proximal and distal ends respectively. The current, however, always has the same profile whether at proximal end, distal end (data not shown) or mid-length. The time profile measured at mid-length is shown in figure 6(b); two peaks of conduction current are measured at the rising edge ($t = 5 \mu\text{s}$) and falling edge ($t = 7 \mu\text{s}$) of the high voltage pulse, corresponding to positive and negative guided streamers respectively, as already evidenced in [53]. Consequently, the time profiles of V_{wire} and I_{wire} enable to assess the electrical power in the auxiliary wire: its value from the proximal end to the distal end decreases from 0.67 W to 0.25 W, a 63% loss. In addition, the impedance of the auxiliary wire (Z_{wire}) can be obtained using equation (1). For the sake of clarity, the figure 6(c) represents $1/Z_{\text{wire}}$ as a function of time. In absence of cold plasma (i.e. no guided streamer and no peak of conduction current), the impedance tends to an infinite value, hence explaining why $1/Z_{\text{wire}}$ is close to zero before 5 μs , between 5.1 and 7 μs , and after 7.1 μs . The notion of impedance appears during the lifespan of the two conduction peaks, with a value close to 11 k Ω at the rising edge of the pulse (5–5.1 μs) and 6 k Ω at the falling edge (7–7.1 μs). These values should be considered as rough estimates due to uncertainties in the three measured parameters ($V_{\text{wire,pr}}$, $V_{\text{wire,dist}}$ and $I_{\text{wire,mid}}$) but overall, Z_{wire} can be estimated to be on the order of 10 k Ω

$$Z_{\text{wire}} = \frac{V_{\text{wire,pr}} - V_{\text{wire,dist}}}{I_{\text{wire,mid}}} \quad (1)$$

The understanding of these results is based on the principle that the auxiliary wire can behave either as a floating electrode or as a transmission line depending on whether its length (L_{wire}) is negligible compared to the spatial period of the voltage signal which traverses it. In this work, since the excited electrode of the catheter is polarized by high voltage pulses that are regularly repeated, cold plasma is generated as guided streamers. The spatial period (λ) associated with a train of guided streamers can be defined as the ratio of the streamer propagation velocity (v) by its temporal repetition frequency (f_{rep}), as indicated in relation (2):

$$\lambda = \frac{v}{f_{\text{rep}}} \quad (2)$$

In our previous research works performed on APPJs, fast ICCD imaging shows that the guided streamers can propagate from $100 \text{ km}\cdot\text{s}^{-1}$ to more than $2000 \text{ km}\cdot\text{s}^{-1}$ depending on the position where velocity is measured [53]. Here, the mean propagation velocity measured by fast ICCD imaging within the catheter is approximately $100 \text{ km}\cdot\text{s}^{-1}$. Since the signal frequency is set at 10 kHz, λ is estimated to be close to $100 \times 10^3 \text{ (m s}^{-1})/10 \times 10^3 \text{ (Hz)} = 10 \text{ m}$. This value is probably overestimated because the Fourier signal decomposition of the pulsed signal shows the presence of harmonics at much higher frequencies due to the very fast rising edge of the voltage signal (30 ns). Consequently, if $L_{\text{wire}} \ll 10 \text{ m}$

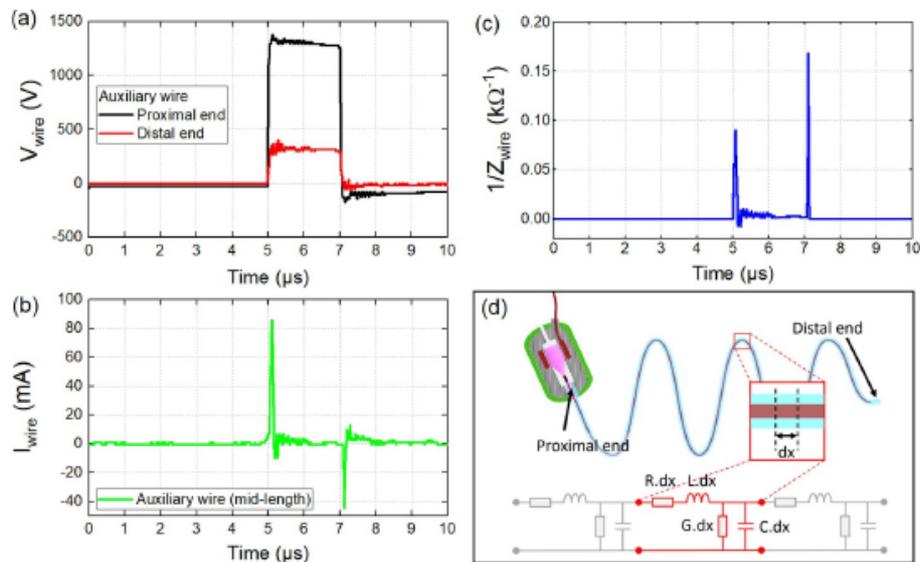


Figure 6. (a) Time profile of the voltage measured at proximal and distal ends of the transmission line, (b) time profile of the current measured at mid-length of the same electrode. In both cases, the transferred plasma catheter is not inserted into the duodenoscope ($D_{\text{Cycle}} = 1\%$, $f_{\text{rep}} = 5$ kHz, He flow rate = 1 slm). (c) Impedance of the auxiliary wire, (d) schematic representation of the elementary components of a transmission line.

Table 2. Elementary components of a transmission line.

Measurands	Components	Symbols	Units
Resistance of the conductors along the line	Series resistor	R	$\Omega \cdot \text{m}^{-1}$
Inductance along the line resulting from the magnetic field associated to the streamers propagation	Series inductor	L	$\text{H} \cdot \text{m}^{-1}$
Capacitance between auxiliary wire and outer walls of the catheter	Shunt capacitor	C	$\text{F} \cdot \text{m}^{-1}$
Conductance of the gas between auxiliary wire and catheter's walls	Shunt resistor	G	$\text{S} \cdot \text{m}^{-1}$

(i.e. a few centimeters) then the auxiliary wire behaves like a floating electrode: the electric potential is uniform at all points and invariable over time. However, if L_{wire} has a value close to 10 m or that is not negligible compared to 10 m, then the auxiliary wire behaves like a transmission line (or waveguide). Here, since $L_{\text{wire}} = 2$ m, the auxiliary wire can be modeled as a transmission line, as already suggested by Bastin *et al* [42]. In order to understand these results, the catheter is modeled as an infinite series of two-port elementary components, each representing an infinitesimally short segment of the transmission line whose cross-section is considered constant along its length. These two-port elementary components are detailed in table 2 and a schematic of their arrangement is proposed in the equivalent electrical model in figure 6(d). The series inductors can be neglected because the voltage profile from figure 6(a) and the current profile from figure 6(b) do not

show significant phase shift. However, shunt resistors must be considered. Indeed, when the catheter is powered, plasma can be observed non-uniformly along the flexible capillary, as photographed in figure 9(b). Thus, the emissive regions which indicate the presence of plasma, can be modeled by a resistor, while the non-emissive regions indicate the presence of non-ionized helium and can therefore be modeled by a capacitor. The catheter behaves like a transmission line characterized by significant energy losses resulting from the non-uniformly propagating plasma regions all along. Finally, it is worth stressing that the terminology of ‘floating electrode’ is inappropriate in our study for at least two reasons: first the auxiliary wire is traversed by a potential gradient (while by definition, voltage is uniform within a same electrode) and its impedance is 80 kΩ (while by definition, it must be zero in any electrode).

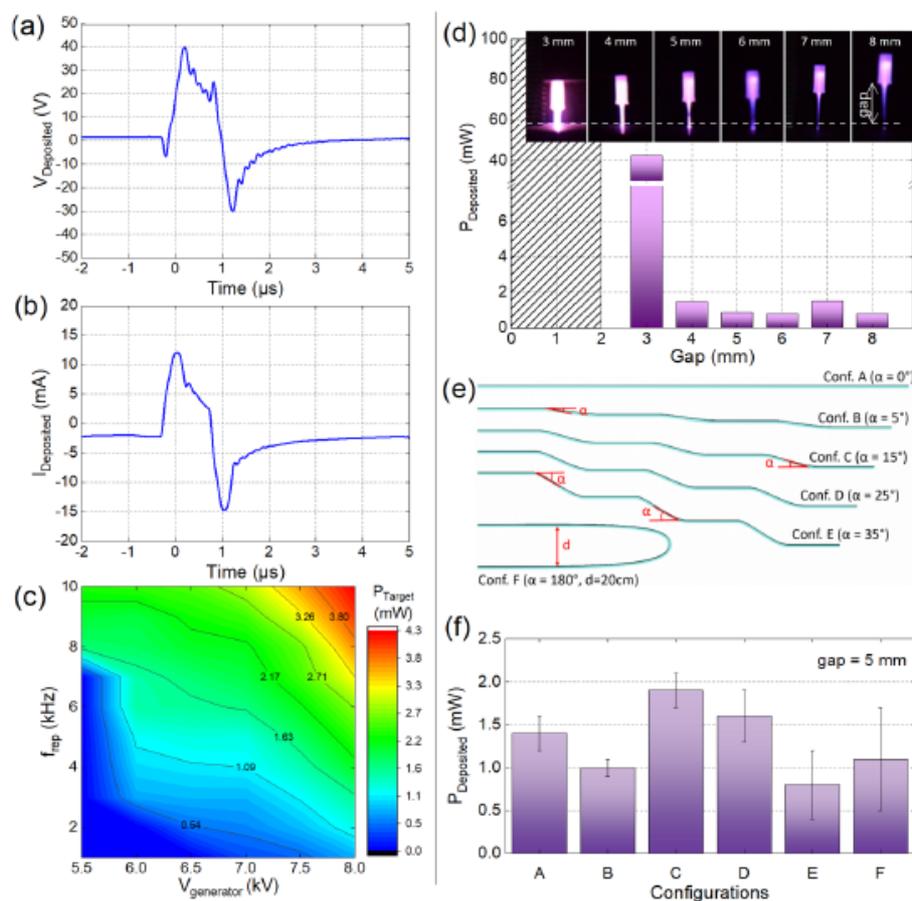


Figure 7. (a) Time profile of the voltage measured on the AHBT tumor insert, (b) time profile of the current measured on AHBT tumor insert, (c) power dissipated in the AHBT tumor insert as a function of the voltage delivered by the generator and its repetition frequency, (d) power measured in the AHBT tumor insert versus the gap, (e) bending configurations of the catheter outside AHBT model, (f) influence of bending configurations on the electrical power deposited by the catheter on target. In all cases, the transferred plasma catheter is not inserted in duodenoscope ($D_{cycle} = 1\%$, $f_{rep} = 10$ kHz, $\Phi_{He} = 1$ slm, gap = 10 mm).

3.2. Transferred plasma catheter applied to the AHBT model

3.2.1. Electrical properties (catheter operating outside the duodenoscope).

The transferred plasma catheter is placed in the AHBT model so that the distance between its distal end and the equivalent electrical tumor insert is 10 mm (i.e. gap = 10 mm). The time profiles of voltage and current deposited on the equivalent electrical tumor insert are shown in figures 7(a) and (b) respectively. It turns out that the maximum values are approximately 40 V and 10 mA respectively. Considering that the signals are close to pulse profiles, their root mean square (RMS) values can be deduced from relation (3) and correspond only to 3.98 V and 1.19 mA respectively.

Then, the electrical power dissipated in the equivalent electrical tumor insert is assessed using relation (4):

$$V_{RMS} = V_{max} \cdot \sqrt{D_{cycle}} \quad (3)$$

$$P_{Deposited} = f_{rep} \cdot \int_T I_{Deposited}(t) \cdot V_{Deposited}(t) \cdot dt. \quad (4)$$

As shown in figure 7(c), the influence of the generator voltage from 5.5 kV to 8.0 kV as well as the influence of the repetition frequency from 1 to 10 kHz drive to power values always lower than 5 mW, which—to a

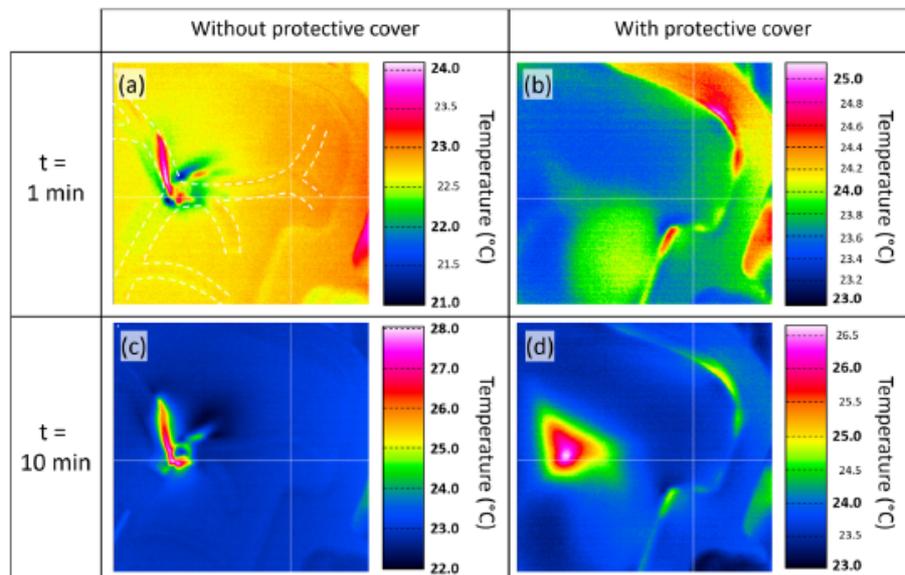


Figure 8. Infrared pictures of the AHBT model where cold plasma is delivered in the right bile duct. The transferred plasma catheter operates at $V_{\text{Generator}} = 7$ kV, 10 kHz, $\Phi_{\text{He}} = 1$ slm. Pictures are taken at $t = 1$ min and $t = 10$ min after plasma exposure, with/without transparent protective cover.

first approximation—corresponds to power densities close to 10 mW cm^{-3} in the biliary ducts. Interestingly, the figure 7(d) indicates that this electrical power has a non-linear dependence with the gap. While $P_{\text{Deposited}}$ remains always lower than 2 mW for gaps higher than 3 mm, $P_{\text{Deposited}}$ reaches a value as high as 40 mW for a 3 mm gap. For this reason, the gap is a strategic parameter that needs to be finely controlled in interventions such as ERCP. By playing on it, it is possible to control the deposited power and therefore the temperature of the exposed tissues, as discussed in the next section. The same question may arise for another parameter of the catheter: its flexibility. Since the catheter is utilized into the AHBT model, it is already bent by passing through the anatomical structures mimicking the duodenum and the choledoc of the biliary tree (see figure 4). However, to verify that its electrical response would remain unchanged to treat other parts of human body, the catheter has been utilized outside the AHBT model and bent into different configurations depicted in figure 7(e), where each configuration is characterized by a set of bending angles ($\alpha = 0^\circ, 5^\circ, 15^\circ, 25^\circ, 35^\circ$ and 180°). For a gap fixed at 5 mm, the figure 7(f) indicates that the deposited power from relation (4) remains roughly the same in all the aforementioned configurations, with values lower than 3 mW. Finally, one must stress that these profiles are obtained when the catheter is outside the duodenoscope. In section 3.3, we will see how the ‘catheter in duodenoscope’ configuration significantly modifies the electrical characteristics of plasma.

3.2.2. Thermal properties (catheter operating outside the duodenoscope). Figure 8 shows infrared photographs of a portion of the AHBT model where the transferred plasma catheter is in operation. The photographs are taken at 1 min and 10 min after cold plasma ignition, without/with the transparent protective cover (as sketched in figure 4(a)). Several observations are noteworthy:

- The temperature values are entirely compatible with the targeted medical application since the 40°C threshold is never exceeded.
- Inside the bile ducts, the temperature goes from about 22°C to 24°C after 1 min to stabilize at a maximum value of 28°C after 10 min of operation.
- In figure 8(a), the gaseous effluent propagates preferentially in the ‘right bile duct’ whose internal walls are heated by the plasma plume. Nevertheless, this same effluent also propagates isotropically over shorter distances without being ionized, leading to a very localized cooling of the internal walls but still significant since a value of approximately -1.0°C is obtained (the infrared camera having a thermal sensitivity of 0.05°C).
- The addition of the protective cover (1 cm thick) qualitatively illustrates the diffusion of heat emitted by plasma in adjacent tissues. The temperature increases from 22°C to 24°C after 1 min exposure, to reach 28°C after 10 min. Maximum temperatures obtained in figures 8(c) and (d) do not drive significant discrepancies.

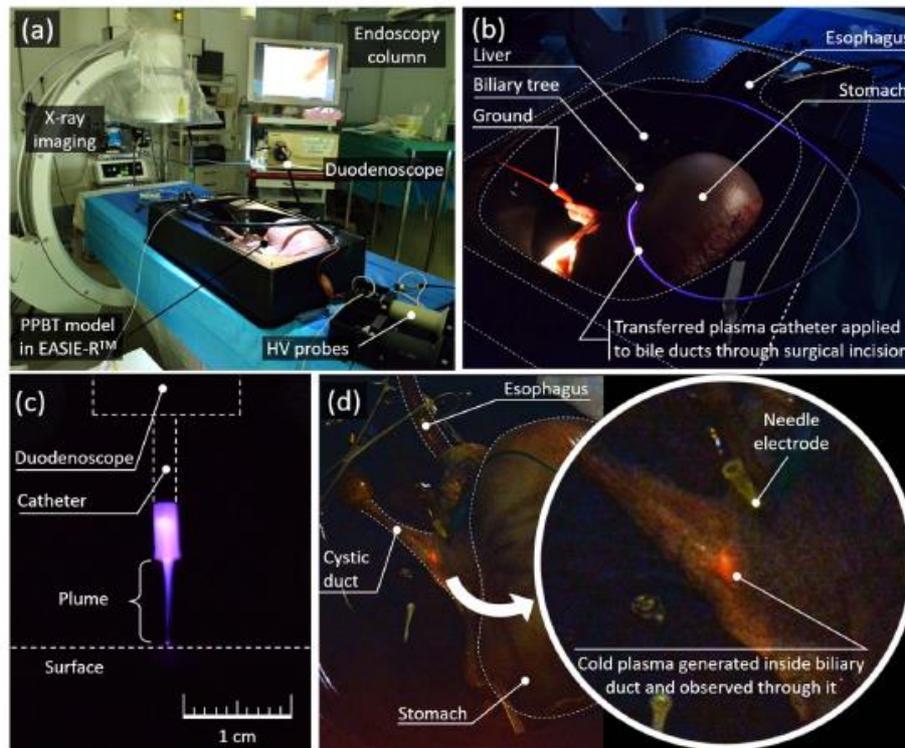


Figure 9. (a) Photograph of the operation room where a post-mortem porcine biliary tree model is contained in EASIE-R™ with endoscopy and plasma equipments, (b) night vision of the PPBT model in which a fine surgical incision is achieved in the duodenum to insert the transferred plasma catheter directly into the bile duct without having to use the duodenoscope, (c) night vision of the plasma plume emitted by the transferred plasma catheter inserted in the duodenoscope (d) night vision of the PPBT model where cold plasma is delivered in the biliary duct and observed through it.

3.3. Transferred plasma catheter in duodenoscope applied to the PPBT model

3.3.1. Experimental framework. The technical feasibility of the transferred plasma catheter has been demonstrated on a model reproducing the topography of the bile ducts while mastering the electrical and thermal risks. Now, we propose to use a model closer to the human, in the perspective of carrying out clinical research in the near future. The photograph in figure 9(a) shows the experimental environment in which this new study is carried out: the PPBT model (whose anatomy is detailed in figure 5) is placed in the EASIE-R™ on an x-ray table. The duodenoscope is connected to the interventional endoscopy column which manages the incoming/outgoing fluids, the light source of the duodenoscope and the real-time video system (for data acquisition and processing). An x-ray imager is also used to perform real-time radiographic monitoring of the endoscopic tools (catheter, duodenoscope, instruments, etc) in the cavities of the PPBT model.

Before inserting the transferred plasma catheter into the duodenoscope to treat the bile ducts, a preliminary maneuver is carried out percutaneously, i.e. without using the duodenoscope. For this, a thin surgical incision is made in the duodenum to introduce the catheter in the bile ducts. Figure 9(b) is a night-time photograph which shows that the part of the catheter left outside the porcine model, shows both emissive regions (indicating the presence of plasma) and dark regions (indicating the presence of un-ionized helium). Since the electrical and thermal parameters have shown values close to those obtained in the previous section, a conventional endoscopic intervention can now be carried out following a four steps-sequence:

- (a) The transferred plasma catheter is introduced into the working channel of the duodenoscope which remains outside the PPBT model. The catheter is supplied at 10 kV to ensure that a plasma plume can be generated. The ‘catheter + duodenoscope’ configuration is validated, as

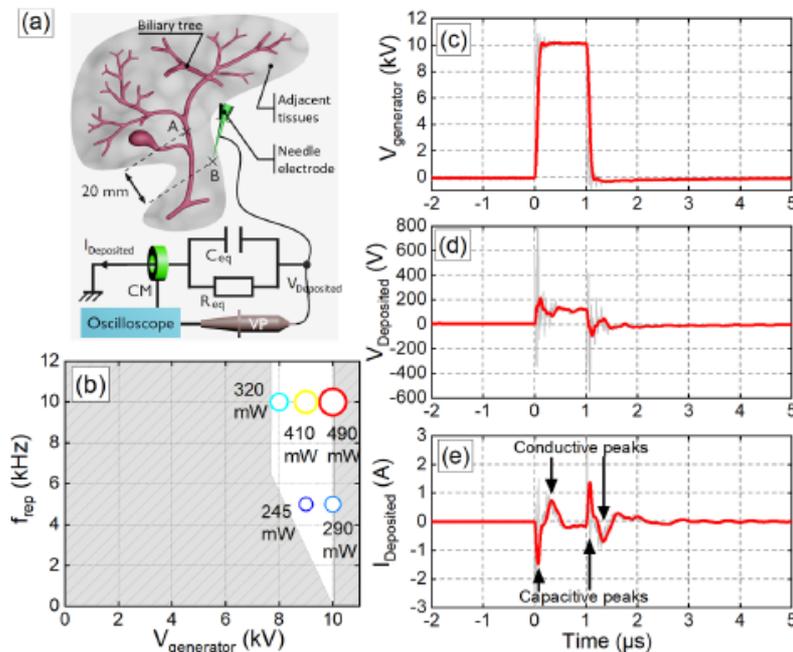


Figure 10. (a) Sketch diagram showing how voltage and current are measured in porcine body, (b) electrical power deposited by cold plasma in the biliary ducts versus voltage magnitude and voltage frequency ($D_{Cycle} = 1\%$, $\Phi_{He} = 1$ slm), (c) temporal profile of the applied voltage for a magnitude of 10 kV, $D_{Cycle} = 1\%$ and $f_{rep} = 10$ kHz, (d) temporal profile of the voltage measured in PPBT, (e) temporal profile of the current measured in PPBT.

evidenced in figure 9(c) since the plume is visible and can reach a length of approximately 1 cm. Then, plasma is switched off.

- The duodenoscope is inserted into the esophagus, the stomach and then the duodenum to reach the papilla which marks the entrance to the biliary tree.
- Using a guide wire (not to be confused with the auxiliary wire), the endoscopist slides the plasma transferred catheter until it passes through the papilla. The catheter is introduced into the common bile duct of the biliary tree to ascend to the common bile duct.
- The catheter is supplied with helium at a flow rate of 1 slm. This value is neither a low nor a high limitation since the catheter can generate cold plasma for values between 0.2 and 10 slm. Note, however, that there is a threshold limit of 8 slm that should not be exceeded to prevent any risk of biliary barotrauma or fatal gas embolism, as underlined by Mukewar *et al* who injected CO_2 into the biliary tree of porcine models [54].
- Plasma in the catheter is switched on for about 20 min during which electrical and thermal measurements are performed. Figure 9(c) is a night photograph of the PPBT model that shows cold plasma illuminating the bile duct from within.

3.3.2. Electrical properties. To verify the absence of electrical hazards inherent in the CPE procedure, the current, voltage and power deposited in the bile ducts are measured using the setup shown in figure 10(a). When the cold plasma plume is generated in the common bile duct at point A, a needle electrode is placed in adjacent tissue approximately 20 mm away (point B). This electrode is then connected to the equivalent electrical model, already used in section 3.2. (1.5 k Ω resistor in parallel with a 100 pF capacitor). Figure 10(b) shows the P_{Model} values measured for $V_{Generator}$ between 8 and 10 kV and f_{rep} set at 5 and 10 kHz. Through these five experimental conditions, it appears that the electrical power typically varies between 250 and 500 mW: values that are higher than those obtained when the catheter operates outside the duodenoscope but which lead to reasonable heating, as we will see in the thermal study of section 3.3.3. Ahead of these electrical power values, it is important to look at the temporal profiles of voltage and current dissipated in the PPBT model. While figure 10(c) recalls the temporal profile of the voltage delivered by the generator ($V_{Generator} = 10$ kV, $f_{rep} = 10$ kHz, $D_{Cycle} = 1\%$), figures 10(d) and (e) represent the temporal profiles of $V_{Deposited}$ and $I_{Deposited}$. The voltage and current reach maximum values of approximately 200 V and 1 A respectively and RMS values of 20 V and 100 mA respectively. The

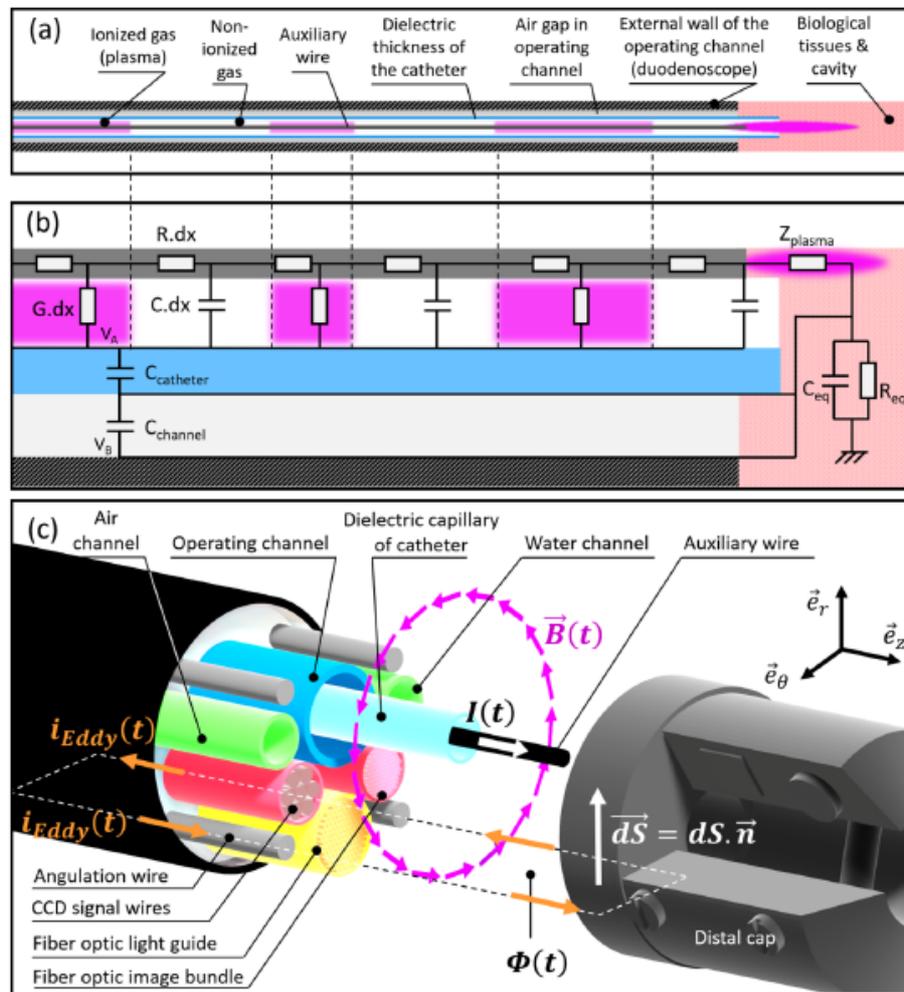


Figure 11. (a) Diagram of the transferred plasma catheter interacting with biological tissues, (b) equivalent electrical model of the ‘catheter in duodenoscope in biliary duct’ assembly, (c) diagram explaining the generation of eddy currents in the aforementioned assembly.

RMS value of current is overestimated since the current peaks do not have a constant 1 A magnitude during the $1 \mu\text{s}$ pulse width. A more accurate calculation shows an RMS value of 32 mA. Although it is common practice to assess electrical risks through these RMS parameters, their use here is irrelevant as detailed afterwards (figure 13) at the light of the standards ruling the safety of medical devices delivering short-time current pulses.

At this stage, three questions legitimately arise: why is the absolute magnitude of current multiplied by a factor of $1/0.012 = 80$ (depending on whether the catheter is inserted into the duodenoscope or not)? What types of undesirable

electromagnetic effects can result from the nanopulsed excitation of cold plasmas? Are the electrical parameters safe for a patient undergoing such a plasma endoscopic procedure? The answers to these questions are discussed below.

3.3.2.1. Why is the current increased if the catheter is inserted into the duodenoscope? First, the figure 11(a) recalls that the gas confined in the dielectric capillary is only ionized at some places. The auxiliary wire behaves as a transmission line whose elementary conductances ($G \cdot dx$) and capacitances ($C \cdot dx$) stand respectively for these ionized and non-ionized gas

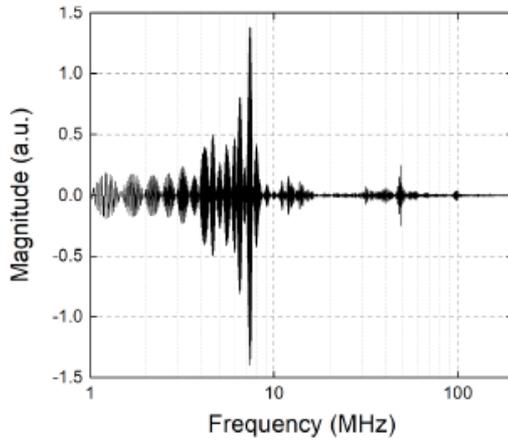


Figure 12. Spectrum of the electromagnetic radiation emitted by the high voltage power supply and measured 30 cm distance.

regions, as shown in figure 11(b). This modeling is completed with C_{Catheter} and C_{Channel} which correspond to the capacitance of the catheter (more precisely the dielectric thickness of its capillary) and the capacitance of the gaseous environment within the working channel respectively. This set is electrically connected to the biological tissues modeled by the paralleling of R_{eq} and C_{eq} . When the catheter is operating outside the duodenoscope, the V_B potential (figure 11(b)) is floating, so the leakage currents passing through C_{Catheter} are relatively small. Since they cannot contribute to a charge transfer to the plasma pen, they can also be referred to as ‘loss currents.’ In contrast, when the catheter is in the duodenoscope, the V_B potential is no longer floating. Indeed, the catheter is inserted in the operating channel of the duodenoscope, the internal walls of which are at certain sections metallic and connected to the ground. Consequently, V_B is grounded, which drives to $(V_A - V_B)$ values larger than those obtained in the simple catheter configuration, and therefore in much higher leakage currents. These leakage currents are not lost: they are transferred to the tissues to be treated by simple contact with the duodenoscope. These leakage currents can thus contribute to significantly increasing the value of $I_{\text{Deposited}}$, as shown in figure 10(e).

3.3.2.2. Undesirable electromagnetic effects. EMR is emitted by the HV generator during the endoscopic procedure, creating interferences on the communication and display systems (CCD camera embedded in the duodenoscope, monitors of the endoscopic column, ...). The images transmitted in real time are altered by the appearance of regularly spaced parasitic patterns, which can interfere with the analysis work of endoscopists, especially when treating patients with pathological or anatomical complications (e.g. stenosis). The figure 12 shows a fast Fourier transform diagram of the EMR measured at oscilloscope and 30 cm away from the high voltage generator. This EMR is mainly present in the frequency range

below 10 MHz, with a maximum value near 7 MHz. It is therefore a frequency range close to that of radio frequencies emitted by cell phones and for which the long-term health risks are still the subject of epidemiological studies [55]. Nevertheless, we are dealing here with relatively short exposure times (typically a few minutes) while having the possibility of moving the high-voltage generator 2 m away from the patient in order to naturally reduce the EMR or, better, to confine it in a Faraday cage. The elimination of electromagnetic noise is therefore an important but not limitative issue that will have to be addressed to make CPE a technology that is both reliable and in line with endoscopists’ expectations.

Another expected side effect is the occurrence of eddy currents if the plasma catheter is powered by nanopulsed excitation. As shown in figure 11(c), the current circulating in the auxiliary wire creates a magnetic induction $\vec{B}(r, t) = B(r, t) \cdot \vec{e}_\theta$. Its circular field lines can pass through the internal structures of the duodenoscope, especially the closed metallic contours which are both numerous and intersecting. For the sake of clarity, a single closed conductive contour is considered in figure 11(c), made of two parallel angulation wires and the proximal/distal metallic elements integrated into the duodenoscope. This contour is associated with an oriented surface $\vec{S} = \iint d\vec{S} \cdot \vec{n}$ and the $\vec{B} \cdot \vec{S}$ scalar product corresponds to the magnetic flux $\Phi(t)$ given by the relation (5). According to the Lenz–Faraday law, a temporal variation of $\Phi(t)$ through the contour of resistance R , generates an electromotive force $e_{\text{ind}}(t)$ at the terminals of this contour which is created to oppose the variation of $\Phi(t)$. As indicated in equation (6), $e_{\text{ind}}(t)$ is associated with an induced current $i_{\text{ind}}(t)$ which is called ‘eddy current’ if it circulates in a closed metallic contour. This type of current can have several undesirable effects, in particular the loss of power and the heating of certain conductors (energy dissipation by Joule effect)

$$\Phi(t) = \iint_{\Sigma} \vec{B}(t) \cdot d\vec{S} \cdot \vec{n} \quad (5)$$

$$i_{\text{ind}}(t) = \frac{e_{\text{ind}}(t)}{R} = -\frac{1}{R} \cdot \frac{d\Phi}{dt} \quad (6)$$

3.3.2.3. Safety of the electrical parameters. The risks associated with electric current in the context of a CPE procedure must be clearly identified. It is known that death by electric shock results primarily from ventricular fibrillation and secondarily from asphyxia or cardiac arrest. Table 3 recalls the effects of AC current at 50–60 Hz on the human body [56]. It turns out that the risks become significant when values as high as 20 mA are reached for contact times of 1 min, driving to tetanization of the rib cage. Consequently, and at first sight, the value of 1 A obtained in figure 10(e) might suggest that CPE is not suitable for humans. This conclusion is erroneous, first because the effects reported in table 3 concern only alternating currents of 50–60 Hz, and second because the biological effects of electricity do not depend solely on the frequency of the current: the type of current (AC, DC, etc) and the wave profile are of major importance.

