



HAL
open science

L'ingénierie tissulaire comme outil pour comprendre et améliorer la délivrance de molécules thérapeutiques à l'échelle du tissu

Laure Gibot

► **To cite this version:**

Laure Gibot. L'ingénierie tissulaire comme outil pour comprendre et améliorer la délivrance de molécules thérapeutiques à l'échelle du tissu. Biotechnologies. Université TOULOUSE III – Paul Sabatier, 2020. tel-03080031

HAL Id: tel-03080031

<https://hal.science/tel-03080031>

Submitted on 17 Dec 2020

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

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



UNIVERSITÉ
TOULOUSE III
PAUL SABATIER



IMRCP

Université TOULOUSE III – Paul Sabatier

Ecole doctorale Science de la matière

Année universitaire 2020-2021

Habilitation à diriger des recherches

Présentée et soutenue le mardi 6 Octobre 2020

L'ingénierie tissulaire comme outil pour comprendre et améliorer la délivrance de molécules thérapeutiques à l'échelle du tissu

Laure GIBOT

Chargée de recherche CRCN (CNRS)

Laboratoire des Interactions Moléculaires et Réactivité Chimique et Photochimique

UMR 5623

Jury

Dr Nathalie Picollet-D'Hahan (CEA, Inserm U1038, équipe BIOMICS, Grenoble)

Pr Vincent Sol (Laboratoire de Chimie des Substances Naturelles, Université de Limoges)

Dr Nicolas L'Heureux (Laboratoire BIOTIS, Inserm U1026, Université de Bordeaux)

Pr Nofel Merbahi (Laboratoire Plasma et conversion d'énergie, Université Paul Sabatier, Toulouse)

Dr Anne-Françoise Mingotaud (Laboratoire des Interactions Moléculaires et Réactivité Chimique et Photochimique, UMR5623, Université Paul Sabatier, Toulouse)

RÉSUMÉ

Pour assurer l'efficacité thérapeutique d'une molécule-médicament, il faut prendre en compte non seulement son activité intrinsèque, mais aussi les nombreuses barrières physiques, chimiques et biologiques qu'elle rencontrera de son site d'injection jusqu'à sa cible et qui peuvent limiter son action. Ces barrières sont aussi diverses que le passage de l'endothélium, des jonctions intercellulaires, la membrane plasmique, la diffusion à travers la matrice extracellulaire, les zones hypoxiques et de faible pH dans les tumeurs...

Dans le contexte du cancer, en associant les médicaments avec un système d'administration adéquat, aussi appelé vecteur, celui-ci va améliorer la pharmacocinétique de la molécule active réduisant sa toxicité, les effets secondaires pour les cellules saines et augmenter sa biodistribution au niveau tumoral. Ce concept de transport de la molécule-médicament vers le tissu cible s'appelle la vectorisation (*drug delivery* en anglais). Dans ce document nous aborderons de façon plus approfondie deux types de vectorisation pour délivrer des molécules-médicament : 1) La vectorisation par des méthodes physiques telles que l'application d'un champ électrique externe, appelée électroporation et 2) La vectorisation par des vecteurs chimiques *via* des nanoparticules polymères de types micelles ou polymersomes dans le cadre de la thérapie photodynamique (PDT).

Le nombre incroyable d'essais cliniques en cancérologie qui ont échoué malgré des résultats extrêmement prometteurs obtenus avec des modèles animaux *in vivo* ou des cellules *in vitro* montrent la nécessité de développer d'autres approches translationnelles pour enrichir le lien entre les études *in vitro* et les applications cliniques. C'est ce que propose l'ingénierie tissulaire qui vise à produire en laboratoire à partir de co-cultures de cellules humaines des tissus humains en trois dimensions riches en matrice extracellulaire.

L'objectif des travaux présentés dans ce document est de mieux comprendre les mécanismes et l'efficacité de transfert des molécules-médicaments par électroporation et nanovecteurs polymères à l'échelle tissulaire dans un contexte cutané et/ou tumoral. Les résultats montrent sans surprise que la vectorisation améliore l'efficacité des molécules-médicament dans un contexte tissulaire 3D. Le point original qui est soulevé par les résultats et la discussion est l'importance de s'intéresser à l'effet intrinsèque du vecteur (*per se*), à savoir le champ électrique seul ou les polymères. Nous avons ainsi démontré par exemple que le champ électrique, un stimulus purement physique, induit la transdifférenciation de fibroblastes en myofibroblastes et le remodelage des collagènes cutanés *via* l'augmentation de la quantité de métalloprotéinases (MMPs) actives.

En conclusion, l'ingénierie tissulaire est une approche attractive pour étudier la délivrance de molécules-médicament à l'échelle tissulaire et donc optimiser leur efficacité thérapeutique, tout en limitant le recours aux expérimentations animales en accord avec la politique éthique des 3R.

MOTS CLÉS

Ingénierie tissulaire, matrice extracellulaire, microvascularisation, peau, sphéroïde, vectorisation, drug delivery, électroporation, matière molle, nanovecteurs polymères, thérapie photodynamique

SOMMAIRE

CURRICULUM VITAE	1
PARCOURS SCIENTIFIQUE	11
INTRODUCTION AUX ENJEUX DE LA DELIVRANCE DE MEDICAMENTS A L'ECHELLE TISSULAIRE	13
1. INGENIERIE TISSULAIRE	17
1.1. DEFINITION	17
1.2. MODELE 3D DE TUMEUR	18
1.3. MODELE TISSULAIRE DE PEAU	20
1.3.1. <i>Le feuillet cellulaire comme brique élémentaire</i>	20
1.3.2. <i>Reconstruction d'un réseau microvasculaire fonctionnel</i>	22
1.3.3. <i>Étude fonctionnelle de la lymphangiogenèse</i>	23
1.3.4. <i>Étude de l'angiogenèse tumorale dans un modèle cutané cancéreux</i>	24
1.3.5. <i>Impact de la matrice extracellulaire sur les propriétés cellulaires</i>	25
2. ÉTUDE A L'ECHELLE TISSULAIRE DE LA VECTORISATION PHYSIQUE PAR ELECTROPORATION ...	27
2.1. DEFINITION DE L'ELECTROPORATION ET ENJEUX A L'ECHELLE TISSULAIRE	27
2.2. ÉLECTROCHIMIOThERAPIE SUR LE SPHEROÏDE	29
2.3. ÉLECTROTRANSFERT DE GENES DANS UN SUBSTITUT DERMIQUE	31
2.4. ÉTUDE DU REMODELAGE DE LA MATRICE EXTRACELLULAIRE CUTANEE SUITE A L'ELECTROPORATION	33
2.4.1. <i>Contexte et état de l'art</i>	33
2.4.2. <i>La capacité migratoire des fibroblastes dermiques est stimulée indirectement par l'électroporation, via le secrétome</i>	34
2.4.3. <i>L'électroporation induit le remodelage des collagènes principalement via l'activation des métalloprotéinases (MMPs)</i>	35
3. ÉTUDE A L'ECHELLE TISSULAIRE DE LA VECTORISATION CHIMIQUE PAR NANOVECTEURS POLYMERES	39
3.1. DEFINITION DE LA THERAPIE PHOTODYNAMIQUE, DES NANOVECTEURS POLYMERES ET ENJEUX A L'ECHELLE TISSULAIRE ..	39
3.2. EFFETS DES PROPRIETES PHYSICO-CHIMIQUES DES NANOVECTEURS POLYMERES SUR L'EFFICACITE ANTICANCEREUSE DE LA PDT DANS UN MODELE 3D <i>IN VITRO</i>	42
3.3. PASSAGE DE LA BARRIERE ENDOTHELIALE PAR DIFFERENTS TYPES DE NANOVECTEURS POLYMERES	46
DISCUSSION	49
4. OBJECTIFS SCIENTIFIQUES A MOYEN TERME	55
4.1. ÉVALUATION DE LA PDT DANS UN SUBSTITUT CUTANE CANCEREUX HUMAIN	55
4.2. INTERACTIONS NANOVECTEURS POLYMERES/MEMBRANES DANS LE CONTEXTE DE LA PDT	56
5. OBJECTIFS SCIENTIFIQUES A LONG TERME	59
5.1. EFFETS DES COMPLEXES POLYIONIQUES (PICs) METALLIQUES SUR LA CICATRISATION CUTANEE	59
5.2. DEVELOPPEMENT DE VECTEURS STIMULABLES POUR AMELIORER LA CICATRISATION CUTANEE	60
5.3. AMELIORATION DE LA CICATRISATION DANS UN CONTEXTE INFECTE	62
CONCLUSION.....	63
RÉFÉRENCES.....	64

Curriculum Vitae

Laure Gibot ([ORCID](#))

CRCN CNRS, gibot@chimie.ups-tlse.fr, née le 28 Juin 1984 à Limoges, célibataire 1 enfant
33 Avenue Tolosane, 31520 Ramonville Saint Agne

Mots clés

Ingénierie tissulaire, matrice extracellulaire, microvascularisation, peau, sphéroïde, vectorisation (physique et chimique), électroporation, nano-objets pour la santé, thérapie photodynamique

Cursus universitaire

- 2007-2010 : Doctorat en biologie cellulaire et moléculaire à l'université Laval, Québec (Canada).
- 2006-2007 : Master Recherche « Biologie, Produits Animaux et Qualité », option « Biochimie et Génétique Appliquées à la Cellule Animale » à l'université de Rennes 1.
- 2004-2007 : Diplôme d'ingénieur à l'École Nationale Supérieure d'Agronomie (ENSA) de Rennes, spécialité Biochimie.
- 2002-2004 : Classes préparatoires aux grandes écoles en BCPST (Biologie, Chimie, Physique, Science de la Terre), Lycée C. Guérin à Poitiers.

Expériences de recherche

2018-... Chargée de recherche CNRS (CRCN) au Laboratoire des Interactions Moléculaires et Réactivité Chimique et Photochimique (IMRCP-CNRS UMR 5623) à Toulouse

Vectorisation chimique de molécules-médicament dans un contexte tissulaire cutané : applications à la thérapie photodynamique et à la cicatrisation

2016-2018 Chargée de recherche CNRS (CR2) à l'Institut de Pharmacologie et de Biologie Structurale (IPBS-CNRS UMR5089) à Toulouse

Électroporation de la peau : effets d'un champ électrique externe sur la matrice extracellulaire et les cellules à l'échelle du tissu

2012-2016 Chercheur post-doctoral sous la direction de Dr Rols à l'IPBS-UMR 5089 à Toulouse

Développement de modèles cellulaires en 3D, sains ou cancéreux, pour l'étude de l'électrotransfert de molécules d'intérêt thérapeutique

2011 Ingénieur R&D chez Genoskin à Toulouse (CDD 12 mois)

Survie d'explants cutanés humains, valorisés dans une start up

2007-2010 Doctorat sous la direction de Dr FA Auger au Laboratoire d'Organogenèse Expérimentale (LOEX), Québec, Canada

Microvascularisation (sanguine et lymphatique) d'un substitut cutané reconstruit par génie tissulaire

Enseignement universitaire

2016 et 2017 : 3h de cours magistral sur l'ingénierie tissulaire cutanée dans le Master 2 « Sciences et Management des Biotechnologies » (Thérapie cellulaire, génique et ingénierie tissulaire), Université Grenoble Alpes

Direction scientifique

Encadrement d'étudiants

- **Post-doctorant**

2016-2017 : Agathe Figarol (50% avec AF Mingotaud IMRCP), 9 mois (Toulouse, France). *(2 publications dont une en 1^{er} auteur ; en post-doc à l'université d'Osaka au Japon depuis 2018)*

- **Doctorant**

2018-2021 : Sara Gouardères (100%), doctorat en biologie, Université Paul Sabatier (Toulouse, France). « Réponse cellulaire et tissulaire cutanée à l'électroporation ». *(1 publication actuellement)*

2015-2018 : Julie Chauvin (20% avec P Vicendo IMRCP, co-supervision des expérimentations biologiques de sa thèse). Doctorat en ingénierie des plasmas, Université Paul Sabatier (Toulouse, France). « Étude des mécanismes anti-cancéreux induits par milieux activés par jet de plasma froid : vers une nouvelle approche thérapeutique ». *(4 publications dont 3 en 1^{er} auteur ; en CDI chez Alten depuis 2019)*

2013-2017 : Moinecha Madi (50% avec MP Rols IPBS), doctorat en biologie, Université Paul Sabatier (Toulouse, France). « Étude de l'électroporation à l'échelle cutanée ». *(4 publications, dont 2 en 1^{er} auteur ; en CDI chez CGI à Toulouse depuis 2018)*

2013-2016 : Ugo Till (20% avec AF Mingotaud IMRCP, co-supervision des expérimentations biologiques de sa thèse). Doctorat en chimie moléculaire et supramoléculaire, Université Paul Sabatier (Toulouse, France). « Vers le développement critique de vecteurs polymères pour l'oncologie ». *(8 publications dont 5 en 1^{er} auteur ; en CDI chez Theseo Biosecurity depuis 2018).*

- **ERASMUS+**

2019 : Mina Raileanu (100%), 1 mois, étudiante en thèse au Horia Hulubei National Institute for R&D in Physics and Nuclear Engineering (Bucarest, Roumanie)

2017 : Mihaela Bacalum (100%), 1 mois, Horia Hulubei National Institute for R&D in Physics and Nuclear Engineering (Bucarest, Roumanie)

2016 : Milda Jakutaviciute (100%), 3 mois, Vytautas Magnus University (Kaunas, Lituanie)

2013 : Stine Krog Frandsen (100%), 1 mois, étudiante en thèse en échange dans le cadre du COST TD1104, Herlev Hospital (Copenhagen, Danemark)

- **Master 2/ingénieur**

2019 : Loyal Doumard (100%), Master 2 « biologie santé » (6 mois), Université Paul Sabatier (Toulouse, France)

2015 : Natacha Calmels (100%), Master 2 « oncologie » (6 mois) Université Paul Sabatier (Toulouse, France)

2013 : Amar Tamra (100%), Master 2 « Diagnostic moléculaire et sciences médico-légales » (6 mois) (Beirut, Liban)

2009 : Jason Micklas (100%), « System Design Engineering », B.Sc final internship (4 month), University of Waterloo (Toronto, Canada)

- **Master 1**

2018 : Layal Doumard (100%), Master 1 « biologie santé » (2 mois), Université Paul Sabatier (Toulouse, France)

- **BTS, IUT**

2020 : Rachel Brival (50% avec I Fourquaux au CMEAB), 3 mois, BTS ANABIOTEC (Auzeville)

2010 : Adeline Boulay (100%), 3 mois, IUT Génie biologique (Laval, France)

2010 : Sophie Vadeboncoeur (100%), stage d'externat 5ème année de médecine (1 mois), Université Laval (Québec, Canada)

2008 : Vicky Gagné (100%), stage de fin d'étude de License « Biologie médicale », 4 mois, Université de Trois-Rivières (Québec, Canada)

Financements en tant que PI

- 2019-2020 : 20k€ **Campus France**, Projet Hubert Curien franco roumain (programme Brancusi) pour le projet ATAMP (antitumoral properties of vectorized antimicrobial peptides)

- 2017-2021 : 296k€ **Agence Nationale de la recherche**, programme ANR **JCJC** pour le projet WHEEL (Electrostimulation of wound healing)

- 2017-2018 : 16k€ **Cancéropôle Grand Sud-Ouest** (GSO) émergence pour le projet AToP (Antitumoral treatment based on cold plasmas)

- 2015-2017 : 40k€ **Fondation d'entreprise SILAB/Jean Paufigue** pour le projet EPCaMEL (électroporation associée au calcium pour combattre le mélanome)

Animation scientifique

Expertise

- 2018-... : Membre du Comité d'Éthique de la Recherche (CER) à l'université fédérale de Toulouse. *Le CER est une instance permettant de garantir la déontologie des protocoles de recherche impliquant la personne humaine.*
- 2018-... : Membre du conseil scientifique de la fondation d'entreprise SILAB-Jean Paufigue
- Examen de demandes de subvention nationales et internationales (Swiss 3R Competence Centre (3RCC); MITACS; ANR ASTRID; Défi interdisciplinaire « InFlniTi » du CNRS)
- Expertise pour le MESRI de dossiers crédit impôt recherche aux entreprises

- Examen d'articles dans des journaux axés biologie et chimie (Advanced Materials, Small, Biomaterials, Journal of membrane biology, Bioelectrochemistry, Nanotechnology, Journal of materials chemistry B, Materials, PlosOne, Biomed Research International...)

Vie de laboratoire

- Correspondante Égalité à l'IMRCP (2018-...). *Plan d'action initié par le CNRS en faveur de l'égalité professionnelle homme-femme*
- Membre du groupe « gestion des locaux » dans le cadre de la démarche d'amélioration continue du laboratoire des IMRCP (2018-...)
- Personne-ressource CODECOH (conservation d'échantillons humains biologiques) (2012-...)
- Représentante élue des post-docs au Conseil de Laboratoire de l'IPBS (2012-2016)

Sociétés savantes

Membre de TERMIS (Tissue Engineering and Regenerative Medicine International Society), de la SFBMEc (société française de biologie de la matrice extracellulaire) et de l'ISEBTT (International Society for Electroporation-Based Technologies and Treatments)

Distinctions et prix

Distinctions

- 2017: Attribution du prix Jeune Chercheur par la fondation d'entreprise FONROGA
- 2016-2019 : Attribution de la PEDR (Prime d'encadrement doctoral et de recherche) par le CNRS
- 2007: Gratification au mérite à l'École Nationale Supérieure d'Agronomie (ENSA) de Rennes

Prix de présentation orale

- 2015: 1er prix jeune chercheur, 1st World congress on electroporation (Portoroz, Slovenia)
- 2010: Prix de la recherche fondamentale, 21th clinical day of FRSQ (Québec, Canada)
- 2009: Prix BD Biosciences, 11th research day of Laval University (Québec, Canada)

Prix poster

- 2015 : Prix jeune chercheur, 11^{ème} journées du Cancéropôle Grand Sud-Ouest (Bordeaux, France)
- 2014 : Prix jeune chercheur, 10^{ème} journées du Cancéropôle Grand Sud-Ouest (Toulouse, France)

Brevets

1. Chrétiennot T, Vézinet R, Catrain A, Gibot L, Pillet F, Rols MP. Méthode de conception de systèmes d'exposition électromagnétique permettant de simultanément maximiser le couplage et l'homogénéité du champ électrique dans l'objet à exposer, et optimiser les propriétés électriques du dispositif d'exposition. FR 15 52670

2. Vézinet R, Catrain A, Chrétiennot T, Gibot L, Pillet F, Rols MP. Procédé de préparation d'un objet à tester et procédé d'amélioration de l'homogénéité et de l'intensité d'un champ électrique induit dans cet objet illuminé par une onde électromagnétique incidente. FR 14 54821

Communication scientifique

Conférences invitées dans des laboratoires

1. Ingénierie tissulaire et vectorisation de molécules-médicament. **Stromalab**, Toulouse, Septembre 2018.
2. Electrostimulation of wound healing: towards a more effective therapy. IMRCP (Laboratoire des **Interactions Moléculaires et Réactivité Chimique et Photochimique** UMR 5623), Toulouse, Février 2018
3. Microvascularisation d'un substitut cutané reconstruit par génie tissulaire : mise au point et applications à la recherche clinique et fondamentale. A l'UDEAR (**Différenciation épidermique et autoimmunité rhumatoïde**) CNRS 5165, Toulouse, juin 2010.
4. Production d'une peau reconstruite par génie tissulaire. **Faculté de médecine**, CNRS unité 6101, Limoges, Décembre 2009.