Table 3. Physiological effects of AC current at 50–60 Hz on the human body (for different current magnitudes and contact times).

Current amplitude	Contact time	Effects
0.5–1.0 mA	—	Perception threshold according to skin state
8 mA	—	Shock when touching, sudden reactions
10 mA	4 min	Contraction of limb muscles and long-lasting muscle twitches
20 mA	60 s	Beginning of tetanization of the rib cage
30 mA	30 s	Ventilatory paralysis
40 mA	3 s	Ventricular fibrillation
75 mA	1 s	Ventricular fibrillation
300 mA	110 ms	Ventilatory paralysis
500 mA	100 ms	Ventricular fibrillation
1000 mA	25 ms	Cardiac arrest

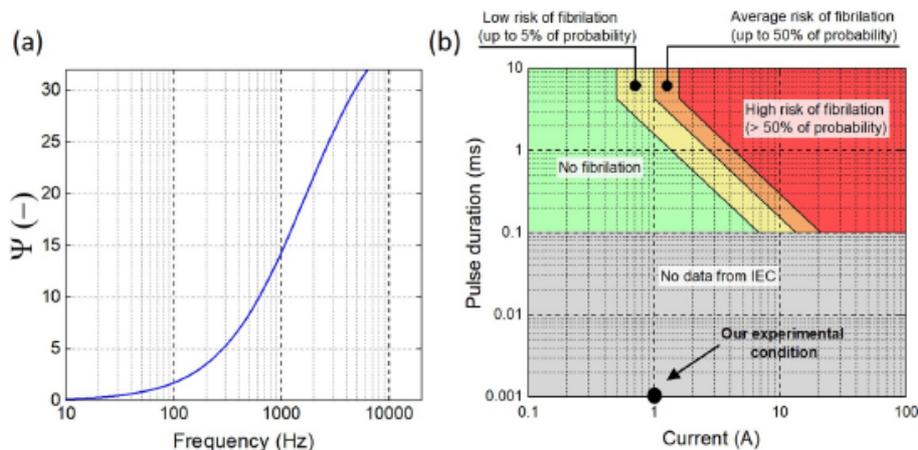


Figure 13. Thresholds of ventricular fibrillation determined through two graphs: (a) frequency factor versus frequency of a periodic current applied to human body (b) pulse duration of a periodic current as a function of its amplitude to highlight fibrillation risks.

For AC currents at frequency higher than 50–60 Hz, the ventricular fibrillation threshold moves away as the frequency of the current increases. This phenomenon can be understood by defining a frequency factor (ψ) as in equation (7) and by plotting it versus frequency, as shown in figure 13(a) following standard International Electrotechnical Commission (IEC) TS 60479-1

$$\psi = \frac{\text{Fibrillation threshold at } f_x \text{ (Hz)}}{\text{Fibrillation threshold at 50 (or 60) Hz}} \quad (7)$$

$$w_{\text{pulse}} = \frac{D_{\text{Cycle}}}{f_{\text{rep}}} \quad (8)$$

For example, it is known that the physiological effects of a 20 mA current at 50 Hz correspond to a tetanization of the rib cage. If one seeks to obtain the same physiological effect at 1000 Hz, then the amplitude of the current will have to be greater. To find out this value, refer to figure 13(a), which indicates that $\psi = 14$ for $f_x = 1000$ Hz. In other words, the

same physiological effect will be triggered by a current of frequency 1000 Hz as if its amplitude is $20 \times 14 = 280$ mA. Similarly, if a sinusoidal current at 10 kHz is delivered, then this threshold increases to 2.8 A. The human body can therefore withstand higher current values as its frequency increases. Within the framework of our experiments, the voltage (and thus the current) is delivered at 10 kHz although its profile is not sinusoidal but pulsed. This means that the current profile must be considered in addition to the frequency, especially the width of the current peaks. The pulse width (w_{pulse}) is defined by equation (8) and has a value of $1\%/10 \text{ kHz} = 1 \mu\text{s}$, as graphically confirmed in figure 10(e). To know if it is dangerous to expose a human body to (1 A; 1 μs) current pulses, it is necessary to comply with IEC standards on medical electrical equipment [56]. For short pulses, the standard indicates the energy as the main factor to determine if fibrillation may occur. Therefore, for pulses of various profiles (rectangular, half sinusoidal cycle, decaying exponential) the key parameters are dc peak value (rectangular pulse), rms and peak value (sinus pulse), rms calculated over 3τ and peak value (exponential pulse).

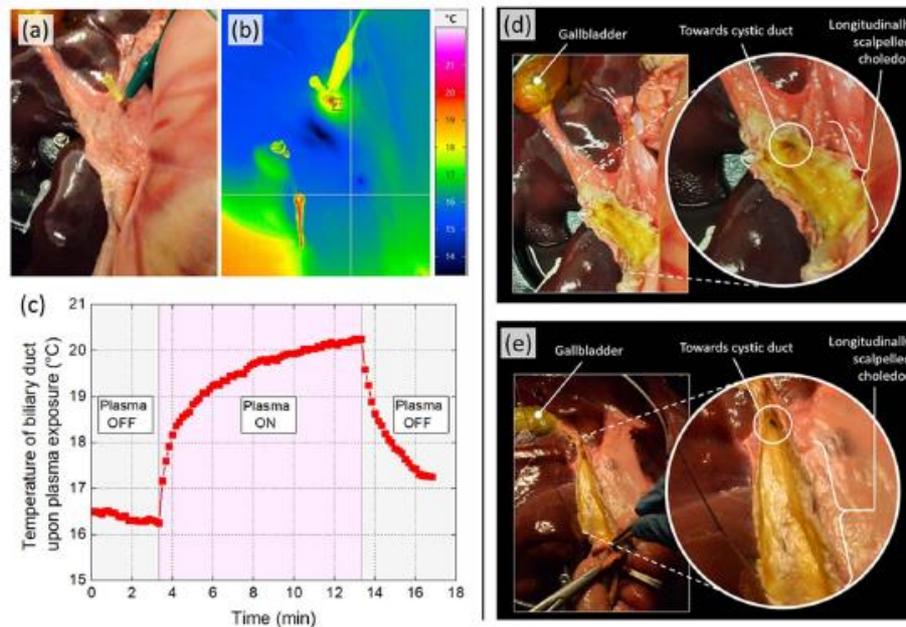


Figure 14. (a) Photograph of part of the porcine biliary tree (b) infrared picture of (a) showing the absence of overheated regions after 1 min of plasma exposure, (c) bile duct outer wall temperature as a function of time. Monitoring is achieved before, during and after plasma exposure, (d) photograph and magnified view of healthy bile ducts from a porcine model, scalped longitudinally to reveal the surface state of the internal walls without exposure to plasma, (e) after plasma exposure (20 min).

According to IEC standards, fibrillation risks can be classified into four categories: zero, low, medium and high. They can be represented by four zones in a graph representing the duration of current pulses (between 0.1 and 100 A) as a function of their amplitude (between 0.1 and 10 ms), as proposed in figure 13(b). The pulsed current measured on the PPBT model in figure 10(e) can be reported in figure 13(b) as a single point whose coordinates are (1 A; 1 μ s). Even if this point falls outside of these four zones, the safety of the measured current can be unambiguously assessed. Indeed, the figure 13(b) clearly shows that pulses of 1 A and 1 ms width are completely innocuous. Consequently, pulses of 1 μ s, thus 1000 times shorter, will be totally negligible. This means that the transferred plasma catheter can be used safely under the experimental conditions tested.

Finally, it is also worth mentioning that our teams (LPP & CRSA) have previously conducted preclinical studies using APPJs that were non-endoscopic devices to treat ectopically-inoculated CCA tumors in mouse models [31, 32]. At that time, we used the same electrical parameters described in the current study (8–10 kV amplitude, 5 kHz frequency and 1% duty cycle) in order to induce antitumor responses without deleterious effects on the exposed tissues. Our treatment

times were typically a few minutes, which is consistent with the recommendations supported by [57] to prevent severe damages.

3.3.3. Thermal properties. As the electrical power deposited in the PPBT model is a few hundred mW (and not a few mW as in the AHBT model), one may wonder whether the conversion of electrical power into calorific power increases too excessively the temperature of the internal tissues. To verify this hypothesis, we focus on the region of the PPBT model comprising the common bile duct and the choledoc (figure 14(a)). Thermographic imaging is performed in real time on this region with the catheter inserted into the bile duct and in which helium flows without being ionized. The infrared image in figure 14(b) shows that the overall temperature of the biliary tree is around 16.5 °C. This value is slightly lower than the ambient temperature (19 °C) because the PPBT model has been taken out of the freezer (−20 °C) only 12 h before the experiment. Metal alligator clips are at slightly higher temperatures because they are in thermal equilibrium with the environment. The 14 °C zone corresponds to a local cooling of the non-ionized helium flow in the internal tissues.

The variation of the external temperature of the bile ducts can be monitored before, during and after exposure to cold plasma, as seen in figure 14(c). This temperature is measured at a specific point of the infrared map and which corresponds to the most penalizing heating conditions. It turns out that:

- Before plasma exposure, the tissue temperature is 16.5 °C.
- During a plasma exposure time of 10 min, the temperature increases by 4 °C and is therefore completely bearable by the human body. This increase is non-linear: it starts sharply in the first few minutes and continues asymptotically. Since this temperature is measured outside (and not inside) the bile ducts, it may be considered as underestimated. However, such thermal discrepancies are negligible since the thickness of a bile duct is only 1.5 mm.
- After plasma exposure ($t \approx 13.3$ min), an immediate and significant drop of tissue temperature is measured. Hence, a decay of 3 °C is reached in less than 3 min, so that the temperature is then stabilized at a value close to 17 °C.

To ensure that cold plasma exposure does not induce deleterious effects in the bile ducts, the appearance of their inner walls can be compared by cutting them longitudinally with a scalpel. Two cases are considered: PPBT model not exposed to plasma (figure 14(d)) and PPBT model after 20 min of plasma exposure (figure 14(e)). In both cases and in a very qualitative way, the tissues retain the same shiny appearance. In addition, there is no dry, ablated, reddened or blackened area: no damage is visible to the naked eye.

3.4. Therapeutic potential on CCA (in vitro studies)

Finally, we performed *in vitro* studies on human CCA cells to analyze the antitumor effects of the plasma catheter. For this, we evaluated the effects of CAP exposure on the viability of two human CCA cell lines, EGI-1 and HuCCT-1. Briefly, cells were directly treated with using the plasma catheter during 0.5, 1, 2, 3 and 5 min and cell viability was assessed 72 h post-treatment. We notice that such a treatment induces a significant decrease in the viability of CCA cells and this effect becomes stronger for longer plasma exposure times for both cell lines (figure 15(a)). As an example, figure 15(b) shows photographs of the HuCCT-1 tumor cells taken 72 h after several plasma exposure times. Altogether, these results demonstrate that the cold plasma catheter can induce antitumor effects on *in vitro* experimental models of human CCA. This result is consistent with the work that we have already published on CCA treated with non-endoscopic plasma sources, whether *in vitro* or *in vivo* models [31, 32]. Although the question of plasma-triggered biological selectivity (i.e. the ability to kill tumor cells while preserving non-tumor cells) is not addressed in this work, we have already demonstrated this effect by exposing CCA tumor lines and healthy patient-derived liver cells (hepatocytes) to an APPJ [31]. Similar effects can be expected using the transferred plasma catheter.

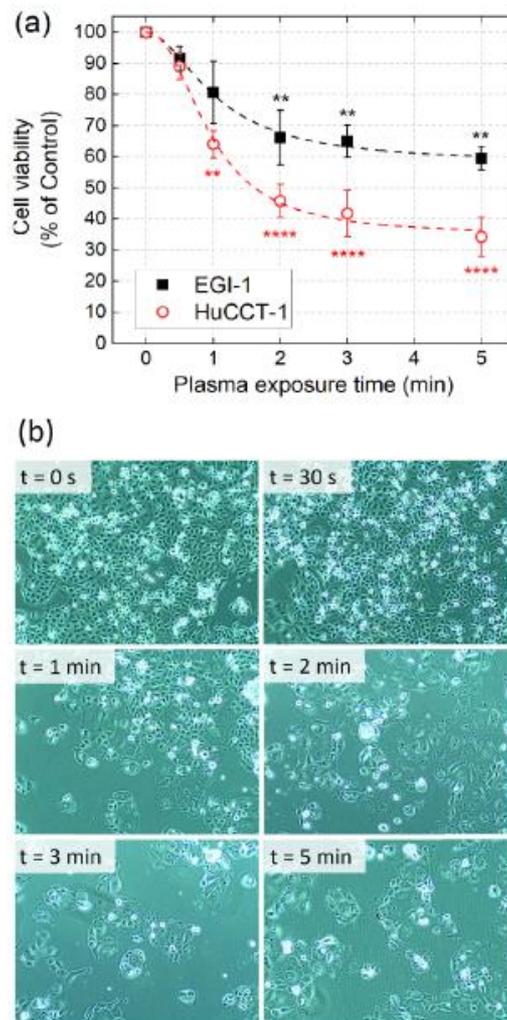


Figure 15. (a) Effects of CAP on the viability of EGI-1 and HuCCT-1 CCA cells. CCA cells were exposed to CAP for 0.5, 1, 2, 3 and 5 min and cell viability was measured 72 h post-treatment using the crystal violet assay. Values are expressed as means \pm SEM from at least three cultures. *, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$; ***, $p < 0.001$; ****, $p < 0.0001$; as compared with untreated CCA cells. SEM, standard error of the mean, (b) photographs of the HuCCT-1 tumor cells taken 72 h after plasma exposure (magnification X10).

4. Conclusion

After evaluating the performances and limitations of the therapeutic options currently used to treat CCA, we have shown the existence of a technological niche for the 'cold plasma'

approach, provided the innovation of ad hoc plasma sources. Among the different catheter configurations that can be endoscopically applied to humans, the transferred plasma catheter has been selected owing to its simple design and ease of use. The particularity of this device is that cold plasma is generated in a main chamber (located outside the subject to be treated) and then transferred along a large flexible capillary containing an auxiliary wire. Thus, the plasma can propagate to the distal end of the catheter to form a plasma plume of a few mm-cm. We have demonstrated that this auxiliary wire behaves as an 80 k Ω impedance transmission line and not as a floating electrode because its length ($L_{\text{wire}} = 2$ m) is not negligible compared with the spatial period of the voltage signal ($\lambda = 10$ m).

Since the transferred plasma catheter cannot be directly applied to a patient, several intermediate steps have been completed in this work. In a first experimental campaign, the device has been applied to an AHBT model supplemented by a tumor insert with the same topographical and electrical characteristics as a solid CCA tumor. While the cold plasma is confined in an artificial biliary tree, we have measured voltage and current values as low as 3.98 V_{RMS} and 1.19 mA_{RMS} respectively. Besides, the tissues directly exposed to the plasma presented a temperature never exceeding 28 °C. This first experimental campaign has demonstrated that cold plasma can be safely applied on the AHBT model, without electrical or thermal risks.

A second experimental campaign has been carried out at the Paris School of Surgery using conventional ERCP conditions to get as close as possible to a clinical case. The cold plasma catheter has been placed in a conventional duodenoscope which was itself inserted in a new model: a PPBT model. Plasma-ERCP has been performed by Dr Marine Camus, professional endoscopist at Saint-Antoine Hospital. This feasibility study has shown that the internal tissues directly exposed to the plasma do not suffer any thermal damage, the maximum temperature increase being of only 4 °C before/during plasma exposure. The electrical analysis shows current and voltage values of about 1 A and 200 V respectively. If these values seem too high for a safe application onto humans, one must however underline that these signals correspond to very short pulses (widths of 1 μ s), which means that they do not induce the same physiological effects on the human body as usual AC currents at 50–60 Hz. Here, the IEC standards show that the current values measured on the PPBT model fall into the zero-risk category, (i.e. absence of ventricular fibrillation, cardiac fibrillation, etc) so that the treatment would be totally painless.

Finally, the antitumor effects of the transferred plasma catheter have been demonstrated in an *in vitro* study performed on human CCA cell lines. Tumor cell viability has decreased by approximately 50% for a plasma exposure time of only 5 min.

This methodological study has allowed us to set important milestones in the perspective of using CPE as a future conventional therapeutic option to treat CCA in patients. Until then, other steps will be achieved, in particular experimental campaigns on alive porcine models followed by a clinical study. In parallel, questions dealing with biological selectivity of cold plasma (i.e. killing the tumor cells while preserving the non-tumor ones) will be investigated.

Data availability statement

The data that support the findings of this study are available upon reasonable request from the authors.

Acknowledgments

The authors would like to thank Josette Legagneux and her team for managing the logistics of our experimental campaigns at the Ecole de Chirurgie de Paris, as well as Marion Chartier and Gregoire Salin for participating in these campaigns. This work received financial state aid as part of the ASCLEPIOS project funded by the Cancéropôle Ile-De-France (Ref. 193602), the PROMISE project funded by SIRIC CURAMUS (Ref. 195741); the ^{PF2}ABIOMEDE platform co-funded by « Région Ile-de-France » (Sesame, Ref. 16016309) and Sorbonne Université (technological platforms funding). L F is supported by ITMO Cancer of Aviesan on funds administered by Inserm (2021). A P, M C and L F are part of a research team supported by the Fondation pour la Recherche Médicale (Equipe FRM 2020 n°EQU202003010517). L F and A P are members of the European Network for the Study of Cholangiocarcinoma (ENS-CCA) and of the European H2020 COST Action CA18122. This article/publication is based upon work from COST Action CA20114 PlasTHER 'Therapeutical Applications of Cold Plasmas', supported by COST.

Conflict of interest

The authors declare that they have NO affiliations with or involvement in any organization or entity with any financial interest in the subject matter or materials discussed in this manuscript.

ORCID iDs

Henri Decauchy  <https://orcid.org/0000-0001-6197-8828>
 Allan Pavy  <https://orcid.org/0000-0002-2919-8706>
 Marine Camus  <https://orcid.org/0000-0003-2566-3866>
 Laura Fouassier  <https://orcid.org/0000-0001-6377-5610>
 Thierry Dufour  <https://orcid.org/0000-0002-0397-368X>

References

- [1] Sung H, Ferlay J, Siegel R L, Laversanne M, Soerjomataram I, Jemal A and Bray F 2021 Global cancer statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries *CA Cancer J. Clin.* **71** 209–49
- [2] Long J, Ji Z, Yuan P, Long T, Liu K, Li J and Cheng L 2020 Nut consumption and risk of cancer: a meta-analysis of prospective studies *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* **29** 565–73
- [3] National Cancer Institute, Cancer statistics, 2020 (available at: www.cancer.gov/about-cancer/understanding/statistics) (Accessed 2 March 2022)
- [4] Defossez G et al 2019 Estimations nationales de l'incidence et de la mortalité par cancer en France métropolitaine entre

- 1990 et 2018 *Tumeurs Solides* vol 1 (Saint-Maurice: Santé publique France) p 372
- [5] Le Guyader-Peyrou S et al 2019 Estimations nationales de l'incidence et de la mortalité par cancer en France métropolitaine entre 1990 et 2018 *Hémathologies Malignes* vol 2 (Saint-Maurice: Santé publique France) p 169
- [6] Coureau G et al 2021 Survie des personnes atteintes de cancer en France métropolitaine 1989–2018—Synthèse des résultats: tumeurs solides et hémathologies malignes (Institut National du Cancer: France) (available at: www.santepubliquefrance.fr/content/download/383032/3195458)
- [7] Abou-Khalil J E and Bertens K A 2019 Embryology, anatomy, and imaging of the biliary tree *Surg. Clin.* **99** 163–74
- [8] Abou-Alfa G K et al 2020 Ivosidenib in IDH1-mutant, chemotherapy-refractory cholangiocarcinoma (ClarIDHy): a multicentre, randomised, double-blind, placebo-controlled, phase 3 study *Lancet Oncol.* **21** 796–807
- [9] Rizzo A, Ricci A D and Brandi G 2021 Pemigatinib: hot topics behind the first approval of a targeted therapy in cholangiocarcinoma *Cancer Treat. Res. Commun.* **27** 100337
- [10] Personeni N, Lleo A, Pressiani T, Colapietro F, Openshaw M R, Stavra C, Poutsis A, Pinato D J and Rimassa L 2020 Biliary tract cancers: molecular heterogeneity and new treatment options *Cancers* **12** 3370
- [11] Banales J M et al 2020 *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.* **17** 557–88
- [12] Yin L, Zhao S, Zhu H, Ji G and Zhang X 2021 Primary tumor resection improves survival in patients with multifocal intrahepatic cholangiocarcinoma based on a population study *Sci. Rep.* **11** 1–12
- [13] Lamarca A, Edeline J and Goyal L 2022 *ESMO Open* **7** 100378
- [14] Sun D, Lv G and Dong J 2022 Liver transplantation for intrahepatic cholangiocarcinoma *Front. Oncol.* **21** 841694
- [15] Cambridge W A, Fairfield C, Powell J J, Harrison E M, Søreide K, Wigmore S J and Guest R V 2021 *Ann. Surg.* **273** 240–50
- [16] Yao W-Y and Gong W 2021 *Surg. Pract. Sci.* **5** 100028
- [17] Shinohara E T, Guo M, Mitra N and Metz J M 2010 Brachytherapy in the treatment of cholangiocarcinoma *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* **78** 722–8
- [18] Gonzalez-Carmona M A et al 2022 Impact of regular additional endobiliary radiofrequency ablation on survival of patients with advanced extrahepatic cholangiocarcinoma under systemic chemotherapy *Sci. Rep.* **12** 1–11
- [19] Ramanathan R, Borrebach J, Tohme S and Tsung A 2018 Preoperative biliary drainage is associated with increased complications after liver resection for proximal cholangiocarcinoma *J. Gastrointest. Surg.* **22** 1950–7
- [20] Li X et al 2021 Photodynamic therapy for cholangiocarcinoma, clinical trial number NCT04860154 (available at: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT04860154>)
- [21] Thomas V W, Schmid A and Wende K 2018 *Clin. Plasma Med.* **3**–21
- [22] Kumar Kaushik N, Bekeschus S, Tanaka H, Lin A and Ha Choi E 2021 *Appl. Sci.* **11** 4584
- [23] Szili E J, Hong S H, Oh J S, Gaur N and Short R D 2018 *Trends Biotechnol.* **36** 594–602
- [24] Kumar Yadav D, Adhikari M, Kumar S, Ghimire B, Han I, Kim M H and Choi E H 2020 *Sci. Rep.* **10** 3396
- [25] Dubuc A, Monsarrat P, Virard F, Merbahi N, Sarrette J-P and Cousty S 2018 *Ther. Adv. Med. Oncol.* **10** 1–12
- [26] Rafiei A, Sohbatazadeh F, Hadavi S, Bekeschus S, Alimohammadi M and Valadan R 2020 *Clin. Plasma Med.* **19**–20 100103
- [27] Adil B H, Majeed Al-Shammari A and Murbat H H 2020 *Clin. Plasma Med.* **19**–20 100103
- [28] Fofana M, Buñay J, Judée F, Baron S, Menecier S, Nivoix M, Perisse F, Vacavant A and Balandraud X 2020 *Clin. Plasma Med.* **17**–18 100098
- [29] Zhang H, Zhang J, Guo B, Chen H, Xu D and Kong M G 2021 *Cancers* **13** 1042
- [30] Wende K, Lackmann J-W, Jablonowski H, Woedtko T V and Bekeschus S 2018 *Clin. Plasma Med.* **9** 43
- [31] Vaquero J et al 2020 Cold-atmospheric plasma induces tumor cell death in preclinical *in vivo* and *in vitro* models of human cholangiocarcinoma *Cancers* **12** 1280
- [32] Judée F, Vaquero J, Fouassier L, Guegan S and Dufour T 2019 Atmospheric pressure plasma jets applied to cancerology: correlating electrical configuration with *in vivo* toxicity and therapeutic efficiency *J. Phys. D: Appl. Phys.* **52** 245201
- [33] Jones O, Cheng X, Murthy S R K, Ly L, Zhuang T, Basadonna G, Keidar M and Canady J 2021 The synergistic effect of Canady Helios cold atmospheric plasma and a POLFIRINOX regimen for the treatment of cholangiocarcinoma *in vitro* *Sci. Rep.* **11** 8967
- [34] Maho T et al 2018 Atmospheric pressure multijet plasma source for plasmamedicine applications ICPM7 (Philadelphia) (available at: <https://hal.archives-ouvertes.fr/hal-01943164>)
- [35] Chung T-H et al 2020 Cell electroporation enhancement by non-thermal-plasma-treated PBS *Cancers* **12** 219
- [36] Nascimento F, Machida M, Kostov K G and Moshkalev S 2020 Four-electrodes DBD plasma jet device with additional floating electrode *Eur. Phys. J. D* **74** 1–7
- [37] Nascimento F, Petroski K and Kostov K 2021 Effects of O₂ addition on the discharge parameters and production of reactive species of a transferred atmospheric pressure plasma jet *Appl. Sci.* **11** 6311
- [38] Nastuta A V, Topala I, Grigoras C, Pohoata V and Popa G 2011 Stimulation of wound healing by helium atmospheric pressure plasma treatment *J. Phys. D: Appl. Phys.* **44** 105204
- [39] Mirpour S, Fathollah S, Mansouri P, Larijani B, Ghoranneviss M, Tehrani M M and Amini M R 2020 Cold atmospheric plasma as an effective method to treat diabetic foot ulcers: a randomized clinical trial *Sci. Rep.* **10** 9
- [40] Robert E, Barbosa E, Dozias S, Vandamme M, Cachoncinlle C, Viladrosa R and Pouvesle J-M 2009 Experimental study of a compact nanosecond plasma gun *Plasma Process. Polym.* **6** 795–802
- [41] Robert E et al 2013 *Clin. Plasma Med.* **1** 8–16
- [42] Bastin O, Thulliez M, Servais J, Nonclercq A, Delchambre A, Hadei A, Devière J and Reniers F 2020 Optical and electrical characteristics of an endoscopic DBD plasma jet *Plasma Med.* **10** 71–90
- [43] Polak M, Winter J, Schnabel U, Ehlbeck J and Weltmann K-D 2012 Innovative plasma generation in flexible biopsy channels for inner-tube decontamination and medical applications *Plasma Process. Polym.* **9** 67–76
- [44] Winter J, T. M. C, Glitsch N S, Lühder H and Weltmann K-D 2018 On the development of a deployable cold plasma endoscope *Contrib. Plasma Phys.* **58** 404–14
- [45] Wang T, Hu M S, Yang B, Wang X L, Chen X and Liu J-Q 2018 Long, biocompatible and highly flexible cold atmospheric microplasma jet device for precise endoscopic therapies *IEEE Micro Electro Mech. Syst.* **365**–8
- [46] Grund K E, Storek D and Farin G 1994 Endoscopic argon plasma coagulation (APC) first clinical experiences in flexible endoscopy *Endosc. Surg. Allied Technol.* **2** 42–46
- [47] Prost B, Poncet G, Scoazec J-Y and Saurin J-C 2004 Unusual complications of argon plasma coagulation *Brief Rep.* **59** 929–32

- [48] Kurosawa M, Takamatsu T, Kawano H, Hayashi Y, Miyahara H, Ota S, Okino A and Yoshida M 2019 Endoscopic hemostasis in porcine gastrointestinal tract using CO₂ low-temperature plasma jet *J. Surg. Res.* **234** 334–42 (PMID: 30527494)
- [49] Keidar M, Walk R, Shashurin A, Srinivasan P, Sandler A, Dasgupta S, Ravi R, Guerrero-Preston R and Trink B 2011 Cold plasma selectivity and the possibility of a paradigm shift in cancer therapy *Br. J. Cancer* **105** 1295–301
- [50] Wang M, Holmes B, Cheng X, Zhu W, Keidar M and Zhang L-G 2013 Cold atmospheric plasma for selectively ablating metastatic breast cancer cells *PLoS One* **8** e73741
- [51] Operation manual of Pentax Video duodenoscope ED-3480TK 2005 p 23
- [52] Judé F and Dufour T 2019 Plasma gun for medical applications: engineering an equivalent electrical target of human body and deciphering relevant electrical parameters *J. Phys. D: Appl. Phys.* **52** 16LT02
- [53] Decauchy H and Dufour T 2022 Transmission and multiple reflection mechanisms of guided streamers propagating through grounded annular electrode and interacting with grounded surface electrode, PSST submitted
- [54] Mukewar S, Gorospe E C, Knipschild M A, Bingener J and Gostout C 2017 Effects of carbon dioxide insufflation during direct cholangioscopy on biliary pressures and vital parameters: a pilot study in porcine models *Gastrointest. Endosc.* **85** 238–42.e1
- [55] European Commission 2016 Directorate-general for health and consumers, opinion on potential health effects of exposure to electromagnetic fields (EMF) (Publications Office) (<https://doi.org/10.2772/75635>)
- [56] IEC 2005 Technical specification TS 60479-1 (Basic Safety Publication)
- [57] Najafzadehvarzi H, Ghasemi M, Sobbatzadeh F, Aminjarahi M and Darzi R E 2022 Risk assessment of a cold atmospheric physical argon plasma jet on the skin, liver, and biochemical factors in an animal model *Med. Eng. Phys.* **106** 103826

Article 3 : Targeting cholangiocarcinoma cells by cold piezoelectric plasmas: *in vitro* efficacy and cellular mechanisms

Article soumis dans *Nature – Scientific Reports*

Cette étude vise à évaluer les effets antitumoraux d'une nouvelle source de plasma, le plasma piézoélectrique froid, sur des cellules de CCA *in vitro*. Le plasma piézoélectrique représente une approche innovante dans le traitement du cancer, permettant la création de dispositifs portables capables d'induire la mort des cellules cancéreuses. Deux configurations électroniques différentes du plasma piézoélectrique ont été testées, l'une étant plus puissante que l'autre. Les deux configurations génèrent des niveaux significatifs d'espèces réactives dans les phases plasma et liquide, et entraînent une augmentation graduelle de la température du centre vers les bords du puits de culture, surtout lors de traitements prolongés. Le plasma piézoélectrique froid a révélé des effets immédiats et durables sur les cellules de CCA humaines, entraînant un remodelage du cytosquelette d'actine sans compromettre la perméabilité de la membrane cellulaire immédiatement après traitement, ainsi qu'une altération des défenses antioxydantes et une activation de la voie de réponse aux dommages de l'ADN à long terme.

Ainsi, cette étude a démontré que le plasma froid piézoélectrique constitue une thérapie antitumorale prometteuse, offrant une nouvelle approche potentielle dans le traitement du cancer.

Targeting cholangiocarcinoma cells by cold piezoelectric plasmas: *in vitro* efficacy and cellular mechanisms

Manon Soulier^{#*1}, Bouchra Lekbaby^{#2}, Imane Houari², Henri Decauchy¹, Allan Pavy², Alexia Coumes¹, Romain Morichon³, Thierry Dufour⁺¹, and Laura Fouassier^{+*2}

¹ Laboratoire de Physique des plasmas (LPP), Sorbonne Université, CNRS, Ecole Polytech., Univ. Paris-Sud, Observatoire de Paris, Université Paris-Saclay, PSL Research University, Paris F-75252, France

² Centre de recherche Saint-Antoine (CRSA), Sorbonne Université, INSERM, Paris F-75012, France

³ Cytometry and Imagery platform Saint-Antoine (CISA), Sorbonne Université, Paris F-75012, France

co-first author

+ co-senior authorship

* corresponding authors: laura.fouassier@inserm.fr and manon.soulier@sorbonne-universite.fr

Cold piezoelectric plasma (CPP) is a novel approach in cancer therapy, enabling the development of portable treatment devices capable of triggering cancer cell death. While its effectiveness remains underexplored, this research focuses on its application against cholangiocarcinoma (CCA), an aggressive cancer of the biliary tract. A CPP device is utilized to generate either a corona discharge (Pz-CD) or a dielectric barrier discharge (Pz-DBD) for *in vitro* experiments. Notably, Pz-CD can deliver more power than Pz-DBD, although both sources produce significant levels of reactive species in plasma and liquid phases. This work shows that CPP causes a gradient increase in medium temperature from the center towards the edges of the culture well, especially for longer treatment times. Although Pz-CD heats more significantly, it cools quickly after plasma extinction. When applied to human CCA cells, CPP shows immediate and long-term effects, more localized for Pz-CD, while more uniform for Pz-DBD. Immediate effects result also in actin cytoskeleton remodeling without alteration of the cell membrane permeability. Long-term effects of CPP, although the antioxidant system is engaged, include activation of the DNA damage response pathway leading to cell death. In conclusion, CPP should be recognized as a promising antitumor therapy.

Cancer is a leading cause of death worldwide (incidence: 20 million – mortality: 10 million in 2020¹). While progress has been made in detecting and treating common cancers like breast and prostate, rare and aggressive cancers like cholangiocarcinoma (CCA) are facing high mortality rates and increasing incidence worldwide^{2,3}. CCA, constituting the second most prevalent malignant liver tumor, comprises intrahepatic (10 to 20 %) and extrahepatic (80 to 90 %) types³. CCA's asymptomatic nature until advanced stages complicates early detection, often leading to biliary tract obstructions or cholangitis⁴. Current curative therapies, mainly surgical removal, are contingent on CCA type, detection stage, and patient condition, resulting in only 35 % of patients eligible for curative surgery. For the ineligible patients, the first-line treatment includes a palliative chemotherapy (GEMCIS) coupled with an immunotherapy (Durvalumab)⁵. Radiotherapy shows promising results as adjuvant therapy while targeted therapies are employed but rather in second line⁶.

Cold atmospheric plasma, a partially ionized gas under ambient conditions, may constitute a breakthrough technology for cancer treatment. Plasma exhibits both high rates of reactive oxygen species (ROS), reactive nitrogen species (RNS), and physical properties (electric, radiative, and thermal)

that can interact with biological substrates⁷⁻⁹. Since the 2000s, various configurations of homemade and commercial plasma sources have been tested in a wide number of cancer preclinical models, from cell-based to murine models¹⁰. Dielectric barrier discharges (DBD) generated by alternative currents have been explored, ranging from plan to jet configurations¹¹. Plan-DBD, requiring accessibility to the tumor site, have demonstrated significant antitumor effects¹² showing cytotoxicity specifically on cancer cell lines, compared to their healthy counterpart, depending on the cellular ROS content¹³. Plasma jets involve the propagation of plasma over several centimeters, with support from a neutral gas¹⁴. Experiments conducted on various tumor models have shown promising results in inducing cell death¹⁵ and tumor growth reduction¹⁶, with mechanistic studies underway to understand the signaling pathways leading to cell death or dysfunction¹⁷⁻²⁰. While showing slightly less tumor regression than chemotherapy, plasma treatments may offer advantages by avoiding systemic side effects²¹. Combined therapies involving plasma are also being explored to optimize treatment efficacy and to reduce the required drug doses for chemotherapy^{22,23}. However, challenges persist in deploying plasma treatments in hospitals. Direct treatments are currently limited to melanomas or post-surgery interventions, and studies are ongoing to develop endoscopic plasma sources to broaden application possibilities²⁴⁻²⁶. Space requirements also affect plasma generators, leading researchers to investigate alternative sources, such as piezoelectric devices.

Resonant piezoelectric transformers consist of the combination of a reverse and direct piezoelectric effect on a piezoelectric crystal, leading to plasma generation at its output²⁷. Cold Piezoelectric Plasmas are studied extensively, both for their fundamental physicochemical properties at atmospheric pressure^{28,29} and for their practical applications in material science and biology³⁰⁻³⁶. Additionally, these plasmas generate high levels of ROS and RNS able to induce cell death for cancer therapy, but so far their effects have poorly been explored in the treatment of cancer³⁷⁻⁴⁰.

This contribution investigates the impact of CPP on cancer cell viability, considering CCA cells as an *in vitro* experimental model of cancer. CCA is a highly chemical-based treatment-refractory cancer. To date, CPP has not been considered for the treatment of CCA. In this study, two CPP sources are utilized to generate either a dielectric barrier discharge (Pz-DBD) or a corona discharge (Pz-CD). This work initially characterizes the plasma-liquid interaction between CPP and CCA cells' culture media, based on electric, chemical and thermal properties. The main differences among the two plasmas are relative to thermal dissipation inside the liquid. Subsequently, investigations are being carried out on two CCA cell lines to understand how CPP affects the cell layer, including its spatial distribution and cell viability. The cell layers' observation indicates whether the effects of CPP are immediate or long-term, since both induce a reduction in cell viability 24 hours after treatment. Finally, the implications of CPP on cell membrane permeability, and signaling of DNA damage and repair are further examined, providing insights into the potential applications of CPP in CCA therapy.

Results

Electrical and chemical properties of cold piezoelectric plasma

First, an electrical characterization of the CPP (**Erreur ! Source du renvoi introuvable.a**), either in Pz-DBD (**Erreur ! Source du renvoi introuvable.b**) or Pz-CD (**Erreur ! Source du renvoi introuvable.c**) configuration is realized, followed by an analysis of the reactive species produced in both plasma and liquid phases.

As far as the distribution of electric field lines from the source cannot be investigated in medium or cells, CPP voltage and current signals are measured on a substrate mimicking human body impedance ($R = 1.5 \text{ k}\Omega - C = 100 \text{ pF}^{41}$). In **Erreur ! Source du renvoi introuvable.d**, Pz-DBD provides various heterogeneous periodic micro-discharges characterized by a maximum voltage of 15 V associated with a 24 ns-FWHM (full width high maximum), and a maximum current intensity of 55 mA coupled with a

3 ns-FWHM. As a result, Pz-DBD deposits a relatively low mean power on the substrate (13 ± 5 mW). In the other configuration, Pz-CD generates intense filamentary discharges. The maximum voltage is 3 times higher than the previous one (51 V) and its FWHM is 2.5 times larger (59 ns). The same order of magnitude is recorded for maximum current intensity (57 mA) but its FWHM is 8 times larger (24 ns). Pz-CD delivers to the substrate a mean power as high as 74 ± 15 mW.

As expected for a mixed helium-air plasma at atmospheric pressure, nitrogen elements are mostly detected in the spectra of the two plasmas (**Erreur ! Source du renvoi introuvable.e**). First and second orders of nitrogen second positive system excited state (N_2^* – 1st order: maximum at 337.2 nm and 2nd order at 674.4 nm) are predominant. The maximum emission of the first negative system of the nitronium ion (N_2^{+*}) is detected in Pz-DBD spectrum only at its maximum (391.5 nm), but not observed for Pz-CD. Nitrite (NO_2^-) and hydrogen peroxide species (H_2O_2) produced in culture media exposed to CPP are quantified by colorimetric titration (**Erreur ! Source du renvoi introuvable.f**). A relevant increase of nitrites content is observed for the two plasmas, leading to a threshold after 3 min of CPP exposure. The threshold reaches 660 ± 44 $\mu\text{mol/L}$ for Pz-DBD and 915 ± 68 $\mu\text{mol/L}$ for Pz-CD. Concerning hydrogen peroxide, the increase is a little bit slower, with concentrations of 262 ± 86 $\mu\text{mol/L}$ for Pz-DBD and 242 ± 63 $\mu\text{mol/L}$ for Pz-DBD after a 5-min treatment. There is no significant difference in H_2O_2 concentration determined for the two sources since 1 min of CPP treatment.

The electric characterization reveals that Pz-CD provides a higher voltage to the substrate for a same maximum current intensity than Pz-DBD. Moreover, the FWHM shows a longer exposure of Pz-CD plasma leading to a five times higher deposited power, increasing potential electric risks. The chemical study demonstrates the production of nitrogen species in plasma phase, able to interact with the chemical compounds of culture media. Compared to untreated medium, nitrite and hydrogen peroxide species are increased whatever CPP condition. Furthermore, nitrites reach higher concentration thresholds with increasing treatment time when medium is exposed to Pz-CD, while hydrogen peroxide is in similar proportions for the two sources.

Cold piezoelectric plasma induces localized thermal effects

Erreur ! Source du renvoi introuvable.a and **b** illustrate the spatial temperature distribution along a radius of the well, from the center to the edge, recorded at 0, 0.5, 1, 2, 3 or 5 min upon CPP treatment. Regardless of the source or duration of exposure, temperatures are higher beneath the nozzle, mostly located at the center of the well, and decrease toward the edges. Considering 1 min of CPP treatment as an example (**Erreur ! Source du renvoi introuvable.b**, blue lines), the temperature at a distance of 10 mm from the center (**Erreur ! Source du renvoi introuvable.b**, dot lines) decreases by 4 °C for Pz-DBD (from 28°C to 24°C) and as high as 8°C for Pz-CD (from 36°C to 28°C).

Erreur ! Source du renvoi introuvable.c depicts the temperature kinetics of the two sources, tracking the heating and cooling phases. Before CPP exposure, the temperature decays due to helium injection, with a more pronounced decrease observed for Pz-CD (drop of -5°C) than for Pz-DBD (drop of -1.5°C). During the heating phase (“plasma ON”), the temperature increases quickly to a higher threshold for Pz-CD (from 2min: +15°C for Pz-CD vs +5°C for Pz-DBD). The post-CPP cooling phase shows temperatures converging rapidly to room temperature ($\Delta T = 0^\circ\text{C}$), even without helium flow. Specifically, Pz-DBD shows a 3°C-decrease within just 1 min after plasma extinction, while Pz-CD experiences a quick 7°C drop.

Furthermore, the evaporation of culture medium after each CPP treatment (0, 0.5, 1, 2, 3 or 5 min), is assessed immediately (0 hour) and after 24 hours (**Erreur ! Source du renvoi introuvable.d**). Initially, evaporation appears to be higher for Pz-CD treatment, recording a weight percentage (%_{wt}) of 4%_{wt} against 2%_{wt} for Pz-DBD at 0.5 min. However, for longer exposure durations, both sources

converge to a similar evaporation rate of 20%_{wt} after 5 min. A global linear regression can be applied with a strong determination coefficient ($r^2 > 0.99$) for the two sources. Evaporation reaches 40%_{wt} after 24 hours, maintaining the trend observed immediately post-treatment ($r^2 > 0.9$).

This thermal characterization shows an overall increase in the temperature of the medium provided by the CPP sources, mainly located below the nozzles and diffusing towards the well edges while increasing treatment time. Notably, Pz-CD induces a more significant increase in temperature compared to Pz-DBD. Kinetics experiments also demonstrate a quick cooling of the medium after plasma extinction. This investigation also exhibits a linear variation of evaporation with exposure time, regardless of the CPP source. This phenomenon is persistent in time, following the same regression slope immediately and 24 hours after CPP treatment, highlighting the control and efficiency of the process across both plasma sources.

Effects of cold piezoelectric plasma on cancer cells are spatiotemporally dependent

In the next experiments, cholangiocarcinoma cell lines, HuCCT-1 and EGI-1, are treated with CPP. To differentiate the immediate vs long-term effects triggered by CPP on cells within the well, analyses are conducted at two distinct timescales, immediately (*0 hour*) or 24 hours after CPP treatment. These effects are evaluated on the cell layer by counting the cells identified with a blue-fluorescent DNA stain (**Erreur ! Source du renvoi introuvable.a**).

The first case, called *0 hour* in **Erreur ! Source du renvoi introuvable.b**, corresponds to the observation of the cell layer immediately after CPP treatment for 0 to 5 min. No modification of HuCCT-1 cell layer distribution is observed after Pz-DBD treatment, regardless of the exposure time, and the number of cells is unchanged. The same observations apply to EGI-1 cells exposed to Pz-DBD. On the contrary, the layer of HuCCT-1 cells treated by Pz-CD for 3 and 5 min displays a high reduction of the cell number below the plasma impact region and it is expanding with treatment time. Such layer modification is not observed for EGI-1 cells exposed to Pz-CD.

The second case, called *24 hours* in **Erreur ! Source du renvoi introuvable.c**, corresponds to the observation of the cell layer 24 hours after CPP treatment from 0 to 5 min. From 0 to 2 min of Pz-DBD treatment, HuCCT-1 cell layer is quasi-homogeneous, and a decrease in cell number is observed. After a 2 min-Pz-DBD treatment, only 30% of cells are still observed on a radius of the layer. The cell number decreases mainly below the DBD nozzle, leaving less than 10% cells at the 3 and 5 min treatment times. The same observations can be done for EGI-1 cells exposed to Pz-DBD with a slight decrease in cell number (at 2 min: still 50% of cells on a radius). Pz-CD treatments provide a decrease of HuCCT-1 cell number around the plasma impact as early as 0.5 min of exposure, and this reduction expands until 3 min of treatment. After 5 min of exposure, the layer is quasi non-existent with only 0.3% of cells observed on a radius of the layer. Similar to Pz-DBD treatments, EGI-1 cells exhibit a slight response 24 hours following Pz-CD exposure.

This experiment highlights an immediate effect of Pz-CD on HuCCT-1 cell layer, becoming noticeable after 3 min of treatment, but not on EGI-1 cells. Conversely, Pz-DBD treatment does not exhibit any immediate effect on each cell line. In contrast, long-term effects are visible; the two sources lead to a decrease in cell number 24 hours after CPP treatment, indicating an impact of CPP on cell viability.

Cold piezoelectric plasma reduces cell viability by inducing DNA damage response-linked apoptosis

The viability of the two human CCA cell lines is assessed 24 hours after their exposure to each CPP source (**Erreur ! Source du renvoi introuvable.a**). The two sources elicit similar responses, showing survival regressions for the two cell lines. If Pz-DBD treatments result in a significant decrease in cell viability, HuCCT-1 cells exhibit higher sensitivity to CPP, with over 75 % cell death after a 5-min

treatment, compared to approximately 55 % for EGI-1 cells. As expected, IC50 values are reached before 5 min, specifically between 2 and 3 min for HuCCT-1 cells and between 3 and 5 min for EGI-1 cells. On the other hand, Pz-CD treatments also demonstrate a notable reduction in cell viability, growing with exposure time. HuCCT-1 cells respond similarly to the two sources while EGI-1 cells are more adversely affected by Pz-CD, with an IC50 value reached at 3 min. Therefore, from 3 min of treatment, Pz-CD seems more efficient to reduce EGI-1 cell viability. These data indicate that CPP, regardless of the type of discharge, decreases the viability of CCA cells, even EGI-1 cells which are more resistant than HuCCT-1 cells. Based on this viability study, treatment times 2-3 min for HuCCT-1 and 3-5 min for EGI-1 are selected to decipher DNA damage response pathway and antioxidant defenses in cells.

In the cells, CPP induces an oxidative stress leading to DNA breaks followed by a DNA damage response (DDR) coordinated by several key proteins. Three of them are studied including γ H2AX, the phosphorylated form of histone H2AX, the checkpoint kinase 1 (Chk1) and the tumor suppressor p53. One of the earliest cellular responses to DNA damage is driven by γ H2AX that serves as a checkpoint for DNA repair. While γ H2AX is not observed by immunofluorescence in untreated cells, foci of γ H2AX are widely visible in almost all cells treated either with Pz-DBD (**Erreur ! Source du renvoi introuvable.b**) or with Pz-CD (Supp. Fig.a), regardless of the cell line. The effect of CPP on γ H2AX is independent of the plasma source; no difference in γ H2AX immunostaining is observed in CPP-treated cells between Pz-DBD and Pz-CD. Expression of γ H2AX is confirmed by western blot in CCA cells treated with Pz-DBD (**Erreur ! Source du renvoi introuvable.c**) or Pz-CD (Supp. Fig.b). Chk1 is a major kinase phosphorylated in response to DNA damage. Upon CPP treatment, phosphorylation level of Chk1 increases in CCA cells. One target of the kinase Chk1 is p53. As shown in **Erreur ! Source du renvoi introuvable.c**, p53 is phosphorylated in CCA cells subjected to CPP treatment, triggering cell death, as evidenced by the expression of cleaved caspase 3 and cleaved PARP (**Erreur ! Source du renvoi introuvable.c** and Supp. Fig.b).

The following assessments focus on the regulation of the antioxidant enzymes by CPP. The key antioxidant enzymes including MSR3, SOD1, SOD2, CAT2 and HMOX1 (HO-1) are analyzed at mRNA levels by RT-QPCR. The expression of these enzymes is increased in cells treated with Pz-DBD, with the exception of CAT2 that is decreased (**Erreur ! Source du renvoi introuvable.d**). In contrast, Pz-CD has less impact on antioxidant defense than Pz-DBD; it only induces an increase in HMOX1 expression, with no change in the others (Supp. Fig.c).

In conclusion, CPP reduces cell viability by activating a DNA damage response pathway leading to cell death, although the antioxidant system is mostly engaged for Pz-DBD and not for Pz-CD.

Cold piezoelectric plasma induces cytoskeleton remodeling without affecting cell membrane permeability

CPP's electric field could be responsible for cell permeabilization which, in turn, could mediate cell viability reduction⁴². To verify this hypothesis, the permeability of the cell membrane is assessed using a fluorescent cell-impermeant dye. As seen in **Erreur ! Source du renvoi introuvable.**, only the immediate effect (*0 hour*) is taken into account, to focus on the plasma electric effects. The cells pre-incubated with the fluorescent cell-impermeant compound are immediately observed after CPP treatments during 2 and 3 min for HuCCT-1 and, 3 and 5 min for EGI-1 cells. As shown in **Erreur ! Source du renvoi introuvable.a**, no dye uptake is observed in cells treated with Pz-DBD or with Pz-CD (data not shown), compared with the positive control which consisted of treating the cells with Triton, a detergent known to induce pores in the membrane.

In light of this result, the effects of CPP on the intracellular environment are assessed, in particular on the actin cytoskeleton that plays a major role in the maintenance of epithelial barrier and

morphology⁴³. CPP is applied to cells under the same conditions as for the permeability study, followed by immediate analysis of the actin cytoskeleton structure (**Erreur ! Source du renvoi introuvable.b**). In HuCCT-1, both plasmas induce actin stress fibers after 2 min of CPP treatment. Upon 3 min of exposure, actin staining is more intense at the cell membrane with the formation of protrusions. In contrast to HuCCT-1, actin stress fibers are not induced in EGI-1 cells during CPP treatment. Upon Pz-DBD at 3 and 5 min, cell shape is changed with a wider cytoplasm and a loss of F-actin at the cell-cell junctions. In contrast, Pz-CD induces a different actin behavior, with a reinforcement of filamentous actin at the cell membrane.

Altogether, these data indicate that both plasmas have short-term effects on cell phenotype by reorganizing actin cytoskeleton and have virtually no impact on cell permeability.

Discussion

The present work investigates the effects of two cold piezoelectric plasma (CPP) sources in the purpose of cancer therapy, using human cholangiocarcinoma (CCA) cells as *in vitro* models. This rare cancer of the biliary tract displays high mortality rates and increasing incidence, without other curative treatment than resection for eligible patients³. As reviewed by Korzec *et al.*²⁷, CPP sources are currently used for material surface treatments, exposing directly the piezoelectric ceramic to a dielectric surface (ceramic or polymer) in ambient air for surface activation, increasing wettability or adhesion before printing, painting or coating processes. They highlight ozone production by direct CPP, useful for disinfection of liquid, material and biological substrates. More recently, Konchekov *et al.*⁴⁴ as well as Korzec *et al.*²⁷ (the latter designing the commercial device piezobrush[®] PZ2 (**Erreur ! Source du renvoi introuvable.a**)) implement nozzles to perform corona or dielectric barrier discharges for conductive, liquids or biological substrates, using CPP as a plasma bridge. A few studies, conducted by two research groups^{37–40}, investigate the same CPP source for cancer treatment, but in diverse discharge configurations and cancer types. Suzuki-Karasaki *et al.* employ the piezoelectric ceramic without nozzle to generate an “Air Plasma Activated Media” (APAM) on osteosarcoma and oral cancer^{39,40}, favoring ozone production to trigger oxidative cell death caused by hydrogen peroxide and iron. As well as they do not expose directly the cells in culture medium, they use mostly long-lifetime ROS produced by plasma-medium interaction⁴⁵. The APAM exhibits the tumor-selective anticancer activity, by increasing the mitochondrial ROS rates in cells. On the other team, Wang *et al.* are using the device with a needle-nozzle, aiming to generate corona discharges in ambient air for the treatment of colon and lung cancer³⁷ or hepatocellular carcinoma³⁸. Based on the imbalance of high oxidative stress and low antioxidant capacity involved in cancer cells, they highlight the effects and mechanisms (apoptosis and autophagy) of ROS, assuming that they do not investigate any electromagnetic, radiative or thermal effect. The present work corresponds to the first study deciphering the immediate and long-term effects caused by two CPP in a mixed helium-air atmosphere on CCA cells. The sources, designed to generate either a dielectric barrier discharge (Pz-DBD, **Erreur ! Source du renvoi introuvable.b**) or a corona discharge (Pz-CD, **Erreur ! Source du renvoi introuvable.c**), are incremented with helium flow drivers for *in vitro* exposure of CCA cells in 6-well plates. Helium is used as a working gas to ignite uniform discharges in larger gaps without increasing gas temperature thanks to its inert chemical nature⁴⁶. A benchmark of the sources establishes that they exhibit similar effects on CCA cells for the first two minutes of exposure. Then, Pz-CD becomes a more efficient but also a more hazardous *in vitro* process, while Pz-DBD is still efficient and safe. These phenomena are mostly explained by the discharge physicochemical properties. A characterization of the plasma-liquid interaction is associated with cellular, molecular and DNA responses to decipher the immediate and long-term effects of CPP exposure.

Since CPP is generated by a commercial device, its electrical characterization can only be achieved indirectly, through the exposure of a conductive substrate, mimicking the human body impedance⁴¹. Even if the mean power deposited by Pz-CD is five times higher than the one deposited by Pz-DBD, none of them show irreversible electric risk for cell treatment⁴⁷. Indeed, during a 20 μ s-period of the piezoelectric direct effect (**Erreur ! Source du renvoi introuvable.d**), Pz-DBD provides at least three positive micro-discharges from the dielectric barrier to the substrate with a decreasing maximum intensity of a few ns, while Pz-CD generates a single filamentous positive discharge of a few tens of ns directly from the powered electrode to the substrate. When generating CPP during a few minutes on culture medium, the conductivity is lower than the one of the human body impedance, ensuring no electric irreversible damage. Furthermore, the assessment of membrane permeability on CCA cells (**Erreur ! Source du renvoi introuvable.a**) confirms that there is no penetration of low-molecular weight molecules (630 Da) across the cell membrane, whatever the CPP exposure. The effects of CPP on cell permeability has never been studied in cancer cells. Thereby, this study first evidences that CPP has no effect on membrane permeability analyzed immediately after treatment, suggesting that its electric field has no deleterious effect on membrane integrity, and prevents the passage of molecules through the cell membrane. These data contrast with plasma sources other than CPP known to increase cell permeability^{48,49} such as a kINPen MED/argon inducing membrane permeability, assessed by different molecules. These differences in methodology may explain the discrepancies between the studies. Although no alteration in cell membrane integrity are detected under CPP conditions, notable intracellular alterations are highlighted in the cellular cytoskeleton with remodeling of actin filaments (F-actin) immediately after plasma treatment. These alterations are evidenced by the presence of actin stress fibers, membrane protrusions and changes in the F-actin network at cell-cell junctions. Such description of actin cytoskeleton remodeling in response to cold plasma is novel. The only reports on actin in cells treated with plasma (kINPen MED/argon) provide evidence of a change in globular actin (G-actin) and filamentous actin (F-actin) ratio with an increase of the G-/F-actin ratio^{48,49}. These changes in the actin cytoskeleton may reflect the effect of cold plasma electric field, although ROS/RNS or temperature cannot be ruled out⁵⁰.

CPP is considered as a cold process in regard to a thermal plasma which is characterized by gas temperature around 10,000°C. However, CPP can heat higher than room temperature, especially when interacting with a conductive medium. CPP diffuses throughout the medium, facilitating heat transfer until the medium achieves a steady-state thermal equilibrium. In this study, the temperature of culture medium exposed to CPP demonstrates a localized thermal effect below the source, diffusing inside the medium while increasing treatment time. Pz-CD shows a higher rise since the beginning of exposure as much as a quicker diffusion toward the edges than Pz-DBD. None of them reaches temperatures able to induce damages on the cells⁵¹ (**Erreur ! Source du renvoi introuvable.b**, $T < 40^{\circ}\text{C}$) in these experimental conditions. Timmermann *et al.*³⁰ have thermally characterized the same CPP sources to generate pure air plasmas for assessing antimicrobial efficacy. Using the DBD configuration with a 2 mm-gap or the corona discharge up to 7 mm-gap, they reached temperatures higher than 40°C in less than 30 s on conductive substrates, concluding that the devices cannot be used for medical purposes. Their work confirmed the necessity of using helium-air plasmas when exposing conductive substrates. However, a special care must be taken when operating with Pz-CD upon treatment longer than 5 min, both for thermal and electric hazards. Even if the maximum temperature of the medium is already reached after 5 min of CPP exposure (and even before, **Erreur ! Source du renvoi introuvable.c**), the evaporation of culture medium increases linearly with exposure time (**Erreur ! Source du renvoi introuvable.d**). Therefore, the conductivity of the substrate increases; the 6-well plate is grounded at the bottom. In the case of Pz-CD, this phenomenon leads to a direct current propagation of a spark discharge to the ground⁵², and a rising temperature. There is no similar effect with Pz-DBD. When increasing the evaporation, the gap between the dielectric barrier and the substrate rises, leading to

plasma extinction. Evaporation of liquid exposed to cold plasma in *in vitro* experiments is not well documented but Freund *et al.*⁵³ utilized the kINPen MED/argon on six different liquids used for clinical purposes and measured also a linear evaporation of 50 mL of liquid exposed during 80 min.

Plasma-liquid interaction cannot be studied without investigating the reactive species in the two phases. Excited molecular nitrogen is predominantly detected in the plasma phase, while oxygen and helium emissions are notably absent. This absence can often be attributed to the production of active species which, although generated, remain non-emissive due to quenching. This quenching occurs through mechanisms such as collisions with other molecules, rapid recombination reactions, and energy transfers to the surrounding medium (**Erreur ! Source du renvoi introuvable.e**). Indeed, when performing analysis of ROS and RNS in the medium, the rising effects of CPP are significant after 0.5 min of exposure (**Erreur ! Source du renvoi introuvable.f**). The reactive species are expected to be the key player in the anticancer process, contributing to different mechanisms and pathways, such as oxidative stress^{14,54,55}. This work focuses on nitrites and peroxide hydrogen which are long-lived synergetic species involved in cell death mechanisms, mainly known to induce cell apoptosis^{39,56,57}. No other chemical study is conducted in the same conditions but Konchekov *et al.*^{33,44} reached similar nitrite and hydrogen peroxide species content when exposing directly the piezoelectric ceramic to different liquids (in the order of 100 $\mu\text{mol/L}$ for a few min of exposure) and Timmermann *et al.*³⁰ obtained concentrations in the range of tens ppm of nitrites produced by the sources in the far field of the air plasma phase.

Both sources show long-term effects, significant after 1 min of CPP exposure for the two cell lines (**Erreur ! Source du renvoi introuvable.d-e**), and correlated with the reduction in cell viability and an increase of cell death (**Erreur ! Source du renvoi introuvable.a** and 4c). These effects depend on the ROS/RNS generated by CPP that induce a cellular oxidative stress affecting DNA integrity as evidenced by DNA strand breaks and DDR response, that are both promoted by the two CPP. These data indicate that common pathways are systematically induced in response of CPP irrespective of the source. However, antioxidant enzyme expression differs from the two sources. While with Pz-DBD, most enzyme expression is up-regulated; unexpectedly, it is not the case for Pz-CD. The explanation for this discrepancy deserves further investigation. It is worth pointing out that Wang *et al.* have nicely shown that CPP decreases antioxidant capacity at a protein level (glutathione) in hepatocellular cells, thus aggravating intracellular imbalance³⁸. Together, CPP devices, like other plasma sources, have the ability to regulate the antioxidant system.

In conclusion, both CPP sources have antitumor effects on CCA tumor cells by inducing cell death, although they differ in their physicochemical properties. In terms of biological effects, the novelty lies in the remodeling of the actin cytoskeleton, which is very pronounced in tumor cells shortly after CPP treatment, while the integrity of the cell membrane remains unaffected. This study provides evidence that the cold atmospheric plasma delivered by CPP is effective against CCA tumor cells.

Methods

Cold piezoelectric plasma device and exposure conditions

Plasma device: the piezobrush[®] PZ2 (**Erreur ! Source du renvoi introuvable.a**) from Relyon Plasma GmbH Company is utilized as a cold piezoelectric plasma (CPP) device. This handheld instrument has a low space requirement (about 21 cm length and 4 cm diameter), and is directly plugged into a standard 230 V-socket. This device facilitates the generation of cold atmospheric plasmas using the piezoelectric effect provided by a lead zirconate titanate ceramic (LZT). The piezoelectric direct discharge achieved by this device offers a voltage transformation ratio exceeding 1000, *e.g.* amplifying 15 V to 15 kV. Two distinct nozzles can be coupled at the end of the LZT ceramic: either a Nearfield-

Nozzle to generate a dielectric barrier discharge (Pz-DBD) or a Needle-Nozzle to generate a corona discharge (Pz-CD)²⁷. The Pz-DBD source (scheme in **Erreur ! Source du renvoi introuvable.b**) features a floating plane electrode facing the LZT ceramic, establishing a galvanic connection. The addition of a dielectric barrier allows the generation of a DBD inside the nozzle and another DBD occurring between the dielectric and the substrate located a few 2-3 millimeters below. A homemade flow driver (0.4 slm) is inserted between the Pz-DBD and the culture well to confine the helium-air mixture. The Pz-CD source (scheme in **Erreur ! Source du renvoi introuvable.c**) consists of a pin electrode coupled with another homemade flow driver to supply gas mixtures. The substrate is there located 4-5 mm below the pin. Helium flow is injected at 5 slm for 30 s and then at 0.5 slm for the different treatment durations.

Operating conditions: in both cases, the 6-well plate is placed on a laminar flow cabinet during processing, with the metal base connected to the ground. Wells are filled with 1.2 mL of culture medium for Pz-DBD and 1.4 mL for Pz-CD to optimize the treatments. Most of the experiments are carried out for the following CPP exposure conditions: 0, 0.5, 1, 2, 3 and 5 min.

Temperature and evaporation of cell culture medium

Temperature: an infrared camera (Jenoptik & Infratec VarioCAM® HD head 680/30) is employed to measure the temperature of the culture medium at the bottom of a grounded 6-well plate, without cell. A macro-lens (Converter Jenoptik ×0.2) focuses on the bottom of the well, where cells are typically placed during plasma treatments. Infrared images are recorded in the medium every 30 s with the following scheme: 30 s without plasma nor helium; 30 s of helium injection but no plasma, 5 min of CPP exposure, and 9 min of cooling without plasma nor helium. A radial temperature profile is then extracted at each current treatment time to illustrate its distribution in the medium.

Evaporation: the medium is weighted using a Sartorius ENTRIS 124i-1S scale accurate at 0.1 mg to determine the evaporation inside a well of 6-well plates filled with its current volume of medium for CPP exposure from 0 to 5 min. Mass are measured before CPP treatment, immediately post-treatment and 24 hours after incubation at 37°C.

CPP electric properties and deposited power on a substrate

A digital oscilloscope (Teledyne Lecroy Company, Wavesurfer 3054) is coupled to a voltage probe (Teledyne LeCroy PP020 10:1) and a current monitor (Pearson Electronics Company, Pearson 2877) to acquire electric signals. Voltage and current are measured on a substrate mimicking human body impedance ($R = 1.5 \text{ k}\Omega - C = 100 \text{ pF}^{41}$) and facing each CPP. Signals, sampled at a rate of 2GS/s, are smoothed by weighted adjacent-averaging with 100 points. Deposited power is calculated from five periods of the integrated instantaneous power.

Reactive species analysis

Optical emission spectroscopy: an optical emission spectrometer (OES – Andor SR-750-B1-R) in Czerny Turner configuration collects the radiative emissions of plasma. Its adjusted parameters are as follows: a focal length of 750 mm, a 1200 grooves/mm grating, blazed at 500 nm, and a range from 250 to 800 nm. This device is coupled to an ICCD camera (Andor Istar DH340T) and an optical fiber (Leoni fiber optics SR-OPT-8014) of 100 μm diameter. A converging lens (ThorLabs LA4380-UV, $f = 100 \text{ mm}$) is added between plasma and optical fiber to collect a maximum of plasma emission. OES characterization is performed with culture medium below CPP; measurements are acquired orthogonally to plasma axis at a 1 mm-height from the culture medium surface.

Colorimetric assays: nitrite (NO_2^-) and hydrogen peroxide (H_2O_2) concentrations are measured by colorimetric assays respectively using Griess reagent (Sigma Aldrich, Saint-Quentin Fallavier, France)

and Titanium Oxysulfate IV ($TiOSO_4$ from Sigma-Aldrich, Saint-Quentin Fallavier, France), to check whether reactive species are produced by plasma in the culture medium, without cell. CPP treatments are performed as usual from 0 to 5 min in a 6-well plate filled with current volumes of culture medium. From each treated sample, 25 μ L are transferred in a 96-well plate with 175 μ L of culture medium and 50 μ L of Griess reagent for nitrite quantification, and 200 μ L in another one with 50 μ L of $TiOSO_4$. Their proportion in culture media are recorded by an absorption spectrophotometer (Biotek Cytation 3 instrument), at 548 nm for nitrite species and at 409 nm for hydrogen peroxide.

Cell culture and plasma treatment

Cell culture: human intrahepatic biliary duct cell line HuCCT-1 (kindly provided by G. Gores, Mayo Clinic, MN, USA) and extrahepatic biliary duct cell line EGI-1 (Leibniz Institute DSMZ-German Collection of Microorganisms and Cell Cultures GmbH, Braunschweig, Germany) are cultured in DMEM supplemented with 1 g/L glucose, 10 mmol/L HEPES, 10 % fetal bovine serum, antibiotics (100 UI/mL penicillin and 100 mg/mL streptomycin), and antimycotic (0.25 mg/mL amphotericin B). Cell lines are routinely screened for the presence of mycoplasma and authenticated for polymorphic markers to prevent cross-contamination.

Plasma treatment: cells are plated in 6-well plates at the density of 2×10^5 cells/well. Twenty-four hours later, the medium is replaced by fresh culture medium, and cells are exposed to CPP. Cell layer distribution and viability are assessed at the current operating conditions: 0, 0.5, 1, 2, 3 and 5 min. The other experiments are conducted at 2 and 3 min for HuCCT-1 cells and 3 and 5 min for EGI-1 cells.

Cell viability

The cell viability is determined by the crystal violet assay, 24 hours after treatment and incubation at 37°C. Absorbance is quantified with a Tecan Microplate Reader at 595 nm.

Staining and immunostaining

Cells from one half of the plates are fixed 15 min immediately after plasma treatment: cells in each well are washed in cold PBS 3 times before being fixed with 4 % paraformaldehyde (PFA) at 4°C. The fixed cells are permeabilized with triton 0.1 % at room temperature (RT) for 15 min. The other half is incubated after plasma treatment, for 24 hours at 37°C before the following experiments.

Nuclear staining for cell layer distribution analysis: after 3 PBS washes, 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI – Thermo Fisher Scientific) is added and then incubated for 5-10 min. Another PBS wash is done before storing them in PBS at 4°C. Observations by fluorescence are performed with a Biotek Cytation™ 3 cell imaging multi-mode reader. Data treatments are realized with a Python program and GIMP2 software to highlight the contrasts of the region of interest and to count the nuclei as pixel aggregates.

Cytoskeleton analysis: the filamentous actin (F-actin) are labeled with 1X Phalloidin iFluor 488 conjugate in 1 % bovine serum albumin (BSA – Abcam) for 90 min in the dark. The stained cells are washed, nuclei counterstained in a DAPI solution (Thermo Fisher Scientific) for 5-10 min, and stored in PBS protected from light. Fluorescence images are acquired with IX83 Evident microscope ($\times 40$) and analyzed with FIJI software.

Immunofluorescence staining: the fixed cells are permeabilized in triton 0.2 % for 15 min and incubated in a blocking solution containing PBS with 1 % BSA and 10 % goat serum for 1 hour at RT. Cells are then incubated with the γ -H2AX antibody solution diluted in 5 % BSA/0.1 % PBS-Tween in a moisture chamber overnight at 4°C. Twenty-four hours later, after 3 PBS washes for 5 min each, cells are incubated for 1 hour at RT with secondary fluorescent antibody diluted in PBS-Tween 0.1 %

protected from light (**Table 1**). The cells nuclei are counterstained in a DAPI solution (Thermo Fisher Scientific) for 5-10 min. Finally, the cells are rinsed in PBS 3 times for 5 min each before being mounting and cover slipped using a mounting medium. Fluorescence images are acquired with IX83 Evident microscope ($\times 20$) and analyzed with FIJI software.