Conférences invitées dans des congrès

1. AFM measurements of the mechanical properties of the same cell type grown under different configurations of increasing complexity (2D, 3D and reconstructed tissue). Journée thématique "**Imagerie Fonctionnelle des Organoïdes**", Toulouse, Mars 2018
2. Blood and lymphatic microvascularization of a self-assembled human skin substitute. CED, (**centre européen de dermocosmétologie**), Lyon, Octobre 2017
3. Tissue-engineered human skin as a tool to understand the mechanisms of electroporation at the tissue scale. Workshop "**Biofabrication & cancer**" organisé par le **cancéropôle Grand Sud-Ouest**, Toulouse, juin 2017
4. Electrostimulation et tissus : Comment l'électricité soigne. **Journée de formation PERSE** (Société française de l'escarre), Paris, 2016
5. Tissue engineered skin as a challenging step toward successful 3D printing? Journée scientifique 3D skin print, CED (**centre européen de dermocosmétologie**), Lyon, 2016.

Communications orales

1. Gouardères S, Mingotaud AF, Vicendo P, Gibot L. A tissue-engineered human microvascularized tumor skin substitute to better understand photodynamic therapy with photosensitizer-loaded polymer micelles. Workshop jeunes chercheurs "**Biofabrication & cancer**" organisé par le Cancéropôle Grand Sud-Ouest, Carcassonne (**France**), 2020.
2. Montis C, Demazeau M, Till U, Collin F, Gibot L, Pimienta V, Vicendo P, Berti D, Roux C, Mingotaud AF, Lonetti B. Structure-effect relationship of copolymer-based nano-carriers for photodynamic therapy. Congrès **IUPAC** 2019, Paris (**France**) 2019
3. Gibot L, Doumard L, Madi M, Rols MP. Contradictory effects of electric field of electroporation type on human cutaneous cell migration and proliferation in perspective of wound healing. 15th International Bioelectrics Symposium (**Bioelectrics**), Prague (**Czech Republic**) 2018
4. Merbahi N, Chauvin J, Vicendo P, Gibot L, Yousfi M. Investigation of Effect of Plasma Activated Medium (PAM) on FaDu (Head & Neck Cancer) Multicellular Tumor Spheroids. 7th international conference on plasma medicine (**ICPM-7**), Philadelphie (**USA**) 2018

5. Kolosnjaj-Tabi J, Kralj S, Gibot L, Gasc G, Fourquaux I, Golzio M, Rols MP. Effect of pulsed electric fields on the cellular internalization and intratumoral distribution of prospectively therapeutic magnetic nanoparticles clusters. **BioEM 2018**, Portoroz (**Slovenia**) 2018
6. Figarol A, Gibot L, Golzio M, Lonetti B, Mingotaud AF, Rols MP. A journey from the endothelium to tumor tissue: distinct behavior between PEO-PCL micelle and polymersome nanocarriers. **Polymer Conference**, Bordeaux (**France**), 2018
7. Gibot L, Audebert M, Gasc G, Golzio M, Rols MP. Calcium delivery by electroporation induces in vitro cell death through mitochondrial dysfunction without any genotoxicity. **2nd world congress on electroporation**. Norfolk (**USA**), 2017
8. Figarol A, Mingotaud AF, Rols MP, Gibot L. Development of an in vitro model to predict the passage of polymersomes nanovectors through the endothelial barrier for an optimized drug delivery to tumor cells. **Nanomedicine and Drug Delivery**, Osaka (**Japon**), 2017
9. Gibot L, Rols MP. Tissue-engineered human skin as a tool to understand the mechanisms of electroporation at the tissue scale. **"Biofabrication & cancer"**, Toulouse (**France**), 2017
10. Gibot L, Audebert M, Rols MP. Calcium delivery by electroporation induces *in vitro* cell death through mitochondrial dysfunction without any genotoxicity. **Workshop Jeunes Chercheurs "Nanomedicine in Cancer"** organisé par le cancéropole grand sud-ouest, Montauban (**France**), 2017
11. Till U, Gibot L, Mingotaud C, Vicendo P, Rols MP, Gaucher M, Violleau F, Mingotaud AF. Self-assembled polymeric vectors mixtures: characterization of the polymorphism and existence of synergetic effects in photodynamic therapy. **Congrès national du GFP**, Marseille (**France**), 2016
12. Till U, Gibot L, Mingotaud AF, Rols MP, Gaucher M, Violleau F, Vicendo P. Polymeric self-assemblies for photodynamic therapy: a critical approach. **Photodynamic therapy and photodiagnosis update meeting**, Nancy (**France**) 2016
13. Gibot L, Madi M, Vézinet R, Rols MP. Mixed spheroids as a relevant 3D biological tool to understand therapeutic window of electrochemotherapy. **First world congress on electroporation**. Portoroz (**Slovenia**), 2015
14. Gibot L, Madi M, Rols MP. *in vitro* reconstruction of human dermal tissue to study gene electrotransfer. XXIII^{ème} congrès annuel de la Société française de biologie de la matrice extracellulaire **SFBMEc**. Lyon (**France**), 2015
15. Gibot L, Pillet F, Madi M, Rols MP, Dague E. Tissue-engineered dermal model rich in collagens recapitulates human native dermal tissue biomechanics better than classical monolayer and spheroid model. « **New concepts & technological advances in extracellular matrix** » Coloque AVIESAN, Paris (**France**), 2015
16. Till U, Gibot L, Moukarzel B, Mingotaud AF, Rols MP, Gaucher M, Violleau F, Chassenieux C, Vicendo P. Polymeric self-assemblies for photodynamic therapy. **Nanotech** Paris (**France**) 2015
17. Gibot L, Rols MP. L'électroperméabilisation comme outil de ciblage des cellules en prolifération. **Modèles 3D et applications en cancérologie**, Toulouse (France), 2014
18. Gibot L, Rols MP. Evidence for the targeting of proliferative cells *viability* by electric field pulses. **Gordon Seminar: Bioelectrochemistry**. Biddeford (**USA**), 2014
19. Mingotaud AF, Gibot L, Lemelle A, Till U, Moukarzel B, Vicendo P, Rols MP, Chassenieux C, Gaucher M, Violleau F. Polymeric micelles encapsulating photosensitizer: structure/photodynamic therapy efficiency relation. **Société Française de Nanomédecine**, Nancy (**France**), 2014
20. Gibot L, Lemelle A, Till U, Moukarzel B, Mingotaud AF, Pimienta V, Saint-Aguet P, Rols MP, Gaucher M, Violleau F, Chassenieux C, Vicendo P. Polymeric micelles encapsulating photosensitizer: structure/photodynamic therapy efficiency relation. **Nanobiomed**, Barcelone (**Espagne**), 2014

21. Vézinet R, Catrain A, Chretienot T, Rols MP, Gibot L, Pillet F. Plane wave in vitro exposure of biological samples, geometry considerations. **IEEE Power Modulator and High Voltage**, Santa Fe (USA), 2014
22. Gibot L, Lemelle A, Wasungu L, Mingotaud AF, Moukarzel B, Vicendo P, Rols MP. Polymeric self-assemblies for photodynamic therapy: treatment efficiency in spheroid 3D tumor models. **9th NanoBioEurope** 2013. Toulouse (France), 2013
23. Gibot L, Wasungu L, Teissié J, Rols MP. Electromediated drug delivery in 3D multicellular spheroid model. **7th conference on experimental and translational oncology**. Portoroz (Slovenia), 2013
24. Ehrhart J, Lemelle A, Mingotaud AF, Moukarzel B, Till U, Vicendo P, Gibot L, Rols MP, Wasungu L, Bonneau S, Kerdous R, Sureau F. Vectorisation de photosensibilisateurs pour la PDT par des micelles de copolymères. Proposition d'un mécanisme d'action. **Fondation RITC**, Toulouse (France) 2013
25. Ehrhart J, Lemelle L, Mingotaud AF, Moukarzel B, Vicendo P, Gibot L, Rols MP, Wasungu L, Bonneau S, Kerdous R, Sureau F. Polymeric self-assemblies for photodynamic therapy: cell penetration of the photosensitizer. **Nanobioeurope**, Toulouse (France) 2013
26. Mingotaud AF, Gibot L, Lemelle A, Wasungu L, Kerdous R, Ehrhart J, Souchard JP, Mingotaud C, Rols MP, Violleau F, Gaucher M, Bonneau S, Sureau F, Vicendo P. Systèmes polymères auto-assemblés pour la thérapie photodynamique : caractérisation par fractionnement flux force et application à des modèles de tumeurs. 41ème colloque du Groupe Français des Polymères (GFP), Grenoble (France) 2012
27. Mingotaud AF, Gibot L, Lemelle A, Wasungu L, Kerdous R, Ehrhart J, Souchard JP, Mingotaud C, Rols MP, Violleau F, Bonneau S, Sureau F, Vicendo P. Vectorisation de photosensibilisateurs pour la PDT par des micelles de copolymères. Proposition d'un mécanisme d'action. Congrès **GDR Photomed**, Toulouse (France), 2012
28. Gibot L, Wasungu L, Teissié J, Rols MP. Multicellular tumor spheroid as a relevant ex vivo model to assess electromediated drug delivery in human tumors. **Electroporation based Technologies and Treatments (EBTT)**. Ljubljana (Slovenia), 2012
29. Gibot L, Auger FA. *In vitro* reconstruction of a microvascularized thick tissue. **TERMIS-EU 2010**. Galway (Ireland), 2010

Publications (*h index 13*)

* ces auteurs ont contribué de manière égale ; ¶ corresponding author ; étudiants (co)-supervisés

Publications dans des journaux à comité de lecture

1. **Gouarderes S**, **Doumard L**, Vicendo P, Mingotaud AF, Rols MP, Gibot L¶. Electroporation does not affect directly human dermal fibroblast proliferation and migration properties directly but indirectly *via* the secretome. **Bioelectrochemistry**. 2020. Doi:10.1016/j.bioelechem.2020.107531
2. Gibot L, Montigny A, Baaziz H, Fourquaux I, Audebert M¶, Rols MP¶. Calcium delivery by electroporation induces *in vitro* cell death through mitochondrial dysfunction without DNA damages. **Cancers** 2020 Feb 12;12(2). pii: E425. doi: 10.3390/cancers12020425.
3. Gibot L*, Demazeau M*, Pimienta V, Mingotaud AF, Vicendo P, Collin F, Martins-Froment N, Dejean S, Nottelet B, Roux C¶, Lonetti B¶. Role of Polymer Micelles in the Delivery of Photodynamic Therapy Agent to Liposomes and Cells. **Cancers** 2020, 12(2), pii: E384. doi: 10.3390/cancers12020384.

4. [Gibot L*](#), Kolosnjaj-Tabi J*, Bellard E, Chretiennot T, Saurin Q, Catrain A, Golzio M, Vézinet R, Rols MP¶. Evaluations of Acute and Sub-Acute Biological Effects of Narrowband and Moderate-Band High Power Electromagnetic Waves on Cellular Spheroids. **Sci Rep** 2019, 9, 1–14.
5. Oudin A, [Chauvin J](#), [Gibot L](#), Rols MP, Balor S, Goudounèche D, Payré B, Lonetti B, Vicendo P, Mingotaud AF¶, Lapinte V¶. Amphiphilic polymers based on polyoxazoline as relevant nanovectors for photodynamic therapy; **J Mater Chem B**. 2019 Aug 14;7(32):4973-4982. doi: 10.1039/c9tb00118b.
6. Griseti E, Kolosnjaj-Tabi J, Gibot L, Fourquaux I, Rols MP, Yousfi M, Merbahi N¶, Golzio M ¶. Elucidation of *in vitro* cellular steps induced by antitumor treatment with plasma-activated medium. **Sci Rep** 2019 May 20;9(1):7583. doi: 10.1038/s41598-019-44087-5.
7. [Chauvin J*](#), [Gibot L*](#), Griseti E, Golzio M, Rols MP, Merbahi N¶, Vicendo P¶. Elucidation of *in vitro* cellular steps induced by antitumor treatment with plasma-activated medium. **Sci Rep** 2019 Mar 19;9(1):4866. doi: 10.1038/s41598-019-41408-6.
8. [Figarol A](#), [Gibot L¶](#), Golzio M, Mingotaud AF¶, Rols MP. A journey from the endothelium to tumor tissue: distinct behavior between PEO-PCL micelles and polymersomes nanocarriers. **Drug Deliv** 2018 Nov;25(1):1766-1778
9. Pillet F, [Gibot L](#), Catrain A, kolosnjaj-Tabi J, Courtois K, Chretiennot T, Bellard E, Tarayre J, Golzio M, Vézinet R, Rols MP¶. High Power Electromagnetic Pulse Applicators for Evaluations of Biological Effects Induced by Electromagnetic Radiation Waves. **RSC Advances** 2018, 8, 16319 - 16329
10. Pillet F*, [Gibot L*](#), [Madi M](#), Rols MP¶, Dague E¶. Importance of endogenous extracellular matrix in biomechanical properties of human skin model. **Biofabrication**. 2017 May 11;9(2):025017
11. [Gibot L](#), Galbraith T, Bourland J, Rogic A, Skobe M¶, Auger FA¶. Tissue-engineered 3D human lymphatic microvascular network for *in vitro* studies of lymphangiogenesis. **Nature Prot** 2017 1077-88
12. Carayon C, Ghodbane A, [Gibot L](#), Dumur R, Wang J, Saffon N, Rols MP, Solntsev KM, Fery-Forgues S¶. Conjugates of Benzoxazole and GFP Chromophore with Aggregation-Induced Enhanced Emission: Influence of the Chain Length on the Formation of Particles and on the Dye Uptake by Living Cells. **Small** 2016 Dec;12(47):6602-6612
13. [Till U](#), [Gibot L](#), Mingotaud AF, Ehrhart J, Wasungu L, Mingotaud C, Souchard JP, Poinso A, Rols MP, Violleau F, Vicendo P¶. Drug release by direct jump from poly(ethyleneglycol-b-ε-caprolactone)nano-vector to cell membrane. **Molecules** 2016 Nov 30;21(12). pii: E1643.
14. [Till U](#), [Gibot L](#), Vicendo P, Rols MP, Gaucher M, Violleau F¶, Mingotaud AF¶. Crosslinked polymeric self-assemblies as an efficient strategy for photodynamic therapy on a 3D cell culture. **RSC Adv**. 2016 6, 69984-69998
15. [Till U](#), [Gibot L](#), Mingotaud C, Vicendo P, Rols MP, Gaucher M, Violleau F¶, Mingotaud AF¶. Self-assembled polymeric vectors mixtures: characterization of the polymorphism and existence of synergistic effects in photodynamic therapy. **Nanotechnology**. 2016 Aug 5;27(31):315102.
16. Phez E, [Gibot L](#), Rols MP¶. How transient alterations of organelles in mammalian cells submitted to electric field may explain some aspects of gene electrotransfer process. **Bioelectrochemistry**. 2016 Dec;112:166-72.
17. [Madi M](#), Rols MP¶, [Gibot L¶](#). Gene Electrotransfer in 3D Reconstructed Human Dermal. **Curr Gene Ther**. 2016;16(2):75-82.
18. [Gibot L](#), Galbraith T, Kloos B, Das S, Lacroix D, Auger FA*, Skobe M*¶. Cell-based approach for 3D reconstruction of lymphatic capillaries *in vitro* reveals distinct functions of HGF and VEGF-C in lymphangiogenesis. **Biomaterials**. 2016 Feb;78:129-39

19. Frandsen SK*, Gibot L*, Madi M, Gehl J¶, Rols MP¶. Calcium electroporation: Evidence for differential effects between malignant and normal cells. **PlosOne**. 2015 Dec 3;10(12):e0144028
20. Madi M, Rols MP¶, Gibot L¶. Efficient *in vitro* Electroporation of Reconstructed Human Dermal Tissue. **J Membr Biol**. 2015 Oct;248(5):903-8
21. Gibot L*, Chabaud S*, Bouhout S, Bolduc S, Auger FA, Moulin VJ¶. Anticancer properties of chitosan on human melanoma are cell line dependent. **Int J Biol Macromol**. 2014 Sep 1. pii: S0141-8130(14)00577-7
22. Gibot L, Lemelle A, Till U, Moukarzel B, Mingotaud AF, Pimienta V, Saint-Aguet P, Rols MP, Gaucher M, Violleau F, Chassenieux C, Vicendo P¶. Polymeric micelles encapsulating photosensitizer: structure/photodynamic therapy efficiency relation. **Biomacromolecules**. 2014 Apr 14;15(4):1443-55
23. Gibot L, Rols MP¶. 3D spheroids' sensitivity to electric field pulses depends on their size. **J Membr Biol**. 2013 Oct;246(10):745-750
24. Gibot L, Wasungu L, Teissié J, Rols MP¶. Antitumor drug delivery in multicellular spheroids by electroporation. **J Control Release**. 2013 Feb;167(2):138-147.
25. Gibot L, Galbraith T, Huot J, Auger FA¶. Development of a tridimensional microvascularized human skin substitute to study melanoma biology. **Clin Exp Metastasis**. 2013 Jan;30(1):83-90.
26. Bouhout S¶, Gauvin R, Gibot L, Aubé D, Bolduc S. Bladder substitute reconstructed in a physiological pressure environment. **J Pediatr Urol**. 2011 Jun;7(3):276-82.
27. Gibot L, Galbraith T, Huot J, Auger FA¶. A preexisting microvascular network benefits *in vivo* revascularization of an endothelialized tissue-engineered skin substitute. **Tissue Eng Part A**. 2010 Oct;16(10):3199-206.
28. Gibot L, Follet J, Metges JP, Auvray P, Simon B, Corcos L, Le Jossic-Corcos C¶. Human caspase-7 is positively controlled by SREBP-1 and SREBP-2. **Biochem J**. 2009 May;420(3):473-83.

Revue dans des journaux à comité de lecture

29. Demazeau M, Gibot L, Mingotaud AF, Vicendo P, Roux C¶, Lonetti B¶. Rational design of block copolymer self-assemblies in photodynamic therapy. **Beilstein J. Nanotechnol** 2020, 11, 180–212. doi:10.3762/bjnano.11.15
30. Kolosnjaj-Tabi J¶, Gibot L, Fourquaux I, Golzio M, Rols MP¶. Electric field-responsive nanoparticles and electric fields: physical, chemical, biological mechanisms and therapeutic prospects. **Adv Drug Deliv Rev**. 2018 Nov 7. pii: S0169-409X(18)30285-0. doi: 10.1016/j.addr.2018.10.017.
31. Gibot L, Golzio M, Rols MP¶. How imaging membrane and cell processes involved in electroporation can improve its development in cell biology and in clinics. **Adv Anat Embryol Cell Biol**. 2017;227:107-118.
32. Gibot L, Rols MP¶. Gene transfer by pulsed electric field is highly promising in cutaneous wound healing. **Expert Opin Biol Ther**. 2016;16(1):67-77
33. Auger FA¶*, Gibot L*, Lacroix D. The pivotal role of vascularization in tissue engineering. **Annu Rev Biomed Eng** 2013 Jul;15:177-200
34. Gibot L¶, Rols MP¶. Progress and prospects: The use of 3D spheroid models as a relevant way to study and optimize DNA electrotransfer. **Curr Gene Ther**. 2013 Jun;13(3):175-81

Chapitres de livre

1. Gibot L, Kotnik T, Golberg A¶. Electroporation applications in wound healing, in **Bioengineering in wound healing**. A system approach. Golberg A, Yarmush M editors. World Scientific, 2017 Vol.8 , p. 355-377
2. Gibot L¶. 3D Tissue Models to Bridge the Gap Between Cell Culture and Tissue in Assessing Electroporation, in **Handbook of Electroporation**, Miklavcic D, Editor. 2016, Springer International Publishing, p. 1-15
3. Gibot L¶, Golberg A¶. Electroporation in Scars/Wound Healing and Skin Response, in **Handbook of Electroporation**, Miklavcic D, Editor. 2016, Springer International Publishing, p. 1-18.