Table 1. Primary antibodies used for immunodetection and probe

Name	Species	Clone	Reference	Manufacturer	Dilution
GAPDH	M	6C5	sc-32233	Santa Cruz	1:5000 (WB)
γ H2AX	R	20E3	9718	CST	1:1000 (WB), 1:200 (IF)
pCHK1	R	133D3	2348	CST	1:1000 (WB)
CHK1	R	2G1D5	2360	CST	1:1000 (WB)
pp53	R	/	9284	CST	1:1000 (WB)
p53	M	DO-1	sc-126	Santa Cruz	1:1000 (WB)
Cleaved caspase 3	R	5A1E	9664	CST	1:1000 (WB)
Cleaved PARP	R	D64E10	5625	CST	1:300 (WB)
Phalloidin-iFluor 488	R	/	ab176753	Abcam	1:1000 (IF)

M, mouse; R, rabbit; WB, western blot; IF, immunofluorescence. CST, Cell Signaling Technology

Western blot

Cells are collected 24 hours after CPP exposure and washed with ice-cold PBS solution, then lysed in RIPA buffer (Merk) supplemented with a protease and phosphatase inhibitor cocktail (Thermo Fisher Scientific). After 15 min of incubation in ice, the cells are centrifuged for 15 min at 4°C at 18000 g. The protein concentrations in the supernatant are determined using the bicinchoninic acid (BCA assay kit – Thermo Fisher Scientific). Absorbance is quantified with a Tecan Microplate Reader at 570 nm. A protein extract of 20 μ g is suspended in Laemmli buffer, boiled, subjected to SDS-PAGE and transferred to nitrocellulose membranes. The blots are blocked with TBS, 0.1 % Tween-20 containing 5 % BSA, and incubated with primary antibodies overnight at 4°C. The membrane is washed 3 times and then incubated with secondary HRP-linked antibody for 1 hour at RT. The signals are revealed using an enhanced chemiluminescence (ECL Prime) kit and the bands are visualized with an Imager iBright. Relative quantification is performed using GAPDH, as an internal reference. The primary and secondary antibodies used are listed in **Table 1**.

RNA and Reverse Transcription PCR

The total RNA from cells is extracted 24 hours after CPP treatment using the Nucleospin RNA kit (MACHEREY-NAGEL). The quantity and quality of RNA are determined spectroscopically using a nanodrop (Thermo Fisher Scientific). Total RNA (1 μ g) is utilized to synthesize cDNA using random primers and SuperScript II reverse transcriptase (Thermo Fisher Scientific) according to the manufacturer's protocol. The cDNA samples are utilized for RT-qPCR using SYBR Green Reagent (Roche Diagnostics) and specific primers (**Table 2**), on a LightCycler 96 Roche Instrument. All RT-qPCRs are performed in duplicate. The $2^{-\Delta\Delta CT}$ method is employed for relative gene expression analysis, with GAPDH, as an internal reference.

Table 2. Human primers used for quantitative real-time PCR

Gene	Protein	Primer Forward (5' → 3')	Primer Reverse (5' → 3')
MSRB3-2	Methionine sulfoxide reductase B3	CGGTTTCAGGTTGGCCTTCATT	GTGCATCCCATAGGAAAAGTCA
SOD1	Superoxide dismutase 1	GGTGGGCCAAAGGATGAAGAG	CCACAAGCCAAACGACTTCC
SOD2	Superoxide dismutase 2	GGAAGCCATCAAACGTGACTT	CCC GTTCCTTATTGAAACCAAGC
CAT	Catalase	TGGAGCTGGTAACCCAGTAGG	CCTTTGCCTTGGAGTATTTGGTA
HMOX1	Hemeoxygenase1	GGCAGAGGGTGATAGAAGAGG	AGCTCCTGCAACTCCTCAAA

GAPDH	GAPDH, H	AGCCACATCGCTCAGACAC	GCCCAATACGACCAATCC
-------	----------	---------------------	--------------------

Membrane permeability

Twenty-four hours after cell plating, the medium is replaced by fresh culture medium containing a green fluorescent YO-PRO™-1, a cell-impermeant dye of 630 Da (already used for studying permeability⁴²), at a final concentration of 0.5 µmol/L. Cells are exposed to CPP and protected from light during 15 min. In parallel, negative and positive controls of membrane permeability are prepared by incubating cells with or without triton X-100, one of the most widely used non-ionic surfactants for permeabilizing membranes of living cells. The medium is replaced by a triton solution 10 % (Thermo Fisher Scientific) at a final concentration of 0.18 mmol/L for 15 min at 4°C (positive control) or by PBS (negative control). After 3 PBS washes, the YO-PRO™-1 solution is added at a final concentration of 0.5 µmol/L in a fresh culture medium for 15 min at RT protected from light. Cells are washed in PBS 3 times and fixed with 4 % PFA for 15 min at 4°C protected from light. Fluorescence images are acquired with IX83 Evident microscope (× 10) and analyzed with FIJI software.

Statistics

The results are analyzed using the GraphPad Prism 5.0 statistical software (GraphPad Software, San Diego, CA, USA) and Origin 2019b software (OriginLab, Northampton, USA). Data are shown as means ± standard error of the mean (s.e.m.). For comparisons between two groups, nonparametric Mann–Whitney test are used (*, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$; ***, $p < 0.001$).

Acknowledgments

The authors would like to thank Pr. Sophie Thenet, Sorbonne Université, INSERM, Centre de Recherche Saint-Antoine, CRSA; Paris Center for Microbiome Medicine (PaCeMM) FHU, APHP; EPHE, PSL University, Paris, France, for her help in the analysis of cell cytoskeleton.

L.F. and T.D. received financial support from ITMO Cancer of Aviesan, INCa and FRM, funds administered by Inserm, CNRS and Sorbonne Université (HRHG-MP22-039, PCSI: 23CP058-00, FRM PMT202306017441). A.P. received a scholarship for 3 years from the French Ministry of Higher Education and Research to complete his doctorate at Sorbonne Université, Paris, France.

Author contributions statement

M.S., B.L., T.D and L.F., conceptualization; M.S. B.L., methodology; M.S., B.L., T.D and L.F., validation; M.S., I.H. and B.L., formal analysis; M.S., B.L., I.H., H.D., A.P. and A.C., investigation; T.D, R.M. and L.F., resources; M.S., I.H., B.L. and R.M., data curation; M.S., B.L. and L.F., writing – original draft preparation; M.S., B.L., T.D., L.F., and A.P., writing – review & editing; M.S., B.L., I.H., T.D., and L.F., visualization; T.D. and L.F., supervision; M.S. and B.L., project administration; T.D. and L.F., funding acquisition.

Competing interests

The authors declare that they have no affiliation with or involvement in any organization or entity with any financial and non-financial interests in the subject matter or materials discussed in this manuscript.

References

1. Ferlay, J. *et al.* Cancer statistics for the year 2020: An overview. *International Journal of Cancer* **149**, 778–789 (2021).

2. Cancer today. <http://gco.iarc.fr/today/home>.
3. Banales, J. M. *et al.* Cholangiocarcinoma 2020: the next horizon in mechanisms and management. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* **17**, 557–588 (2020).
4. Van Beers, B. E. Diagnosis of cholangiocarcinoma. *HPB* **10**, 87–93 (2008).
5. Olkus, A. *et al.* Durvalumab Plus Gemcitabine and Cisplatin in Patients with Advanced Biliary Tract Cancer: An Exploratory Analysis of Real-World Data. *Target Oncol* **19**, 213–221 (2024).
6. Moris, D. *et al.* Advances in the treatment of intrahepatic cholangiocarcinoma: An overview of the current and future therapeutic landscape for clinicians. *CA: A Cancer Journal for Clinicians* **73**, 198–222 (2023).
7. Misra, N. N., Schlüter, O. & Cullen, P. J. *Cold Plasma in Food and Agriculture: Fundamentals and Applications*. (Academic Press, 2016).
8. Beyrer, M. *et al.* Cold Atmospheric Plasma Inactivation of Microbial Spores Compared on Reference Surfaces and Powder Particles. *Food Bioprocess Technol* **13**, 827–837 (2020).
9. Boeckmann, L. *et al.* Cold Atmospheric Pressure Plasma in Wound Healing and Cancer Treatment. *Applied Sciences* **10**, 6898 (2020).
10. Dubuc, A. *et al.* Use of cold-atmospheric plasma in oncology: a concise systematic review. *Ther Adv Med Oncol* **10**, 1758817418786475 (2018).
11. Laroussi, M. Cold Gas Plasma Sources and the Science behind their Applications in Biology and Medicine. Preprint at <https://doi.org/10.48550/arXiv.2106.01366> (2021).
12. Vandamme, M. *et al.* Antitumor Effect of Plasma Treatment on U87 Glioma Xenografts: Preliminary Results. *Plasma Processes and Polymers* **7**, 264–273 (2010).
13. Panngom, K. *et al.* Preferential killing of human lung cancer cell lines with mitochondrial dysfunction by nonthermal dielectric barrier discharge plasma. *Cell Death Dis* **4**, e642–e642 (2013).
14. Bekeschus, S. Medical gas plasma technology: Roadmap on cancer treatment and immunotherapy. *Redox Biology* **65**, 102798 (2023).
15. Schlegel, J., Körtzer, J. & Boxhammer, V. Plasma in cancer treatment. *Clinical Plasma Medicine* **1**, 2–7 (2013).
16. Judée, F., Vaquero, J., Guégan, S., Fouassier, L. & Dufour, T. Atmospheric pressure plasma jets applied to cancerology: correlating electrical configuration with in vivo toxicity and therapeutic efficiency. *J. Phys. D: Appl. Phys.* **52**, 221801 (2019).
17. Faramarzi, F. *et al.* Cold Physical Plasma in Cancer Therapy: Mechanisms, Signaling, and Immunity. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* **2021**, e9916796 (2021).
18. Dai, X. & Zhu, K. Cold atmospheric plasma: Novel opportunities for tumor microenvironment targeting. *Cancer Medicine* **12**, 7189–7206 (2023).
19. Hayashi, N., Yao, Y.-C. & Matsunaga, Y. Regulation of macrophage-like cell activity driven by atmospheric oxygen plasma. *Jpn. J. Appl. Phys.* **59**, SHHF03 (2020).
20. Fang, T., Cao, X., Shen, B., Chen, Z. & Chen, G. Injectable cold atmospheric plasma-activated immunotherapeutic hydrogel for enhanced cancer treatment. *Biomaterials* **300**, 122189 (2023).
21. Vaquero, J. *et al.* Cold-Atmospheric Plasma Induces Tumor Cell Death in Preclinical In Vivo and In Vitro Models of Human Cholangiocarcinoma. *Cancers* **12**, 500 (2020).
22. Jones, O. *et al.* The synergistic effect of Canady Helios cold atmospheric plasma and a FOLFIRINOX regimen for the treatment of cholangiocarcinoma in vitro. *Sci Rep* **11**, 8967 (2021).
23. Kniazeva, V. *et al.* Adjuvant composite cold atmospheric plasma therapy increases antitumoral effect of doxorubicin hydrochloride. *Frontiers in Oncology* **13**, (2023).
24. Decauchy, H., Pavy, A., Camus, M., Fouassier, L. & Dufour, T. Cold plasma endoscopy applied to biliary ducts: feasibility risk assessment on human-like and porcine models for the treatment of cholangiocarcinoma. *J. Phys. D: Appl. Phys.* **55**, 455401 (2022).
25. Bastin, O. *et al.* Generation and transport of cold plasma in metres-long tubing for plasma medicine application in endoscopy. (2019).
26. Winter, J., Nishime, T. M. C., Glitsch, S., Lühder, H. & Weltmann, K.-D. On the development of a deployable cold plasma endoscope. *Contributions to Plasma Physics* **58**, 404–414 (2018).
27. Korzec, D., Hoppenthaler, F. & Nettesheim, S. Piezoelectric Direct Discharge: Devices and Applications. *Plasma* **4**, 1–41 (2021).
28. Artem'ev, K. V. *et al.* Study of Characteristics of the Cold Atmospheric Plasma Source Based on a Piezo Transformer. *Russ Phys J* **62**, 2073–2080 (2020).

29. Korzec, D., Hoppenthaler, F., Burger, D., Andres, T. & Nettesheim, S. Atmospheric pressure plasma jet powered by piezoelectric direct discharge. *Plasma Processes and Polymers* **17**, 2000053 (2020).
30. Timmermann, E. *et al.* Piezoelectric-driven plasma pen with multiple nozzles used as a medical device: risk estimation and antimicrobial efficacy. *J. Phys. D: Appl. Phys.* **54**, 025201 (2020).
31. Stekke, J. *et al.* Low-Voltage Plasma Jet With Piezoelectric Generator: Preliminary Evaluation of Decontamination Capabilities. *IEEE Transactions on Plasma Science* **48**, 1264–1270 (2020).
32. González-González, C. R. *et al.* The effect of cold atmospheric plasma and linalool nanoemulsions against *Escherichia coli* O157:H7 and *Salmonella* on ready-to-eat chicken meat. *LWT* **149**, 111898 (2021).
33. Konchekov, E. M. *et al.* Properties and Use of Water Activated by Plasma of Piezoelectric Direct Discharge. *Frontiers in Physics* **8**, (2021).
34. Herianto, S. *et al.* The effects of glazing with plasma-activated water generated by a piezoelectric direct discharge plasma system on whiteleg shrimp (*Litopenaeus vannamei*). *LWT* **154**, 112547 (2022).
35. Yon, M. J. Y., Matinlinna, J. P., Tsoi, J. K. H., Vallittu, P. K. & Lassila, L. V. J. Plasma Treated AR-Glass Fibres in Experimental Reinforced Composites with Three Silanes: A Study on Mechanical Properties. *Silicon* **15**, 7109–7119 (2023).
36. Xu, F. *et al.* A portable piezoelectric transformer microplasma optical emission spectrometry for the determination of mercury. *Microchemical Journal* **193**, 109109 (2023).
37. Wang, Y., Mang, X., Li, X., Cai, Z. & Tan, F. Cold atmospheric plasma induces apoptosis in human colon and lung cancer cells through modulating mitochondrial pathway. *Frontiers in Cell and Developmental Biology* **10**, (2022).
38. Wang, Y. *et al.* Piezoelectric cold atmospheric plasma induces apoptosis and autophagy in human hepatocellular carcinoma cells through blocking glycolysis and AKT/mTOR/HIF-1 α pathway. *Free Radical Biology and Medicine* **208**, 134–152 (2023).
39. Suzuki-Karasaki, M. *et al.* Air Plasma-Activated Medium Evokes a Death-Associated Perinuclear Mitochondrial Clustering. *International Journal of Molecular Sciences* **23**, 1124 (2022).
40. Suzuki-Karasaki, M. *et al.* Ozone mediates the anticancer effect of air plasma by triggering oxidative cell death caused by H₂O₂ and iron. *European Journal of Cell Biology* **102**, 151346 (2023).
41. Judée, F. & Dufour, T. Plasma gun for medical applications: engineering an equivalent electrical target of human body and deciphering relevant electrical parameters. *J. Phys. D: Appl. Phys.* **52**, 16LT02 (2019).
42. Chung, T.-H. *et al.* Cell Electroporation Enhancement by Non-Thermal-Plasma-Treated PBS. *Cancers* **12**, 219 (2020).
43. Chang, C.-H., Yano, K. & Sato, T. Nanosecond pulsed current under plasma-producing conditions induces morphological alterations and stress fiber formation in human fibrosarcoma HT-1080 cells. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **681**, 108252 (2020).
44. Konchekov, E. M. *et al.* Bacterial Decontamination of Water-Containing Objects Using Piezoelectric Direct Discharge Plasma and Plasma Jet. *Biomolecules* **14**, 181 (2024).
45. Sklias, K., Santos Sousa, J. & Girard, P.-M. Role of Short- and Long-Lived Reactive Species on the Selectivity and Anti-Cancer Action of Plasma Treatment In Vitro. *Cancers* **13**, 615 (2021).
46. Dharini, M., Jaspin, S. & Mahendran, R. Cold plasma reactive species: Generation, properties, and interaction with food biomolecules. *Food Chemistry* **405**, 134746 (2023).
47. Batista Napotnik, T., Polajžer, T. & Miklavčič, D. Cell death due to electroporation – A review. *Bioelectrochemistry* **141**, 107871 (2021).
48. Haralambiev, L. *et al.* Cold Atmospheric Plasma Treatment of Chondrosarcoma Cells Affects Proliferation and Cell Membrane Permeability. *Int J Mol Sci* **21**, 2291 (2020).
49. Jacoby, J. M. *et al.* An Innovative Therapeutic Option for the Treatment of Skeletal Sarcomas: Elimination of Osteo- and Ewing's Sarcoma Cells Using Physical Gas Plasma. *Int J Mol Sci* **21**, 4460 (2020).
50. Aermes, C., Hayn, A., Fischer, T. & Mierke, C. T. Cell mechanical properties of human breast carcinoma cells depend on temperature. *Sci Rep* **11**, 10771 (2021).

51. Roti Roti, J. L. Cellular responses to hyperthermia (40–46°C): Cell killing and molecular events. *International Journal of Hyperthermia* **24**, 3–15 (2008).
52. Wu, S. *et al.* Positive streamer corona, single filament, transient glow, dc glow, spark, and their transitions in atmospheric air. *Physics of Plasmas* **25**, 123507 (2018).
53. Freund, E. *et al.* In Vitro Anticancer Efficacy of Six Different Clinically Approved Types of Liquids Exposed to Physical Plasma. *IEEE Transactions on Radiation and Plasma Medical Sciences* **3**, 588–596 (2019).
54. Mitra, S. *et al.* Impact of ROS Generated by Chemical, Physical, and Plasma Techniques on Cancer Attenuation. *Cancers* **11**, 1030 (2019).
55. Privat-Maldonado, A. *et al.* ROS from Physical Plasmas: Redox Chemistry for Biomedical Therapy. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* **2019**, e9062098 (2019).
56. Aggarwal, V. *et al.* Role of Reactive Oxygen Species in Cancer Progression: Molecular Mechanisms and Recent Advancements. *Biomolecules* **9**, 735 (2019).
57. Bauer, G. The synergistic effect between hydrogen peroxide and nitrite, two long-lived molecular species from cold atmospheric plasma, triggers tumor cells to induce their own cell death. *Redox Biol* **26**, 101291 (2019).

Figures

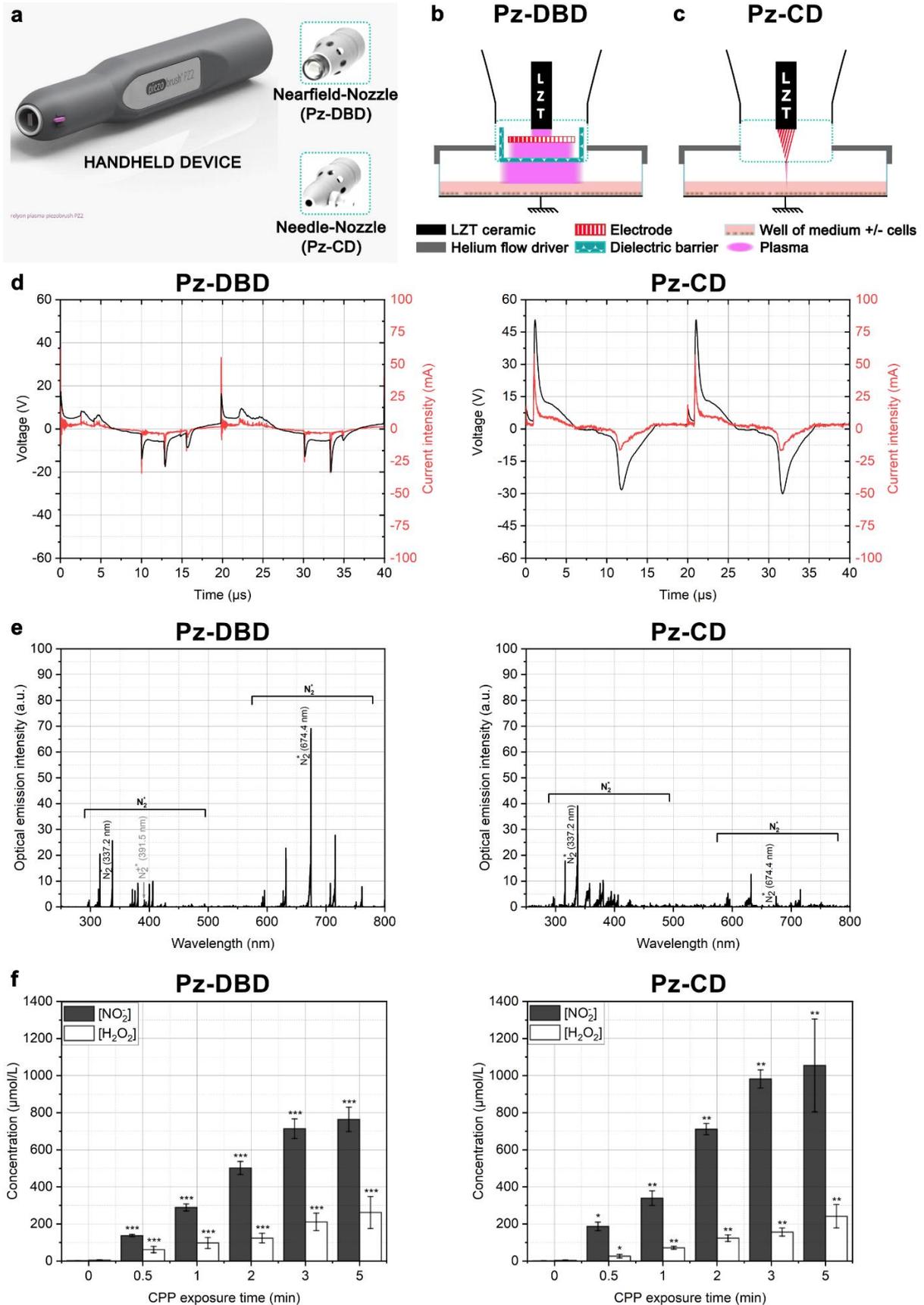


Figure 1. Cold piezoelectric plasma (CPP) device, electric and chemical properties.

(a) Photograph of the commercial source of plasma, and the nozzles used in this study. Schemes representing the setups during a plasma treatment of medium with or without cells: (b) for Pz-DBD, the Nearfield-Nozzle is added; and (c) for Pz-CD, it is the Needle-Nozzle. LZT ceramic is the Lead Zirconate Titanate piezoelectric material. In both cases, a helium flow driver is inserted to fill the well and maintain the device. (d) Instantaneous voltage and current intensity recorded on a substrate mimicking human body impedance ($R = 1.5 \text{ k}\Omega - C = 100 \text{ pF}^{41}$). (e) Optical emission spectra from CPP sources interacting with culture medium in a well. Nitrogen species are in majority, mainly represented by the second positive system (respectively, first and second orders) of molecular nitrogen N_2^* and the first negative system of the nitronium ion N_2^{+*} . (f) Nitrite (NO_2^-) and hydrogen peroxide (H_2O_2) content in culture media after CPP exposure from 0 to 5 min. Values are expressed as means \pm s.e.m. from at least three replicates. Significant differences for *, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$; ***, $p < 0.001$ are compared with untreated cells (0 min).

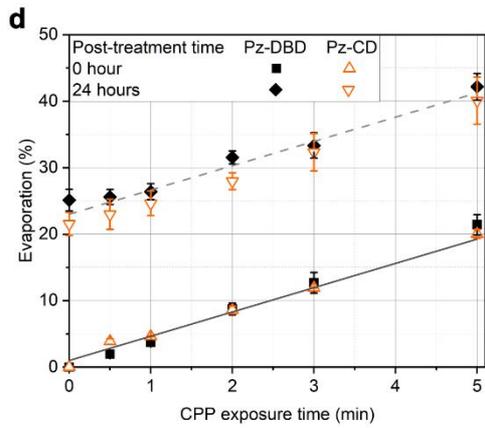
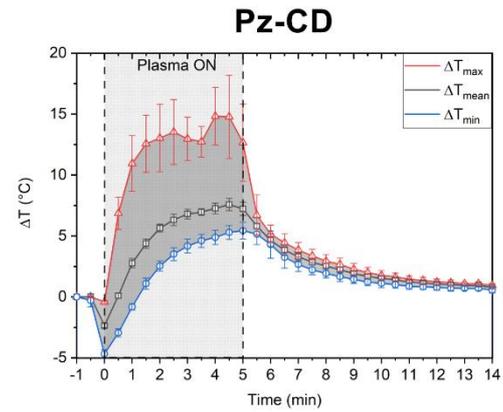
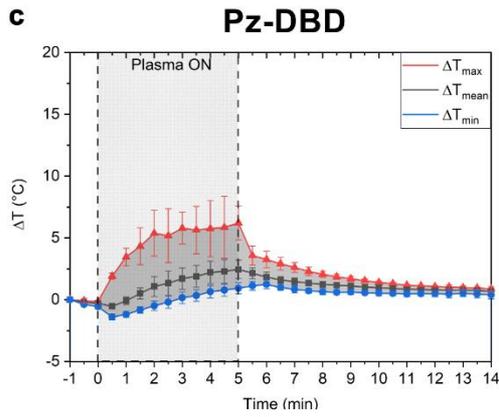
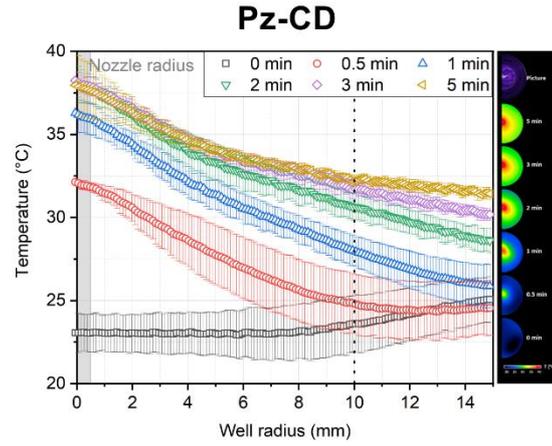
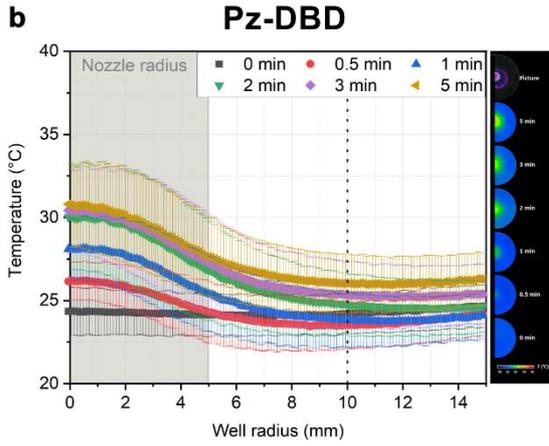
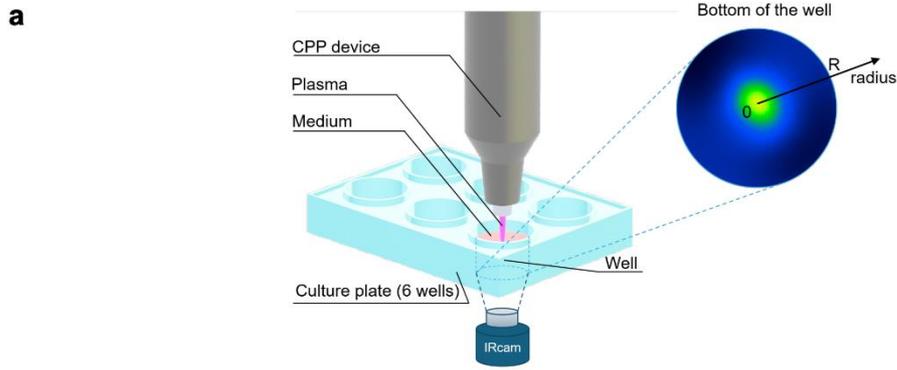


Figure 2. Localized thermal effects induced by CPP.

(a) 3D-view of the setup for infrared camera (IRcam) observation of a culture medium exposed to a CPP device. In this scheme, the helium flow driver is absent to show plasma-liquid interaction inside a well. The bottom of the well is 2D-represented with the picture obtained for a 0.5 min-Pz-CD exposure. **(b)** Radial distribution of the temperature collected from infrared images, aligned on the right border of the graphs at the current plasma treatment times (0, 0.5, 1, 2, 3 and 5 min). Dot lines correspond to $r = 10$ mm. **(c)** Kinetics evolution of the thermal effect for the two sources, beginning at room temperature for 30 s, helium injection during the next 30 s; then, plasma ignition from 0 to 5 min, and finally, helium and plasma turned off for the last 9 min. Temperature variation ΔT corresponds to the difference between the current temperature and the initial one. ΔT_{mean} (gray line), ΔT_{min} (blue line) and ΔT_{max} (red line) are respectively the mean value, minimum value and maximum value recorded on the area of the well. **(d)** Evaporation of the culture medium on a well immediately (0 hour) and 24 hours after CPP treatment. The linear regression is performed with a great determination coefficient (0 hour: $r^2 > 0.99$ – 24 hours: $r^2 > 0.9$) for each source.

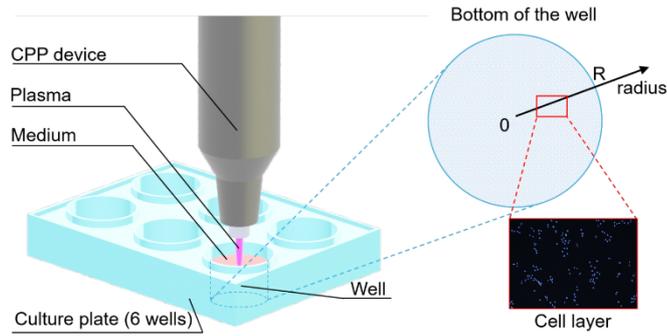
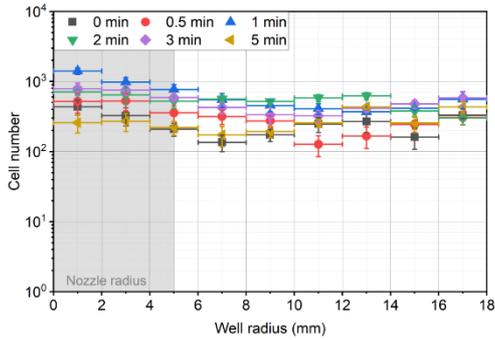
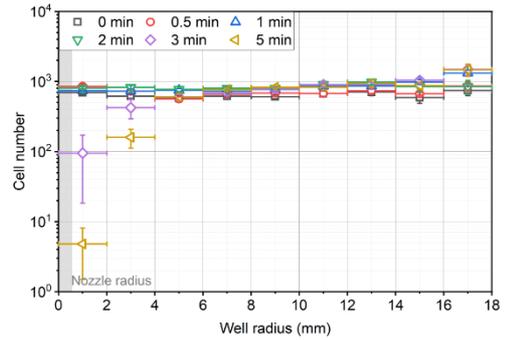
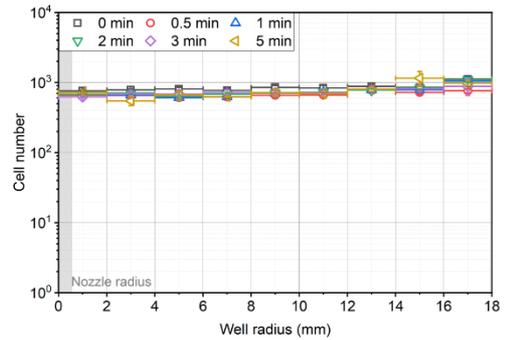
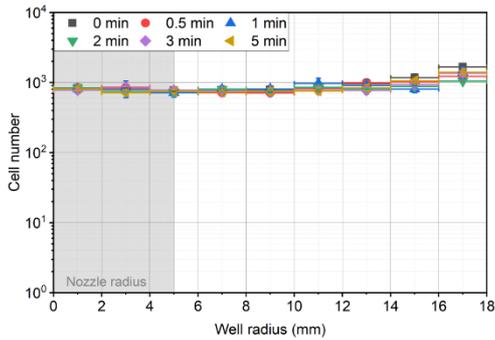
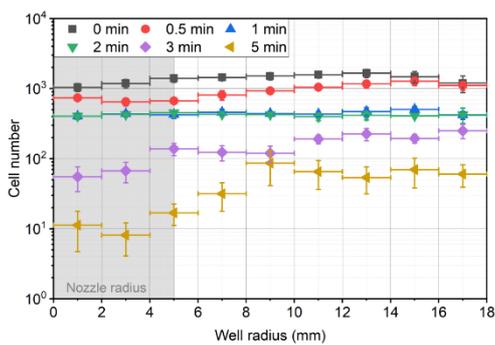
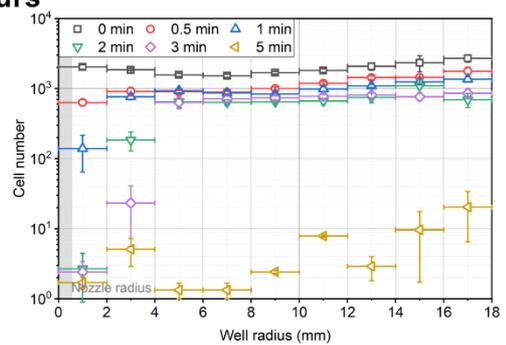
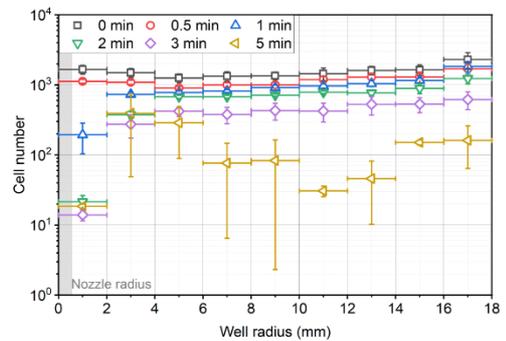
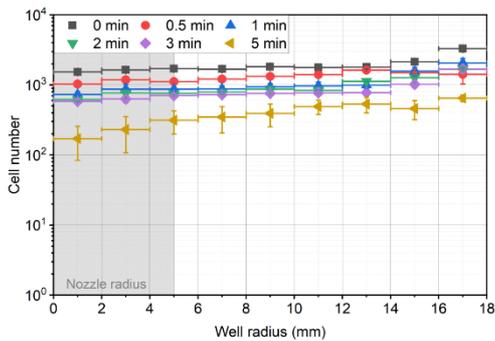
a**Pz-DBD****Pz-CD****b**
HuCCCT-1 cells**0 hour****c**
EG1-1 cells**d**
HuCCCT-1 cells**24 hours****e**
EG1-1 cells

Figure 3. Spatiotemporally dependence of CPP effects on the CCA cell layer distribution.

(a) 3D-view of the setup when the cell layer is exposed to a CPP device. In this scheme, the helium flow driver is absent to show plasma-liquid interaction inside a well. The bottom of the well is 2D-represented to focus on the cell nucleus observed from DAPI fluorescence images acquired along a radius of the well. Cell distribution observed on a radius of the well immediately (0 hour) after CPP exposure, either for (b) HuCCT-1 cells or (c) EGI-1 cells. The same conditions are then observed 24 hours after treatment and quantified for the two cell lines: (d) HuCCT-1 and (e) EGI-1. The nozzle radius is notified by gray background, respectively 5 mm for Pz-DBD and 0.5 mm for Pz-CD. Cell number is plotted in log-scale.

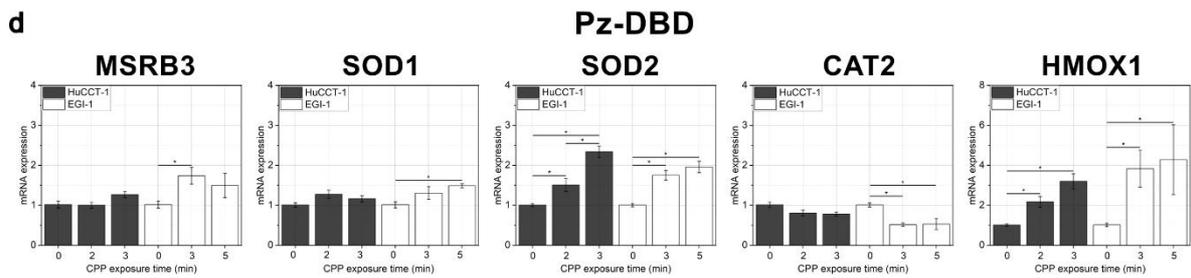
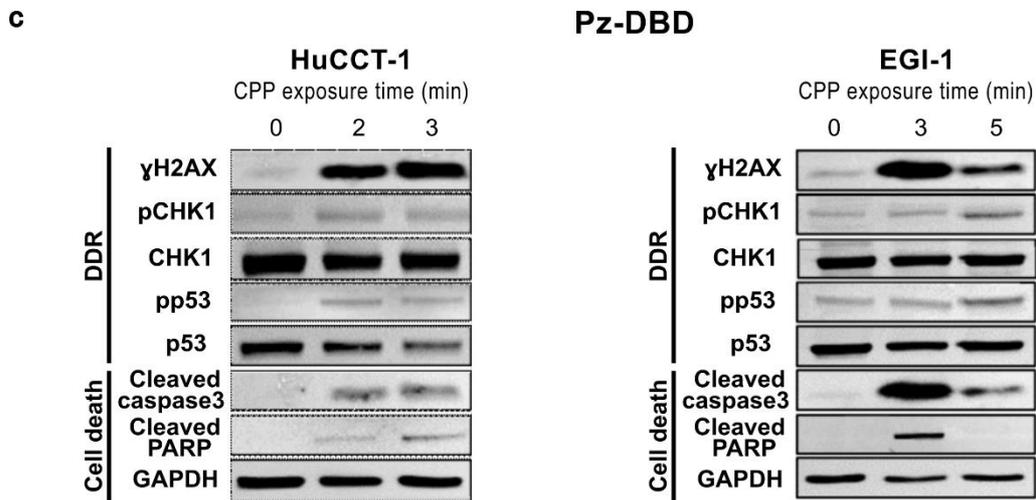
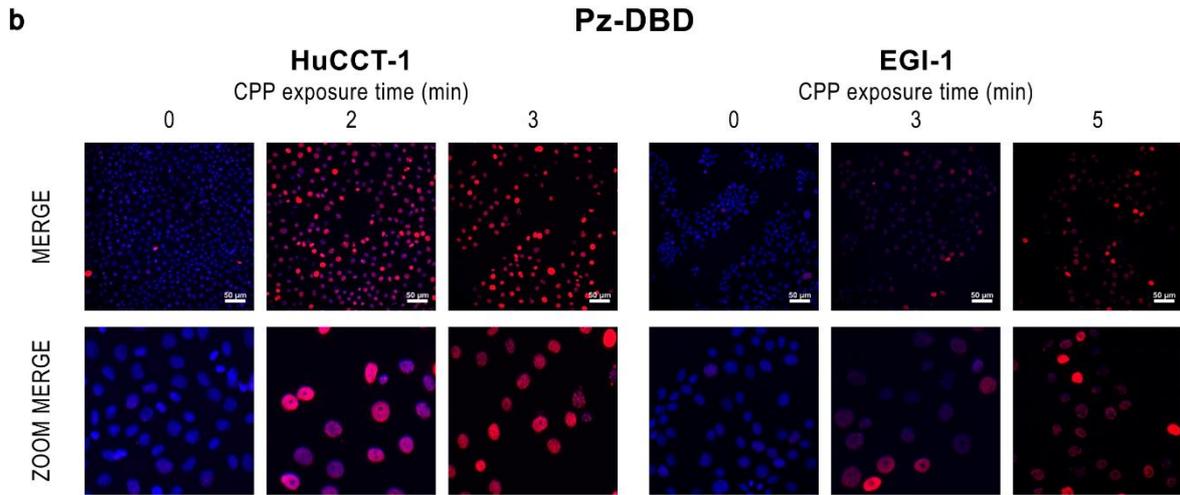
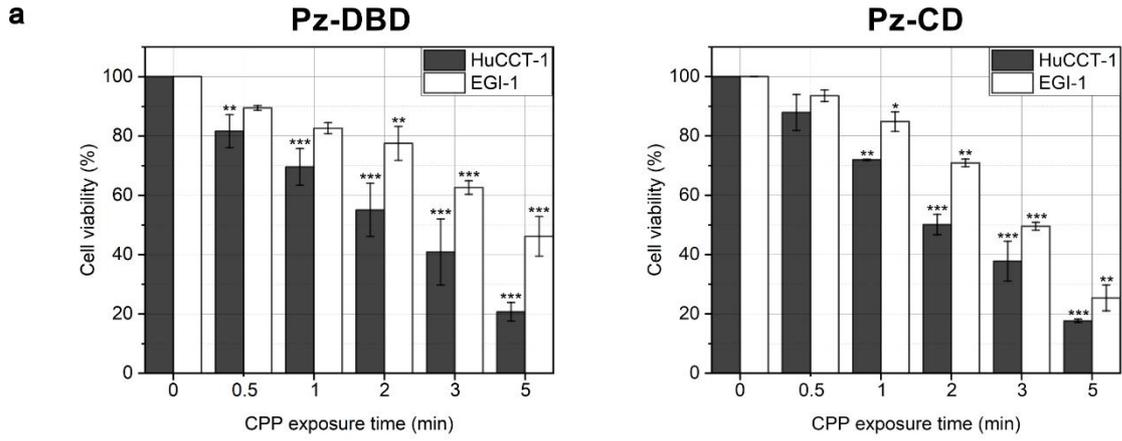


Figure 4. Effects of CPP on cell viability, DNA damage response, cell death and antioxidant system.

(a) HuCCT-1 and EGI-1 CCA cells viability is quantified 24 hours after CPP exposure for 0.5, 1, 2, 3 or 5 min by crystal violet assay. (b-c) CCA cells are treated with Pz-DBD for 2 and 3 min for HuCCT1 – 3 and 5 min for EGI-1, and analyses are performed 24 hours post-treatment. (b) Representative images of phosphorylated H2AX (γ H2AX) analyzed by immunofluorescence in cells (c) Representative images of western blot analysis of phosphorylated H2AX, phosphorylated and total Chk1, phosphorylated and total p53, cleaved caspase-3 and cleaved PARP. Expression of MSR3, SOD1, SOD2, CAT2, and HMOX1 at mRNA level by RT-QPCR. Values are expressed as means \pm s.e.m. from at least three cultures. Significant differences for *, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$; ***, $p < 0.001$ are compared with untreated cells (0 min).

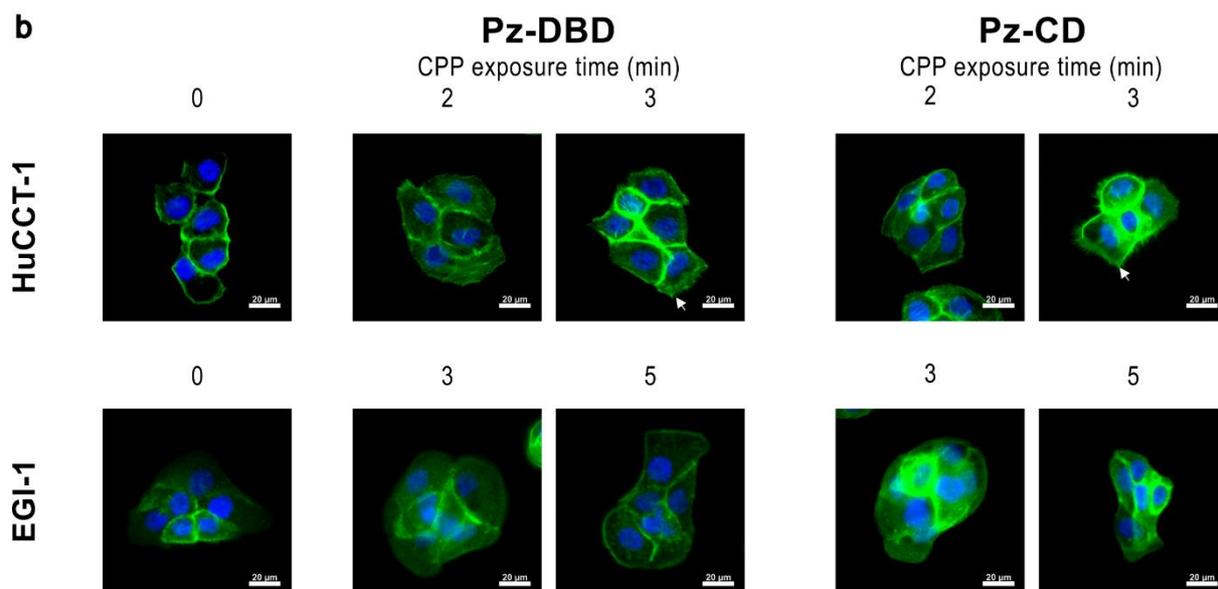
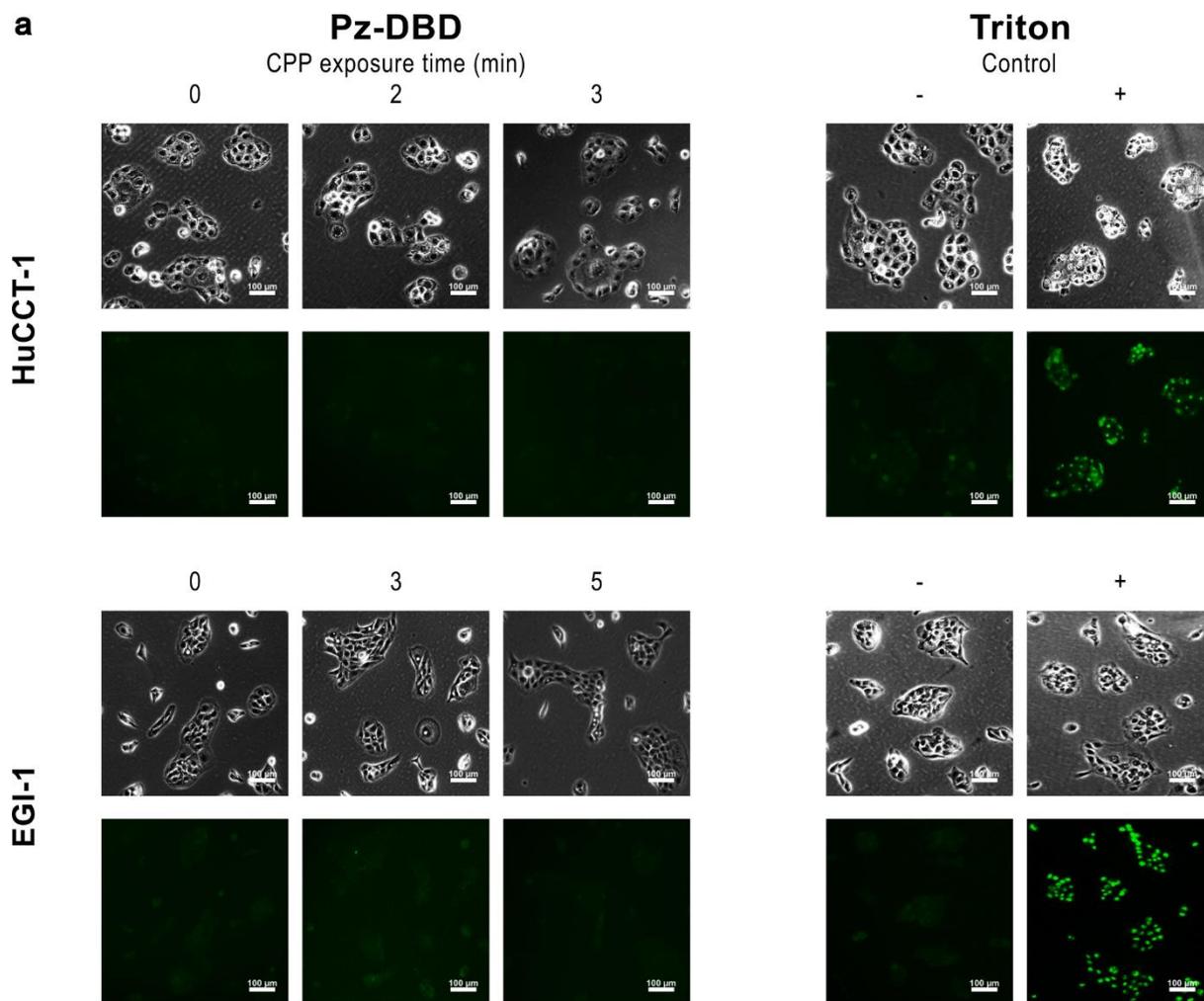


Figure 5. Effect of CPP on cell membrane permeability and actin cytoskeleton

Representative immunofluorescence images of **(a)** cell impermeant dye and **(b)** F-actin cytoskeleton in CCA cells captured immediately after Pz-DBD exposure for 0.5, 1, 2, 3 or 5 min. **(a)** Cell impermeant dye does not cross the cell membrane of CCA cells treated with Pz-DBD compared to cells treated with Triton X-100, a detergent that induces pores in the membrane. **(b)** F-actin is reorganized in cells treated with plasma. CPP induces actin stress fibers and membrane protrusions in HuCCT-1 but not in EGI-1 cells. In both cells, actin staining is reinforced at the cell membrane upon Pz-CD treatment. Write arrows indicate membrane protrusion.

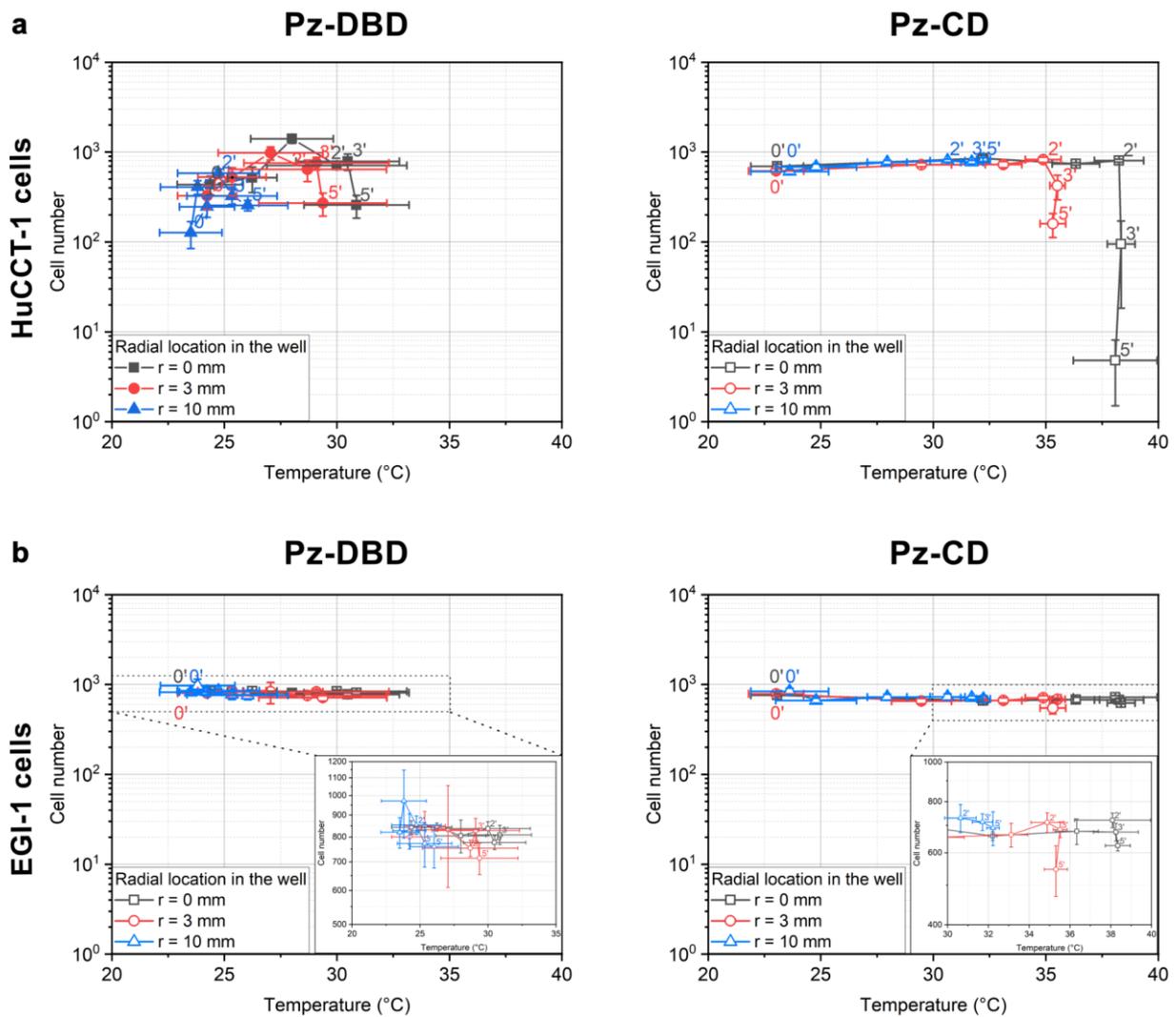
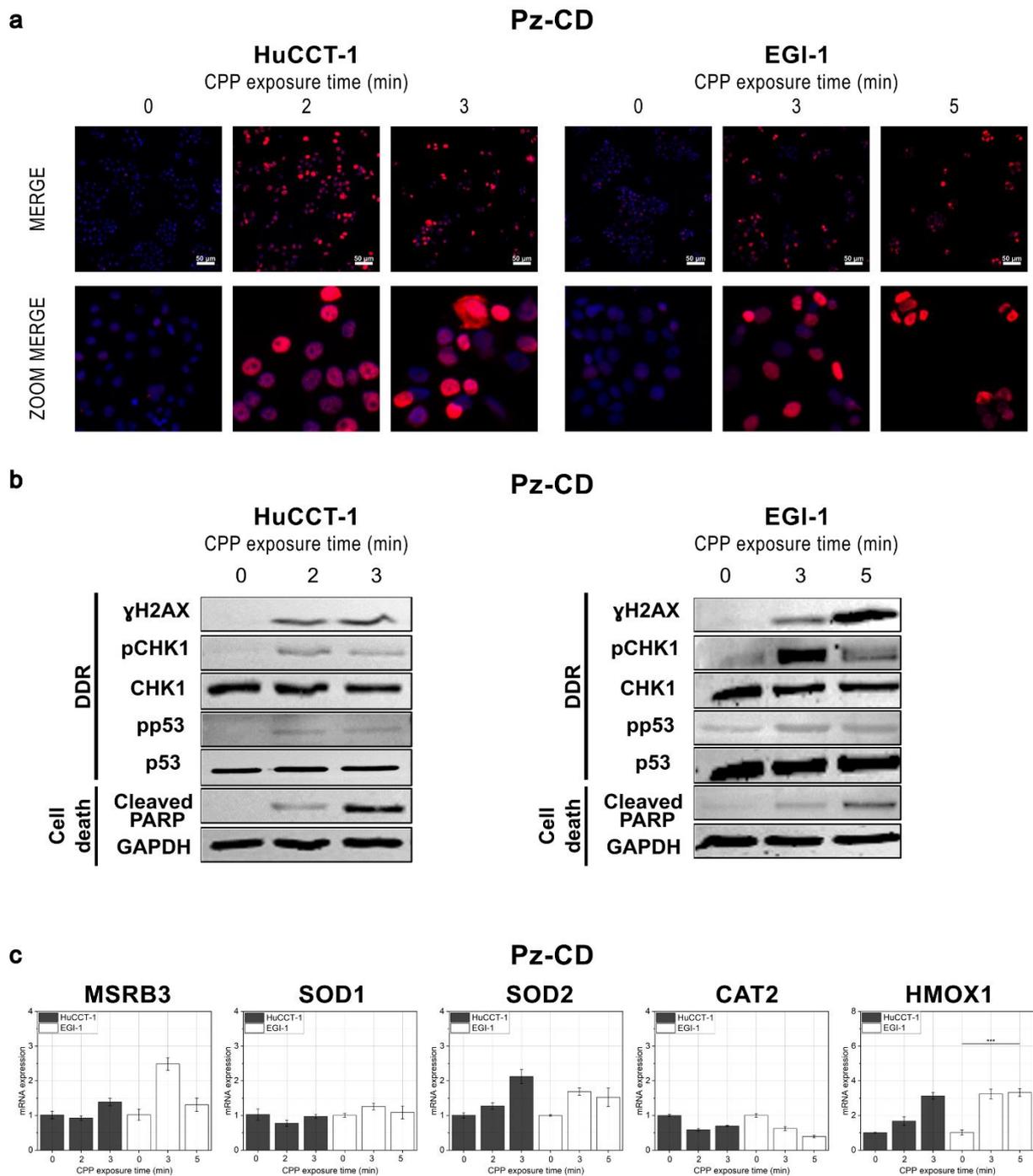


Figure 6. Decorrelation between the diffusion of temperature in the medium and the decrease of the cell number induced by CPP.

Dependence of culture medium temperature on the cell number when (a) HuCCT-1 cells and (b) EGI-1 cells are exposed to CPP. The cell number calculated from the immediate cell layer distribution (**Erreur ! Source du renvoi introuvable.**b-c) is plotted as a function of medium temperature (**Erreur ! Source du renvoi introuvable.**) for three radial locations in the well: $r = 0$ mm (well center), $r = 3$ mm (intermediate case) and $r = 10$ mm (close to well border). For EGI-1 cells, a focus is realized to dilate the cell number axis and observe the phenomenon.



Supplementary Figure. Effects of Pz-CD on DNA damage response, cell death and antioxidant system. (a-c) CCA cells are treated with Pz-CD for 2 and 3 min for HuCCT-1 – 3 and 5 min for EGI-1 cells, and analyses are performed 24 hours post treatment. (a) Representative images of phosphorylated H2AX (γ H2AX) analyzed by immunofluorescence. (b) Representative images of western blot analysis of phosphorylated H2AX, phosphorylated and total Chk1, phosphorylated and total p53, cleaved caspase-3 and cleaved PARP in CCA cells treated in the same conditions. Expression of MSRB3, SOD1, SOD2, CAT2, and HMOX1 at mRNA level by RT-QPCR in CCA cells in the same conditions. Values are expressed as means \pm s.e.m. from at least three cultures. Significant differences for *, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$; ***, $p < 0.001$ are compared with untreated cells (0 min).

CONCLUSION, DISCUSSION ET PERSPECTIVES

Conclusion, discussion et perspectives

CONCLUSION GÉNÉRALE

L'ensemble des travaux réalisés au cours de ces trois années de doctorat visait à caractériser les effets antitumoraux pléiotropes du plasma froid atmosphérique dans le traitement du cholangiocarcinome, un cancer au pronostic sombre, en utilisant deux dispositifs distincts (articles 1 et 3). Le cathéter CAP s'est révélé efficace pour traiter plusieurs modèles précliniques de CCA, et des études menées sur des modèles porcins ont confirmé sa fiabilité et sa sécurité pour le patient et l'endoscopiste (article 2).

Durant ma thèse, mon principal objectif a été d'examiner les effets du cathéter à plasma sur diverses populations cellulaires tumorales, notamment les fibroblastes associés au cancer, les cellules endothéliales tumorales et les cellules immunitaires. L'article 1, qui synthétise l'ensemble de mes travaux, montre que le CAP induit des remodelages du microenvironnement tumoral qui pourraient limiter la progression du CCA. De plus, l'induction d'une mort cellulaire immunogène par le CAP a été démontrée *in vivo* et *in vitro*, suggérant un recrutement immunitaire accru au site tumoral.

En outre, une nouvelle approche thérapeutique innovante basée sur des vaccinations a été proposée, avec des résultats prometteurs pour le contrôle de la croissance tumorale, principalement grâce à un infiltrat immunitaire antitumoral renforcé. Ce travail a également permis de valider la faisabilité technique et l'applicabilité biologique de la source endoscopique, qui a été brevetée et qui est désormais au centre des expérimentations actuelles. Ainsi, une série d'expériences sur des modèles porcins vivants est en cours pour vérifier la sécurité du dispositif dans des voies biliaires, un contexte plus pertinent et plus proche de l'Homme.

En parallèle, des études *in vitro* avec un dispositif CAP piézoélectrique portable et moins encombrant ont confirmé les effets antitumoraux d'une nouvelle source plasma piézoélectrique (article 3).

Mes travaux de thèse s'inscrivent dans une recherche à la fois fondamentale et translationnelle. À l'aide de modèles précliniques, j'ai validé et renforcé certains résultats de

la littérature tout en gardant à l'esprit l'application clinique du projet. Mes résultats expérimentaux ont confirmé l'efficacité thérapeutique de la source plasma endoscopique, que j'espère voir utilisée en clinique dans le futur pour limiter la progression non seulement du CCA, mais aussi d'autres cancers.

DISCUSSION ET PERSPECTIVES

La recherche en oncoplasmathérapie doit reposer sur des expertises complémentaires

Comme pour toute nouvelle thérapie basée sur la physique ou la chimie, la recherche en oncoplasmathérapie nécessite une collaboration étroite entre des experts aux compétences complémentaires. Des connaissances en oncologie, biologie fondamentale, ingénierie et physico-chimie sont cruciales pour mener à bien des projets robustes visant à démontrer l'efficacité du CAP dans le traitement du cancer. Cela exige des ressources considérables et une répartition équitable des tâches de recherche, un aspect qui manque souvent dans la littérature. En effet, de nombreuses publications présentent une analyse limitée des concepts biologiques, se concentrant principalement sur la caractérisation de nouvelles sources de plasma et l'étude de la mort cellulaire sur des modèles 2D. La communauté de chercheurs en plasmathérapie est encore relativement restreinte, regroupant un nombre limité de groupes de recherche. En France, en 2024, par exemple, seuls quatre groupes portent cette expertise : le LPP à Paris, le GREMI à Orléans, l'Institut Pascal à Clermont-Ferrand et l'Institut Laplace à Toulouse. C'est en partie pour cette raison que l'Union Européenne a créé en 2022 un réseau de recherche interdisciplinaire nommé E-COST (*European Cooperative in Science and Technology*). Ce réseau, appelé PLASTHER (*Therapeutic Applications of Cold Plasmas*), rassemble des groupes de recherche issus de 24 pays européens et vise à valoriser les recherches en plasmathérapie en unifiant les expertises et les connaissances dans ce domaine, et en organisant des congrès annuels permettant aux scientifiques de partager leurs résultats expérimentaux.

En Europe, les avancées majeures dans l'utilisation du CAP en oncologie sont menées par les groupes d'Annemie Bogaerts en Belgique, de Sander Bekeschus en Allemagne, et de Christina Canal en Espagne. Aux États-Unis, les groupes de recherche les plus en pointe en

oncoplasmathérapie sont ceux de Vandana Miller à Philadelphie et de Michael Keidar à Washington. C'est d'ailleurs ce dernier qui, en collaboration avec le groupe de Jérôme Canady, a publié les résultats de la première étude clinique approuvée par la FDA utilisant le plasma froid à des fins thérapeutiques en oncologie.

Des débats au sein de la communauté scientifique

Malgré les avancées significatives réalisées dans le domaine de la médecine plasmatisque, des débats fondamentaux subsistent au sein de la communauté scientifique.

L'un des principaux enjeux réside dans la définition d'une dose unitaire pour les traitements par le CAP qui soit à la fois facilement mesurable et contrôlable. La grande variété des sources de plasma, des paramètres de fonctionnement, des conditions environnementales, des cibles biomédicales et des variables mesurables complexifie considérablement cette tâche. Cette diversité rend non seulement difficile, mais peut-être même impossible, l'élaboration d'une dose unitaire standard et le développement d'un contrôle prédictif des résultats. Le concept de « dose » est donc au cœur de nombreux débats au niveau international. Certains groupes de recherche se basent sur le temps d'exposition au CAP, tandis que d'autres s'appuient sur des paramètres physiques tels que la puissance déposée sur la cible biologique. En fonction de la pathologie à traiter et de son microenvironnement, il est donc essentiel de calibrer avec précision la dose de traitement plasmatisque afin d'obtenir des résultats thérapeutiques optimaux et comparables entre les investigateurs. Déterminer la dose adéquate, ou la fenêtre thérapeutique, est alors crucial pour standardiser le protocole et garantir un effet anticancéreux prévisible et reproductible. Alors, quelle est la « dose » de plasma idéale pour initier une réponse antitumorale ? Faut-il se concentrer sur la quantité de RONS générées ? Autant de questions qui restent sans réponse à ce jour.

Une solution potentielle pour relever ces défis pourrait être le développement de modèles mathématiques capables de prédire la réponse au traitement à partir de données préexistantes. L'utilisation de l'intelligence artificielle, combinée au partage de données au sein de la communauté de la médecine plasmatisque, pourrait alors accélérer les avancées du domaine, favorisant ainsi un impact sociétal plus large. Cette approche s'est déjà avérée prometteuse dans certains domaines comme la science des matériaux^{216,371}.

Un autre débat important au sein de la communauté concerne les mécanismes biologiques qui expliquent l'innocuité du plasma froid atmosphérique sur les cellules saines. Il a notamment été rapporté que presque toutes les lignées cellulaires, qu'elles soient malignes ou non, réagissent à l'exposition au CAP, y compris en présentant des effets cytotoxiques lors de traitements prolongés ³⁷². Une étude récente portant sur le criblage de 36 lignées tumorales et de deux types de cellules non malignes a révélé des différences de sensibilité parfois importantes entre les lignées de cellules tumorales les plus sensibles et les plus résistantes, tandis que les cellules non malignes ont montré une sensibilité modeste ³⁷³. De plus, il a été démontré que les lymphocytes primaires étaient plus sensibles à la mort cellulaire induite par le CAP que leurs homologues leucémiques ³³¹. Ces résultats suggèrent donc que les effets cytotoxiques du CAP ne dépendent pas uniquement du degré de malignité de la cible biologique, mais aussi de sa capacité à gérer le stress oxydatif et à l'interpréter en signaux de mort cellulaire. Par exemple, l'étude publiée par notre équipe en 2020 a montré qu'en réponse au plasma froid, les hépatocytes humains sains adaptaient l'expression de leurs défenses antioxydantes, ce qui a permis d'assurer leur survie par rapport aux cellules tumorales de CCA ²⁴⁷. Ces observations contrastent fortement avec l'idée selon laquelle l'innocuité du plasma froid serait due à la surexpression des aquaporines à la surface des cellules tumorales ^{231,248}. Il devient donc clair qu'une sélectivité anticancéreuse globale du traitement au plasma ne peut pas être revendiquée, du moins en conditions *in vitro*. Cela soulève également des questions sur la capacité des cellules tumorales à développer une résistance au traitement par plasma. À ce jour, une seule étude a montré que des traitements successifs de cellules humaines de mélanome pouvaient rendre ces cellules résistantes au stress oxydant induit par le CAP. Cette étude a révélé que les cellules résistantes avaient une préférence pour la glycolyse aérobie et étaient plus sensibles à la ferroptose ³⁶⁹. Ces résultats suggèrent que le développement d'une résistance au CAP pourrait modifier le métabolisme cellulaire et la vulnérabilité à d'autres formes de mort cellulaire. Il serait donc pertinent de poursuivre les recherches sur la possibilité d'acquisition d'une résistance au traitement CAP, en explorant cette dynamique dans d'autres types de modèles tumoraux. Une meilleure compréhension de ces mécanismes pourrait non seulement informer l'utilisation clinique du CAP, mais aussi guider l'élaboration de stratégies combinatoires visant à prévenir ou à surmonter cette résistance.

Enfin, bien qu'il existe une grande diversité de dispositifs et de modalités de traitement par le CAP, la majorité des études publiées sur l'utilisation du plasma froid en oncologie montrent des effets antitumoraux similaires dans de nombreux modèles précliniques. Le rôle des RONS en tant qu'effecteurs bioactifs principaux des traitements par CAP est largement reconnu. Cependant, il serait réducteur d'ignorer les effets physiologiques probables et les effets secondaires d'autres composants du plasma, tels que les rayonnements UV, les électrons libres, les radicaux, et le champ électromagnétique. Bien qu'il soit difficile de dissocier les propriétés chimiques du plasma de ses composantes physiques, des études ont montré que la quantité d'irradiation UV émise par le plasma est généralement très faible, voire négligeable³⁷⁴. Néanmoins, les contributions potentielles des autres éléments physiques du plasma méritent d'être explorées davantage, afin de mieux comprendre leur impact global sur le traitement et de minimiser les risques de dommages collatéraux ou d'effets indésirables. L'étude de l'impact du champ électromagnétique est d'ailleurs une tendance en vogue actuellement, avec notamment la mise en place de méthodes de traitement qui permettraient de s'affranchir des RONS générés par le plasma.