Actes de congrès

Figarol A, Mingotaud AF, Rols MP, Gibot L. Development of an *in vitro* model to predict the passage of polymersomes nanovectors through the endothelial barrier for an optimized drug delivery to tumor cells. **J Pharm Drug Deliv Res** 2017, 6:4 (Suppl) (Nanomedicine and drug delivery, May 2017, Osaka (Japan))

Gibot L, **Madi M**, Vézinet R, Rols MP. Mixed Spheroids as a Relevant 3D Biological Tool to Understand Therapeutic Window of Electrochemotherapy. **IFBME Proceedings**. 2016, 32, 200-203. DOI: 10.1007/978-981-287-817-5_45 (1st World congress of electroporation Portoroz (Slovenia))

Gibot L, Pillet F, **Madi M**, Rols MP, Dague E. A tissue-engineered dermal model rich in endogenous collagens recapitulates human native dermal tissue biomechanics better than classical monolayer or spheroid models. **European Cells and Materials** Vol. 31. Suppl. 1, 2016 (page P131) (TERMIS-EU 2016 Uppsala (Sweden))

Gibot L, Wasungu L, Chopinet L, Rols MP. Multicellular spheroids as a relevant model to study and optimize the electrotransfer of (macro)molecules. **Human Gene Therapy**. Oct 2012, 23(10): A1-A173. (European Society of gene and cell therapy (ESGCT). Versailles (France))

Gibot L, Chopinet-Mayeux L, Rols MP. The use of multicellular tumor spheroids (MCTS) as *in vitro* model for electrogene therapy optimization. **J Tissue Eng Regen Med** Sep 2012; 6 (Suppl.1):287. (3th TERMIS World congress 2012 Vienna (Austria))

Cattan V, Basoni C, Gibot L, Lacroix D, Garenc C, Lavigne C, Marette A, Auger FA. New *in vitro* Atherosclerosis Models with Genetic Deficient Tissue-Engineered Vascular Substitute. **Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology**. 2010;30:e183–e321

Gibot L, Chabaud S, Moulin V, Auger FA. Development of a human endothelialized reconstructed skin by tissue engineering to study melanoma biology. **J Invest Dermatol**. Apr 2009: 129 (Supplement 1s) Supp: S138-S138. (Society for Investigative Dermatology Annual Meeting, Montreal (Canada))

Parcours Scientifique

Lors de mon cursus en agronomie, au cours duquel je me suis spécialisée en biochimie et génétique appliquées à la cellule animale, j'ai eu l'occasion de découvrir la culture cellulaire. J'ai trouvé cet outil tellement extraordinaire que j'ai souhaité m'orienter vers l'ingénierie tissulaire afin d'exploiter au maximum le potentiel des cellules cultivées *in vitro*. Pour cela, je suis partie au Canada pour réaliser un doctorat en biologie cellulaire et moléculaire. J'ai choisi l'université Laval à Québec pour avoir la possibilité de travailler avec Dr François Auger au sein du Laboratoire d'Organogenèse EXpérimentale (LOEX), qui est un des laboratoires de pointe au niveau mondial pour la reconstruction en laboratoire de tissus humains. Cette expérience de recherche dans un laboratoire à l'interface entre la recherche fondamentale et les applications cliniques m'a permis d'acquérir des connaissances et des compétences uniques en termes de reconstruction de peau humaine. J'ai pris conscience à cette époque de l'importance de développer des modèles tissulaires de plus en plus complets et complexes afin de faire le lien entre les études réalisées *in vitro* sur des monocouches et celles réalisées *in vivo*. Une des lignes directrices de mes recherches est donc de proposer, grâce aux modèles cellulaires et tissulaires que je développe, des études qui soient en accord avec la règle éthique des 3R (Raffinement, Reduction, Remplacement) visant à limiter le recours aux expérimentations animales.

Une expérience rapide dans une entreprise de biotechnologie à mon retour en France m'a convaincue de réaliser un stage post-doctoral en recherche académique. J'ai donc rejoint le groupe de Biophysique Cellulaire dirigé par Dr Marie-Pierre Rols au sein de l'Institut de Pharmacologie et de Biologie Structurale (IPBS) à Toulouse. Cette expérience en recherche m'a permis de me familiariser avec une approche physique de vectorisation appelée électroporation et surtout de prendre conscience des contraintes liées à la vectorisation d'une molécule-médicament à l'échelle tissulaire. Depuis, je suis convaincue que l'exploration de la vectorisation non virale de molécules-médicaments dans un contexte tissulaire apportera non seulement de nombreuses réponses pertinentes sur ses mécanismes fondamentaux mais favorisera aussi des avancées déterminantes pour les applications médicales qui en découlent.

Mon cursus, mes différentes expériences ainsi que mes affinités font que mes travaux de recherche ont toujours été multidisciplinaires et ils se situent désormais à l'interface entre la biologie et la chimie. En effet, en 2018 j'ai réalisé une mobilité thématique et j'ai rejoint l'équipe IDeAS (Interfaces Dynamiques et Assemblages Stimulables) au Laboratoire des Interactions Moléculaires et Réactivité Chimique et Photochimique (IMRCP). Depuis, j'oriente mes recherches vers une vectorisation chimique à base de nanovecteurs polymères, toujours dans un contexte tissulaire cutané avec pour applications la thérapie photodynamique et la cicatrisation. Je propose donc aujourd'hui une analyse multi-échelle des interactions nanovecteurs polymères / vivant, que ce soit à l'échelle de la membrane, de la cellule ou du tissu. L'objectif est de comprendre le devenir des nanovecteurs polymères au sein du tissu et suite à leur rencontre avec la membrane plasmique, tout en analysant par des approches de pointe en biologie les effets cellulaires de cette interaction en termes de modulations géniques, protéiques et des fonctions cellulaires.

La Figure 1 résume mes activités de recherche autour de l'ingénierie tissulaire comme outil pour comprendre et améliorer la délivrance de molécules thérapeutiques à l'échelle du tissu. Elle indique aussi les collaborations nationales et internationales que je développe et dont je ne parlerai pas dans ce document.

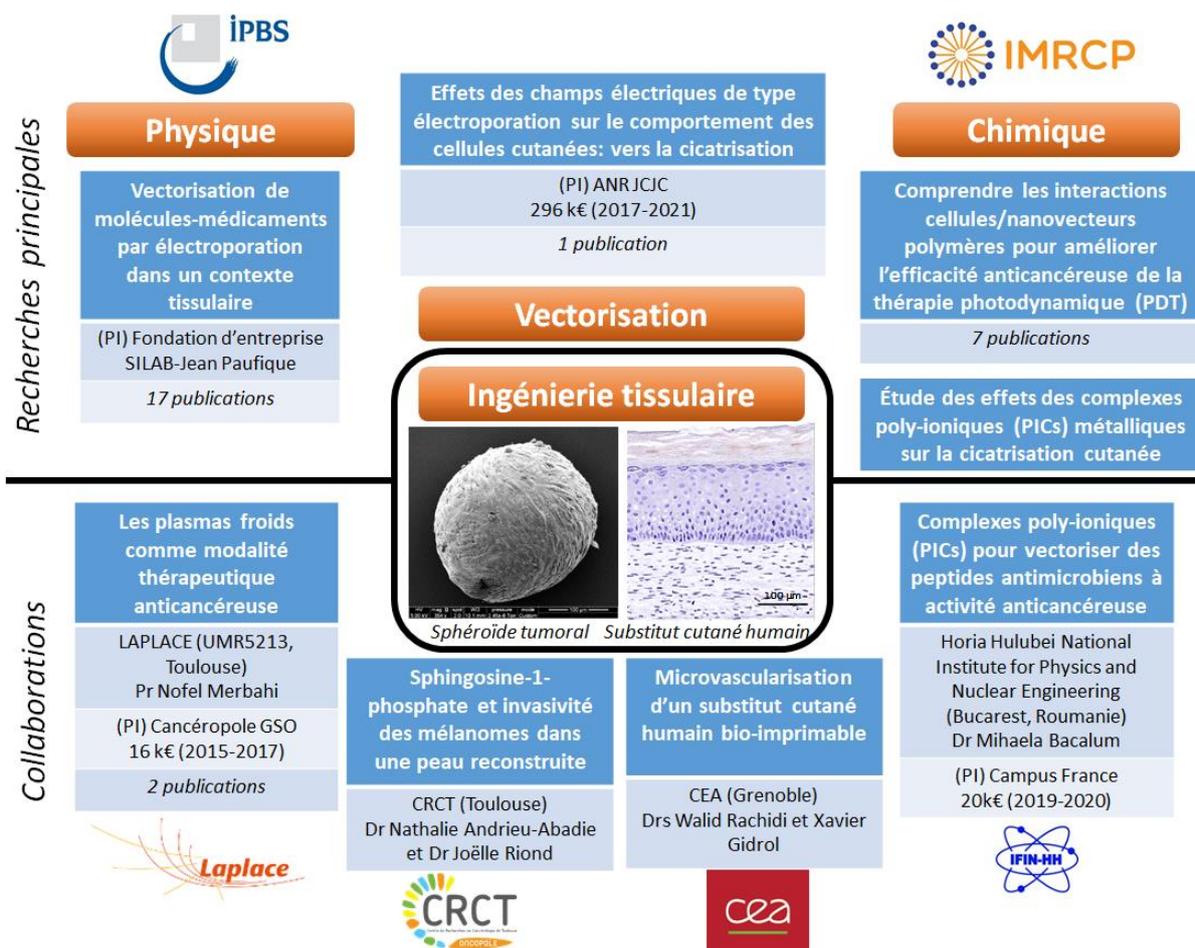


Figure 1: Résumé de mes activités de recherche autour de l'ingénierie tissulaire comme outil pour comprendre et améliorer la délivrance de molécules thérapeutiques à l'échelle du tissu.

Introduction aux enjeux de la délivrance de médicaments à l'échelle tissulaire

La pénétration des molécules-médicaments au niveau tissulaire et cellulaire est un enjeu majeur pour une activité thérapeutique efficace et ciblée. Si nous prenons l'exemple du cancer, l'injection systémique d'un agent chimiothérapeutique est la première ligne de traitement envisagée après la chirurgie. Pourtant, cette approche comporte un certain nombre de limites comme la forte toxicité du médicament, sa rapide élimination et sa biodistribution non sélective dans le cas des thérapie non ciblées. Pour surmonter ces problèmes, des systèmes avancés d'administration des médicaments ont été conçus et évalués. En associant les médicaments avec un système d'administration adéquat, aussi appelé vecteur, l'exposition des cellules saines peut être réduite, la concentration intra-tumorale en anticancéreux peut être augmentée et donc entraîner une efficacité accrue du traitement avec des effets secondaires réduits. Ce concept de transport de la molécule-médicament vers le tissu cible s'appelle la vectorisation (*drug delivery* en anglais), qui peut être passive ou active si un ciblage cellulaire y est associé. Deux classes de vecteurs ont été développées : les vecteurs viraux et les vecteurs non viraux. Les vecteurs viraux, largement utilisés en thérapie génique, sont particulièrement efficaces mais peu sûrs puisque le virus peut causer une réaction immune grave chez le patient [1] et que son insertion près d'un oncogène peut causer des cancers [2]. Les vecteurs non viraux peuvent transporter aussi bien des molécules que des acides nucléiques et sont divisés en deux catégories : les techniques physiques de vectorisation et les vecteurs chimiques. Les techniques physiques de vectorisation sont l'électroporation [3], la sonoporation [4] et les champs magnétiques et la température. Les vecteurs chimiques développés dans le contexte de la nanomédecine regroupent notamment les nanoparticules métalliques, les dendrimères, les liposomes et les novecteurs polymères (micelles et polymersomes) [5].

Pour assurer l'efficacité thérapeutique d'une molécule-médicament, il faut prendre en compte non seulement son activité intrinsèque, mais aussi les nombreuses barrières physiques, chimiques et biologiques qu'elle rencontrera de son site d'injection jusqu'à sa cible et qui peuvent limiter son action.

Pour obtenir les nutriments nécessaires à leur croissance et faciliter leur dissémination vers d'autres organes, les cellules cancéreuses favorisent l'émergence de nouveaux vaisseaux sanguins à partir de vaisseaux existants, c'est l'angiogenèse tumorale. La vasculature qui en résulte est anormale sur le plan structurel et fonctionnel [6] (Figure 2). Les vaisseaux sanguins sont tortueux, dilatés et présentent des fuites. Les cellules endothéliales qui tapissent ces vaisseaux ont une morphologie aberrante, les péricytes sont mal attachés ou absents et la membrane basale est souvent anormale.

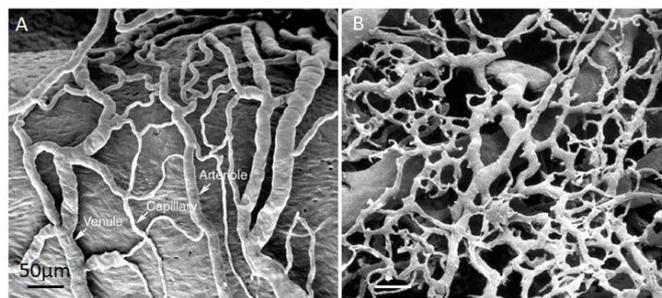


Figure 2: Visualisation par microscopie électronique à balayage de la microvascularisation normale et tumorale dans un tissu. A. Vasa Vasorum du sinus carotidien chez le rat. Les artérioles, capillaires et veinules sont clairement organisés et structurés. B. Xénogreffe d'une tumeur humaine dans une souris nude. La microvasculature est chaotique et désorganisée. Tiré de [7].

Ces défauts structurels et fonctionnels rendent les parois vasculaires au sein du microenvironnement tumoral plus perméables, notamment aux macromolécules. Ainsi, Matsumura *et al* ont découvert en 1986 que les agents anticancéreux de haute masse molaire peuvent s'accumuler passivement dans les tumeurs solides grâce à l'effet de perméabilité et de rétention accrue (Enhanced permeability and retention, EPR) [8,9]. Les nanovecteurs peuvent donc fuir des vaisseaux sanguins au sein de la tumeur et s'y accumuler en raison du mauvais drainage lymphatique dans les tissus tumoraux.

Une fois au voisinage de la tumeur, il reste un certain nombre d'obstacles que les médicaments, vectorisés ou non, doivent franchir pour assurer leur efficacité thérapeutique (Figure 3) [10].

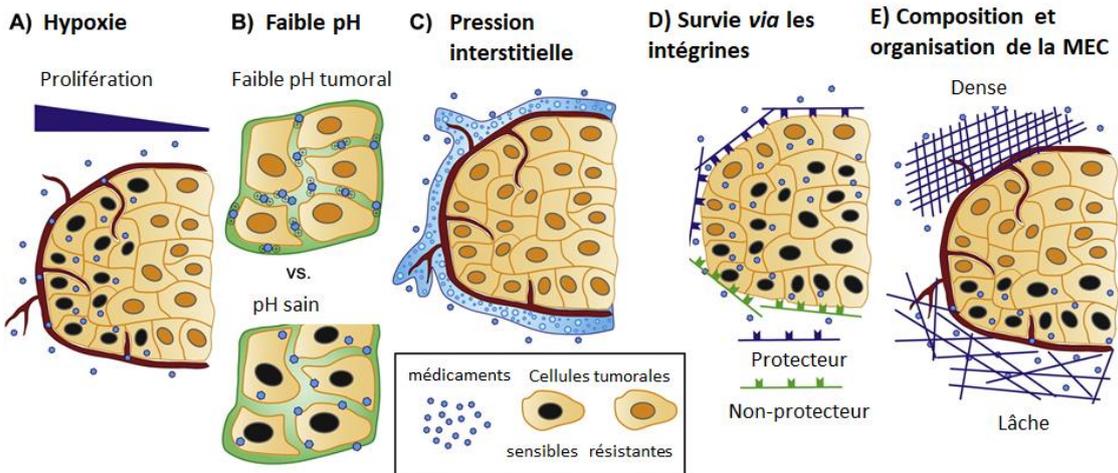


Figure 3: Obstacles du microenvironnement à l'efficacité thérapeutique antitumorale. A) Les conditions hypoxiques limitent l'action des médicaments qui ciblent les cellules en prolifération. B) Le faible pH du microenvironnement de la tumeur peut modifier l'état des médicaments et empêcher leur passage à travers la membrane cellulaire. C) La pression du liquide interstitiel est plus élevée dans les tumeurs, ce qui constitue une barrière physique à la diffusion des médicaments. D) La liaison de certaines intégrines à la matrice active des voies de survie et confère une résistance aux cellules tumorales. E) La densité et l'organisation de la matrice extracellulaire (MEC) limite physiquement la pénétration du médicament. Adapté de [10].

Les tumeurs en croissance présentent de nombreuses zones hypoxiques, car se situant à plus de 200 μm d'un capillaire sanguin, distance limite de diffusion de l'oxygène [11,12]. Les zones avasculaires des tumeurs adoptent une organisation particulière, à savoir que la zone périphérique est constituée de cellules en prolifération puis de cellules quiescentes voire nécrotiques dans la zone centrale [13]. Comme de nombreux médicaments anticancéreux ciblent les cellules en prolifération, davantage de cellules quiescentes peuvent survivre au traitement (Figure 3A).

Le pH du microenvironnement tumoral est souvent bas, à cause d'un drainage insuffisant et de l'accumulation de métabolites comme l'acide lactique produit par la glycolyse anaérobie des cellules tumorales en cas d'hypoxie [14]. L'acidité du microenvironnement peut provoquer la protonation des médicaments faiblement basiques, ce qui entrave leur capacité à traverser la membrane cellulaire et donc à exercer leur action anticancéreuse [15] (Figure 3B). Il est intéressant de noter que les propriétés physicochimiques des médicaments (masse molaire, forme, charge et solubilité aqueuse) déterminent leur capacité/vitesse de diffusion à travers les tissus [16]. Par exemple, les médicaments hydrosolubles se distribuent plus facilement dans la matrice extracellulaire notamment grâce aux glycosaminoglycanes extrêmement hydratés. Les médicaments hydrophobes pénètrent les membranes lipidiques et peuvent donc être transportés à travers les cellules.

L'augmentation de la pression interstitielle due à la croissance tumorale, à une microvasculature sanguine chaotique, à un défaut de microvasculature lymphatique et à la densification de la matrice extracellulaire crée une barrière physique à la diffusion des médicaments [17,18] (Figure 3C).

L'adhésion des cellules tumorales à la matrice extracellulaire environnante *via* les intégrines peut stimuler les voies de signalisation liées à la survie et la migration [19]. Cette perspective thérapeutique a été largement étudiée puisqu'en 2016 six inhibiteurs d'intégrines étaient disponibles sur le marché, ciblant principalement l'unité $\alpha 4$, et avaient généré plus de 3.5 milliards de dollars de recettes [20] (Figure 3D).