Un manque de connaissances sur les effets du plasma froid atmosphérique sur le stroma tumoral

Comme mentionné précédemment dans ce manuscrit, la majorité des travaux sur l'utilisation du plasma froid atmosphérique en oncologie ont été réalisés sur des modèles *in vitro*. Les études portant sur les populations stromales, notamment les CAFs, et sur le remodelage de la MEC, ont souvent été menées dans des contextes non tumoraux. En effet, étant donné que le plasma froid est principalement utilisé en dermatologie et pour la cicatrisation des plaies, très peu de recherches ont exploré ses effets sur les fibroblastes dans un contexte tumoral. Quant aux TECs, seules quelques études ont démontré un effet cytotoxique du CAP sur des modèles tumoraux. Par exemple, une étude publiée en 2020 sur le CHC a montré que le CAP inhibait la formation de vaisseaux sanguins dans un modèle *in ovo*³²¹. À ce jour, aucune étude *in vivo* n'a démontré de remodelage du microenvironnement tumoral non-immunitaire suite à une exposition au CAP. Par exemple, aucune étude à ma connaissance n'a montré de colorations au rouge Sirius ou de marquages endothéliaux sur des coupes tumorales dans les publications

traitant des effets antitumoraux du CAP. Néanmoins, une étude publiée en Juin 2024 menée sur un modèle *in ovo* de cancer pancréatique utilisant différents PTH a démontré que le traitement des tumeurs avec un PTH à base d'alginate et d'acide hyaluronique diminuait significativement la quantité de glycosaminoglycane (coloration bleu Alcian), mais contribuait à l'accumulation de collagène (coloration Trichrome de Masson) dans la MEC tumorale³⁷⁵. Ces observations ont notamment soulevé l'hypothèse que la modification de la chimie de l'acide hyaluronique contenu dans le gel par les espèces oxydantes du CAP pourrait notamment affecter les voies de signalisation régulées par ce composé. Néanmoins, pour notamment permettre la transition de la recherche fondamentale au domaine clinique, il est nécessaire d'approfondir ces connaissances au sujet du stroma tumoral. Ainsi, il serait donc pertinent d'explorer les modifications structurales du collagène tumoral induites par le CAP. Dans notre étude (article 1), les analyses de RNA-Séq réalisées sur des sphéroïdes multicellulaires ont révélé une dérégulation de l'organisation de la MEC après traitement. Une des perspectives de ce travail est notamment d'examiner par SHG l'organisation structurale du collagène sur des coupes tumorales, et de lier ces données avec des analyses protéomiques afin de valider les modifications oxydatives des composants de la MEC.

La majorité des publications basées sur des modèles *in vivo* ont montré des résultats très prometteurs. En effet, des études utilisant des modèles syngéniques ont démontré que le traitement des tumeurs par plasma froid entraînait une réduction significative du volume tumoral, ainsi qu'une augmentation de l'infiltrat immunitaire antitumoral. Ces résultats ont soulevé l'hypothèse que le CAP pourrait induire l'entrée des cellules tumorales dans la voie de l'ICD. Ainsi, de nombreuses recherches se sont concentrées sur l'exploration des signaux de danger (DAMPs) associés à l'ICD, tels que la libération d'ATP et de HMGB1 ainsi que l'externalisation de la calréticuline (CRT). Cependant, la seule méthode permettant de démontrer l'induction de l'ICD consiste à réaliser des expériences de vaccination prophylactique³⁴⁸. À ce jour, seules trois études ont véritablement mené à bien ces expériences après un traitement *in vitro* de cellules cancéreuses. La première, réalisée dans un modèle ectopique de cancer colorectal, a révélé que 90 % des souris immunisées avec des cellules traitées au CAP présentaient des volumes tumoraux inférieurs à la moyenne observée dans le groupe contrôle, suggérant une protection partielle conférée par la vaccination³¹³. Les deux autres études, menées sur le même modèle de mélanome, ont également montré un

ralentissement de la croissance tumorale chez les souris vaccinées ^{289,349}. Malgré cela, l'induction de l'ICD est souvent considérée comme acquise par de nombreux groupes de recherche, qui se limitent à démontrer *in vitro* la libération de DAMPs caractéristiques dans des lignées de cellules tumorales en 2D. Certaines publications vont un peu plus loin en montrant l'activation des DCs isolées de sang humain via des expériences de co-cultures, comme cela a été observé dans des modèles *in vitro* d'ostéosarcome ²³⁹, mais cela ne suffit pas à confirmer l'induction d'une ICD par le plasma froid atmosphérique. Cependant, cette approche vaccinale présente une limitation importante. En effet, les cellules mourantes ou mortes injectées lors de la première vaccination, supposées activer le système immunitaire antitumoral, doivent être inactives et ne pas induire de croissance tumorale. Or, il est souvent difficile de vérifier l'absence de développement tumoral à la suite de cette première injection en raison des contraintes éthiques liées à l'expérimentation animale. Les animaux sont généralement sacrifiés avant qu'une tumeur potentielle ne puisse se développer au site initial d'injection. Pour surmonter cette incertitude, il serait nécessaire d'inoculer le vaccin à des souris et de les observer sur une période prolongée afin de s'assurer que le vaccin ne provoque pas de formation tumorale à long terme.

Enfin, certaines études ont montré que l'utilisation du CAP pouvait induire un effet abscopal, impliquant ainsi une réponse systémique activant le système immunitaire. Ce phénomène a, par exemple, été observé dans des tumeurs murines de mélanome ³⁰⁴. Cependant, cette approche présente une limitation, car les dispositifs à plasma peuvent présenter des fuites. Étant donné que les animaux utilisés dans ces expériences sont généralement de petite taille, il est possible que le traitement direct d'une tumeur affecte également une autre tumeur située à proximité, si celle-ci n'est pas très éloignée du site de traitement. Pour démontrer rigoureusement un effet abscopal, il serait nécessaire de rechallenger les souris avec deux autres tumeurs une fois les traitements CAP terminés : l'une dérivée des mêmes cellules que la première, et l'autre provenant de cellules distinctes. Si un effet abscopal est présent, l'implantation de la tumeur dérivée des mêmes cellules devrait être inhibée ou ralentie, tandis que la croissance de l'autre tumeur ne devrait pas être affectée.

Les vaccinations antitumorales : une approche cliniquement possible ?

Ces dernières années, le CAP a été de plus en plus reconnu comme un inducteur efficace de l'ICD, notamment grâce à la détection des DAMPs caractéristiques, à des tests de vaccination, à l'observation d'effets abscopaux, et à des effets stimulants sur les fonctions des cellules immunitaires. Dans l'article 1 de cette thèse, une nouvelle approche thérapeutique basée sur des vaccinations utilisant des cellules traitées par le CAP a également été proposée. Cependant, la plupart des recherches sur l'induction de l'ICD par le CAP ont principalement utilisé une approche de traitement directe, laissant un vide dans l'exploration des capacités du CAP à stimuler l'immunité antitumorale via une approche indirecte. Les études qui ont examiné cette approche indirecte ont principalement utilisé des solutions traitées au plasma telles que du PBS ou des milieux de culture cellulaire. Pour que cette méthode devienne cliniquement viable, il est crucial d'utiliser des liquides cliniquement approuvés, tout en évaluant soigneusement leur efficacité et leur sécurité. À cet égard, une étude publiée en 2019 s'est penchée sur l'analyse de six liquides différents, tous cliniquement approuvés, après traitement au CAP ³⁷⁶. Les résultats ont montré que le chlorure de sodium (concentré à 0,9 %), parmi les différents liquides testés, offrait la plus grande stabilité des RONS ainsi que des effets antitumoraux cohérents dans une lignée de cancer colorectal humain. Cependant, la capacité de ces différents liquides cliniquement approuvés à induire l'ICD n'a pas encore été caractérisée en détail.

De plus, l'application clinique de vaccins antitumoraux préparés avec ces liquides nécessiterait un diagnostic extrêmement précoce des tumeurs. Comme mentionné dans l'article 1, cette approche vaccinale serait cliniquement envisageable seulement pour un très petit nombre de patients atteints de CCA en raison de la difficulté de diagnostiquer ce cancer à un stade précoce. Par ailleurs, l'idée d'injecter des cellules tumorales, même si elles sont inactivées, pourrait poser des défis éthiques importants et soulever des préoccupations chez les patients. La réticence à accepter une telle approche pourrait limiter l'application clinique de ces vaccins antitumoraux basés sur des cellules traitées au CAP, ce qui souligne la nécessité de développer des stratégies alternatives plus acceptables pour le traitement du cancer.

Les limites de l'utilisation du CAP en clinique

Bien que le CAP représente une avancée prometteuse dans le traitement du cancer, notamment par sa capacité à induire une réponse immunitaire antitumorale durable, son application clinique est actuellement limitée par plusieurs facteurs. L'approche directe, qui consiste à appliquer le CAP directement sur les tumeurs, est restreinte aux néoplasies facilement accessibles par les dispositifs actuels. Cela explique pourquoi les essais cliniques sur le CAP réalisés jusqu'à présent se sont concentrés sur des carcinomes épidermoïdes localement avancés de la tête et du cou, ou ont été menés dans un contexte peropératoire^{237,300}. Ces études, bien qu'encourageantes, présentent des lacunes notables, notamment l'absence de groupes témoins ou placebo, ce qui rend difficile l'évaluation complète de l'efficacité en termes de survie des patients. Pour élargir l'application du CAP aux tumeurs situées plus profondément dans le corps, de nombreuses équipes de recherche ont suggéré l'utilisation de dispositifs endoscopiques. En réponse à cette nécessité, notre groupe a développé un cathéter à plasma qu'il est possible d'insérer au sein d'un duodéroscope. D'autres équipes, comme un groupe français qui a conçu une source CAP endoscopique en 2013, ont montré des résultats prometteurs dans le traitement de modèles murins orthotopiques de cancers colorectal et pancréatique. Ces études ont rapporté des effets antitumoraux significatifs sans effets secondaires majeurs après deux expositions au CAP, tels que des brûlures ou des saignements, ce qui souligne le potentiel de cette approche pour le traitement direct des tumeurs internes³⁷⁷.

En revanche, l'approche indirecte, qui consiste à utiliser des liquides activés par le plasma, offre une solution moins invasive pour cibler les tumeurs profondes. Cette méthode permet l'injection répétée de ces solutions dans les tissus tumoraux, comme cela a été démontré dans le traitement de cellules cancéreuses ovariennes sous-cutanées chimio-résistantes chez la souris³⁷⁸. La poursuite de cette étude a même montré que la perfusion de cette solution dans la cavité abdominale de la souris pouvait supprimer les métastases intrapéritonéales du cancer ovarien³⁷⁹. Cependant, l'efficacité de cette méthode est limitée par la perte des RONS à courte durée de vie et la dilution des solutions activées par les liquides corporels, ce qui réduit leur impact thérapeutique. C'est pour cela que l'émergence des PTHs, qui permettent une action localisée et une meilleure rétention des RONS au site de traitement, représente une avancée significative dans ce domaine.

Malgré les bénéfices des deux approches, directe et indirecte, il reste à déterminer si leurs mécanismes d'action sont équivalents en termes d'efficacité anticancéreuse. La question de l'optimisation des traitements CAP pour différents types de cancers et la compréhension approfondie de leurs mécanismes d'action restent des défis cruciaux pour l'avenir de cette technologie.

Perspective clinique envisagée pour l'oncoplasmathérapie : l'intérêt des thérapies combinatoires

Une des perspectives les plus prometteuses pour l'utilisation du CAP dans le traitement du cancer repose sur des approches combinatoires. En effet, bien que le CAP seul ait démontré des effets anticancéreux significatifs, l'association de cette thérapie à d'autres traitements pourrait optimiser son efficacité et surmonter certaines limitations actuelles.

Ces dernières années, des études précliniques ont mis en évidence l'intérêt de combiner le CAP avec des chimiothérapies. Le CAP pourrait en effet potentialiser l'efficacité de ces médicaments en augmentant la perméabilité des membranes cellulaires tumorales, facilitant ainsi l'entrée des agents chimiothérapeutiques dans les cellules cancéreuses. Cela pourrait permettre de réduire la dose nécessaire de médicaments et, par conséquent, les effets secondaires associés à la chimiothérapie. Ces effets ont notamment été observés dans le traitement du glioblastome en association avec le témozolomide ³⁵⁴, ainsi que dans le traitement des cancers de la tête et du cou en combinaison avec la cisplatine ³⁶¹.

Avec l'essor actuel de l'immunothérapie, l'idée de combiner le CAP avec des inhibiteurs de points de contrôle immunitaire gagne en popularité. Des études précliniques ont montré des résultats très prometteurs, et cette approche pourrait également être appliquée au CCA. En effet, les résultats de l'article 1 ont révélé une élévation des niveaux de PD1 ou de PD-L1 sur plusieurs types cellulaires, tant *in vitro* qu'*in vivo*. Une piste intéressante serait de combiner le traitement plasma avec un inhibiteur de point de contrôle immunitaire, en particulier à la lumière de la récente mise sur le marché du durvalumab pour le traitement du CCA. Cependant, il a également été observé qu'après l'exposition des sphéroïdes multicellulaires au CAP l'expression de certaines cytokines, comme l'IL-6 était significativement élevée, ce qui pourrait favoriser un effet pro-tumoral si cette surexpression persiste sur le long terme. Une

perspective intéressante serait donc d'étudier les effets du CAP sur une période prolongée, en commençant les traitements dès les premières phases de la croissance tumorale, en les stoppant, et en analysant la progression tumorale au fil du temps jusqu'aux limites éthiques.

Le plasma froid atmosphérique représente ainsi une option thérapeutique prometteuse pour le traitement du cholangiocarcinome, et potentiellement pour le cancer en général. À l'avenir, il pourrait être possible de développer des protocoles de traitement endoscopiques standardisés, adaptés à la malignité rencontrée par le clinicien et permettant de moduler la dose de plasma nécessaire pour obtenir des effets antitumoraux optimaux. En outre, l'intégration de ces traitements avec des chimiothérapies ou des immunothérapies, en ajustant les doses de manière personnalisée pour chaque patient, pourrait constituer une approche idéale pour l'utilisation future du CAP.

Liste des publications et des communications scientifiques réalisées au cours de la thèse

Publications :

- Lekbaby B, Vaquero J, **Pavy A**, Minini M, Gonzalez-Sanchez E, Augustin J & Fouassier L (2024) **Experimental Model of Biliary Tract Cancers: Subcutaneous Xenograft of Human Cell Lines in Immunodeficient Nude Mice**. Methods of Molecular Biology (IF 1.4) doi: [10.1007/978-1-0716-3694-7_7](https://doi.org/10.1007/978-1-0716-3694-7_7)
- Minini M, **Pavy A**, Lekbaby B, Fouassier L (2024) **Crosstalk between cancer cell plasticity and immune microenvironment in cholangiocarcinoma**. Hepatoma Research (IF 1.67) doi: 10.20517/2394-5079.2023.69
- Vaquero J, **Pavy A**, Gonzalez-Sanchez E, Meredith M, Arbelaiz A, Fouassier L (2022) **Genetic alterations shaping tumor response to anti-EGFR therapies**. Drug Resistance Updates (IF 22.841) doi: [10.1016/j.drug.2022.100863](https://doi.org/10.1016/j.drug.2022.100863)
- Decauchy H, **Pavy A**, Camus M, Fouassier L, Dufour T (2022) **Cold plasma endoscopy applied to biliary ducts: feasibility risk assessment on human-like and porcine models for the treatment of cholangiocarcinoma**. Journal of Physics D : Applied Physics (IF 3.409) doi :[10.1088/1361-6463/ac8c4d](https://doi.org/10.1088/1361-6463/ac8c4d)

Communications scientifiques :

- **Pavy A**, Decauchy H, Soulier Manon, Lekbaby B, Minini M, Geraud K, Aoudjehane L, Augustin J, Camus M, Pol J, Dufour T, Fouassier L: Unraveling the multifaceted antitumor effects of cold atmospheric plasma on cholangiocarcinoma (**Communication Orale**). 2nd Annual Meeting of COST Action PlasTHER, Septembre 2023 – Bologne, Italie
- **Pavy A**, Decauchy H, Soulier Manon, Lekbaby B, Minini M, Geraud K, Aoudjehane L, Augustin J, Camus M, Pol J, Dufour T, Fouassier L: Deciphering the direct and indirect antitumoral effects of Cold Atmospheric Plasma - Application to the treatment of Cholangiocarcinoma – (**Communication Orale**). 8th International Workshop on Plasma for Cancer Treatment (IWPCT), Mars 2023 – Raleigh, Caroline du Nord, USA

- **Pavy A**, Decauchy H, Lekbaby B, Minini M, Laroche S, Vallette M, Aoudjehane L, Pol J, Camus M, Dufour T, Fouassier L: Direct and Indirect antitumoral effects of Cold Atmospheric Plasma: a disruptive technological approach in the local treatment of Cholangiocarcinoma (**Communication orale**). ACABI, Septembre 2022 – Paris, France
- **Pavy A**, Decauchy H, Lekbaby B, Minini M, Laroche S, Vallette M, Aoudjehane L, Pol J, Camus M, Dufour T, Fouassier L: Direct and Indirect antitumoral effects of Cold Atmospheric Plasma: a disruptive technological approach in the local treatment of Cholangiocarcinoma (**Poster**). ENSCCA, Juillet 2022 – Édimbourg, Écosse
- **Pavy A**, Decauchy H, Lekbaby B, Minini M, Laroche S, Vallette M, Aoudjehane L, Pol J, Camus M, Dufour T, Fouassier L: Remodeling of Cholangiocarcinoma Microenvironment by Cold Atmospheric Plasma through *in vitro* approach (**Communication Orale**). International Conference on Plasma Medecine (ICPM9), Juin 2022 – Utrecht, Pays-Bas
- **Pavy A**, Decauchy H, Lekbaby B, Minini M, Laroche S, Vallette M, Aoudjehane L, Pol J, Camus M, Dufour T, Fouassier L: Direct and Indirect antitumoral effects of Cold Atmospheric Plasma: a disruptive technological approach in the local treatment of Cholangiocarcinoma (**Poster**). EASL Liver Cancer Summit, Février 2022 – Portugal (distanciel)

BIBLIOGRAPHIE

Bibliographie

1. Liver: Anatomy and Functions. <https://www.hopkinsmedicine.org/health/conditions-and-diseases/liver-anatomy-and-functions> (2019).
2. López-Terrada, D. *et al.* Towards an international pediatric liver tumor consensus classification: proceedings of the Los Angeles COG liver tumors symposium. *Modern Pathology* **27**, 472–491 (2014).
3. Ben-Moshe, S. & Itzkovitz, S. Spatial heterogeneity in the mammalian liver. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* **16**, 395–410 (2019).
4. Trefts, E., Gannon, M. & Wasserman, D. H. The liver. *Current Biology* **27**, R1147–R1151 (2017).
5. Manco, R. & Itzkovitz, S. Liver zonation. *Journal of Hepatology* **74**, 466–468 (2021).
6. Jungermann, K. & Katz, N. Functional Hepatocellular Heterogeneity. *Hepatology* **2**, 385S–395S (1982).
7. Goel, C., Monga, S. P. & Nejak-Bowen, K. Role and Regulation of Wnt/ β -Catenin in Hepatic Perivenous Zonation and Physiological Homeostasis. *The American Journal of Pathology* **192**, 4–17 (2022).
8. Racanelli, V. & Rehermann, B. The liver as an immunological organ. *Hepatology* **43**, S54–S62 (2006).
9. Gissen, P. & Arias, I. M. Structural and functional hepatocyte polarity and liver disease. *Journal of Hepatology* **63**, 1023–1037 (2015).
10. Yoo, K.-S., Lim, W. T. & Choi, H. S. Biology of Cholangiocytes: From Bench to Bedside. *Gut and Liver* **10**, 687–698 (2016).
11. Kamm, D. R. & McCommis, K. S. Hepatic stellate cells in physiology and pathology. *The*

- Journal of Physiology* **600**, 1825–1837 (2022).
12. Gracia-Sancho, J., Caparrós, E., Fernández-Iglesias, A. & Francés, R. Role of liver sinusoidal endothelial cells in liver diseases. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* **18**, 411–431 (2021).
 13. Nguyen-Lefebvre, A. T. & Horuzsko, A. Kupffer Cell Metabolism and Function. *J Enzymol Metab* **1**, 101 (2015).
 14. Roth, S., Gong, W. & Gressner, A. M. Expression of different isoforms of TGF- β and the latent TGF- β binding protein (LTBP) by rat Kupffer cells. *Journal of Hepatology* **29**, 915–922 (1998).
 15. Kolios, G., Valatas, V. & Kouroumalis, E. Role of Kupffer cells in the pathogenesis of liver disease. *World Journal of Gastroenterology* **12**, 7413–7420 (2006).
 16. Pradere, J.-P. *et al.* Hepatic macrophages but not dendritic cells contribute to liver fibrosis by promoting the survival of activated hepatic stellate cells in mice. *Hepatology* **58**, 1461–1473 (2013).
 17. Lanthier, N. *et al.* Kupffer cell depletion prevents but has no therapeutic effect on metabolic and inflammatory changes induced by a high-fat diet. *The FASEB Journal* **25**, 4301–4311 (2011).
 18. Neyrinck, A. M. *et al.* Critical role of Kupffer cells in the management of diet-induced diabetes and obesity. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **385**, 351–356 (2009).
 19. Robinson, M. W., Harmon, C. & O’Farrelly, C. Liver immunology and its role in inflammation and homeostasis. *Cell Mol Immunol* **13**, 267–276 (2016).
 20. Hammerich, L. & Tacke, F. Role of gamma-delta T cells in liver inflammation and fibrosis. *World Journal of Gastrointestinal Pathophysiology* **5**, 107–113 (2014).

21. Bhatia, S. N., Underhill, G. H., Zaret, K. S. & Fox, I. J. Cell and tissue engineering for liver disease. *Science Translational Medicine* **6**, 245sr2-245sr2 (2014).
22. Alamri, Z. Z. The role of liver in metabolism: an updated review with physiological emphasis. *International Journal of Basic & Clinical Pharmacology* **7**, 2271–2276 (2018).
23. Chiang, J. Liver Physiology: Metabolism and Detoxification. in *Pathobiology of Human Disease* 1770–1782 (2014). doi:10.1016/B978-0-12-386456-7.04202-7.
24. Jones, J. G. Hepatic glucose and lipid metabolism. *Diabetologia* **59**, 1098–1103 (2016).
25. Almazroo, O. A., Miah, M. K. & Venkataramanan, R. Drug Metabolism in the Liver. *Clinics in Liver Disease* **21**, 1–20 (2017).
26. Michalopoulos, G. K. & Bhushan, B. Liver regeneration: biological and pathological mechanisms and implications. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* **18**, 40–55 (2021).
27. Huh, C.-G. et al. Hepatocyte growth factor/c-met signaling pathway is required for efficient liver regeneration and repair. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**, 4477–4482 (2004).
28. Selzner, N. et al. ICAM-1 triggers liver regeneration through leukocyte recruitment and Kupffer cell-dependent release of TNF- α /IL-6 in mice. *Gastroenterology* **124**, 692–700 (2003).
29. Aizarani, N. et al. A human liver cell atlas reveals heterogeneity and epithelial progenitors. *Nature* **572**, 199–204 (2019).
30. Collins, S. L., Stine, J. G., Bisanz, J. E., Okafor, C. D. & Patterson, A. D. Bile acids and the gut microbiota: metabolic interactions and impacts on disease. *Nat Rev Microbiol* **21**, 236–247 (2023).
31. Fleishman, J. S. & Kumar, S. Bile acid metabolism and signaling in health and disease: molecular mechanisms and therapeutic targets. *Sig Transduct Target Ther* **9**, 1–51 (2024).

32. Housset, C., Chrétien, Y., Debray, D. & Chignard, N. Functions of the Gallbladder. in *Comprehensive Physiology* 1549–1577 (John Wiley & Sons, Ltd, 2016). doi:10.1002/cphy.c150050.
33. Definition of gallbladder - NCI Dictionary of Cancer Terms - NCI. <https://www.cancer.gov/publications/dictionaries/cancer-terms/def/gallbladder> (2011).
34. Wang, H. *et al.* Expert Consensus on Pathological Diagnosis of Intrahepatic Cholangiocarcinoma (2022 version). *Journal of Clinical and Translational Hepatology* **11**, 1553–1564 (2023).
35. de Jong, I. E. M., van den Heuvel, M. C., Wells, R. G. & Porte, R. J. The heterogeneity of the biliary tree. *Journal of Hepatology* **75**, 1236–1238 (2021).
36. Banales, J. M. *et al.* Cholangiocyte pathobiology. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* **16**, 269–281 (2019).
37. Marzioni, M. *et al.* Functional Heterogeneity of Cholangiocytes. *Seminars in Liver Disease* **22**, 227–240 (2002).
38. Lazaridis, K. N. & LaRusso, N. F. The Cholangiopathies. *Mayo Clinic Proceedings* **90**, 791–800 (2015).
39. gramproject. Primary Biliary Cholangitis (PBC) vs Primary Sclerosing Cholangitis (PSC). *Gram Project* <https://gramproject.com/diagram/primary-biliary-cholangitis-pbc-vs-primary-sclerosing-cholangitis-psc/>.
40. Soret, P.-A., Chazouillères, O. & Corpechot, C. [Primary biliary cholangitis]. *Rev Prat* **71**, 885–891 (2021).
41. Liu, X. *et al.* Genome-wide meta-analyses identify three loci associated with primary biliary cirrhosis. *Nat Genet* **42**, 658–660 (2010).

42. Mells, G. F. *et al.* Genome-wide association study identifies 12 new susceptibility loci for primary biliary cirrhosis. *Nat Genet* **43**, 329–332 (2011).
43. European Association for the Study of the Liver. EASL Clinical Practice Guidelines: Management of cholestatic liver diseases. *Journal of Hepatology* **51**, 237–267 (2009).
44. Sharafinski, M. E., Meyers, A. B. & Vorona, G. Pediatric cholangiopathies: diseases of the gallbladder and biliary tract. *Abdom Radiol* **42**, 69–85 (2017).
45. Siddiqui, A. I. & Ahmad, T. Biliary Atresia. in *StatPearls* (StatPearls Publishing, Treasure Island (FL), 2024).
46. Kohut, T. J., Gilbert, M. A. & Loomes, K. M. Alagille Syndrome: A Focused Review on Clinical Features, Genetics, and Treatment. *Seminars in Liver Disease* **41**, 525–537 (2021).
47. Hassan, S. & Hertel, P. Overview of Progressive Familial Intrahepatic Cholestasis. *Clin Liver Dis* **26**, 371–390 (2022).
48. Zdanowicz, K., Daniluk, J., Lebensztejn, D. M. & Daniluk, U. The Etiology of Cholelithiasis in Children and Adolescents-A Literature Review. *Int J Mol Sci* **23**, 13376 (2022).
49. Hanahan, D. Hallmarks of Cancer: New Dimensions. *Cancer Discovery* **12**, 31–46 (2022).
50. Banales, J. M. *et al.* Cholangiocarcinoma 2020: the next horizon in mechanisms and management. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* **17**, 557–588 (2020).
51. Lendvai, G. *et al.* Cholangiocarcinoma: Classification, Histopathology and Molecular Carcinogenesis. *Pathol Oncol Res* **26**, 3–15 (2020).
52. Bragazzi, M. C. New insights into cholangiocarcinoma: multiple stems and related cell lineages of origin. *aog* (2017) doi:10.20524/aog.2017.0209.
53. Louis, C., Papoutsoglou, P. & Coulouarn, C. Molecular classification of cholangiocarcinoma. *Current Opinion in Gastroenterology* **36**, 57 (2020).
54. Putra, J. *et al.* Molecular profiling of intrahepatic and extrahepatic cholangiocarcinoma

- using next generation sequencing. *Exp Mol Pathol* **99**, 240–244 (2015).
55. Nakamura, H. *et al.* Genomic spectra of biliary tract cancer. *Nat Genet* **47**, 1003–1010 (2015).
 56. Nepal, C. *et al.* Genomic perturbations reveal distinct regulatory networks in intrahepatic cholangiocarcinoma. *Hepatology* **68**, 949 (2018).
 57. Andersen, J. B. *et al.* Genomic and Genetic Characterization of Cholangiocarcinoma Identifies Therapeutic Targets for Tyrosine Kinase Inhibitors. *Gastroenterology* **142**, 1021-1031.e15 (2012).
 58. Makawita, S. *et al.* Infigratinib in patients with advanced cholangiocarcinoma with FGFR2 gene fusions/translocations: the PROOF 301 trial. *Future Oncol* **16**, 2375–2384 (2020).
 59. Zhu, A. X. *et al.* Final Overall Survival Efficacy Results of Ivosidenib for Patients With Advanced Cholangiocarcinoma With IDH1 Mutation: The Phase 3 Randomized Clinical ClarIDHy Trial. *JAMA Oncol* **7**, 1669–1677 (2021).
 60. Abou-Alfa, G. K. *et al.* Ivosidenib in IDH1-mutant, chemotherapy-refractory cholangiocarcinoma (ClarIDHy): a multicentre, randomised, double-blind, placebo-controlled, phase 3 study. *Lancet Oncol* **21**, 796–807 (2020).
 61. O'Rourke, C. J., Lafuente-Barquero, J. & Andersen, J. B. Epigenome Remodeling in Cholangiocarcinoma. *Trends Cancer* **5**, 335–350 (2019).
 62. Goepfert, B. *et al.* Global alterations of DNA methylation in cholangiocarcinoma target the Wnt signaling pathway. *Hepatology* **59**, 544–554 (2014).
 63. Jusakul, A. *et al.* Whole-Genome and Epigenomic Landscapes of Etiologically Distinct Subtypes of Cholangiocarcinoma. *Cancer Discovery* **7**, 1116–1135 (2017).
 64. Gentilini, A., Pastore, M., Marra, F. & Raggi, C. The Role of Stroma in Cholangiocarcinoma: The Intriguing Interplay between Fibroblastic Component, Immune Cell Subsets and

- Tumor Epithelium. *International Journal of Molecular Sciences* **19**, 2885 (2018).
65. Sulpice, L. *et al.* Molecular profiling of stroma identifies osteopontin as an independent predictor of poor prognosis in intrahepatic cholangiocarcinoma. *Hepatology* **58**, 1992–2000 (2013).
 66. Kawamura, E., Matsubara, T. & Kawada, N. New Era of Immune-Based Therapy in Intrahepatic Cholangiocarcinoma. *Cancers (Basel)* **15**, 3993 (2023).
 67. Job, S. *et al.* Identification of Four Immune Subtypes Characterized by Distinct Composition and Functions of Tumor Microenvironment in Intrahepatic Cholangiocarcinoma. *Hepatology* **72**, 965 (2020).
 68. Martin-Serrano, M. A. *et al.* Novel microenvironment-based classification of intrahepatic cholangiocarcinoma with therapeutic implications. *Gut* **72**, 736–748 (2023).
 69. Fan, Z. *et al.* A transcriptome based molecular classification scheme for cholangiocarcinoma and subtype-derived prognostic biomarker. *Nat Commun* **15**, 484 (2024).
 70. Dong, L. *et al.* Proteogenomic characterization identifies clinically relevant subgroups of intrahepatic cholangiocarcinoma. *Cancer Cell* **40**, 70-87.e15 (2022).
 71. Cho, S. Y. *et al.* Refining Classification of Cholangiocarcinoma Subtypes via Proteogenomic Integration Reveals New Therapeutic Prospects. *Gastroenterology* **164**, 1293–1309 (2023).
 72. Saini, A. *et al.* Radiogenomics and Radiomics in Liver Cancers. *Diagnostics (Basel)* **9**, 4 (2018).
 73. Viganò, L. *et al.* CT-based radiogenomics of intrahepatic cholangiocarcinoma. *Digestive and Liver Disease* (2024) doi:10.1016/j.dld.2024.06.033.
 74. Alaimo, L. *et al.* Multi-Omics Classification of Intrahepatic Cholangiocarcinoma: A

- Systematic Review and Meta-Analysis. *Cancers* **16**, 2596 (2024).
75. Qurashi, M., Vithayathil, M. & Khan, S. A. Epidemiology of cholangiocarcinoma. *European Journal of Surgical Oncology* **0**, (2023).
 76. Matsumoto, K. *et al.* Hepatitis B and C virus infection is a risk factor for the development of cholangiocarcinoma. *Intern Med* **53**, 651–654 (2014).
 77. Clements, O., Eliahoo, J., Kim, J. U., Taylor-Robinson, S. D. & Khan, S. A. Risk factors for intrahepatic and extrahepatic cholangiocarcinoma: A systematic review and meta-analysis. *Journal of Hepatology* **72**, 95–103 (2020).
 78. Bertuccio, P. *et al.* Global trends in mortality from intrahepatic and extrahepatic cholangiocarcinoma. *Journal of Hepatology* **71**, 104–114 (2019).
 79. Rodrigues, P. M. *et al.* Pathogenesis of Cholangiocarcinoma. *Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease* **16**, 433–463 (2021).
 80. Woo, H. G. *et al.* Identification of a cholangiocarcinoma-like gene expression trait in hepatocellular carcinoma. *Cancer Res* **70**, 3034–3041 (2010).
 81. Komuta, M. *et al.* Histological diversity in cholangiocellular carcinoma reflects the different cholangiocyte phenotypes. *Hepatology* **55**, 1876–1888 (2012).
 82. Cardinale, V. *et al.* Mucin-producing cholangiocarcinoma might derive from biliary tree stem/progenitor cells located in peribiliary glands. *Hepatology* **55**, 2041–2042 (2012).
 83. Brunt, E. *et al.* cHCC-CCA: Consensus terminology for primary liver carcinomas with both hepatocytic and cholangiocytic differentiation. *Hepatology* **68**, 113 (2018).
 84. Clinicopathological study on cholangiolocellular carcinoma suggesting hepatic progenitor cell origin - Komuta - 2008 - *Hepatology* - Wiley Online Library. <https://aasldpubs.onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/hep.22238>.
 85. Fan, B. *et al.* Cholangiocarcinomas can originate from hepatocytes in mice. *J Clin Invest*

- 122, 2911–2915 (2012).
86. Moeini, A., Haber, P. K. & Sia, D. Cell of origin in biliary tract cancers and clinical implications. *JHEP Reports* **3**, 100226 (2021).
 87. Zou, S. *et al.* Mutational landscape of intrahepatic cholangiocarcinoma. *Nat Commun* **5**, 5696 (2014).
 88. Fujimoto, A. *et al.* Whole-genome mutational landscape of liver cancers displaying biliary phenotype reveals hepatitis impact and molecular diversity. *Nat Commun* **6**, 6120 (2015).
 89. Jiao, Y. *et al.* Exome sequencing identifies frequent inactivating mutations in BAP1, ARID1A and PBRM1 in intrahepatic cholangiocarcinomas. *Nat Genet* **45**, 1470–1473 (2013).
 90. Tanaka, M. *et al.* KRAS mutation in intrahepatic cholangiocarcinoma: Linkage with metastasis-free survival and reduced E-cadherin expression. *Liver Int* **42**, 2329–2340 (2022).
 91. Churi, C. R. *et al.* Mutation Profiling in Cholangiocarcinoma: Prognostic and Therapeutic Implications. *PLOS ONE* **9**, e115383 (2014).
 92. Wang, P. *et al.* Mutations in isocitrate dehydrogenase 1 and 2 occur frequently in intrahepatic cholangiocarcinomas and share hypermethylation targets with glioblastomas. *Oncogene* **32**, 3091–3100 (2013).
 93. Salati, M. *et al.* IDH Signalling Pathway in Cholangiocarcinoma: From Biological Rationale to Therapeutic Targeting. *Cancers (Basel)* **12**, 3310 (2020).
 94. Qiu, Y. *et al.* miR-204 inhibits epithelial to mesenchymal transition by targeting slug in intrahepatic cholangiocarcinoma cells. *Cell Physiol Biochem* **32**, 1331–1341 (2013).
 95. Aoki, S. *et al.* Aberrant activation of Notch signaling in extrahepatic cholangiocarcinoma: clinicopathological features and therapeutic potential for cancer stem cell-like

- properties. *BMC Cancer* **16**, 854 (2016).
96. Huntzicker, E. G. *et al.* Differential effects of targeting Notch receptors in a mouse model of liver cancer. *Hepatology* **61**, 942–952 (2015).
 97. Sekiya, S. & Suzuki, A. Intrahepatic cholangiocarcinoma can arise from Notch-mediated conversion of hepatocytes. *J Clin Invest* **122**, 3914–3918 (2012).
 98. Perugorria, M. J. *et al.* Wnt- β -catenin signalling in liver development, health and disease. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* **16**, 121–136 (2019).
 99. Moeini, A., Sia, D., Bardeesy, N., Mazzaferro, V. & Llovet, J. M. Molecular Pathogenesis and Targeted Therapies for Intrahepatic Cholangiocarcinoma. *Clin Cancer Res* **22**, 291–300 (2016).
 100. Sirica, A.-E. Role of ErbB family receptor tyrosine kinases in intrahepatic cholangiocarcinoma. *World J Gastroenterol* **14**, 7033–7058 (2008).
 101. Vaquero, J. *et al.* The IGF2/IR/IGF1R Pathway in Tumor Cells and Myofibroblasts Mediates Resistance to EGFR Inhibition in Cholangiocarcinoma. *Clin Cancer Res* **24**, 4282–4296 (2018).
 102. Philip, P. A. *et al.* Phase II study of erlotinib in patients with advanced biliary cancer. *J Clin Oncol* **24**, 3069–3074 (2006).
 103. Dai, J. *et al.* Impact of bile acids on the growth of human cholangiocarcinoma via FXR. *Journal of Hematology & Oncology* **4**, 41 (2011).
 104. Jaiswal, M., LaRusso, N. F., Burgart, L. J. & Gores, G. J. Inflammatory cytokines induce DNA damage and inhibit DNA repair in cholangiocarcinoma cells by a nitric oxide-dependent mechanism. *Cancer Res* **60**, 184–190 (2000).
 105. Kobayashi, S., Werneburg, N. W., Bronk, S. F., Kaufmann, S. H. & Gores, G. J. Interleukin-6 contributes to Mcl-1 up-regulation and TRAIL resistance via an Akt-signaling pathway

- in cholangiocarcinoma cells. *Gastroenterology* **128**, 2054–2065 (2005).
106. Cai, C., Wang, X., Fu, Q. & Chen, A. The VEGF expression associated with prognosis in patients with intrahepatic cholangiocarcinoma: a systematic review and meta-analysis. *World J Surg Oncol* **20**, 40 (2022).
107. Fabris, L., Sato, K., Alpini, G. & Strazzabosco, M. The Tumor Microenvironment in Cholangiocarcinoma Progression. *Hepatology* **73 Suppl 1**, 75–85 (2021).
108. Zhang, M. *et al.* Single-cell transcriptomic architecture and intercellular crosstalk of human intrahepatic cholangiocarcinoma. *Journal of Hepatology* **73**, 1118–1130 (2020).
109. Louis, C., Edeline, J. & Coulouarn, C. Targeting the tumor microenvironment in cholangiocarcinoma: implications for therapy. *Expert Opinion on Therapeutic Targets* **25**, 153–162 (2021).
110. Cadamuro, M. *et al.* Platelet-derived growth factor-D enables liver myofibroblasts to promote tumor lymphangiogenesis in cholangiocarcinoma. *J Hepatol* **70**, 700–709 (2019).
111. Cantalops Vilà, P., Ravichandra, A., Agirre Lizaso, A., Perugorria, M. J. & Affò, S. Heterogeneity, crosstalk, and targeting of cancer-associated fibroblasts in cholangiocarcinoma. *Hepatology* **79**, 941 (2024).
112. Chuaysri, C. *et al.* Alpha-smooth muscle actin-positive fibroblasts promote biliary cell proliferation and correlate with poor survival in cholangiocarcinoma. *Oncol Rep* **21**, 957–969 (2009).
113. Mertens, J. C. *et al.* Therapeutic effects of deleting cancer-associated fibroblasts in cholangiocarcinoma. *Cancer Res* **73**, 897–907 (2013).
114. Cadamuro, M. *et al.* Platelet-derived growth factor-D and Rho GTPases regulate recruitment of cancer-associated fibroblasts in cholangiocarcinoma. *Hepatology* **58**,

- 1042–1053 (2013).
115. Tsuchida, T. & Friedman, S. L. Mechanisms of hepatic stellate cell activation. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* **14**, 397–411 (2017).
116. Ying, F., Chan, M. S. M. & Lee, T. K. W. Cancer-Associated Fibroblasts in Hepatocellular Carcinoma and Cholangiocarcinoma. *Cellular and Molecular Gastroenterology and Hepatology* **15**, 985–999 (2023).
117. Cadamuro, M., Morton, S. D., Strazzabosco, M. & Fabris, L. Unveiling the role of tumor reactive stroma in cholangiocarcinoma: an opportunity for new therapeutic strategies. *Transl Gastrointest Cancer* **2**, 130–144 (2013).
118. Høgdall, D., Lewinska, M. & Andersen, J. B. Desmoplastic Tumor Microenvironment and Immunotherapy in Cholangiocarcinoma. *Trends Cancer* **4**, 239–255 (2018).
119. Monteran, L. & Erez, N. The Dark Side of Fibroblasts: Cancer-Associated Fibroblasts as Mediators of Immunosuppression in the Tumor Microenvironment. *Front Immunol* **10**, 1835 (2019).
120. Minini, M. & Fouassier, L. Cancer-Associated Fibroblasts and Extracellular Matrix: Therapeutical Strategies for Modulating the Cholangiocarcinoma Microenvironment. *Current Oncology* **30**, 4185–4196 (2023).
121. Zanconato, F., Cordenonsi, M. & Piccolo, S. YAP/TAZ at the Roots of Cancer. *Cancer Cell* **29**, 783–803 (2016).
122. Tahkola, K. *et al.* Stromal hyaluronan accumulation is associated with low immune response and poor prognosis in pancreatic cancer. *Sci Rep* **11**, 12216 (2021).
123. Gennisson, J.-L., Deffieux, T., Fink, M. & Tanter, M. Élastographie ultrasonore : principes et procédés. *Journal de Radiologie Diagnostique et Interventionnelle* **94**, 504–513 (2013).
124. Nicolás-Boluda, A. *et al.* Photothermal Depletion of Cancer-Associated Fibroblasts

- Normalizes Tumor Stiffness in Desmoplastic Cholangiocarcinoma. *ACS Nano* **14**, 5738–5753 (2020).
125. Roy, S., Glaser, S. & Chakraborty, S. Inflammation and Progression of Cholangiocarcinoma: Role of Angiogenic and Lymphangiogenic Mechanisms. *Front. Med.* **6**, (2019).
126. Sha, M. *et al.* Tumor-associated lymphangiogenesis predicts unfavorable prognosis of intrahepatic cholangiocarcinoma. *BMC Cancer* **19**, 208 (2019).
127. Dudley, A. C. Tumor Endothelial Cells. *Cold Spring Harb Perspect Med* **2**, a006536 (2012).
128. Mariotti, V., Fiorotto, R., Cadamuro, M., Fabris, L. & Strazzabosco, M. New insights on the role of vascular endothelial growth factor in biliary pathophysiology. *JHEP Reports* **3**, 100251 (2021).
129. Pezzuto, A. & Carico, E. Role of HIF-1 in Cancer Progression: Novel Insights. A Review. *Curr Mol Med* **18**, 343–351 (2018).
130. Wang, J., Loeuillard, E., Gores, G. J. & Ilyas, S. I. Cholangiocarcinoma: what are the most valuable therapeutic targets – cancer-associated fibroblasts, immune cells, or beyond T cells? *Expert Opin Ther Targets* **25**, 835–845 (2021).
131. Tomlinson, J. L., Valle, J. W. & Ilyas, S. I. Immunobiology of cholangiocarcinoma. *Journal of Hepatology* **79**, 867–875 (2023).
132. Yang, S. *et al.* Tumor immune microenvironment and the current immunotherapy of cholangiocarcinoma (Review). *International Journal of Oncology* **63**, 1–23 (2023).
133. Yu, X., Zhu, L., Wang, T. & Chen, J. Immune microenvironment of cholangiocarcinoma: Biological concepts and treatment strategies. *Front. Immunol.* **14**, (2023).
134. Paillet, J., Kroemer, G. & Pol, J. G. Immune contexture of cholangiocarcinoma. *Curr Opin Gastroenterol* **36**, 70–76 (2020).

135. Loilome, W. *et al.* Activated macrophages promote Wnt/ β -catenin signaling in cholangiocarcinoma cells. *Tumour Biol* **35**, 5357–5367 (2014).
136. Zhou, S.-L. *et al.* CXCL5 contributes to tumor metastasis and recurrence of intrahepatic cholangiocarcinoma by recruiting infiltrative intratumoral neutrophils. *Carcinogenesis* **35**, 597–605 (2014).
137. Parker, K. H., Beury, D. W. & Ostrand-Rosenberg, S. Myeloid-Derived Suppressor Cells: Critical Cells Driving Immune Suppression in the Tumor Microenvironment. *Adv Cancer Res* **128**, 95–139 (2015).
138. Lin, Y. *et al.* CAFs shape myeloid-derived suppressor cells to promote stemness of intrahepatic cholangiocarcinoma through 5-lipoxygenase. *Hepatology* **75**, 28–42 (2022).
139. Loeuillard, E. *et al.* Targeting tumor-associated macrophages and granulocytic myeloid-derived suppressor cells augments PD-1 blockade in cholangiocarcinoma. *J Clin Invest* **130**, 5380–5396 (2020).
140. Chiossone, L., Dumas, P.-Y., Vienne, M. & Vivier, E. Natural killer cells and other innate lymphoid cells in cancer. *Nat Rev Immunol* **18**, 671–688 (2018).
141. Fukuda, Y. *et al.* Endogenous CXCL9 affects prognosis by regulating tumor-infiltrating natural killer cells in intrahepatic cholangiocarcinoma. *Cancer Sci* **111**, 323–333 (2020).
142. Morisaki, T. *et al.* Combining cetuximab with killer lymphocytes synergistically inhibits human cholangiocarcinoma cells in vitro. *Anticancer Res* **32**, 2249–2256 (2012).
143. Jung, I. H. *et al.* In Vivo Study of Natural Killer (NK) Cell Cytotoxicity Against Cholangiocarcinoma in a Nude Mouse Model. *In Vivo* **32**, 771–781 (2018).
144. Kim, H.-D. *et al.* Spatial Distribution and Prognostic Implications of Tumor-Infiltrating FoxP3⁺ CD4⁺ T Cells in Biliary Tract Cancer. *Cancer Res Treat* **53**, 162–171 (2021).
145. Liu, D. *et al.* The role of tumor-infiltrating lymphocytes in cholangiocarcinoma. *J Exp Clin*

- Cancer Res* **41**, 127 (2022).
146. Whiteside, T. L. What are regulatory T cells (Treg) regulating in cancer and why? *Semin Cancer Biol* **22**, 327–334 (2012).
147. Böttcher, J. P. & Reis e Sousa, C. The Role of Type 1 Conventional Dendritic Cells in Cancer Immunity. *Trends Cancer* **4**, 784–792 (2018).
148. Wallet, M. A., Sen, P. & Tisch, R. Immunoregulation of Dendritic Cells. *Clin Med Res* **3**, 166–175 (2005).
149. Li, Z. *et al.* The role of CD47-SIRP α immune checkpoint in tumor immune evasion and innate immunotherapy. *Life Sci* **273**, 119150 (2021).
150. Vaeteewoottacharn, K. *et al.* Attenuation of CD47-SIRP α Signal in Cholangiocarcinoma Potentiates Tumor-Associated Macrophage-Mediated Phagocytosis and Suppresses Intrahepatic Metastasis. *Transl Oncol* **12**, 217–225 (2019).
151. Kitano, Y. *et al.* Clinical Significance of PD-L1 Expression in Both Cancer and Stroma Cells of Cholangiocarcinoma Patients. *Ann Surg Oncol* **27**, 599–607 (2020).
152. Mao, J. *et al.* Gut microbiome is associated with the clinical response to anti-PD-1 based immunotherapy in hepatobiliary cancers. *J Immunother Cancer* **9**, e003334 (2021).
153. Kodali, S., Connor, A. A., Brombosz, E. W. & Ghobrial, R. M. Update on the Screening, Diagnosis, and Management of Cholangiocarcinoma. *Gastroenterol Hepatol (N Y)* **20**, 151–158 (2024).
154. Calvisi, D. F. *et al.* Criteria for preclinical models of cholangiocarcinoma: scientific and medical relevance. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* **20**, 462–480 (2023).
155. Zabron, A., Edwards, R. J. & Khan, S. A. The challenge of cholangiocarcinoma: dissecting the molecular mechanisms of an insidious cancer. *Dis Model Mech* **6**, 281–292 (2013).
156. Domcke, S., Sinha, R., Levine, D. A., Sander, C. & Schultz, N. Evaluating cell lines as tumour

- models by comparison of genomic profiles. *Nat Commun* **4**, 2126 (2013).
157. Nath, S. & Devi, G. R. Three-Dimensional Culture Systems in Cancer Research: Focus on Tumor Spheroid Model. *Pharmacol Ther* **163**, 94–108 (2016).
158. Sato, K. *et al.* Organoids and Spheroids as Models for Studying Cholestatic Liver Injury and Cholangiocarcinoma. *Hepatology* **74**, 491–502 (2021).
159. Broutier, L. *et al.* Human primary liver cancer–derived organoid cultures for disease modeling and drug screening. *Nat Med* **23**, 1424–1435 (2017).
160. Nuciforo, S. *et al.* Organoid Models of Human Liver Cancers Derived from Tumor Needle Biopsies. *Cell Rep* **24**, 1363–1376 (2018).
161. Chen, X. & Calvisi, D. F. Hydrodynamic transfection for generation of novel mouse models for liver cancer research. *Am J Pathol* **184**, 912–923 (2014).
162. Loeuillard, E., Fischbach, S. R., Gores, G. J. & Ilyas, S. I. Animal models of cholangiocarcinoma. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis* **1865**, 982–992 (2019).
163. Lekbaby, B. *et al.* Experimental Model of Biliary Tract Cancers: Subcutaneous Xenograft of Human Cell Lines in Immunodeficient Nude Mice. *Methods Mol Biol* **2769**, 87–98 (2024).
164. Vicent, S. *et al.* Experimental models to unravel the molecular pathogenesis, cell of origin and stem cell properties of cholangiocarcinoma. *Liver Int* **39 Suppl 1**, 79–97 (2019).
165. Massani, M. *et al.* Isolation and characterization of biliary epithelial and stromal cells from resected human cholangiocarcinoma: a novel in vitro model to study tumor-stroma interactions. *Oncology Reports* **30**, 1143–1148 (2013).
166. Misericocchi, G. *et al.* Management and potentialities of primary cancer cultures in preclinical and translational studies. *J Transl Med* **15**, 229 (2017).
167. Manzanares, M. Á. *et al.* Transforming Growth Factors α and β Are Essential for Modeling

- Cholangiocarcinoma Desmoplasia and Progression in a Three-Dimensional Organotypic Culture Model. *The American Journal of Pathology* **187**, 1068–1092 (2017).
168. Friedrich, J., Seidel, C., Ebner, R. & Kunz-Schughart, L. A. Spheroid-based drug screen: considerations and practical approach. *Nat Protoc* **4**, 309–324 (2009).
169. Cadamuro, M. *et al.* Animal models of cholangiocarcinoma: What they teach us about the human disease. *Clin Res Hepatol Gastroenterol* **42**, 403–415 (2018).
170. Ilyas, S. I. *et al.* YAP-associated chromosomal instability and cholangiocarcinoma in mice. *Oncotarget* **9**, 5892–5905 (2017).
171. Sirica, A. E. *et al.* A novel “patient-like” model of cholangiocarcinoma progression based on bile duct inoculation of tumorigenic rat cholangiocyte cell lines. *Hepatology* **47**, 1178–1190 (2008).
172. Alvaro, D. *et al.* EASL-ILCA Clinical Practice Guidelines on the management of intrahepatic cholangiocarcinoma. *Journal of Hepatology* **79**, 181–208 (2023).
173. Neuzillet, C. *et al.* Management of intrahepatic and perihilar cholangiocarcinomas: Guidelines of the French Association for the Study of the Liver (AFEF). *Liver International* **n/a**,.
174. Lee, Y. *et al.* The Role of F-18 FDG PET/CT in Intrahepatic Cholangiocarcinoma. *Nucl Med Mol Imaging* **51**, 69–78 (2017).
175. Caragut, R.-L. *et al.* Updates in Diagnosis and Endoscopic Management of Cholangiocarcinoma. *Diagnostics* **14**, 490 (2024).
176. Kovač, J. D. *et al.* Imaging Spectrum of Intrahepatic Mass-Forming Cholangiocarcinoma and Its Mimickers: How to Differentiate Them Using MRI. *Current Oncology* **29**, 698–723 (2022).
177. Borbath, I. *et al.* Human equilibrative nucleoside transporter 1 (hENT1) expression is a

- potential predictive tool for response to gemcitabine in patients with advanced cholangiocarcinoma. *Eur J Cancer* **48**, 990–996 (2012).
178. Nakajima, T. *et al.* Reversal of multiple drug resistance in cholangiocarcinoma by the glutathione S-transferase-pi-specific inhibitor O1-hexadecyl-gamma-glutamyl-S-benzylcysteinyl-D-phenylglycine ethylester. *J Pharmacol Exp Ther* **306**, 861–869 (2003).
179. Habara, K., Ajiki, T., Kamigaki, T., Nakamura, T. & Kuroda, Y. High expression of thymidylate synthase leads to resistance to 5-fluorouracil in biliary tract carcinoma in vitro. *Jpn J Cancer Res* **92**, 1127–1132 (2001).
180. Govaere, O. *et al.* Laminin-332 sustains chemoresistance and quiescence as part of the human hepatic cancer stem cell niche. *J Hepatol* **64**, 609–617 (2016).
181. Morton, S. D. *et al.* Leukemia inhibitory factor protects cholangiocarcinoma cells from drug-induced apoptosis via a PI3K/AKT-dependent Mcl-1 activation. *Oncotarget* **6**, 26052–26064 (2015).
182. Ebata, T. *et al.* Randomized clinical trial of adjuvant gemcitabine chemotherapy versus observation in resected bile duct cancer. *Br J Surg* **105**, 192–202 (2018).
183. Edeline, J. *et al.* Gemcitabine and Oxaliplatin Chemotherapy or Surveillance in Resected Biliary Tract Cancer (PRODIGE 12-ACCORD 18-UNICANCER GI): A Randomized Phase III Study. *J Clin Oncol* **37**, 658–667 (2019).
184. Primrose, J. N. *et al.* Capecitabine compared with observation in resected biliary tract cancer (BILCAP): a randomised, controlled, multicentre, phase 3 study. *Lancet Oncol* **20**, 663–673 (2019).
185. Sapisochin, G. *et al.* Liver transplantation for ‘very early’ intrahepatic cholangiocarcinoma: International retrospective study supporting a prospective assessment. *Hepatology* **64**, 1178–1188 (2016).

186. Sapisochin, G. *et al.* Intrahepatic cholangiocarcinoma or mixed hepatocellular-cholangiocarcinoma in patients undergoing liver transplantation: a Spanish matched cohort multicenter study. *Ann Surg* **259**, 944–952 (2014).
187. De Martin, E. *et al.* Analysis of Liver Resection Versus Liver Transplantation on Outcome of Small Intrahepatic Cholangiocarcinoma and Combined Hepatocellular-Cholangiocarcinoma in the Setting of Cirrhosis. *Liver Transpl* **26**, 785–798 (2020).
188. D, M. *et al.* Comparison between liver transplantation and resection for hilar cholangiocarcinoma: A systematic review and meta-analysis. *PloS one* **14**, (2019).
189. Chimioembolisation transartérielle (TACE) du cancer du foie | Société canadienne du cancer. <https://cancer.ca/fr/cancer-information/cancer-types/liver/treatment/transarterial-chemoembolization>.
190. Radiothérapie pour le cancer du foie | Société canadienne du cancer. <https://cancer.ca/fr/cancer-information/cancer-types/liver/treatment/radiation-therapy>.
191. Park, S.-Y. *et al.* Transarterial chemoembolization versus supportive therapy in the palliative treatment of unresectable intrahepatic cholangiocarcinoma. *Clin Radiol* **66**, 322–328 (2011).
192. Chemo Plus TARE Shows Promise in Unresectable Intrahepatic Cholangiocarcinoma. <https://www.oncologynewscentral.com/article/chemo-plus-tare-shows-promise-in-unresectable-intrahepatic-cholangiocarcinoma> (2023).
193. Edeline, J. *et al.* Radioembolization Plus Chemotherapy for First-line Treatment of Locally Advanced Intrahepatic Cholangiocarcinoma: A Phase 2 Clinical Trial. *JAMA Oncol* **6**, 51–59 (2020).
194. Hong, T. S. *et al.* Multi-Institutional Phase II Study of High-Dose Hypofractionated Proton

- Beam Therapy in Patients With Localized, Unresectable Hepatocellular Carcinoma and Intrahepatic Cholangiocarcinoma. *J Clin Oncol* **34**, 460–468 (2016).
195. Edeline, J. *et al.* Locoregional therapies in patients with intrahepatic cholangiocarcinoma: A systematic review and pooled analysis. *Cancer Treat Rev* **99**, 102258 (2021).
196. Valle, J. *et al.* Cisplatin plus gemcitabine versus gemcitabine for biliary tract cancer. *N Engl J Med* **362**, 1273–1281 (2010).
197. Valle, J. W. *et al.* Cediranib or placebo in combination with cisplatin and gemcitabine chemotherapy for patients with advanced biliary tract cancer (ABC-03): a randomised phase 2 trial. *Lancet Oncol* **16**, 967–978 (2015).
198. Malka, D. *et al.* Gemcitabine and oxaliplatin with or without cetuximab in advanced biliary-tract cancer (BINGO): a randomised, open-label, non-comparative phase 2 trial. *The Lancet Oncology* **15**, 819–828 (2014).
199. Burris, H. A. *et al.* Durvalumab plus gemcitabine and cisplatin in advanced biliary tract cancer (TOPAZ-1): patient-reported outcomes from a randomised, double-blind, placebo-controlled, phase 3 trial. *Lancet Oncol* **25**, 626–635 (2024).
200. Kelley, R. K. *et al.* Pembrolizumab in combination with gemcitabine and cisplatin compared with gemcitabine and cisplatin alone for patients with advanced biliary tract cancer (KEYNOTE-966): a randomised, double-blind, placebo-controlled, phase 3 trial. *Lancet* **401**, 1853–1865 (2023).
201. Lamarca, A. *et al.* Second-line FOLFOX chemotherapy versus active symptom control for advanced biliary tract cancer (ABC-06): a phase 3, open-label, randomised, controlled trial. *The Lancet Oncology* **22**, 690–701 (2021).
202. Merters, J. & Lamarca, A. Integrating cytotoxic, targeted and immune therapies for cholangiocarcinoma. *Journal of Hepatology* **78**, 652–657 (2023).

203. Abou-Alfa, G. K. *et al.* Pemigatinib for previously treated, locally advanced or metastatic cholangiocarcinoma: a multicentre, open-label, phase 2 study. *Lancet Oncol* **21**, 671–684 (2020).
204. Javle, M. *et al.* Infigratinib (BGJ398) in previously treated patients with advanced or metastatic cholangiocarcinoma with FGFR2 fusions or rearrangements: mature results from a multicentre, open-label, single-arm, phase 2 study. *Lancet Gastroenterol Hepatol* **6**, 803–815 (2021).
205. Harding, J. J. *et al.* Antitumour activity of neratinib in patients with HER2-mutant advanced biliary tract cancers. *Nat Commun* **14**, 630 (2023).
206. Subbiah, V. *et al.* Dabrafenib plus trametinib in BRAFV600E-mutated rare cancers: the phase 2 ROAR trial. *Nat Med* **29**, 1103–1112 (2023).
207. Wainberg, Z. A. *et al.* Efficacy and safety of dabrafenib (D) and trametinib (T) in patients (pts) with BRAF V600E–mutated biliary tract cancer (BTC): A cohort of the ROAR basket trial. *JCO* **37**, 187–187 (2019).
208. Marabelle, A. *et al.* Efficacy of Pembrolizumab in Patients With Noncolorectal High Microsatellite Instability/Mismatch Repair–Deficient Cancer: Results From the Phase II KEYNOTE-158 Study. *J Clin Oncol* **38**, 1–10 (2020).
209. Qiao, Y. *et al.* Enhancement of CAR-T cell activity against cholangiocarcinoma by simultaneous knockdown of six inhibitory membrane proteins. *Cancer Commun (Lond)* **43**, 788–807 (2023).
210. Cancer (IARC), T. I. A. for R. on. Global Cancer Observatory. <https://gco.iarc.fr/>.
211. Langmuir, I. Oscillations in Ionized Gases. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **14**, 627–637 (1928).
212. Yan, D., Sherman, J. H. & Keidar, M. Cold atmospheric plasma, a novel promising anti-

- cancer treatment modality. *Oncotarget* **8**, 15977–15995 (2017).
213. Alam, M. S. *Dust-Ion-Acoustic Waves in Dusty Plasmas with Superthermal Electrons*. (2013).
214. Laroussi, M. Cold Plasma in Medicine and Healthcare: The New Frontier in Low Temperature Plasma Applications. *Front. Phys.* **8**, (2020).
215. Atmospheric pressure non-thermal plasmas and their interaction with targets. <https://www.tue.nl/en/research/research-groups/elementary-processes-in-gas-discharges/atmospheric-pressure-non-thermal-plasmas-and-their-interaction-with-substrates>.
216. Kazemi, A., Nicol, M. J., Bilén, S. G., Kirimanjeswara, G. S. & Knecht, S. D. Cold Atmospheric Plasma Medicine: Applications, Challenges, and Opportunities for Predictive Control. *Plasma* **7**, 233–257 (2024).
217. Stańczyk, B. & Wiśniewski, M. The Promising Potential of Cold Atmospheric Plasma Therapies. *Plasma* **7**, 465–497 (2024).
218. Busco, G., Robert, E., Chettouh-Hammas, N., Pouvesle, J.-M. & Grillon, C. The emerging potential of cold atmospheric plasma in skin biology. *Free Radical Biology and Medicine* **161**, 290–304 (2020).
219. Sies, H. & Jones, D. P. Reactive oxygen species (ROS) as pleiotropic physiological signalling agents. *Nat Rev Mol Cell Biol* **21**, 363–383 (2020).
220. Dai, X., Bazaka, K., Thompson, E. W. & Ostrikov, K. (Ken). Cold Atmospheric Plasma: A Promising Controller of Cancer Cell States. *Cancers (Basel)* **12**, 3360 (2020).
221. Gaur, N. *et al.* On cold atmospheric-pressure plasma jet induced DNA damage in cells. *J. Phys. D: Appl. Phys.* **54**, 035203 (2020).
222. Yusupov, M., Van der Paal, J., Neyts, E. C. & Bogaerts, A. Synergistic effect of electric field

- and lipid oxidation on the permeability of cell membranes. *Biochim Biophys Acta Gen Subj* **1861**, 839–847 (2017).
223. Fu, J. *et al.* Viral disinfection using nonthermal plasma: A critical review and perspectives on the plasma-catalysis system. *Chemosphere* **309**, 136655 (2022).
224. Sakudo, A., Yagyu, Y. & Onodera, T. Disinfection and Sterilization Using Plasma Technology: Fundamentals and Future Perspectives for Biological Applications. *Int J Mol Sci* **20**, 5216 (2019).
225. Wang, J. *et al.* Atmospheric pressure plasma treatment induces abscisic acid production, reduces stomatal aperture and improves seedling growth in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Biol (Stuttg)* **23**, 564–573 (2021).
226. Lata, S. *et al.* Aurora Borealis in dentistry: The applications of cold plasma in biomedicine. *Mater Today Bio* **13**, 100200 (2022).
227. Abu Rached, N., Kley, S., Storck, M., Meyer, T. & Stücker, M. Cold Plasma Therapy in Chronic Wounds—A Multicenter, Randomized Controlled Clinical Trial (Plasma on Chronic Wounds for Epidermal Regeneration Study): Preliminary Results. *J Clin Med* **12**, 5121 (2023).
228. Miyamoto, K. *et al.* Red blood cell coagulation induced by low-temperature plasma treatment. *Arch Biochem Biophys* **605**, 95–101 (2016).
229. Ercan, U. K., Özdemir, G. D., Özdemir, M. A. & Güren, O. Plasma medicine: The era of artificial intelligence. *Plasma Processes and Polymers* **20**, e2300066 (2023).
230. Murillo, D., Huergo, C., Gallego, B., Rodríguez, R. & Tornín, J. Exploring the Use of Cold Atmospheric Plasma to Overcome Drug Resistance in Cancer. *Biomedicines* **11**, 208 (2023).
231. Min, T. *et al.* Therapeutic Effects of Cold Atmospheric Plasma on Solid Tumor. *Front. Med.*

- 9, (2022).
232. Motaln, H., Recek, N. & Rogelj, B. Intracellular Responses Triggered by Cold Atmospheric Plasma and Plasma-Activated Media in Cancer Cells. *Molecules* **26**, 1336 (2021).
233. Mann, M. S. *et al.* Introduction to DIN-specification 91315 based on the characterization of the plasma jet kINPen® MED. *Clinical Plasma Medicine* **4**, 35–45 (2016).
234. Product. *neoplas med GmbH* <https://neoplas-med.eu/en/product/>.
235. PiezoBrush PZ3 Handheld Plasma Surface Treatment. *Intertronics* <https://www.intertronics.co.uk/product/piezobrush-pz3-handheld-plasma-surface-treatment/>.
236. Schuster, M. *et al.* Visible tumor surface response to physical plasma and apoptotic cell kill in head and neck cancer. *J Craniomaxillofac Surg* **44**, 1445–1452 (2016).
237. Canady, J. *et al.* The First Cold Atmospheric Plasma Phase I Clinical Trial for the Treatment of Advanced Solid Tumors: A Novel Treatment Arm for Cancer. *Cancers* **15**, 3688 (2023).
238. Tanaka, H. *et al.* Plasma-Treated Solutions (PTS) in Cancer Therapy. *Cancers* **13**, 1737 (2021).
239. Živanić, M. *et al.* Injectable Plasma-Treated Alginate Hydrogel for Oxidative Stress Delivery to Induce Immunogenic Cell Death in Osteosarcoma. *Advanced Functional Materials* **34**, 2312005 (2024).
240. Živanić, M., Espona-Noguera, A., Lin, A. & Canal, C. Current State of Cold Atmospheric Plasma and Cancer-Immunity Cycle: Therapeutic Relevance and Overcoming Clinical Limitations Using Hydrogels. *Adv Sci (Weinh)* **10**, 2205803 (2023).
241. Judée, F., Vaquero, J., Guégan, S., Fouassier, L. & Dufour, T. Atmospheric pressure plasma jets applied to cancerology: correlating electrical configuration with in vivo toxicity and therapeutic efficiency. *J. Phys. D: Appl. Phys.* **52**, 245201 (2019).

242. Nastasa, V. *et al.* Toxicity Assessment of Long-Term Exposure to Non-Thermal Plasma Activated Water in Mice. *Int J Mol Sci* **22**, 11534 (2021).
243. Semmler, M. L. *et al.* Molecular Mechanisms of the Efficacy of Cold Atmospheric Pressure Plasma (CAP) in Cancer Treatment. *Cancers (Basel)* **12**, 269 (2020).
244. Jomova, K. *et al.* Reactive oxygen species, toxicity, oxidative stress, and antioxidants: chronic diseases and aging. *Arch Toxicol* **97**, 2499–2574 (2023).
245. Mali, S. B. Role of Cold atmospheric plasma in cancer management. *Oral Oncology Reports* **9**, 100133 (2024).
246. Bauer, G. The synergistic effect between hydrogen peroxide and nitrite, two long-lived molecular species from cold atmospheric plasma, triggers tumor cells to induce their own cell death. *Redox Biology* **26**, 101291 (2019).
247. Vaquero, J. *et al.* Cold-Atmospheric Plasma Induces Tumor Cell Death in Preclinical In Vivo and In Vitro Models of Human Cholangiocarcinoma. *Cancers (Basel)* **12**, 1280 (2020).
248. Yan, D. *et al.* Toward understanding the selective anticancer capacity of cold atmospheric plasma—A model based on aquaporins (Review). *Biointerphases* **10**, 040801 (2015).
249. Bienert, G. P. & Chaumont, F. Aquaporin-facilitated transmembrane diffusion of hydrogen peroxide. *Biochim Biophys Acta* **1840**, 1596–1604 (2014).
250. Van der Paal, J., Verheyen, C., Neyts, E. C. & Bogaerts, A. Hampering Effect of Cholesterol on the Permeation of Reactive Oxygen Species through Phospholipids Bilayer: Possible Explanation for Plasma Cancer Selectivity. *Sci Rep* **7**, 39526 (2017).
251. Zimmermann, T. *et al.* Cold Atmospheric Plasma Triggers Apoptosis via the Unfolded Protein Response in Melanoma Cells. *Cancers (Basel)* **15**, 1064 (2023).
252. Xia, J. *et al.* Cold atmospheric plasma induces apoptosis of melanoma cells via Sestrin2-mediated nitric oxide synthase signaling. *J Biophotonics* **12**, e201800046 (2019).