Il a été démontré que la matrice extracellulaire tumorale est généralement plus rigide que la matrice saine [21,22] (Figure 3E). Plusieurs explications sont possibles, notamment l'installation d'un processus fibrotique, c'est-à-dire le remplacement des éléments structurels normaux du tissu par une accumulation excessive de composants matriciels non fonctionnels, ou alors une réticulation excessive des collagènes à cause de l'enzyme lysyl-oxydase (LOX). La Figure 4 illustre les modifications intervenant sur la composition et l'organisation de la matrice extracellulaire lors du développement tumoral. Il est aisé de concevoir que cette matrice extracellulaire soit un frein à la pénétration des molécules-médicament au sein de la tumeur.

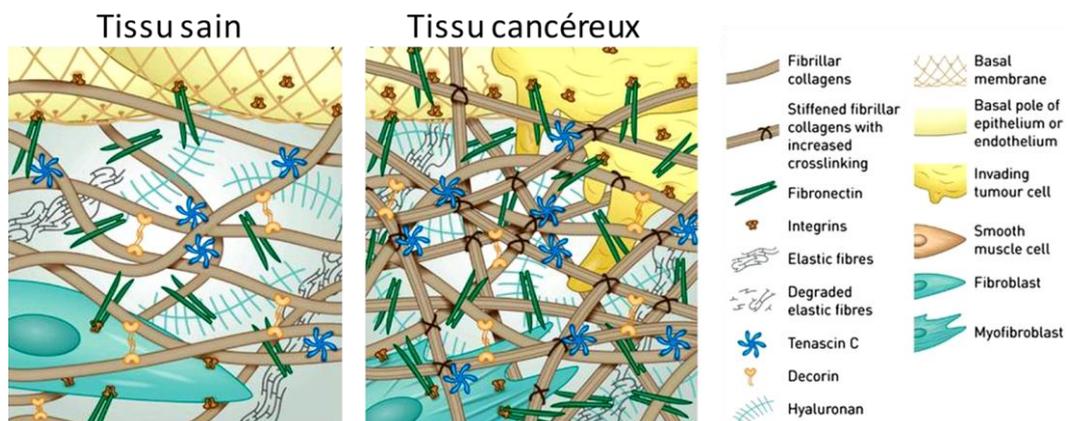


Figure 4: Organisation 3D d'un tissu sain et cancéreux. La matrice extracellulaire saine est remodelée par l'activité des fibroblastes résidents et présente un maillage lâche de collagènes, d'élastine et de fibronectine ancré à la membrane basale de la couche cellulaire épithéliale ou endothéliale environnante *via* les intégrines. Les tumeurs primaires et métastatiques sont entourées d'un stroma rigide qui contient des collagènes hautement réticulés, des niveaux élevés de fibronectine, de ténascine C et de hyaluronane. La composition cellulaire est aussi altérée par rapport à un tissu sain. Adapté de [23].

Ainsi, lorsque l'on conçoit des stratégies thérapeutiques, il est primordial de prendre en compte l'environnement 3D du tissu cible, ce qui n'est pas le cas dans la vaste majorité des études *in vitro*.

Bien que les cultures classiques de cellules en monocouche aient fourni d'importantes avancées scientifiques et conceptuelles, il est manifeste qu'en 2D les cellules perdent l'architecture propre au tissu dont elles proviennent, les signaux mécaniques et biophysiques tout comme les échanges et la communication intercellulaire [24]. Cet environnement joue un rôle primordial dans l'homéostasie cellulaire et tissulaire. Les cellules communiquent entre elles et avec le stroma environnant de manière dynamique et plastique. C'est cet échange permanent entre les cellules et leur environnement matriciel, qui permet le maintien de l'architecture et l'organisation fonctionnelle des tissus (Figure 5). Ainsi, de nombreux travaux ont démontré que les interactions dynamiques et réciproques qui existent entre la matrice extracellulaire et le noyau, médiées par le cytosquelette, coordonnent les fonctions cellulaires, l'architecture et l'homéostasie tissulaire [25].

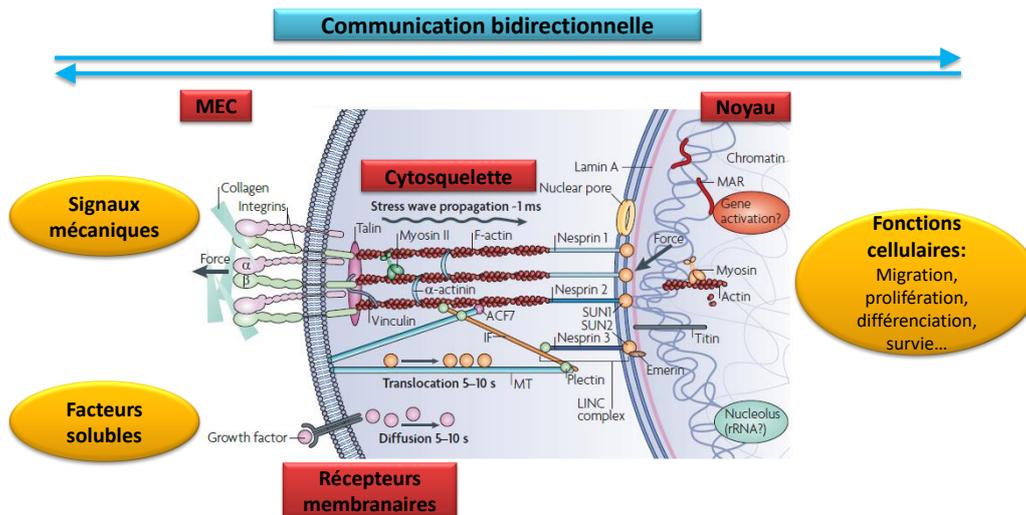


Figure 5: La cellule dans son environnement 3D. Dans un contexte tissulaire, il existe un lien physique entre la matrice extracellulaire (MEC) et le noyau via les récepteurs membranaires et le cytosquelette. Ce lien physique existe aussi au niveau les jonctions intercellulaires qui lient deux cellules voisines. Ces axes supportent une communication dynamique et réciproque où l'environnement régule les fonctions cellulaires et où l'expression génique module l'architecture de l'environnement. Adapté de [26].

Les modèles animaux constituent une source importante d'informations *in vivo*. Le choix d'un modèle d'étude repose sur bon nombre de facteurs comme sa disponibilité, son coût, sa facilité de manipulation et surtout sur sa similitude anatomique/fonctionnelle avec le tissu de référence. Les petits mammifères comme les rongeurs sont classiquement utilisés pour des études sur la physiopathologie cutanée par exemple. Cependant, la peau murine diffère de la peau humaine du point de vue de son architecture et de sa composition cellulaire [27]. De plus, une étude transcriptomique montre que seuls 30% des gènes associés à la peau sont identiques entre l'homme et la souris [28]. Ainsi, pour obtenir des résultats les plus fiables possibles, il est important de se placer dans un contexte cellulaire humain.

Le nombre incroyable d'essais cliniques en cancérologie qui ont échoué malgré des résultats extrêmement prometteurs obtenus avec des modèles animaux *in vivo* ou *in vitro* [29–31] montrent la nécessité de développer d'autres approches translationnelles pour **enrichir le lien entre les études *in vitro* et les applications cliniques.**

L'ingénierie tissulaire, qui sera décrite plus en détails dans la suite du document, vise à produire en laboratoire à partir de cellules humaines en culture des **tissus humains en trois dimensions**. Cette approche est une option attractive pour **étudier la délivrance de molécules-médicament à l'échelle tissulaire et donc optimiser leur efficacité thérapeutique, tout en limitant le recours aux animaux de laboratoire.**

Dans la suite de ce document nous aborderons de façon plus approfondie l'application de **l'électroporation pour délivrer des molécules anticancéreuses et des acides nucléiques ainsi que l'utilisation des nanovecteurs polymères pour la thérapie photodynamique (PDT), dans un contexte tissulaire humain cutané ou tumoral.**

1. Ingénierie tissulaire

1.1. Définition

L'**ingénierie tissulaire** permet de remplacer, restaurer, maintenir ou améliorer la fonction de tissus humains grâce à la production en laboratoire de substituts biologiques destinés à la greffe [32]. Outre ces applications cliniques, l'ingénierie tissulaire est aussi un outil d'une valeur inestimable en recherche fondamentale. Les substituts reconstruits doivent offrir un **environnement biologique, biochimique et biophysique** dans lequel les cellules **survivent, se différencient, s'organisent et sont en mesure de s'acquitter de leurs fonctions biologiques**.

Si on laisse de côté la bio-impression, trois approches principales sont couramment utilisées pour produire des substituts tissulaires (Figure 6) : 1) les substituts à base de support exogène (scaffold) synthétique ou biologique, 2) les substituts à base de scaffolds issus de la décellularisation d'organes et 3) les modèles scaffold-free, exempts de matière exogène.

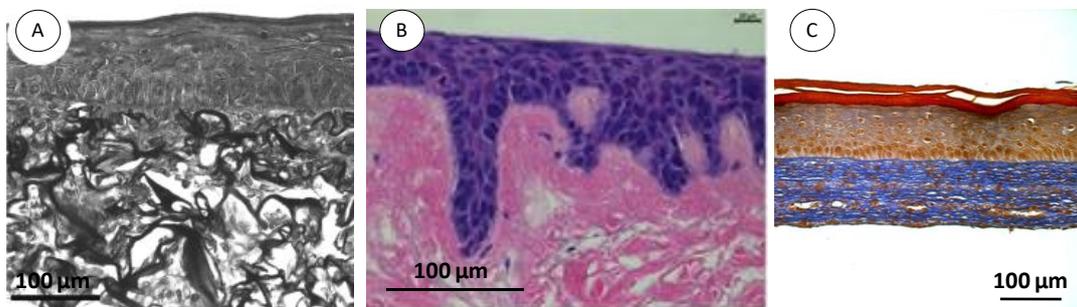


Figure 6: Exemples de substituts cutanés humains reconstruits par ingénierie tissulaire. A. Scaffold exogène (éponge de collagène) [33] ; B. Derme décellularisé recolonisé par des cellules humaines [34]. C. Approche par auto-assemblage [35]. Colorations histologiques (Hématoxyline Eosine ou trichrome de Masson) de coupes transversales de substituts cutanés.

Les **scaffolds exogènes** sont généralement fabriqués à partir de matériaux polymères, qui peuvent être classés comme des céramiques (hydroxyapatite, calcium tri-phosphate), des polymères d'origine naturelle (collagènes, alginates, chitosan) ou des polymères synthétiques (polystyrène, acide poly-L-lactique (PLLA), acide polyglycolique (PGA) et acide poly(D,L-lactique-co-glycolique) (PLGA)) [36,37]. Ces biomatériaux doivent avant tout être biocompatibles, et éventuellement biodégradables selon leurs applications. Le principal avantage de cette approche est que le choix des matériaux offrira au substitut tissulaire l'architecture et les propriétés mécaniques attendues, ce qui peut être critique par exemple dans le domaine orthopédique. Mais il est à noter que l'implantation de ces substituts reconstruits à l'aide de matrices exogènes peut conduire à une réaction inflammatoire chez le patient ou générer des produits de dégradation toxiques [37,38].

Les scaffolds biologiques peuvent être composés de **matrice extracellulaire endogène récoltée après décellularisation de tissus ou d'organes** [39]. L'association de méthodes physiques (congélation/décongélation, chocs osmotiques), chimiques (détergent, lyses acides ou basiques) et biologiques (enzymes) est généralement utilisée pour lyser les cellules, puis un rinçage est effectué pour éliminer les débris cellulaires [40]. L'objectif est de préserver à la fois la composition et l'ultrastructure de la matrice extracellulaire, cependant il est reconnu que les méthodes de décellularisation entraînent une perturbation de l'architecture de la matrice extracellulaire et une perte d'éléments informatifs cruciaux comme les vésicules extracellulaires liées à la matrice [41]. De

plus, cette approche est basée sur l'utilisation de tissus natifs, qui peuvent être compliqués à obtenir car peu disponibles lorsqu'on travaille avec des tissus humains.

L'approche **scaffold-free**, comme son nom l'indique, repose sur l'organisation spontanée des cellules dans les trois dimensions, sans support exogène. C'est celle que nous allons privilégier par la suite. Deux applications majeures seront décrites dans les parties suivantes : le **sphéroïde tumoral** et les **substituts tissulaires produits par auto-assemblage**. Dans l'approche par auto-assemblage, les cellules synthétisent leur propre matrice extracellulaire [42]. La culture des cellules en présence de vitamine C [43], de cuivre [44] ou d'acide lysophosphatidique [45] stimule leur capacité à produire et organiser la matrice extracellulaire autour d'elles. Par exemple, l'acide ascorbique a des effets directs sur l'hydroxylation et la stabilisation de la triple hélice de collagène [46,47], mais aussi sur sa sécrétion [48] et sur la stabilisation de l'ARNm du collagène I (COL1A2) [49]. Les cellules s'organisent spontanément dans les trois dimensions et la matrice extracellulaire qu'elles secrètent correspond à leurs besoins, ce qui assure la mise en place d'interactions cellules-cellules et cellules-matrice physiologiques. L'application la plus emblématique de l'approche par auto-assemblage remonte aux années 70 lorsque Rheinwald et Green ont mis au point la première greffe de feuillets de kératinocytes autologues pour traiter les patients brûlés [50]. Le principal avantage de la technique d'auto-assemblage est que les substituts tissulaires qui en résultent ne contiennent absolument aucun biomatériau et sont composés d'une matrice extracellulaire complexe. La limite majeure de l'approche par auto-assemblage est le temps que mettent les cellules à synthétiser leur matrice extracellulaire. En effet, il faut entre 21 et 28 jours à des fibroblastes dermiques pour synthétiser un feuillet de matrice suffisamment dense pour être manipulable [51]. Les feuillets de kératinocytes sont plus rapides à obtenir. Ainsi, à partir d'une biopsie cutanée de 1 cm², la culture *in vitro* permet d'obtenir une surface de 6000 cm² d'épiderme en environ 14 jours [52].

1.2. Modèle 3D de tumeur

Les sphéroïdes multicellulaires sont des assemblages *in vitro* et en 3D de cellules tumorales qui reflètent de nombreuses propriétés des tumeurs solides [53,54]. Lors de la croissance du sphéroïde, des gradients (oxygène, nutriments, catabolites...) se mettent en place (Figure 7).

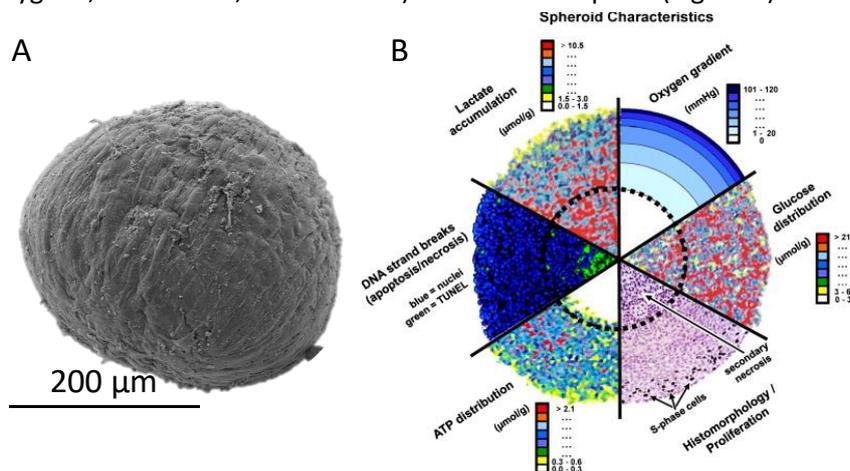


Figure 7: Caractéristiques d'un sphéroïde. A. Sphéroïde observé par microscopie électronique à balayage. Données non publiées. B. Gradients (oxygène, glucose, prolifération, ATP, apoptose et catabolites) mis en place au sein d'un sphéroïde tumoral. Tiré de [55].

Ainsi, les cellules en prolifération sont situées dans les couches cellulaires externes et les cellules quiescentes sont situées plus au centre. Plus les sphéroïdes seront larges plus une région hypoxique et nécrotique se développera au centre. Cette hétérogénéité cellulaire est similaire à celle que l'on trouve dans les microrégions avasculaires des tumeurs [56]. De plus, les sphéroïdes tumoraux peuvent produire des traces de composants de la matrice extracellulaire tels que les collagènes, la laminine, la fibronectine et les glycosaminoglycanes [57,58].

Il a été démontré que la réponse aux agents thérapeutiques des cellules tumorales cultivées sous forme de sphéroïdes diffère de celle des mêmes cellules cultivées en monocouche [59,60]. La pénétration limitée des médicaments, le statut différent en termes d'hypoxie et de prolifération rentrent en jeu mais les contacts cellulaires en 3D jouent aussi un rôle car ils entraînent une modification de l'expression de certains gènes par rapport aux cellules cultivées en monocouche [61].

Le modèle sphéroïde offre la possibilité de co-cultiver plusieurs types cellulaires au sein du même modèle, c'est ce qu'on appelle des sphéroïdes mixtes. Il a été montré que des cellules endothéliales (HUVECs) co-cultivées avec des fibroblastes s'organisent en réseau de tubes [58]. L'association de cellules pancréatiques β sécrétrices d'insuline avec des cellules endothéliales ou des fibroblastes permet une sécrétion accrue d'insuline par le sphéroïde mixte [62]. Des cellules comme des fibroblastes associés au cancer (CAF) [63,64] ou des macrophages associés au cancer (TAM) [65] sont co-cultivées avec des cellules cancéreuses pour mieux prédire les réponses thérapeutiques.

Dans les contextes de l'électroporation et de la thérapie photodynamique qui vont nous intéresser par la suite nous pouvons citer la co-culture de fibroblastes avec des cellules HCT-116 de cancer colorectal qui a permis de reproduire *in vitro* la fenêtre thérapeutique observée par les cliniciens lors de l'électrochimiothérapie sur les patients, à savoir que les sites traités cicatrisent très bien comme si les cellules normales n'étaient pas affectées [66]. Yakavets *et al* ont démontré que les sphéroïdes mixtes (cancer tête et cou FaDU + cellules stromales cancéreuses MeWo) présentent des réponses différentes des sphéroïdes simples en terme de pénétration, distribution et efficacité antitumorale de photosensibilisateurs tels que la Temoporfin et la chlorin e6 [67]. Lamberti *et al* ont démontré que la co-culture de cellules cancéreuses du colon / fibroblastes limite l'accumulation dans le sphéroïde mixte du photosensibilisateur PpIX et confère une résistance des cellules tumorales à la thérapie photodynamique par rapport aux sphéroïdes homotypiques [68]. Dans l'ensemble, les données suggèrent que le stroma et la tumeur communiquent de manière intégrée et réciproque, ce qui influence la réponse thérapeutique. Il est donc clairement primordial de prendre en compte les interactions entre différents types cellulaires.

Pour ces différentes raisons le modèle sphéroïde s'est révélé depuis plusieurs années un modèle de choix pour étudier la réponse cellulaire aux médicaments, vectorisés ou non, dans un contexte 3D plus proche du tissu natif [16,55,69,70].

1.3. Modèle tissulaire de peau

1.3.1. Le feuillet cellulaire comme brique élémentaire

Étudiantes en thèse supervisées : Moinecha Madi ; Sara Gouardères. Financements : Bourse du conseil départemental de Mayotte ; ANR JCJC WHEEL (17-CE19-0013) (PI) ; Collaboration initiée : Dr Valérie Samouillan (CIRIMAT, Toulouse). Publication sur ce thème : [71].