253. Clemens, M. J. Initiation factor eIF2 alpha phosphorylation in stress responses and apoptosis. *Prog Mol Subcell Biol* **27**, 57–89 (2001).
254. Wang, Y. *et al.* Fine particulate matter induces mitochondrial dysfunction and oxidative stress in human SH-SY5Y cells. *Chemosphere* **218**, 577–588 (2019).
255. Raturi, A. & Simmen, T. Where the endoplasmic reticulum and the mitochondrion tie the knot: the mitochondria-associated membrane (MAM). *Biochim Biophys Acta* **1833**, 213–224 (2013).
256. Wang, Y., Mang, X., Li, X., Cai, Z. & Tan, F. Cold atmospheric plasma induces apoptosis in human colon and lung cancer cells through modulating mitochondrial pathway. *Front. Cell Dev. Biol.* **10**, (2022).
257. Ahn, H. J. *et al.* Atmospheric-Pressure Plasma Jet Induces Apoptosis Involving Mitochondria via Generation of Free Radicals. *PLOS ONE* **6**, e28154 (2011).
258. Arfin, S. *et al.* Oxidative Stress in Cancer Cell Metabolism. *Antioxidants (Basel)* **10**, 642 (2021).
259. Kaushik, N. *et al.* Responses of Solid Tumor Cells in DMEM to Reactive Oxygen Species Generated by Non-Thermal Plasma and Chemically Induced ROS Systems. *Sci Rep* **5**, 8587 (2015).
260. Wang, Y. *et al.* Cold atmospheric plasma sensitizes head and neck cancer to chemotherapy and immune checkpoint blockade therapy. *Redox Biology* **69**, 102991 (2024).
261. Chang, J. W. *et al.* Non-thermal atmospheric pressure plasma induces apoptosis in oral cavity squamous cell carcinoma: Involvement of DNA-damage-triggering sub-G(1) arrest via the ATM/p53 pathway. *Arch Biochem Biophys* **545**, 133–140 (2014).
262. Judée, F. *et al.* Short and long time effects of low temperature Plasma Activated Media

- on 3D multicellular tumor spheroids. *Sci Rep* **6**, 21421 (2016).
263. Hara, H., Kobayashi, M., Shiiba, M., Kamiya, T. & Adachi, T. Sublethal treatment with plasma-activated medium induces senescence-like growth arrest of A549 cells: involvement of intracellular mobile zinc. *J Clin Biochem Nutr* **65**, 16–22 (2019).
264. Ishaq, M., Bazaka, K. & Ostrikov, K. Intracellular effects of atmospheric-pressure plasmas on melanoma cancer cells. *Physics of Plasmas* **22**, 122003 (2015).
265. Han, X., Klas, M., Liu, Y., Sharon Stack, M. & Ptasinska, S. DNA damage in oral cancer cells induced by nitrogen atmospheric pressure plasma jets. *Applied Physics Letters* **102**, 233703 (2013).
266. Körtzner, J. et al. Restoration of Sensitivity in Chemo — Resistant Glioma Cells by Cold Atmospheric Plasma. *PLoS One* **8**, e64498 (2013).
267. Wang, P. et al. Epithelial-to-Mesenchymal Transition Enhances Cancer Cell Sensitivity to Cytotoxic Effects of Cold Atmospheric Plasmas in Breast and Bladder Cancer Systems. *Cancers* **13**, 2889 (2021).
268. Zhuang, J. et al. Nanosecond pulsed cold atmospheric plasma jet suppresses proliferation and migration of human glioblastoma cells via apoptosis promotion and EMT inhibition. *Arch Biochem Biophys* **747**, 109757 (2023).
269. Xu, S. et al. Cold atmospheric plasma-activated Ringer's solution inhibits the proliferation of osteosarcoma cells through the mitochondrial apoptosis pathway. *Oncology Reports* **43**, 1683–1691 (2020).
270. Elmore, S. Apoptosis: A Review of Programmed Cell Death. *Toxicol Pathol* **35**, 495–516 (2007).
271. Bauer, G., Sersenová, D., Graves, D. B. & Machala, Z. Cold Atmospheric Plasma and Plasma-Activated Medium Trigger RONS-Based Tumor Cell Apoptosis. *Sci Rep* **9**, 14210

- (2019).
272. Thiyagarajan, M., Anderson, H. & Gonzales, X. F. Induction of apoptosis in human myeloid leukemia cells by remote exposure of resistive barrier cold plasma. *Biotechnol Bioeng* **111**, 565–574 (2014).
273. Virard, F. *et al.* Cold Atmospheric Plasma Induces a Predominantly Necrotic Cell Death via the Microenvironment. *PLoS One* **10**, e0133120 (2015).
274. Yan, D. *et al.* Multi-Modal Biological Destruction by Cold Atmospheric Plasma: Capability and Mechanism. *Biomedicines* **9**, 1259 (2021).
275. Parzych, K. R. & Klionsky, D. J. An Overview of Autophagy: Morphology, Mechanism, and Regulation. *Antioxid Redox Signal* **20**, 460–473 (2014).
276. Shi, L. *et al.* Non-thermal plasma induces a stress response in mesothelioma cells resulting in increased endocytosis, lysosome biogenesis and autophagy. *Free Radic Biol Med* **108**, 904–917 (2017).
277. Adhikari, M., Adhikari, B., Ghimire, B., Baboota, S. & Choi, E. H. Cold Atmospheric Plasma and Silymarin Nanoemulsion Activate Autophagy in Human Melanoma Cells. *Int J Mol Sci* **21**, 1939 (2020).
278. Wei, S., Feng, M. & Zhang, S. Molecular Characteristics of Cell Pyroptosis and Its Inhibitors: A Review of Activation, Regulation, and Inhibitors. *Int J Mol Sci* **23**, 16115 (2022).
279. Du, L. *et al.* Decitabine combined with cold atmospheric plasma induces pyroptosis via the ROS/Caspase-3/GSDME signaling pathway in Ovar5 cells. *Biochim Biophys Acta Gen Subj* **1868**, 130602 (2024).
280. Yang, X. *et al.* Cold atmospheric plasma induces GSDME-dependent pyroptotic signaling pathway via ROS generation in tumor cells. *Cell Death Dis* **11**, 295 (2020).

281. Lachaier, E. *et al.* La ferroptose, une nouvelle forme de mort cellulaire applicable au traitement médical des cancers. *Med Sci (Paris)* **30**, 779–783 (2014).
282. Jo, A. *et al.* Plasma-activated medium induces ferroptosis by depleting FSP1 in human lung cancer cells. *Cell Death Dis* **13**, 212 (2022).
283. Dhuriya, Y. K. & Sharma, D. Necroptosis: a regulated inflammatory mode of cell death. *J Neuroinflammation* **15**, 199 (2018).
284. Zhao, L. *et al.* Biosafety and differentially expressed genes analysis of melanoma cells treated with cold atmospheric plasma. *Journal of Biophotonics* **15**, e202100403 (2022).
285. Arndt, S. *et al.* Cold atmospheric plasma, a new strategy to induce senescence in melanoma cells. *Exp Dermatol* **22**, 284–289 (2013).
286. Gkantaras, A. *et al.* Multi-Cohort Transcriptomic Profiling of Medical Gas Plasma-Treated Cancers Reveals the Role of Immunogenic Cell Death. *Cancers (Basel)* **16**, 2186 (2024).
287. Guerrero-Preston, R. *et al.* Cold atmospheric plasma treatment selectively targets head and neck squamous cell carcinoma cells. *Int J Mol Med* **34**, 941–946 (2014).
288. Welz, C. *et al.* Cold Atmospheric Plasma: A Promising Complementary Therapy for Squamous Head and Neck Cancer. *PLoS One* **10**, e0141827 (2015).
289. Lin, A. *et al.* Non-Thermal Plasma as a Unique Delivery System of Short-Lived Reactive Oxygen and Nitrogen Species for Immunogenic Cell Death in Melanoma Cells. *Adv Sci (Weinh)* **6**, 1802062 (2019).
290. Bekeschus, S. *et al.* Physical plasma-triggered ROS induces tumor cell death upon cleavage of HSP90 chaperone. *Sci Rep* **9**, 4112 (2019).
291. Binenbaum, Y. *et al.* Cold Atmospheric Plasma, Created at the Tip of an Elongated Flexible Capillary Using Low Electric Current, Can Slow the Progression of Melanoma. *PLoS One* **12**, e0169457 (2017).

292. Zhao, S. *et al.* Atmospheric pressure room temperature plasma jets facilitate oxidative and nitrative stress and lead to endoplasmic reticulum stress dependent apoptosis in HepG2 cells. *PLoS One* **8**, e73665 (2013).
293. Kaushik, N. K., Kaushik, N., Park, D. & Choi, E. H. Altered antioxidant system stimulates dielectric barrier discharge plasma-induced cell death for solid tumor cell treatment. *PLoS One* **9**, e103349 (2014).
294. Kim, J. Y., Wei, Y., Li, J. & Kim, S.-O. 15- μ m-sized single-cellular-level and cell-manipulatable microplasma jet in cancer therapies. *Biosens Bioelectron* **26**, 555–559 (2010).
295. Schneider, C. *et al.* Cold atmospheric plasma causes a calcium influx in melanoma cells triggering CAP-induced senescence. *Sci Rep* **8**, 10048 (2018).
296. Ahn, H. J. *et al.* Targeting cancer cells with reactive oxygen and nitrogen species generated by atmospheric-pressure air plasma. *PLoS One* **9**, e86173 (2014).
297. Sagwal, S. K., Pasqual-Melo, G., Bodnar, Y., Gandhirajan, R. K. & Bekeschus, S. Combination of chemotherapy and physical plasma elicits melanoma cell death via upregulation of SLC22A16. *Cell Death Dis* **9**, 1179 (2018).
298. Okazaki, Y. *et al.* Direct exposure of non-equilibrium atmospheric pressure plasma confers simultaneous oxidative and ultraviolet modifications in biomolecules. *Journal of Clinical Biochemistry and Nutrition* **55**, 207–215 (2014).
299. Li, Y., Tang, T., Lee, H. & Song, K. Cold Atmospheric Pressure Plasma-Activated Medium Induces Selective Cell Death in Human Hepatocellular Carcinoma Cells Independently of Singlet Oxygen, Hydrogen Peroxide, Nitric Oxide and Nitrite/Nitrate. *International Journal of Molecular Sciences* **22**, 5548 (2021).
300. Metelmann, H.-R. *et al.* Clinical experience with cold plasma in the treatment of locally

- advanced head and neck cancer. *Clinical Plasma Medicine* **9**, 6–13 (2018).
301. Partecke, L. I. *et al.* Tissue Tolerable Plasma (TTP) induces apoptosis in pancreatic cancer cells in vitro and in vivo. *BMC Cancer* **12**, 473 (2012).
302. Bekeschus, S. *et al.* Plasma Treatment of Ovarian Cancer Cells Mitigates Their Immunomodulatory Products Active on THP-1 Monocytes. *Plasma* **1**, 201–217 (2018).
303. Mizuno, K., Yonetamari, K., Shirakawa, Y., Akiyama, T. & Ono, R. Anti-tumor immune response induced by nanosecond pulsed streamer discharge in mice. *J. Phys. D: Appl. Phys.* **50**, 12LT01 (2017).
304. Kaushik, N. K. *et al.* Cytotoxic macrophage-released tumour necrosis factor-alpha (TNF- α) as a killing mechanism for cancer cell death after cold plasma activation. *J. Phys. D: Appl. Phys.* **49**, 084001 (2016).
305. Lin, A. *et al.* Uniform Nanosecond Pulsed Dielectric Barrier Discharge Plasma Enhances Anti-Tumor Effects by Induction of Immunogenic Cell Death in Tumors and Stimulation of Macrophages. *Plasma Processes and Polymers* **12**, 1392–1399 (2015).
306. Lin, A. *et al.* Nanosecond-Pulsed DBD Plasma-Generated Reactive Oxygen Species Trigger Immunogenic Cell Death in A549 Lung Carcinoma Cells through Intracellular Oxidative Stress. *International Journal of Molecular Sciences* **18**, 966 (2017).
307. Kaushik, N. K. *et al.* Preventing the Solid Cancer Progression via Release of Anticancer-Cytokines in Co-Culture with Cold Plasma-Stimulated Macrophages. *Cancers* **11**, 842 (2019).
308. Liedtke, K. R. *et al.* A myeloid and lymphoid infiltrate in murine pancreatic tumors exposed to plasma-treated medium. *Clinical Plasma Medicine* **11**, 10–17 (2018).
309. Van Loenhout, J. *et al.* Cold Atmospheric Plasma-Treated PBS Eliminates Immunosuppressive Pancreatic Stellate Cells and Induces Immunogenic Cell Death of

- Pancreatic Cancer Cells. *Cancers* **11**, 1597 (2019).
310. Bekeschus, S. *et al.* Toxicity and Immunogenicity in Murine Melanoma following Exposure to Physical Plasma-Derived Oxidants. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* **2017**, 4396467 (2017).
311. Rödder, K. *et al.* Activation of Murine Immune Cells upon Co-culture with Plasma-treated B16F10 Melanoma Cells. *Applied Sciences* **9**, 660 (2019).
312. Freund, E. *et al.* Physical plasma-treated saline promotes an immunogenic phenotype in CT26 colon cancer cells in vitro and in vivo. *Sci Rep* **9**, 634 (2019).
313. Lin, A. G. *et al.* Non-thermal plasma induces immunogenic cell death in vivo in murine CT26 colorectal tumors. *Oncotarget* **7**, e1484978 (2018).
314. Azzariti, A. *et al.* Plasma-activated medium triggers cell death and the presentation of immune activating danger signals in melanoma and pancreatic cancer cells. *Sci Rep* **9**, 4099 (2019).
315. Bekeschus, S., Mueller, A., Miller, V., Gaipf, U. & Weltmann, K.-D. Physical Plasma Elicits Immunogenic Cancer Cell Death and Mitochondrial Singlet Oxygen. *IEEE Transactions on Radiation and Plasma Medical Sciences* **2**, 138–146 (2018).
316. Shi, X. *et al.* Effect of Cold Plasma on Cell Viability and Collagen Synthesis in Cultured Murine Fibroblasts*. *Plasma Sci. Technol.* **18**, 353 (2016).
317. Bourdens, M. *et al.* Short exposure to cold atmospheric plasma induces senescence in human skin fibroblasts and adipose mesenchymal stromal cells. *Sci Rep* **9**, 8671 (2019).
318. Arndt, S., Unger, P., Bosserhoff, A.-K., Berneburg, M. & Karrer, S. The Anti-Fibrotic Effect of Cold Atmospheric Plasma on Localized Scleroderma In Vitro and In Vivo. *Biomedicines* **9**, 1545 (2021).
319. Privat-Maldonado, A., Bengtson, C., Razzokov, J., Smits, E. & Bogaerts, A. Modifying the

- Tumour Microenvironment: Challenges and Future Perspectives for Anticancer Plasma Treatments. *Cancers* **11**, 1920 (2019).
320. Gweon, B. *et al.* Suppression of angiogenesis by atmospheric pressure plasma in human aortic endothelial cells. *Applied Physics Letters* **104**, 133701 (2014).
321. Haralambiev, L. *et al.* Inhibition of Angiogenesis by Treatment with Cold Atmospheric Plasma as a Promising Therapeutic Approach in Oncology. *International Journal of Molecular Sciences* **21**, 7098 (2020).
322. Kugler, P. *et al.* Cold Atmospheric Plasma Reduces Vessel Density and Increases Vascular Permeability and Apoptotic Cell Death in Solid Tumors. *Cancers (Basel)* **14**, 2432 (2022).
323. Freund, E. *et al.* Plasma-Derived Reactive Species Shape a Differentiation Profile in Human Monocytes. *Applied Sciences* **9**, 2530 (2019).
324. Niu, Y. *et al.* Non-invasive Physical Plasma Modulates Macrophage Polarization: A Potential Strategy for Tumor Microenvironment Remodeling. *Anticancer Research* **44**, 2437–2444 (2024).
325. Chen, C. *et al.* In vitro study of cold atmospheric plasma-activated liquids inhibits malignant melanoma by affecting macrophage polarization through the ROS/JAK2/STAT1 pathway. *Biomedicine & Pharmacotherapy* **175**, 116657 (2024).
326. Förster, S. *et al.* Modulation of the Tumor-Associated Immuno-Environment by Non-Invasive Physical Plasma. *Cancers* **15**, 1073 (2023).
327. Bekeschus, S., Clemen, R. & Metelmann, H.-R. Potentiating anti-tumor immunity with physical plasma. *Clinical Plasma Medicine* **12**, 17–22 (2018).
328. Dai, X. & Zhu, K. Cold atmospheric plasma: Novel opportunities for tumor microenvironment targeting. *Cancer Medicine* **12**, 7189–7206 (2023).
329. Rada, B. Neutrophil Extracellular Traps. *Methods Mol Biol* **1982**, 517–528 (2019).

330. Bekeschus, S. *et al.* Neutrophil extracellular trap formation is elicited in response to cold physical plasma. *Journal of Leukocyte Biology* **100**, 791–799 (2016).
331. Bekeschus, S. *et al.* Differential Viability of Eight Human Blood Mononuclear Cell Subpopulations After Plasma Treatment. *PMED* **3**, (2013).
332. Keyvani, A., Atyabi, S. & Madanchi, H. Effects of cold atmospheric plasma jet on collagen structure in different treatment times. *Basic Research Journal of Medicine and Clinical Sciences* **6**, 84–90 (2017).
333. Kang, S. U. *et al.* Opposite effects of non-thermal plasma on cell migration and collagen production in keloid and normal fibroblasts. *PLOS ONE* **12**, e0187978 (2017).
334. Eisenhauer, P. *et al.* Chemical modification of extracellular matrix by cold atmospheric plasma-generated reactive species affects chondrogenesis and bone formation. *Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine* **10**, 772–782 (2016).
335. Metelmann, H.-R. *et al.* Head and neck cancer treatment and physical plasma. *Clinical Plasma Medicine* **3**, 17–23 (2015).
336. Dhaliwal, D. & Shepherd, T. G. Molecular and cellular mechanisms controlling integrin-mediated cell adhesion and tumor progression in ovarian cancer metastasis: a review. *Clin Exp Metastasis* **39**, 291–301 (2022).
337. Lee, H. J. *et al.* Degradation of adhesion molecules of G361 melanoma cells by a non-thermal atmospheric pressure microplasma. *New J. Phys.* **11**, 115026 (2009).
338. Haralambiev, L. *et al.* Effects of Cold Atmospheric Plasma on the Expression of Chemokines, Growth Factors, TNF Superfamily Members, Interleukins, and Cytokines in Human Osteosarcoma Cells. *Anticancer Research* **39**, 151–157 (2019).
339. Bauer, G. Intercellular singlet oxygen-mediated bystander signaling triggered by long-lived species of cold atmospheric plasma and plasma-activated medium. *Redox Biology*

- 26, 101301 (2019).
340. Pouget, J.-P., Georgakilas, A. G. & Ravanat, J.-L. Targeted and Off-Target (Bystander and Abscopal) Effects of Radiation Therapy: Redox Mechanisms and Risk/Benefit Analysis. *Antioxidants & Redox Signaling* **29**, 1447–1487 (2018).
341. Khalili, M. *et al.* Non-Thermal Plasma-Induced Immunogenic Cell Death in Cancer: A Topical Review. *J Phys D Appl Phys* **52**, 423001 (2019).
342. Palanivelu, L., Liu, C.-H. & Lin, L.-T. Immunogenic cell death: The cornerstone of oncolytic viro-immunotherapy. *Front. Immunol.* **13**, (2023).
343. Galluzzi, L., Buqué, A., Kepp, O., Zitvogel, L. & Kroemer, G. Immunogenic cell death in cancer and infectious disease. *Nat Rev Immunol* **17**, 97–111 (2017).
344. Kepp, O. *et al.* Consensus guidelines for the detection of immunogenic cell death. *Oncot Immunology* **3**, e955691 (2014).
345. Mellman, I., Chen, D. S., Powles, T. & Turley, S. J. The cancer-immunity cycle: Indication, genotype, and immunotype. *Immunity* **56**, 2188–2205 (2023).
346. Troitskaya, O. *et al.* Non-Thermal Plasma Application in Tumor-Bearing Mice Induces Increase of Serum HMGB1. *Int J Mol Sci* **21**, 5128 (2020).
347. Lin, A. *et al.* The effect of local non-thermal plasma therapy on the cancer-immunity cycle in a melanoma mouse model. *Bioeng Transl Med* **7**, e10314 (2022).
348. Humeau, J., Lévesque, S., Kroemer, G. & Pol, J. G. Gold Standard Assessment of Immunogenic Cell Death in Oncological Mouse Models. *Methods Mol Biol* **1884**, 297–315 (2019).
349. Bekechus, S. *et al.* Medical Gas Plasma Jet Technology Targets Murine Melanoma in an Immunogenic Fashion. *Advanced Science* **7**, 1903438 (2020).
350. Mahdikia, H. *et al.* Gas plasma irradiation of breast cancers promotes immunogenicity,

- tumor reduction, and an abscopal effect in vivo. *Oncolmmunology* **10**, 1859731 (2021).
351. Jinno, R., Komuro, A., Yanai, H. & Ono, R. Antitumor abscopal effects in mice induced by normal tissue irradiation using pulsed streamer discharge plasma. *J. Phys. D: Appl. Phys.* **55**, 17LT01 (2022).
352. Limanowski, R., Yan, D., Li, L. & Keidar, M. Preclinical Cold Atmospheric Plasma Cancer Treatment. *Cancers (Basel)* **14**, 3461 (2022).
353. Lee, S. Y. Temozolomide resistance in glioblastoma multiforme. *Genes & Diseases* **3**, 198–210 (2016).
354. Gjika, E. *et al.* Combination therapy of cold atmospheric plasma (CAP) with temozolomide in the treatment of U87MG glioblastoma cells. *Sci Rep* **10**, 16495 (2020).
355. Shaw, P., Kumar, N., Privat-Maldonado, A., Smits, E. & Bogaerts, A. Cold Atmospheric Plasma Increases Temozolomide Sensitivity of Three-Dimensional Glioblastoma Spheroids via Oxidative Stress-Mediated DNA Damage. *Cancers* **13**, 1780 (2021).
356. Soni, V. *et al.* In Vitro and In Vivo Enhancement of Temozolomide Effect in Human Glioblastoma by Non-Invasive Application of Cold Atmospheric Plasma. *Cancers (Basel)* **13**, 4485 (2021).
357. Al-malky, H. S., Al Harthi, S. E. & Osman, A.-M. M. Major obstacles to doxorubicin therapy: Cardiotoxicity and drug resistance. *J Oncol Pharm Pract* **26**, 434–444 (2020).
358. Kniazeva, V. *et al.* Adjuvant composite cold atmospheric plasma therapy increases antitumoral effect of doxorubicin hydrochloride. *Front. Oncol.* **13**, (2023).
359. Dezhpour, A., Ghafouri, H., Jafari, S. & Nilkar, M. Effects of cold atmospheric-pressure plasma in combination with doxorubicin drug against breast cancer cells *in vitro* and *in vivo*. *Free Radical Biology and Medicine* **209**, 202–210 (2023).
360. Mateu-Sanz, M., Ginebra, M.-P., Tornín, J. & Canal, C. Cold atmospheric plasma enhances

- doxorubicin selectivity in metastatic bone cancer. *Free Radic Biol Med* **189**, 32–41 (2022).
361. Brunner, T. F. *et al.* Primary cold atmospheric plasma combined with low dose cisplatin as a possible adjuvant combination therapy for HNSCC cells—an in-vitro study. *Head & Face Medicine* **18**, 21 (2022).
362. Li, Y., Tang, T., Lee, H. J. & Song, K. Selective Anti-Cancer Effects of Plasma-Activated Medium and Its High Efficacy with Cisplatin on Hepatocellular Carcinoma with Cancer Stem Cell Characteristics. *International Journal of Molecular Sciences* **22**, 3956 (2021).
363. Chen, G. *et al.* Transdermal cold atmospheric plasma-mediated immune checkpoint blockade therapy. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **117**, 3687–3692 (2020).
364. Fang, T., Cao, X., Shen, B., Chen, Z. & Chen, G. Injectable cold atmospheric plasma-activated immunotherapeutic hydrogel for enhanced cancer treatment. *Biomaterials* **300**, 122189 (2023).
365. Cao, X. *et al.* Trehalose enhanced cold atmospheric plasma-mediated cancer treatment. *Biomaterials* **309**, 122582 (2024).
366. Zhu, W. *et al.* Synergistic Effect of Cold Atmospheric Plasma and Drug Loaded Core-shell Nanoparticles on Inhibiting Breast Cancer Cell Growth. *Sci Rep* **6**, 21974 (2016).
367. Momeni, S., Shanej, A., Sazgarnia, A., Attaran, N. & Aledavood, S. A. The Synergistic Effect of Cold Atmospheric Plasma Mediated Gold Nanoparticles Conjugated with Indocyanine Green as An Innovative Approach to Cooperation with Radiotherapy. *Cell Journal (Yakhteh)* **25**, 51–61 (2023).
368. Ha, J.-H. & Kim, Y.-J. Photodynamic and Cold Atmospheric Plasma Combination Therapy Using Polymeric Nanoparticles for the Synergistic Treatment of Cervical Cancer. *International Journal of Molecular Sciences* **22**, 1172 (2021).

369. Lin, A. *et al.* Acquired non-thermal plasma resistance mediates a shift towards aerobic glycolysis and ferroptotic cell death in melanoma. *Drug Resistance Updates* **67**, 100914 (2023).
370. Chen, G. *et al.* Portable air-fed cold atmospheric plasma device for postsurgical cancer treatment. *Science Advances* **7**, eabg5686 (2021).
371. Pyzer-Knapp, E. O. *et al.* Accelerating materials discovery using artificial intelligence, high performance computing and robotics. *npj Comput Mater* **8**, 1–9 (2022).
372. Bekeschus, S. Medical gas plasma technology: Roadmap on cancer treatment and immunotherapy. *Redox Biology* **65**, 102798 (2023).
373. Bekeschus, S. *et al.* Tumor cell metabolism correlates with resistance to gas plasma treatment: The evaluation of three dogmas. *Free Radical Biology and Medicine* **167**, 12–28 (2021).
374. do Nascimento, F. *et al.* A Low Cost, Flexible Atmospheric Pressure Plasma Jet Device with Good Antimicrobial Efficiency. *IEEE Transactions on Radiation and Plasma Medical Sciences* **8**, 307–322 (2024).
375. Unlocking Novel Anticancer Strategies: Bioactive Hydrogels for Local Delivery of Plasma-Derived Oxidants in an In Ovo Cancer Model - Espona-Noguera - *Macromolecular Bioscience* - Wiley Online Library. <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/mabi.202400213>.
376. Freund, E. *et al.* In Vitro Anticancer Efficacy of Six Different Clinically Approved Types of Liquids Exposed to Physical Plasma. *IEEE Transactions on Radiation and Plasma Medical Sciences* **3**, 588–596 (2019).
377. Robert, E. *et al.* Perspectives of endoscopic plasma applications. *Clinical Plasma Medicine* **1**, 8–16 (2013).

378. Utsumi, F. et al. Effect of Indirect Nonequilibrium Atmospheric Pressure Plasma on Anti-Proliferative Activity against Chronic Chemo-Resistant Ovarian Cancer Cells In Vitro and In Vivo. PLOS ONE 8, e81576 (2013).
379. Nakamura, K. et al. Novel Intraperitoneal Treatment with Non-Thermal Plasma-Activated Medium Inhibits Metastatic Potential of Ovarian Cancer Cells. Sci Rep 7, 6085 (2017).

Title : Adaptive cellular mechanisms of the tumor microenvironment exposed to cold atmospheric plasma – Application to the treatment of cholangiocarcinoma

Abstract : Cholangiocarcinoma (CCA) is a cancer with a poor prognosis and limited therapeutic options. Surgical resection is the only curative option available, but it is applicable to only a small number of patients and offers relatively low survival rates (5-year survival of 30%) due to the typically late diagnosis of this cancer. Palliative therapies, based on chemotherapy and immunotherapy, are generally ineffective, mainly because of the desmoplastic nature of CCA, which limits the entry of drugs into the tumor site. With an increasing incidence and accounting for 2% of global cancer mortality, it is crucial to develop new therapies, including local treatments targeting tumor cells and their microenvironment, for the treatment of this cancer.

It is in this context that enthusiasm for the use of cold atmospheric plasma (CAP) in the treatment of CCA has emerged. Considered the fourth state of matter and generated by the partial ionization of a gas at low temperature, CAP has demonstrated promising antitumor effects in various preclinical cancer models over the past fifteen years. It is indeed capable of producing reactive oxygen and nitrogen species (RONS). A close collaboration between the Saint-Antoine Research Center (CRSA) and the Plasma Physics Laboratory (LPP) has highlighted significant antitumor effects in an immunodeficient murine model of CCA, as well as significant remodeling of the tumor stroma, a crucial element in tumor progression. Since then, a CAP device adapted for insertion into a duodenoscope has been developed, with the aim of enabling *in situ* treatment of CCA tumors via endoscopy in the future.

The objective of this thesis was to explore the antitumor effects of this new plasma source on *in vitro* and *in vivo* models of CCA, distinguishing the direct effects of plasma on tumor cells from indirect effects on tumorigenesis, mediated by phenotypic modifications of stromal cells, including cancer-associated fibroblasts (CAFs) and tumor endothelial cells (TECs). After demonstrating the technical feasibility and biological applicability of this endoscopic source, it was observed that the oxidative stress induced by CAP altered the activation state and migratory phenotype of CAFs, while affecting the viability and angiogenic profile of TECs. The use of three-dimensional spheroid models also revealed immunogenic signatures triggered by cold plasma treatment. Indeed, it was proven *in vivo*, through prophylactic vaccination, that CAP could induce immunogenic cell death (ICD) of tumor cells, promoting the recruitment of immune cells to the tumor site. Preliminary results also showed that direct treatment of subcutaneous tumors slowed tumor growth while allowing the recruitment of antitumor immune cells. Finally, after elucidating the mechanisms of ICD *in vitro*, a new therapeutic approach combining CAP and vaccinations was proposed, demonstrating an antitumor effect accompanied by increased infiltration of immune cells. To make the use of CAP clinically accessible, tests on porcine models were conducted to verify the thermal and electrical safety of this endoscopic source, both for the patient and the clinician. Thus, CAP opens up promising new perspectives for the locoregional treatment of CCA, by modulating the immunogenicity of tumors and impacting their desmoplastic stroma.

Keywords : cholangiocarcinoma, cold atmospheric plasma, tumor microenvironment

Titre : Mécanismes cellulaires adaptatifs du microenvironnement tumoral exposé au plasma froid atmosphérique – Application au traitement du cholangiocarcinome

Résumé : Le cholangiocarcinome (CCA) est un cancer au pronostic défavorable, avec un arsenal thérapeutique limité. La résection chirurgicale est la seule option curative disponible, mais n'est applicable qu'à un nombre restreint de patients et offre des chances de survie relativement faibles (survie de 5 ans de 30 %) en raison d'un diagnostic généralement tardif. Les thérapies palliatives, basées sur la chimiothérapie et l'immunothérapie, sont généralement inefficaces, principalement en raison du caractère desmoplasique du CCA qui limite l'entrée des médicaments au site tumoral. Avec une incidence croissante et représentant 2 % de la mortalité mondiale par cancer, il est crucial de développer de nouvelles thérapies, notamment des traitements locaux ciblant les cellules tumorales et leur microenvironnement, pour le traitement de ce cancer.

C'est dans ce contexte que l'enthousiasme pour l'utilisation du plasma froid atmosphérique (CAP) dans le traitement du CCA a émergé. Considéré comme le quatrième état de la matière et généré par l'ionisation partielle d'un gaz à basse température, le CAP a démontré des effets antitumoraux prometteurs dans divers modèles précliniques de cancer depuis une quinzaine d'années. Il est en effet capable de produire des espèces réactives de l'oxygène et de l'azote (RONS). Une collaboration étroite entre le Centre de Recherche Saint-Antoine (CRSA) et le Laboratoire de Physique des Plasmas (LPP) a permis de mettre en évidence des effets antitumoraux significatifs dans un modèle murin immunodéficient de CCA, ainsi que des remodelages importants du stroma tumoral, un élément crucial dans la progression de la tumeur. Depuis, un dispositif CAP adapté à une insertion dans un duodélescope a été mis au point, dans le but de permettre dans le futur un traitement *in situ* des tumeurs de CCA par voie endoscopique.

L'objectif de cette thèse a donc été d'explorer les effets antitumoraux de cette nouvelle source de plasma sur des modèles *in vitro* et *in vivo* de CCA, en distinguant les effets directs du plasma sur les cellules tumorales de ceux indirects sur la tumorigenèse, portés via des modifications phénotypiques des cellules stromales, notamment les fibroblastes associés au cancer (CAFs) et les cellules endothéliales tumorales (TECs). Après avoir démontré la faisabilité technique et l'applicabilité biologique de cette source endoscopique, il a été observé que le stress oxydant induit par le CAP modifiait l'état d'activation et le phénotype migratoire des CAFs, tout en affectant la viabilité et le profil angiogénique des TECs. L'utilisation de modèles tridimensionnels sphéroïdes a également révélé des signatures immunogènes déclenchées par le traitement au plasma froid. En effet, il a été prouvé *in vivo*, via une vaccination prophylactique, que le CAP pouvait induire une mort cellulaire immunogène (ICD) des cellules tumorales, favorisant le recrutement de cellules immunitaires sur le site tumoral. Des résultats préliminaires ont aussi montré que le traitement direct des tumeurs sous-cutanées ralentissait la croissance tumorale tout en permettant le recrutement de cellules immunes antitumorales. Enfin, après avoir éclairci les mécanismes de l'ICD *in vitro*, une nouvelle approche thérapeutique combinant le CAP et des vaccinations a été proposée, démontrant un effet antitumoral accompagné d'une infiltration accrue de cellules immunitaires. Dans l'optique de rendre l'utilisation du CAP accessible en clinique, des tests sur des modèles porcins ont été réalisés pour vérifier la sécurité thermique et électrique de cette source endoscopique, tant pour le patient que pour le clinicien. Ainsi, le CAP ouvre de nouvelles perspectives prometteuses pour le traitement locorégional du CCA, en modulant l'immunogénicité des tumeurs et en impactant leur stroma desmoplasique.

Mots-clés : cholangiocarcinome, plasma froid atmosphérique, microenvironnement tumoral