Comme expliqué précédemment, les cellules cultivées en présence de vitamine C vont produire et organiser en quelques semaines une matrice extracellulaire dense, jusqu'à obtenir un feuillet qui est manipulable. Pour faciliter leur manipulation et éviter la contraction des tissus, nous avons cultivé les cellules avec un ancrage en papier. Cet ancrage est bien entendu absent lors d'une culture pour greffer le substitut tissulaire sur un patient. La Figure 8 montre l'aspect d'un feuillet dermique cultivé dans un puits de plaque 24 puits ainsi qu'une coupe transversale colorée au trichrome de Masson indiquant que l'épaisseur d'un feuillet est d'environ 40 µm après 4 semaines de culture [71].

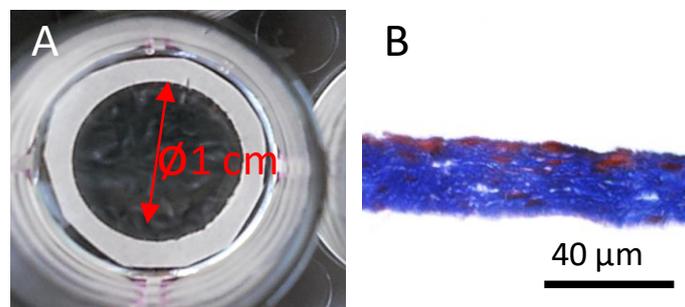


Figure 8: Le feuillet dermique humain reconstruit par ingénierie tissulaire : un modèle riche en matrice extracellulaire. A. Aspect macroscopique d'un feuillet dermique cultivé en présence d'un ancrage en papier (anneau blanc) pour faciliter la manipulation et éviter la contraction du tissu. B. Coloration histologique au trichrome de Masson d'une coupe transversale de feuillet. Les cellules sont colorées rouges et les collagènes sont bleus. Adapté de [71].

La composition de la matrice extracellulaire de ce modèle a récemment été déterminée par protéomique par Magnan *et al* [72]. Plus de 50 protéines différentes ont été identifiées parmi lesquelles de nombreux collagènes, des protéoglycans et des protéines associées aux membranes basales. Ces informations montrent **le haut degré de complexité de la matrice extracellulaire du modèle de feuillet produit par auto-assemblage.**

J'ai choisi différents outils de microscopie pour visualiser la matrice extracellulaire au sein des feuillets. Les approches classiques de microscopie optique (confocale, biphotonique) et électronique (à balayage, à transmission) sont particulièrement adaptées. Mais pour aller plus loin, j'ai mis en place une collaboration avec le Dr Valérie Samouillan du CIRIMAT à Toulouse afin de quantifier différents composants des feuillets par spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier IRTF-ATR. Nous observons ainsi que les substituts dermiques reconstruits par la technique d'auto-assemblage avec des fibroblastes dermiques humains primaires sont riches en collagènes (Figure 9). Ces collagènes fibrillaires sont structurellement bien organisés comme l'indique la génération de seconde harmonique observée par microscopie biphotonique sur des échantillons vivants (Figure 9E). Il est intéressant de noter qu'une **polarisation du feuillet** apparaît au cours de la culture. Ainsi, la face supérieure du feuillet, en contact avec le milieu de culture, est très riche en cellules, alors que la face inférieure, du côté du pétri, est beaucoup plus riche en matrice extracellulaire (collagènes) (Figure 9 A, B, C, F).

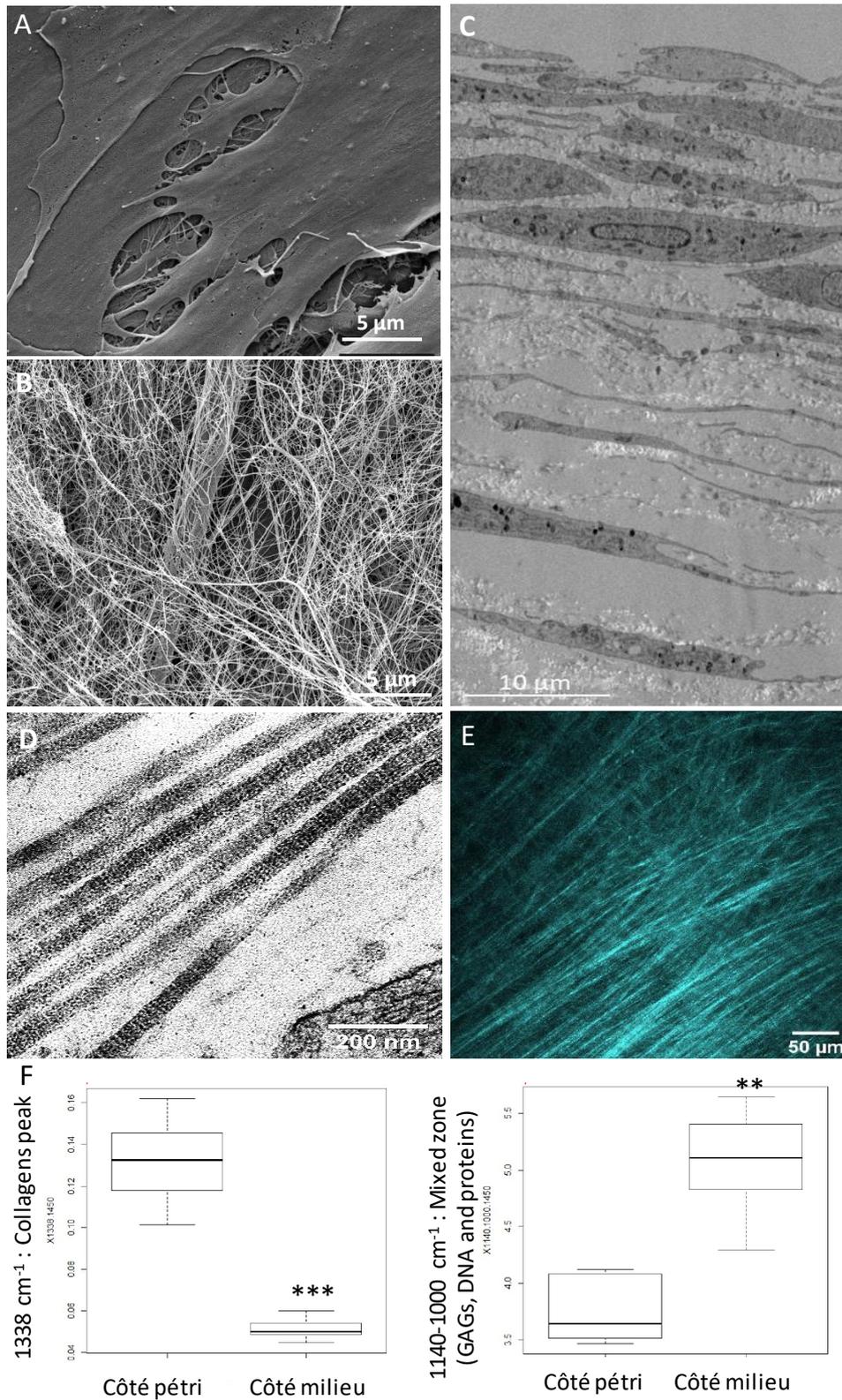


Figure 9: Le feuillet dermique, riche en collagènes organisés, présente une polarisation haut/bas. A. Face supérieure (côté milieu) d'un feuillet dermique, observée au microscope électronique à balayage (MEB). B. Face inférieure d'un feuillet dermique (côté pétri), observée au MEB. C. Coupe transversale sur toute l'épaisseur d'un feuillet dermique, observée par microscopie électronique à transmission (MET). D. Striations des fibres de collagènes observées au MET. E. Génération d'un signal de seconde harmonique (SHG, en cyan) des collagènes, observé par microscopie biphotonique (vue de dessus). F. Répartition des cellules et des collagènes entre le côté milieu (face supérieure) et le côté pétri (face inférieure) mesurée par spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier IRTF-ATR. Données non publiées.

Ces feuillets sont les briques élémentaires de la reconstruction d'un tissu par auto-assemblage, sur lesquels nous pouvons co-cultiver d'autres types cellulaires pertinents, comme les cellules endothéliales et les kératinocytes dans notre cas, et que nous pouvons empiler pour qu'ils fusionnent et produisent un tissu plus épais.

Nous avons mis au point un protocole, décrit dans la Figure 10A, afin de produire par auto-assemblage un substitut cutané classique (derme + épiderme). Il faut cultiver trois feuillets de fibroblastes dermiques pendant 3 semaines avec de la vitamine C (50µg/ml). Sur le feuillet qui servira à produire l'épiderme des kératinocytes primaires humains seront ensemencés. Une fois les kératinocytes à confluence, les 3 feuillets dermiques superposés en étant bien vigilant à positionner sur le dessus celui ensemencé avec les kératinocytes. Le substitut est ensuite cultivé à l'interface air-liquide pendant 10 jours durant lesquels les feuillets fusionnent et les kératinocytes se différencient verticalement jusqu'à l'obtention d'une couche cornée (Figure 10B).

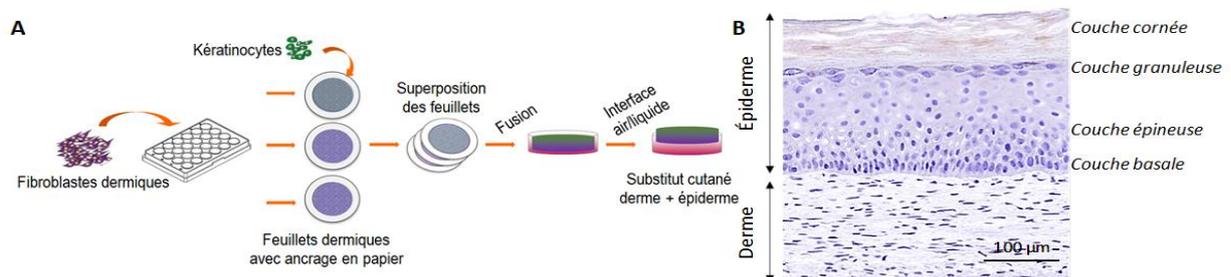


Figure 10: Substitut cutané humain reconstruit par auto-assemblage. A. Schéma de production d'un substitut cutané humain basique (derme + épiderme). B. Coloration à l'hématoxyline d'une coupe transversale de substitut cutané humain (photo non publiée).

En ajoutant différents types cellulaires humains au modèle basique (derme + épiderme), j'ai pu développer :

- Un substitut cutané microvascularisé avec un réseau sanguin fonctionnel [73]
- Un substitut dermique microvascularisé avec un réseau lymphatique [74,75]
- Un substitut cutané microvascularisé cancéreux [35]

1.3.2. Reconstruction d'un réseau microvasculaire fonctionnel

Financement : Institut de Recherche en Santé du Canada (IRSC) (MOP-14364). Publications sur ce thème : [73,76]

La microvascularisation des tissus reconstruits est une problématique universelle de la médecine régénérative et de l'ingénierie tissulaire [76]. D'un point de vue clinique, la présence d'un réseau microvasculaire dans un greffon accélère sa revascularisation et limite ainsi son risque de nécrose, autorise l'infiltration rapide de types cellulaires impliqués dans son remodelage et favorise son innervation et donc sa fonctionnalité. Du point de vue de la recherche fondamentale, la mise au point de modèles cellulaires en 3D microvascularisés offre de nombreuses perspectives : criblage *in vitro* de composés pro- et anti-angiogéniques, étude du processus de cicatrisation. De façon intéressante, nous avons démontré que des cellules endothéliales sanguines primaires humaines, qu'elles soient

microvasculaires dermiques ou artérielles (HUVECs), s'organisent spontanément en un réseau ramifié de capillaires fonctionnels qui s'anastomose en moins de 4 jours avec le réseau sanguin de l'hôte suite à une greffe (Figure 11) [73].

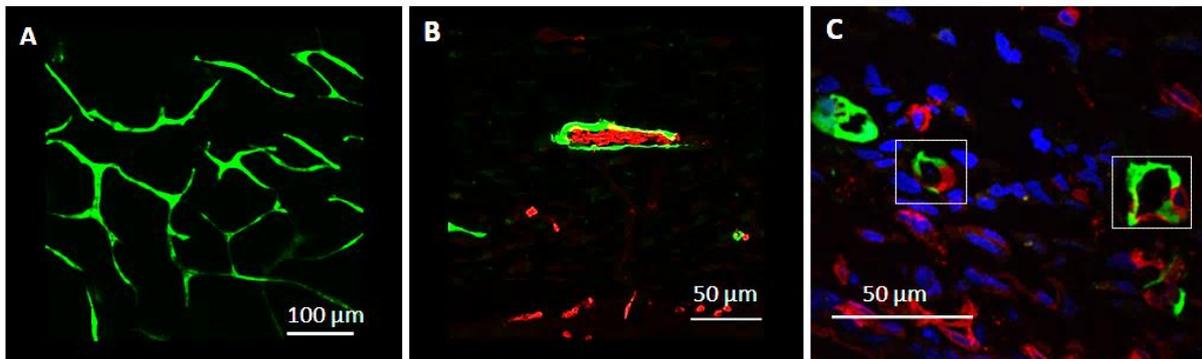


Figure 11: Inoculation d'un réseau microvasculaire humain reconstruit *in vitro* avec le réseau murin de l'hôte. A. Vue du dessus d'un réseau microvasculaire (HUVEC-GFP) spontanément organisé dans un substitut cutané. B. Présence de globules rouges murins (rouge) dans la lumière d'un capillaire humain (HUVEC-GFP) 4 jours après la greffe sur une souris. C. Vaisseaux chimériques (encadrés) composés de cellules endothéliales humaines (HUVEC-GFP) et de cellules endothéliales murines (CD31, rouge). Adapté de [73].

Cette observation avait déjà été réalisée au LOEX dans un modèle de substitut cutané à base d'éponge de collagène [77,78,33]. Il semble que la matrice extracellulaire produite et organisée par les fibroblastes dermiques soit un facteur clé pour l'organisation spontanée des cellules endothéliales sanguines humaines en un réseau microvasculaire [79].

En conclusion, le point fort du modèle que j'ai développé est que **les cellules endothéliales s'organisent spontanément en un réseau ramifié de capillaires, fonctionnel une fois greffé, au sein d'un substitut potentiellement totalement autologue**. La présence d'un réseau microvasculaire dans le greffon favorise la néo-vascularisation par les cellules de l'hôte. L'ajout d'une composante microvasculaire fonctionnelle dans des greffons potentiellement autologues ouvre de nombreuses possibilités d'amélioration de la qualité de vie des patients traités (greffons viables, fonctionnels et esthétiques).

1.3.3. Étude fonctionnelle de la lymphangiogenèse

Financements : DOD grant BC044819 et IRSC SAC-92850. Collaboration initiée : Dr Mihaela Skobe (Icahn School of Medicine at Mount Sinai, New York); Publications sur ce thème : [74,75]

Tout comme les cellules endothéliales sanguines, les cellules endothéliales lymphatiques primaires s'organisent spontanément en un réseau microvasculaire lorsqu'elles sont co-cultivées avec des fibroblastes dermiques au sein d'un tissu conjonctif riche en matrice extracellulaire (Figure 12A) [74,75]. Ce réseau de capillaires présente les caractéristiques des réseaux de capillaires lymphatiques retrouvés dans la peau *in vivo* (Figure 12B, C) : larges lumières, extrémités borgnes ou en cul-de-sac, expression de marqueurs partagés avec les endothéliales sanguines (CD31) et propres aux cellules lymphatiques tels que la podoplanine ou Prox-1.

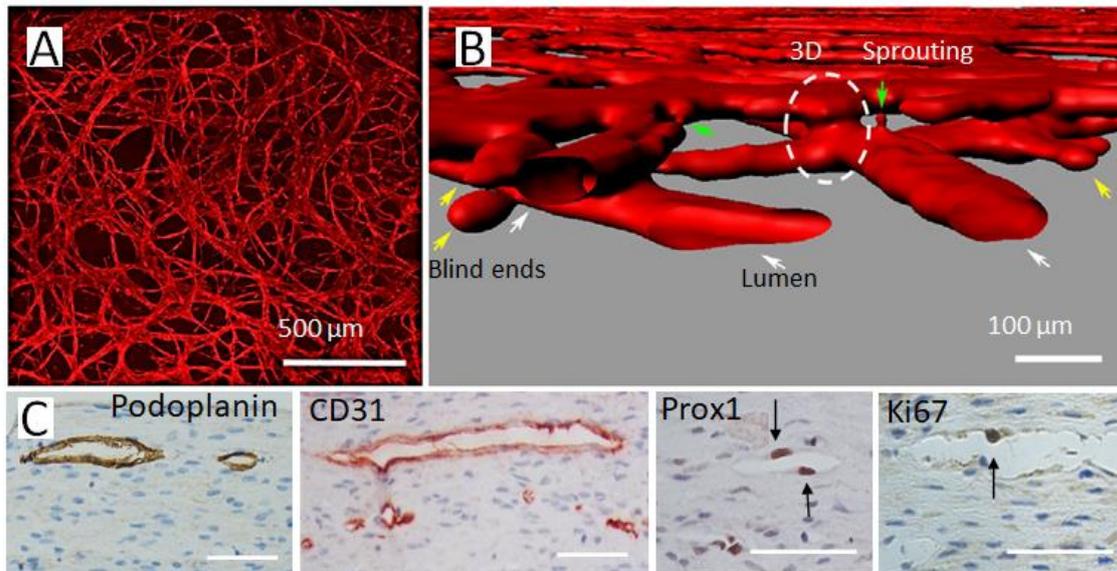


Figure 12: Réseau de capillaires lymphatiques reconstruit *in vitro* par ingénierie tissulaire. A. Organisation du réseau lymphatique dans le substitut (vue de dessus). B. Reconstruction 3D sur le logiciel IMARIS du réseau lymphatique. Flèches vertes : bourgeonnement des cellules, flèches jaunes : extrémités borgnes, flèches blanches : lumières. C. Détection par immunohistochimie de plusieurs marqueurs de cellules endothéliales lymphatiques et de prolifération (Ki67) sur des coupes de tissu reconstruit. Barre de mesure : 50µm. Adapté de [74,75].

J'ai pu démontrer pour la première fois que lorsqu'elles sont cultivées au sein d'un tissu conjonctif en 3D, **les cellules endothéliales lymphatiques s'organisent spontanément en un réseau microvasculaire lymphatique**. Ce modèle nous a permis de démontrer fonctionnellement que le VEGFR-3 et l'HGF, acteurs connus dans la lymphangiogenèse, agissent en synergie pour moduler la densité et la qualité du réseau microvasculaire lymphatique. Ce modèle ouvre des perspectives sur l'étude dans un contexte tissulaire pertinent et en 3D du processus de lymphangiogenèse tumorale et de son traitement.

1.3.4. Étude de l'angiogenèse tumorale dans un modèle cutané cancéreux

Financement : IRSC SAC-92850. Collaboration initiée : Dr Jacques Huot (Centre de recherche en cancérologie de l'Université Laval, Québec); Publication sur ce thème : [35]

Enfin, le modèle basique (derme + épiderme) ou la version microvascularisée offre la possibilité d'y inclure une composante tumorale, avec des cellules de mélanome humain par exemple. Ce modèle assure la mise en place d'interactions complexes entre les cellules cancéreuses et leur environnement 3D, à la fois cellulaire et matriciel. Dans ce cadre, nous avons ajouté des lignées cellulaires humaines de mélanomes issus de sites primaires (A375, SKMel28) ou de sites métastatiques (RPMI 7951, Malme3M) lors de l'ensemencement des kératinocytes. **Nos résultats démontrent que l'organisation histologique et le potentiel invasif de ces lignées correspondent à ceux observés *in situ* chez l'humain**. Nous avons mis en évidence que les lignées de mélanomes issues d'un site primaire forment des nodules cancéreux au-dessus de la jonction dermo-épidermique (Figure 13B) alors que les lignées métastatiques se dispersent dans le derme (Figure 13C). Ainsi, la capacité des cellules cancéreuses à traverser la jonction dermo-épidermique est corrélée avec leur potentiel métastatique. La microscopie confocale sur cryocoupe nous a permis de visualiser les interactions entre cellules endothéliales et

cellules cancéreuses métastatiques dans un substitut cutané microvascularisé cancéreux (Figure 13D). Enfin, un puissant effet pro-angiogénique a été détecté pour une lignée métastatique agressive sécrétant du VEGF (Figure 13E, F).

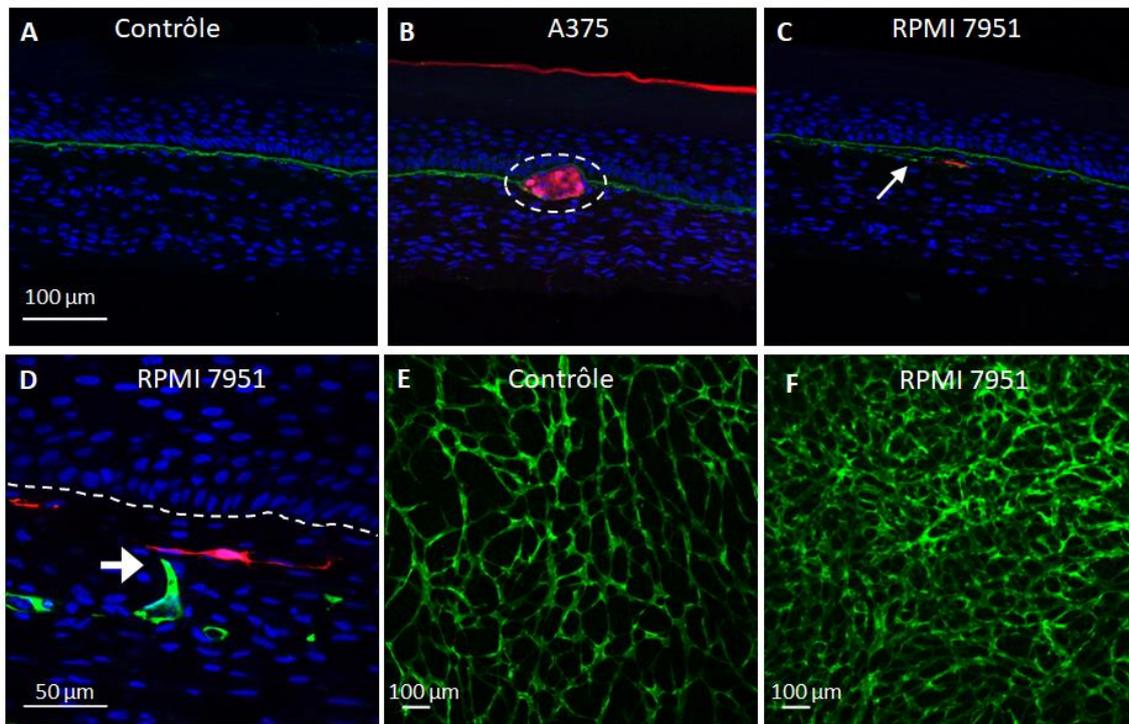


Figure 13: Substitut cutané humain microvascularisé sain et tumoral. A, B, C : Immunodétection sur cryocoupe de la lame basale à la jonction dermo-épidermique (collagène VII en vert) et des cellules de mélanomes Ds-Red+ (rouge). A : Contrôle sain. B : Substitut tumoral ensemencé avec des cellules de mélanome issues d'un site primaire (A375). Les nodules cancéreux sont entourés en pointillés. C : Substitut tumoral ensemencé avec des cellules métastatiques (RPMI 7951). La flèche indique la dégradation de la membrane basale. D : interaction entre une cellule endothéliale (vert) et une cellule de mélanome métastatique (rouge). E : Densité de capillaires sanguins dans la condition contrôle. F : Densité des capillaires dans le substitut ensemencé avec les cellules métastatiques (RPMI 7951). Les noyaux sont marqués au Hoechst (bleu). Adapté de [35].

Ce modèle se révèle donc être particulièrement pertinent pour cribler le potentiel pro- ou -anti-angiogénique de molécules d'intérêt. Il permettra aussi des avancées majeures dans **l'évolution des connaissances en cancérologie grâce à la co-culture en 3D des différents types cellulaires clés dans le processus métastatique**. Ainsi, depuis 2016 je collabore avec les Dr Nathalie Andrieu-Abadie et Dr Joëlle Riond (Centre de Recherche en Cancérologie de Toulouse, CRCT) sur l'utilisation de ces substituts cutanés humains cancéreux pour comprendre le rôle de la sphingosine-1-phosphate (S1P) dans la progression métastatique du mélanome.

1.3.5. Impact de la matrice extracellulaire sur les propriétés cellulaires

Financement : ANR PIERGEN (ANR-12-ASTR-0039), fondation d'entreprise SILAB-Jean Paufigue.
Collaboration : Dr Etienne Dague (LAAS-CNRS, Toulouse); Publication sur ce thème : [80]

Nous avons pu démontrer le rôle de la matrice extracellulaire sur les propriétés viscoélastiques d'un même type cellulaire (i.e les fibroblastes dermiques humains primaires) cultivé sous différentes configurations de complexité croissante [80]. À partir d'une biopsie cutanée humaine unique, des

fibroblastes dermiques primaires ont été extraits et ensemencés à passage 1 (précoce) pour produire une monocouche (modèle 2D), un sphéroïde (modèle 3D pauvre en matrice extracellulaire) et un feuillet dermique (modèle 3D riche en matrice extracellulaire complexe). Nous avons également travaillé avec le derme natif et frais. Dans ces différents modèles cellulaires de complexité croissante, les propriétés nanomécaniques et viscoélastiques à l'échelle cellulaire ont été mesurées par microscopie à force atomique (AFM). La microscopie biphotonique a permis la détection des collagènes par génération de seconde harmonique (SHG).

Dans tous les modèles, les fibroblastes présentent une forme de cellule allongée typique, avec un cytosquelette bien agencé le long de l'axe de la cellule. Les **fibres de collagènes ont été observées uniquement dans le derme natif et le feuillet** (Figure 14A-D). Les fibroblastes cultivés par la technique d'auto-assemblage au sein du feuillet dermique possèdent les mêmes **caractéristiques biophysiques** (i.e **module de Young**) que ceux dans le derme natif, contrairement aux fibroblastes cultivés sous forme de sphéroïde ou de monocouche (Figure 14E).

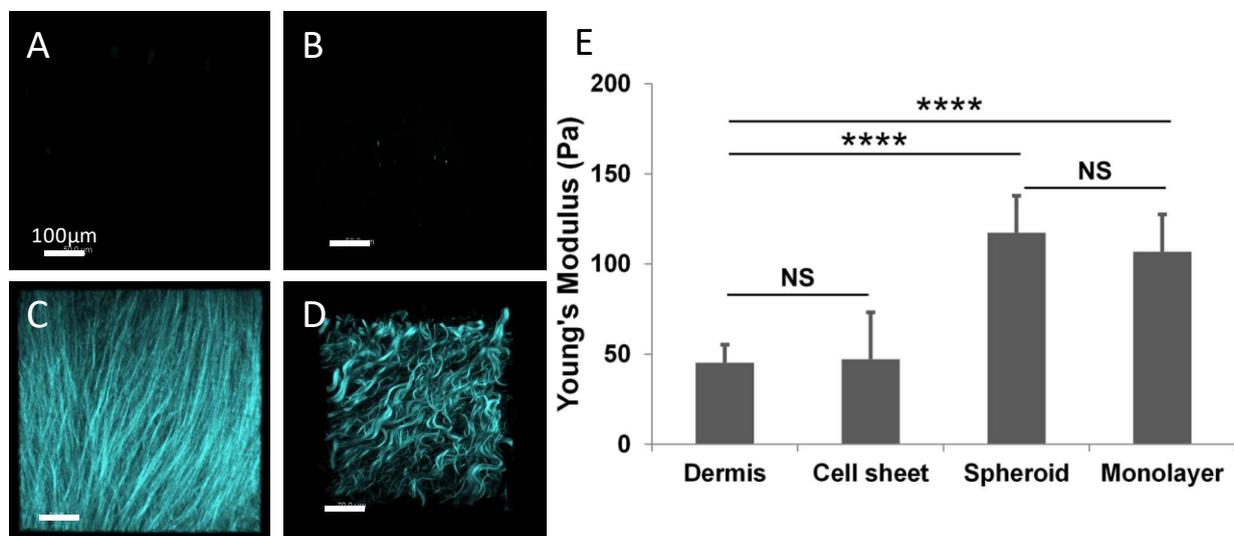


Figure 14 : Caractérisation de modèles cellulaires produits à partir des mêmes fibroblastes dermiques humains. La présence de collagènes fibrillaires organisés est révélée par la génération de seconde harmonique dans une monocouche (A), un sphéroïde (B), un feuillet (C) et le derme natif (D). Les propriétés viscoélastiques des cellules sont quantifiées par microscopie à force atomique (E). Adapté de [80].

Les différents résultats que j'ai obtenus montrent que l'approche par auto-assemblage, dans laquelle la matrice extracellulaire endogène joue un rôle central, permet de produire des substituts cutanés de plus en plus complexes et dans lesquels de plus en plus de types cellulaires sont co-cultivés ensemble. Les substituts cutanés dermiques humains produits par auto-assemblage se révèlent donc être des outils de qualité pour étudier la vectorisation de molécules-médicaments à l'échelle tissulaire.

2. Étude à l'échelle tissulaire de la vectorisation physique par électroporation

2.1. Définition de l'électroporation et enjeux à l'échelle tissulaire

En modulant le potentiel transmembranaire des cellules, l'application **d'impulsions électriques calibrées** permet de **perméabiliser de façon locale et réversible la membrane plasmique**: c'est le phénomène d'électroporation [3,81] (Figure 15). Le principal avantage de cette technique physique est que la perturbation induite est parfaitement contrôlée dans le temps puisque la perméabilisation des membranes est transitoire et dans l'espace puisque seul le tissu situé entre les électrodes est affecté.

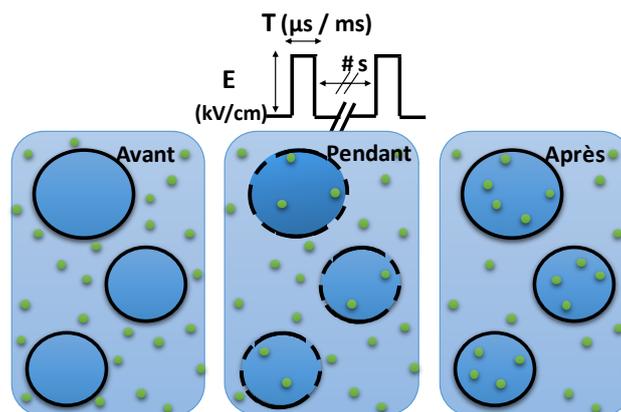


Figure 15: Schéma des événements lors de l'électrotransfert de molécules-médicament. Avant l'application externe d'impulsions électriques calibrées, la membrane plasmique est intégrée et les molécules d'intérêts (anticancéreux non perméants par exemple) sont bloqués en dehors de la cellule. Pendant l'application des impulsions, la membrane plasmique se perméabilise transitoirement, laissant pénétrer dans la cellule les molécules-médicament. Après l'application des impulsions, la membrane plasmique retrouve en quelques minutes son intégrité. E = intensité du voltage ; T = durée des impulsions ; $\#$ = nombre d'impulsions ; s = fréquence d'application des impulsions. Adapté de [3].

Les développements de la méthodologie tant sur le plan agroalimentaire, environnemental que médical sont multiples [82]. Nous allons par la suite uniquement traiter de l'électrochimiothérapie et de l'électrotransfert de gènes.

L'électroporation assure **l'entrée ciblée et massive de molécules cytotoxiques** dans les cellules tumorales. Cette application clinique est appelée **électrochimiothérapie (ECT)**. La preuve de concept a été réalisée avec la bléomycine, une molécule non-perméante, dont la cytotoxicité peut être multipliée jusqu'à 700 fois lorsqu'elle est associée à l'électroporation, par rapport à la drogue seule [83]. **D'un point de vue mécanistique, les petites molécules comme les anticancéreux ont librement accès au cytoplasme des cellules électroperméabilisées.** Leur transfert vers le cytoplasme se produit à la fois durant l'application des impulsions électriques et aussi dans les minutes qui suivent, tant que la membrane plasmique reste perméable [84]. La pénétration cytoplasmique accrue, spatialement et temporairement localisée dans les tissus entre les électrodes, permet de diminuer la quantité de médicaments antitumoraux injectés, limitant ainsi les effets secondaires à court et long terme. Aujourd'hui, l'électrochimiothérapie associe l'application d'impulsions de champ électrique externe à l'injection de médicaments hydrophiles tels que la bléomycine et le cisplatine. L'électrochimiothérapie a été développée au cours des dernières décennies et est actuellement utilisée dans plus de 150 hôpitaux et cliniques en Europe [82] pour traiter principalement les cancers cutanés mais également certaines métastases internes (os, foie, cerveau). Le traitement par électrochimiothérapie a été

normalisé dans le cadre de l'essai multicentrique ESOPE (European Standard Operating Procedure on Electrochemotherapy), publié pour la première fois en 2006 [85] et récemment mis à jour [86]. Il est intéressant de noter que selon une récente méta-analyse de toutes les données cliniques disponibles sur l'électrochimiothérapie (molécule anticancéreuse associée à l'application d'un champ électrique externe) de tumeurs cutanées, la réponse objective au traitement des études évaluées était de 83,91% (IC 95% : 79,15-88,17%) pour la bléomycine et de 80,82% (IC 95% : 66,00-92,36%) pour le cisplatine, avec une bonne préservation des tissus sains [87] (Figure 16).

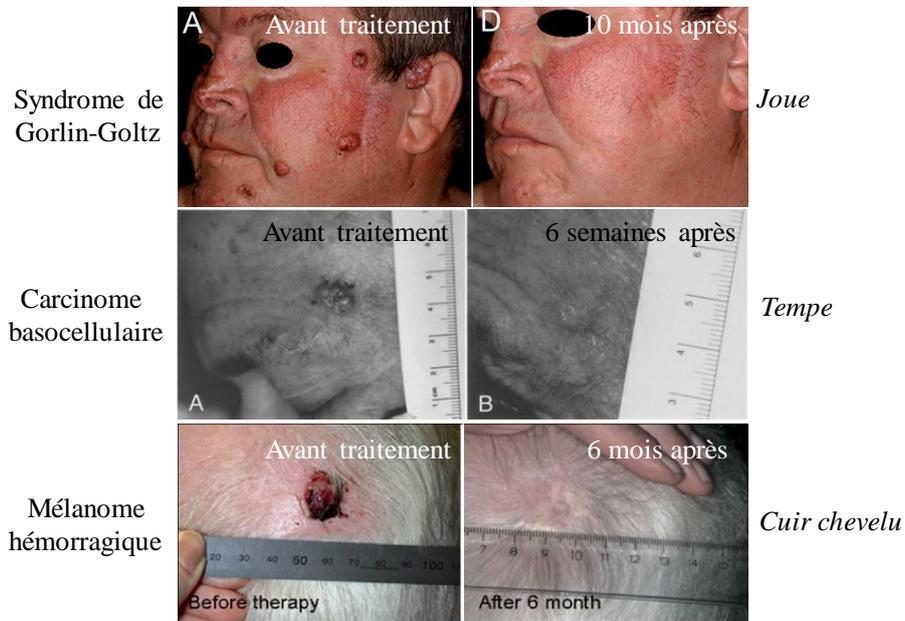


Figure 16: Aspect de tumeurs traitées par électrochimiothérapie. Les tissus sains semblent épargnés par le traitement anticancéreux. Tiré de [85,88,89].

L'électroporation est aussi une technique sûre quoique limitée en terme d'efficacité pour transférer des acides nucléiques dans différents organes et tissus cibles [90] : c'est **l'électrotransfert de gènes**, ou GET. L'électrotransfert de gènes induit une augmentation de l'efficacité de transfection de 10 à 1000 fois en comparaison avec l'injection d'ADN plasmidique nu, soulignant l'intérêt à perméabiliser les membranes plasmiques des cellules cibles [91]. **D'un point de vue mécanistique, l'introduction de grosses molécules chargées comme un ADN plasmidique est plus complexe que celui des petites molécules et nécessite plusieurs étapes** [92,93]: la migration de l'ADN vers la membrane plasmique, médiée par des impulsions électriques « longues » (de l'ordre de la milliseconde) pour générer une **migration électrophorétique** ; l'insertion de l'ADN dans la membrane *via* la mise en place de complexes ADN-membrane localisés; la translocation à travers la membrane par voie endocytaire *via* l'implication du cytosquelette ; la migration de l'ADN vers le noyau et enfin le franchissement de l'enveloppe nucléaire lors des mitoses.

Il apparaît donc que suite à l'injection, quatre obstacles majeurs doivent être franchis localement par le plasmide avant qu'il ne puisse être exprimé par la cellule cible (Figure 17) [94]: 1) la diffusion dans le milieu extracellulaire riche en matrice extracellulaire ; 2) le passage de la membrane plasmique qui empêche le franchissement des grosses molécules chargées négativement ; 3) les risques de dégradation dans le cytoplasme ; 4) le passage de la membrane nucléaire pour pénétrer dans le noyau.

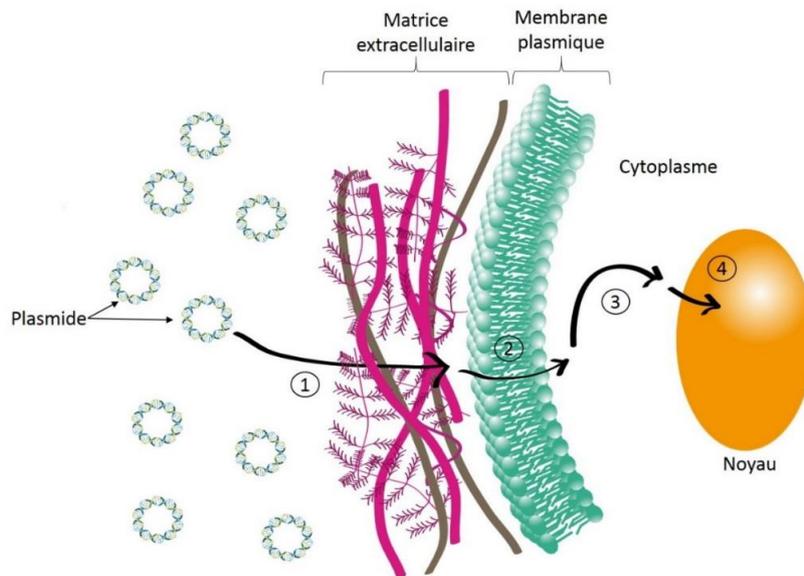


Figure 17: Schéma des différentes barrières biologiques rencontrées par l'ADN plasmidique lors du transfert de gènes dans le tissu : 1) La matrice extracellulaire limite la diffusion dans le tissu ; 2) l'ADN plasmidique doit traverser la membrane plasmique ; 3) Encombrement moléculaire intense dans le cytoplasme et présence de nucléases endogènes ; 4) L'ADN plasmidique doit traverser l'enveloppe nucléaire. Tiré de la [thèse de Moinecha Madi](#).

La composition et l'organisation de la matrice extracellulaire jouent un rôle critique dans l'efficacité de l'électrotransfert d'acides nucléiques, au même titre que dans la capacité de diffusion des molécules anticancéreuses.

2.2. Électrochimiothérapie sur le sphéroïde

Étudiantes supervisées : Moinecha Madi (thèse) ; Stine Krog Frandsen (ERAMUS+). Financements : Bourse du conseil départemental de Mayotte ; Short-Term Scientific Mission (STSM COST-TD1104) ; Fondation d'entreprise SILAB-Jean Paufigue (PI). Collaboration : Dr Julie Gehl (Center for Experimental Drug and Gene Electrotransfer, Hospital Herlev, Danemark). Publications sur ce thème : [95,96]

Le modèle sphéroïde a largement été utilisé pour étudier la pénétration et l'efficacité thérapeutique d'agents anticancéreux délivrés soit sous forme libre, soit associés à divers nano-objets. Il est aussi de plus en plus utilisé pour étudier les réponses cellulaires à l'électrochimiothérapie ou l'électrotransfert de gènes [97–103]. Nous avons proposé de l'utiliser pour comprendre les mécanismes d'action d'une **nouvelle approche thérapeutique anticancéreuse : l'électroporation associée au calcium**, récemment proposée par Dr Julie Gehl, oncologue danoise leader mondiale dans l'utilisation de l'électrochimiothérapie en clinique humaine.

Son équipe a démontré *in vitro* et *in vivo* chez la souris que le calcium associé à l'application d'un champ électrique est très efficace pour détruire des tumeurs [104]. En collaboration avec cette équipe, nous avons découvert *in vitro* en utilisant le modèle sphéroïde que l'électroporation associée au calcium **cible de façon privilégiée les cellules cancéreuses** (lignées de cancers du côlon, de la vessie et du sein), en comparaison avec des cellules saines (fibroblastes dermiques humains primaires) (Figure 18A,B,C) [95]. De plus, la lignée de cancer de la vessie, qui est connue pour présenter des jonctions intercellulaires extrêmement serrées, est moins sensible que les autres types cancéreux étudiés (Figure 18C), probablement à cause d'une moindre pénétration du calcium au cœur du sphéroïde.

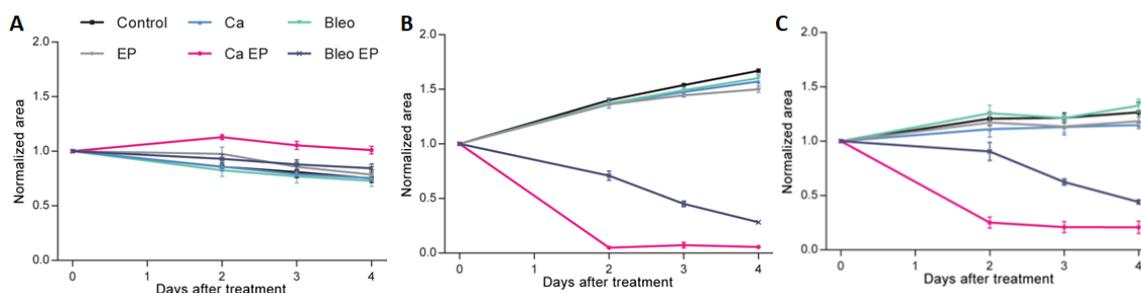


Figure 18 : Électroporation associée au calcium et électrochimiothérapie dans un modèle de sphéroïde humain. A. Sphéroïdes sains produits à partir de fibroblastes dermiques primaires. B. Sphéroïdes cancéreux produits à partir de cellules de cancer du côlon (lignée HT29). C. Sphéroïdes cancéreux produits à partir de cellules de cancer de la vessie (lignée SW780). Ca : calcium seul. Bleo : bléomycine seule. EP : champ électrique seul. CaEP : électroporation associée à 168mM de calcium. Bléo EP : électrochimiothérapie (1mM de bléomycine). Adapté de [95].

La préservation des cellules saines suite à l'électroporation associée au calcium a été confirmée plus récemment en clinique [105] et dans plusieurs modèles pré-cliniques [106] comme par exemple dans un modèle de sarcome où les cellules musculaires saines sont moins sensibles que les cellules cancéreuses [107]. Les mécanismes sous-jacents semblent être liés à une capacité de réparation de la membrane plus efficace dans les cellules primaires saines [108]. De plus, celles-ci présentent aussi une capacité accrue à effluer le calcium intracellulaire, notamment grâce à la Ca^{2+} -ATPase (PMCA) de la membrane plasmique qui est plus exprimée dans les cellules saines que dans les cellules cancéreuses.

Nous avons aussi démontré *in vitro* que **les doses supra-physiologiques de calcium qui pénètrent dans le cytoplasme des cellules suite à leur électroporation induisent un dysfonctionnement mitochondrial conduisant à la mort cellulaire de manière indépendante de l'apoptose** [96]. La disparition du potentiel membranaire mitochondrial suite à l'électroporation associée au calcium (Figure 19) est corrélée dans les 5 minutes suivant le traitement à une diminution massive de l'ATP intracellulaire.

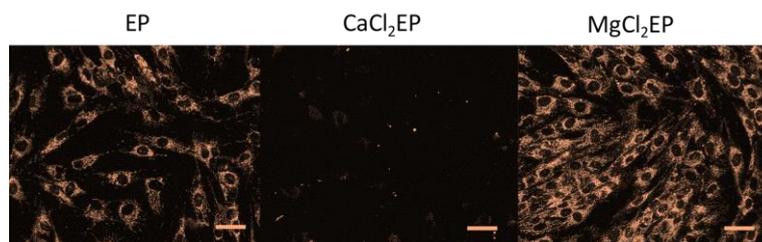


Figure 19: Dysfonctionnement mitochondrial observé par la perte du potentiel membranaire mitochondrial dès 5 minutes après le traitement. Le Mitoview633 est utilisé comme indicateur fluorescent du potentiel membranaire mitochondrial. EP : électroporation ; CaCl₂EP : électroporation associée à 5mM de CaCl₂ ; MgCl₂EP : électroporation associée à 5mM de MgCl₂. Barre d'échelle : 50µm. Tiré de [96].

Un contrôle avec du MgCl₂ indique que la mort cellulaire induite n'est pas dépendante de l'osmolarité mais bel et bien de la nature de l'ion, à savoir le calcium, et ce en culture en 2D et en 3D.

In vitro l'électroporation associée au calcium est aussi efficace d'un point de vue anticancéreux que l'électrochimiothérapie avec la bléomycine [109]. Mais contrairement à ce qui est observé avec les médicaments antitumoraux classiques tels que le cisplatine et la bléomycine, j'ai démontré que **l'électroporation associée au calcium n'induit pas de génotoxicité dans les cellules exposées**, ce qui limite considérablement le risque de développer des cancers secondaires chez les patients traités par cette approche. Ainsi, par rapport aux molécules anticancéreuses classiques, **le calcium présente un meilleur profil de sécurité aussi bien pour le patient que pour le personnel soignant et il est facilement accessible et à faible coût.**

2.3. Électrotransfert de gènes dans un substitut dermique

Étudiante en thèse supervisée : Moinecha Madi. Financement : Bourse du conseil départemental de Mayotte. Publications sur ce thème : [71,110]

La peau est le tissu privilégié pour étudier les conséquences tissulaires de l'électrotransfert de molécules-médicaments, non seulement en raison de son accessibilité et des connaissances acquises par les médecins avec l'électrochimiothérapie, mais aussi parce qu'elle est riche en cellules présentatrices d'antigènes [111] et présente donc des propriétés immunologiques indispensables au développement de l'électro-vaccination [112,113]. Une meilleure compréhension des mécanismes de l'électrotransfert dans le contexte cutané permettra d'en améliorer la capacité de ciblage et l'efficacité, tout en limitant les dommages induits aux tissus environnants. Le modèle de substitut dermique cutané humain produit par auto-assemblage et décrit précédemment sera utilisé comme modèle cutané dans l'étude du transfert de gènes par électroporation.

L'application d'impulsions électriques de l'ordre de la milliseconde (5ms) a permis **d'électroperméabiliser efficacement toutes les cellules du feuillet dermique**, même celles situées à l'intérieur (Figure 20) [71]. Des résultats similaires (non publiés) ont été obtenus dans des expériences utilisant des impulsions microsecondes (100µs), du même type que celles utilisées en électrochimiothérapie.

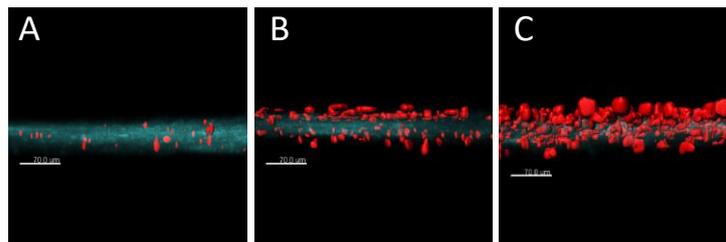


Figure 20: Electroperméabilisation d'un substitut dermique humain (vue latérale). Feuillet dermique électroperméabilisé en présence de 100µM d'iodure de propidium (rouge) observé par microscopie biphotonique. L'iodure de propidium pénètre dans les seules cellules présentant un défaut d'intégrité membranaire. Le signal de seconde harmonique (SHG) généré par les collagènes apparaît en bleu. Paramètres électriques appliqués : 10 impulsions de 5ms, fréquence 1 Hz. L'intensité du champ électrique était de 0V/cm (A), 400V/cm (B) et 600 V/cm (C). Adapté de [71].

Pour aller plus loin, nous avons évalué la capacité des cellules, au sein de ce modèle tissulaire, à exprimer efficacement le gène rapporteur de la *green fluorescent protein* (GFP) présent dans un plasmide après application d'un champ électrique externe de type électrotransfert de gènes [110]. Nous avons vu qu'en appliquant une gamme d'impulsions électriques de cinq millisecondes et d'intensité croissante allant jusqu'à 800 V/cm, les cellules du feuillet dermique sont efficacement électroperméabilisées, sans affecter de manière significative leur survie à 24h (Figure 21A). Les résultats montrent que **seules les cellules situées en surface du tissu, en contact direct avec le plasmide dans le milieu de culture, expriment efficacement le gène de la GFP** avec un taux de 8% à 800 V/cm (Figure 21B, C).

Il a été démontré *in vitro* que les cellules en prolifération sont plus facilement électrotransfectées probablement car lors de la mitose la membrane nucléaire se rompt, laissant au plasmide un libre accès à la machinerie de transcription [114]. Une analyse de l'état de prolifération des cellules au sein des substituts dermiques a été effectuée afin de vérifier s'il corrèle avec les zones d'expression du gène rapporteur. La caractérisation de la prolifération cellulaire du substitut montre que les **cellules prolifératives sont réparties de manière homogène à travers le feuillet dermique**. L'état de

prolifération ne peut donc pas expliquer à lui seul la localisation à la surface du feuillet des cellules efficacement transfectées par le plasmide codant la GFP.

Au cours des expériences suivantes nous avons cherché à déterminer si l'ADN plasmidique était **accessible** à toutes les cellules. Pour ce faire, les impulsions électriques ont été appliquées en présence d'un plasmide marqué par la sonde fluorescente TOTO-1 pour visualiser sa distribution dans le substitut dermique. L'analyse au microscope biphotonique a révélé que **l'ADN plasmidique fluorescent est confiné à la surface du tissu**, ce qui signifie que seules les cellules à la surface ont été en contact avec le plasmide (Figure 21D). En effet les complexes ADN/membrane plasmique formés pendant l'application des pulses électriques ont pu être observés uniquement sur la partie du substitut dermique en contact avec le plasmide. Soulignons que sans application des impulsions électriques il n'y a ni complexe ADN/membrane plasmique ni expression du gène rapporteur de la GFP. **Le succès de l'électrotransfection dépend donc en grande partie de la mobilité des plasmides dans le tissu riche en matrice extracellulaire.**

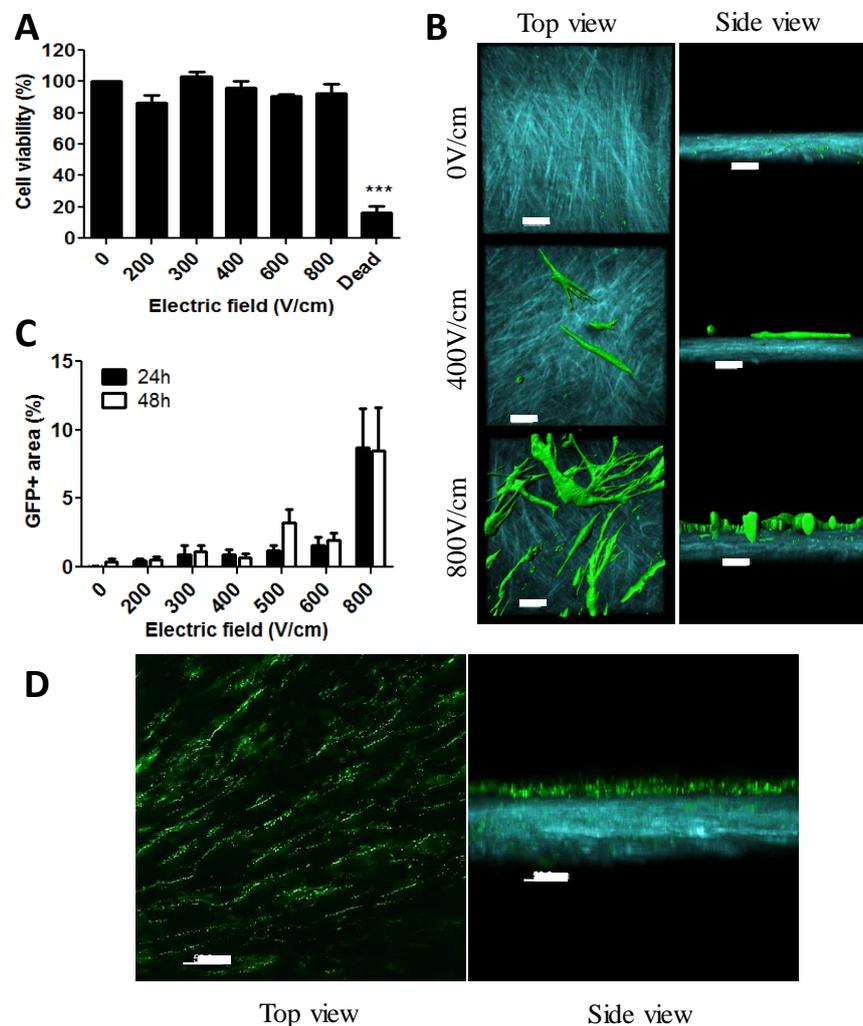


Figure 21: Electrotransfert d'un plasmide codant pour la GFP dans un substitut cutané dermique. A. Quantification par test PrestoBlue de la viabilité du tissu (% du contrôle) 24h après application du champ électrique de type électrotransfert de gènes. B. Observation par microscopie biphotonique des cellules efficacement électrotransfectées avec le plasmide codant pour la GFP (vert) et des collagènes (SHG, bleu). C. Quantification de la surface de cellules GFP+ dans le feuillet 24h et 48h après électrotransfert d'un plasmide codant pour la GFP. D. Localisation du plasmide marqué de façon fluorescente (vert) après application des paramètres électriques (10 impulsions de 5ms à 800V/cm à 1Hz). Barre d'échelle : 50µm. Adapté de [110].

Il apparaît clairement que **la première étape limitante est le transport du plasmide à travers la matrice extracellulaire**. L'efficacité de l'électrotransfert de gènes dépend beaucoup du tissu ciblé. Ainsi, dans le muscle de souris, l'expression d'un gène rapporteur est maintenue pendant plusieurs mois [91] alors que dans des tumeurs murines sous-cutanées, seules 5% des cellules sont transfectées transitoirement [115]. Une des explications est la **faible mobilité des acides nucléiques à travers la matrice extracellulaire**. En effet, les études d'électrotransfert d'ADN réalisées *in vivo* ont démontré que **l'efficacité de transfection est moindre dans les tissus riches en matrice extracellulaire** [116]. Ceci est dû au fait que la **migration électrophorétique**, indispensable à la mobilité des grosses molécules d'acides nucléiques chargées, est inversement **proportionnelle à la quantité de collagène du tissu** [117].

Nos résultats montrent que le substitut dermique humain est un outil précieux pour évaluer le rôle de la matrice extracellulaire dans les réponses tissulaires à l'application d'un champ électrique externe, permettant de limiter le recours aux expérimentations animales.

Il faut souligner que dans la communauté des chercheurs travaillant sur l'électroporation, l'impact du champ électrique externe sur le comportement cellulaire et tissulaire est considéré comme nul et seul l'effet des molécules-thérapeutiques co-administrées est pris en compte. Pour illustrer ce propos, il est remarquable de noter que dans la vaste majorité des publications concernant l'électroporation le groupe contrôle « champ électrique seul » est très rarement présenté ou discuté. Pour la suite de mes recherches autour de l'électroporation j'ai choisi de prendre le contre-pied de ce postulat et d'analyser « **Comment l'électroporation (i.e la composante électrique de l'électroporation) affecte le comportement cellulaire dans un contexte tissulaire ?** ». Les travaux présentés font l'objet de l'ANR jeune chercheur jeune chercheuse WHEEL que j'ai obtenu en 2017 (17-CE19-0013).

2.4. Étude du remodelage de la matrice extracellulaire cutanée suite à l'électroporation

Étudiante en thèse supervisée : Sara Gouardères. Financement : ANR JCJC WHEEL (17-CE19-0013) (PI) ; Collaborations initiées : Dr Valérie Samouillan (CIRIMAT, Toulouse) ; Dr Alexander Golberg (Tel Aviv University). Publications sur ce thème : [118]

2.4.1. Contexte et état de l'art

La principale application clinique de l'électroporation est le traitement local de cancers cutanés, c'est l'électrochimiothérapie (ECT). Cette approche est actuellement utilisée dans plus de 150 hôpitaux en Europe, notamment comme traitement de première intention contre le mélanome au Royaume-Uni. Fait intéressant, les cliniciens ont généralement observé une cicatrisation esthétique et fonctionnelle des sites tumoraux traités par électrochimiothérapie. Les patients eux-mêmes ont confirmé ce résultat [119] puisque des questionnaires auto-compilés soulignaient une amélioration de la cicatrisation des plaies, des saignements, des troubles esthétiques, ainsi que des activités de la vie quotidienne et des relations sociales. Une autre application médicale de l'électroporation est l'électrotransfert de gènes (GET). L'électrotransfert de gènes codant pour différents facteurs de croissance (KGF-1, VEGF ou bFGF) s'est révélé très prometteur pour la cicatrisation cutanée de plaies

dans des modèles animaux [120]. Mais plus intéressant encore, certaines études ont démontré une tendance [121] voire un effet bénéfique significatif [122] de l'électroporation seule sur la fermeture des plaies dans un modèle animal.

Pour comprendre ce résultat, il convient de rappeler que des thérapies originales telles que **l'électrostimulation** sont apparues comme des alternatives aux traitements conventionnels des plaies chroniques. L'électrostimulation est basée sur un processus électrique naturel qui se produit après une blessure. Dans un épiderme intact, il existe une ségrégation active des ions Na^+ grâce à l'action de la Na^+/K^+ ATPase et à la présence de canaux ENac, conduisant à un gradient sodique de la couche basale de l'épiderme à la couche supérieure [123]. Ce processus crée un potentiel trans-épithélial (TEP) au sein de l'épiderme. Selon la partie du corps, ce TEP est estimé entre -10 et -50 mV. Lors d'une blessure cutanée, la relocalisation de ces ions Na^+ conduit à la création locale d'un champ électrique endogène de 100 à 200 mV/mm aux marges de la plaie. Ce champ électrique endogène joue un rôle majeur dans le processus de cicatrisation des plaies, notamment par l'activation de la migration et la prolifération des cellules cutanées, ainsi que par la promotion de l'angiogenèse [124]. **Les cellules cutanées sont donc « électro-sensibles ».**

Même si les paramètres électriques appliqués en électrostimulation ne sont absolument pas identiques à ceux utilisés en électroporation, **l'hypothèse du projet WHEEL est que le champ électrique appliqué lors de l'électrochimiothérapie (ECT) et de l'électrotransfert de gènes (GET) peut affecter le comportement des cellules cutanées notamment en modulant le remodelage de la matrice extracellulaire par les fibroblastes, l'induction de la migration et de la différenciation des kératinocytes et la promotion de l'angiogenèse.**

La suite de cette partie se concentrera sur les résultats obtenus pour le premier volet de ce projet, à savoir l'effet de l'électroporation sur la modulation du comportement des fibroblastes dermiques, notamment en termes de potentiel de migration et de remodelage de la matrice extracellulaire.

2.4.2. La capacité migratoire des fibroblastes dermiques est stimulée indirectement par l'électroporation, *via* le secrétome

Nous avons profité de la vidéomicroscopie pour suivre en temps réel le comportement des fibroblastes dermiques humains primaires, cultivés en monocouche, lorsqu'ils sont exposés *in vitro* à des paramètres électriques ECT et GET [118]. Nous ne nous attarderons pas sur cette étude et indiquerons seulement les résultats car elle a été réalisée sur des monocouches. Tout au long de l'étude, des intensités de champ électrique distinctes ont été appliquées pour permettre un gradient d'électroperméabilisation cellulaire, mais toujours en veillant à maintenir des conditions de perméabilisation réversibles, afin d'imiter la distribution hétérogène du champ électrique observé *in vivo* dans les tissus complexes. Les résultats obtenus sur ces monocouches sont les suivants : **1) L'exposition directe à l'électroporation ne modifie ni la prolifération ni les capacités migratoires des fibroblastes dermiques humains cultivés en monocouche; 2) Une apoptose légère à modérée apparaît (30% de la population maximum), même si les paramètres électriques appliqués conduisent à 100% d'électroperméabilisation réversible et transitoire ; 3) Le secrétome des cellules en voie d'apoptose améliore significativement les capacités migratoires de cellules non exposées au champ électrique,** notamment *via* la surexpression de facteurs de croissances (mesurée par RT-qPCR et

ELISA) ; 4) La communication cellulaire *via* le secrétome doit être prise en compte lors de l'évaluation de l'électroporation à l'échelle cellulaire ou tissulaire.

Pour obtenir des résultats plus pertinents en termes de remodelage matriciel, nous avons travaillé avec le modèle de feuillet dermique.

2.4.3. L'électroporation induit le remodelage des collagènes principalement *via* l'activation des métalloprotéinases (MMPs)

Nous avons analysé par transcriptomique la modulation de l'expression génique 4h après électroporation d'un feuillet dermique avec des paramètres de types électrochimiothérapie (ECT, 8 impulsions de 100µs appliquées à une fréquence de 1Hz à 1000V/cm) et électrotransfert de gènes (GET, 10 impulsions de 5ms appliquées à une fréquence de 1Hz à 600V/cm). Ces paramètres électriques induisent une perméabilisation réversible des cellules, sans affecter leur viabilité.

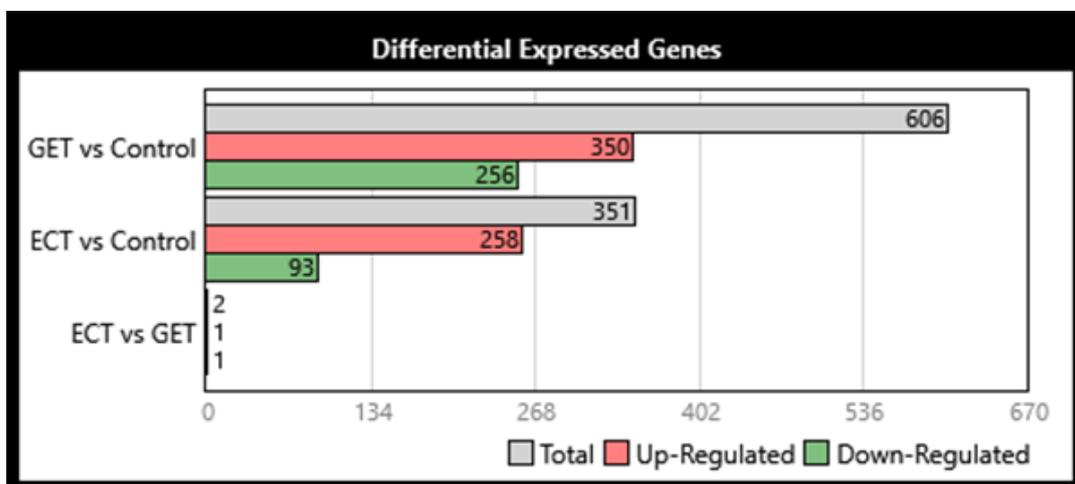


Figure 22: Gènes différentiels exprimés 4h après l'électroporation d'un feuillet dermique, quantifié par analyse transcriptomique à l'aide de la puce Clariom S Affymetrix. n=4. Données non publiées.

Même si l'expression de plusieurs centaines de gènes est significativement modulée (Figure 22), peu de ces gènes sont directement reliés à la synthèse, l'organisation ou le remodelage de la matrice. Les données ont été classées et analysées selon les recommandations du projet Matrisome (<http://matrisomeproject.mit.edu>) [125] (liste exhaustive en Tableau 1).

Tableau 1: Analyse transcriptomique des gènes régissant le remodelage de la matrice extracellulaire, dans des feuillets de dermiques, 4h après l'électroporation. Seuls les gènes présentant une modulation statistique ont été répertoriés. Dans la colonne Gene symbol regroupant tous les gènes associés au matrisome sur la puce Affymetrix, les gènes en gras sont ceux qui ont été modulés après l'électroporation. Dans la colonne GET et ECT seuls les gènes dont l'expression est significativement modulée sont indiqués, les fold-changes sont indiqués entre parenthèses après le symbole du gène. Vert = gènes régulés à la baisse ; Rouge = gènes régulés à la hausse. Col = Collagènes ; PG = Protéoglycanes. La p-value a été fixée à < 0,05. n=4. Données non publiées.

On peut noter que la **quantité d'ARNm des collagènes Col1A1 et Col5A1 est significativement diminuée** suite à l'application de l'électroporation, jusqu'à -2.2 fois en GET par exemple. Nous avons pu vérifier une diminution de la sécrétion de **pro-peptide de collagène 1A1 dans le surnageant** dans les jours suivant l'électroporation (Figure 23A), indiquant une baisse de sécrétions du collagène 1 dans l'espace extracellulaire. L'hydroxyproline étant un acide aminé spécifique des collagènes, sa quantification par colorimétrie (basée sur la réaction de l'hydroxyproline oxydée avec le p-diméthylaminobenzaldéhyde (DMAB ; réactif d'Ehrlich)) permet d'estimer précisément la quantité de collagènes dans le tissu. Nous avons observé *via* cette approche sur tissu entier une **diminution significative de la quantité d'hydroxyproline**, et donc des **collagènes**, une semaine après électroporation (Figure 23B). Une approche par spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier IRTF-ATR a permis d'observer cette diminution de la quantité de collagènes **dès 48h** après électroporation, mais ce type d'analyse se limite au premier micromètre d'épaisseur du tissu.

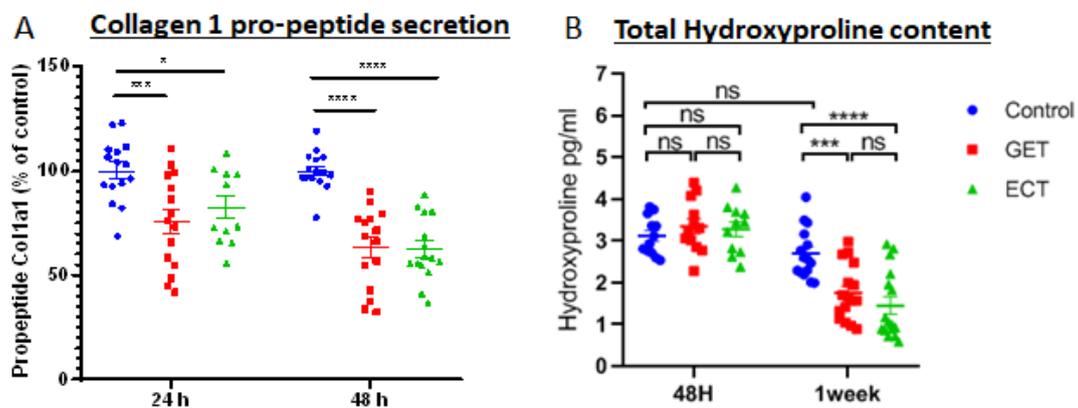


Figure 23 : La quantité de collagène dans les feuillets diminue dans les jours qui suivent l'électroporation. A. Quantification par ELISA du pro-peptide du collagène 1A1 dans le surnageant de culture. N=3, n>12. B. Quantification chimique de l'hydroxyproline dans le feuillet dermique entier. N=2, n=12. GET et ECT: paramètres électriques respectivement de type électrotransfert de gènes et électrochimiothérapie.

Outre la synthèse des collagènes, nous nous sommes intéressés à leur **remodelage**. Les principales enzymes responsables de la **dégradation** des collagènes sont les métalloprotéinases (MMPs). Nous avons donc quantifié l'activité de ces enzymes dans les surnageants à différents temps après électroporation des feuillets, en présence ou absence d'un inhibiteur pharmacologique des MMPs à large spectre, le GM6001 ou Ilomastat (Figure 24A). **L'activité des MMPs est significativement augmentée dès 6h après l'électroporation et ce pendant au moins 48h**. Les conditions d'utilisation de l'inhibiteur sont efficaces car en sa présence l'activité des MMPs est négligeable. De façon intéressante, lorsque les feuillets sont cultivés **en présence de l'inhibiteur des MMPs pendant une semaine, la quantité d'hydroxyproline (et donc de collagènes) est statistiquement la même entre la condition contrôle et les conditions électroporées** (Figure 24B). La spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier a permis de confirmer cette observation. Ces résultats indiquent que les **MMPs jouent un rôle majeur dans le remodelage des collagènes observé suite à l'électroporation**

Les expériences en cours visent à vérifier si les MMPs sont **surexprimées** même si au niveau transcriptomique rien ne le laisse entendre, ou si seule leur **activité est augmentée**. Nous essaierons ensuite **d'identifier** si un type de MMPs en particulier est sur-exprimé/sur-activé.

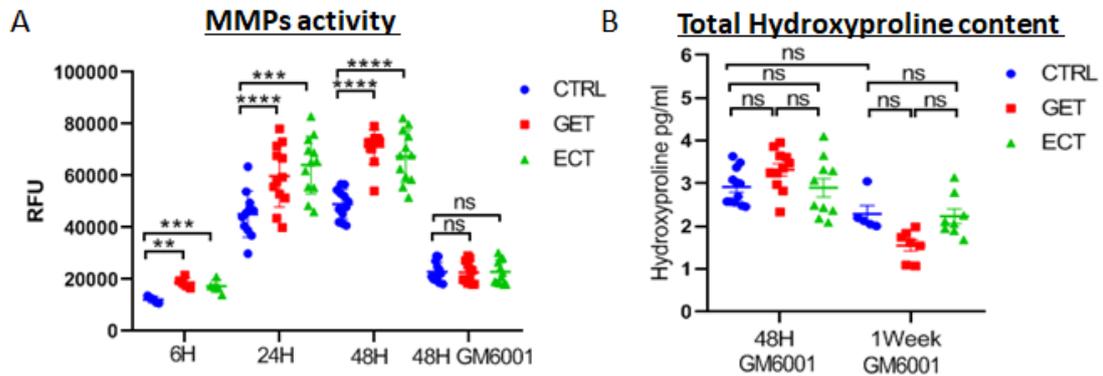


Figure 24: Les collagènes dermiques sont principalement remodelés par l'activité des MMPs après électroporation. A. L'activité des MMPs totales a été quantifiée par fluorimétrie en l'absence ou en présence de 100 μ m de GM6001 pendant la culture, un inhibiteur chimique à large spectre des MMPs. N=2, n=12. B. La teneur totale en hydroxyproline des feuilletts dermiques cultivés en présence de 100 μ m de GM6001 a été quantifiée chimiquement. N=2, n=12.

Enfin, nous avons pu observer sur des monocouches que l'électroporation induit une **transdifférenciation d'une partie de la population de fibroblastes en myofibroblastes**. Le myofibroblaste a des caractéristiques intermédiaires entre les fibroblastes et les cellules musculaires lisses [126]. Il joue un rôle important dans le remodelage matriciel au cours d'évènement comme la cicatrisation par exemple. 24h après l'électroporation moins de 5% de la population devient positive au marquage de l' α -smooth muscle actin (α -SMA), un marqueur typique des myofibroblastes. Cette différenciation n'est **pas dépendante de la voie classique du TGF β 1** mais plus vraisemblablement du **PDGFAA**, comme vérifié par RT-qPCR et ELISA (Figure 25A). Même si la population de myofibroblastes induite par l'électroporation est quantitativement faible, ces cellules sont **fonctionnelles** puisqu'une fois électroporées et ensemencées dans un gel de collagène elles sont capables de le **remodeler significativement**, comme observé avec le test de contraction d'un gel de collagène (Figure 25B).

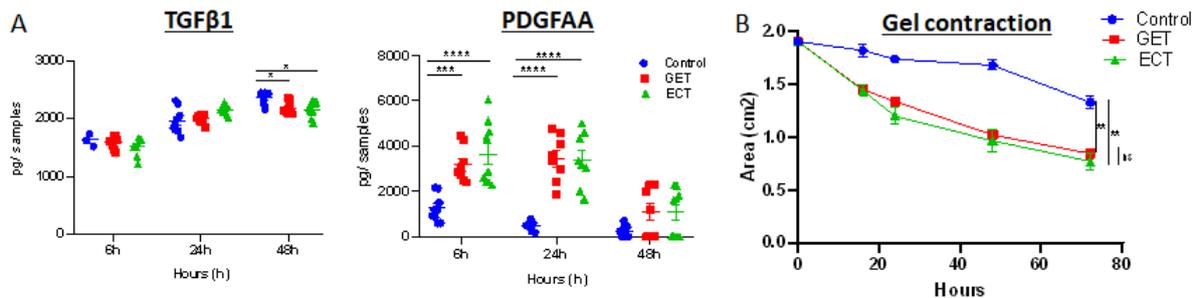


Figure 25: L'électroporation induit la transdifférenciation des fibroblastes dermiques en myofibroblastes fonctionnels de façon indépendante du TGF β 1. A. Quantification par ELISA du TGF β 1 et PDGFAA relargués dans le milieu de culture après électroporation d'une monocouche de fibroblastes dermiques. B. Fonctionnalité des myofibroblastes évaluée par la contraction d'un gel de collagène avec des cellules ensemencées 4h30 après électroporation (n=4).

En conclusion, l'électroporation 1) diminue la production de collagènes, 2) active les MMPs responsables de leur dégradation et 3) promeut la transdifférenciation d'une partie des fibroblastes en myofibroblastes fonctionnels. Il apparaît donc que l'application d'un champ électrique externe calibré, un stimulus purement physique, est un outil pertinent et original pour assurer le remodelage ciblé (entre les électrodes) de la matrice extracellulaire cutanée. Comme nous le verrons dans la discussion, cette observation est intéressante dans la perspective d'améliorer la pénétration d'agents thérapeutiques, vectorisés ou non, dans le tissu cible.

3. Étude à l'échelle tissulaire de la vectorisation chimique par nanovecteurs polymères

3.1. Définition de la thérapie photodynamique, des nanovecteurs polymères et enjeux à l'échelle tissulaire

La thérapie photodynamique (ou *photodynamic therapy*, PDT) est une approche thérapeutique anticancéreuse et dermatologique basée sur l'activation sélective par la lumière de molécules photo-activables, dites « photosensibilisateurs » tels que des dérivés porphyriniques (Figure 26).

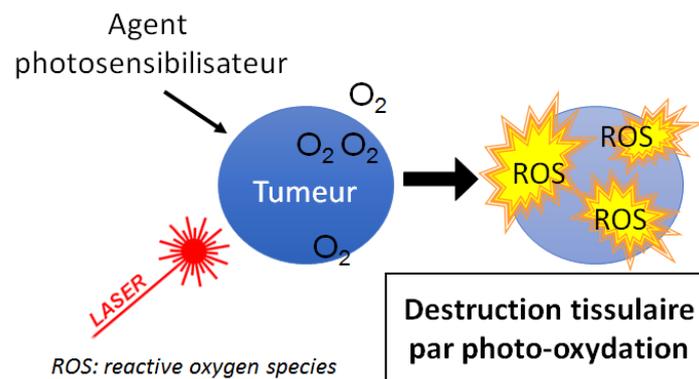


Figure 26: Principe de la thérapie photodynamique. Un agent photosensibilisateur est photo-activé à une certaine longueur d'onde. En présence d'oxygène, le photosensibilisateur activé génère la formation de ROS dans les cellules cibles.

En l'absence d'excitation lumineuse à une longueur d'onde spécifique, les photosensibilisateurs sont non-toxiques. Suite à une **irradiation lumineuse** localisée et en présence d' O_2 , le photosensibilisateur génère des **espèces réactives de l'oxygène (ROS)** telles que **l'oxygène singulet (1O_2)**, très réactives et qui oxydent de manière irréversible les substrats biologiques adjacents [127]. Ces altérations moléculaires conduisent à la mort cellulaire et expliquent le potentiel anticancéreux de cette approche.

Les principaux photosensibilisateurs, tels que le phéophorbide a, présentent généralement **deux inconvénients : une faible solubilité aqueuse conduisant à leur agrégation et une efficacité PDT plus faible sous leur forme agrégée**. Pour cette raison, **l'encapsulation** de photosensibilisateurs dans des nanovecteurs est nécessaire. Afin de répondre à cette problématique nous nous sommes intéressés à la vectorisation du phéophorbide a dans des nanovecteurs polymères.

Un grand nombre des nanoparticules utilisées dans les études précliniques et cliniques sont des vecteurs polymères, fabriqués à partir de polymères biocompatibles et biodégradables. Ils peuvent être formulés par un processus d'auto-assemblage utilisant des copolymères à blocs constitués de deux ou plusieurs chaînes de polymères ayant des hydrophilies différentes [128]. Les processus de fabrication des nano-objets polymères sont très variés [129,130] mais selon leur structure, les copolymères peuvent former des auto-assemblages. C'est généralement le cas des copolymères amphiphiles, qui peuvent former en solution aqueuse des nano-objets polymères tels que des micelles ou des vésicules aussi appelées polymersomes (Figure 27).

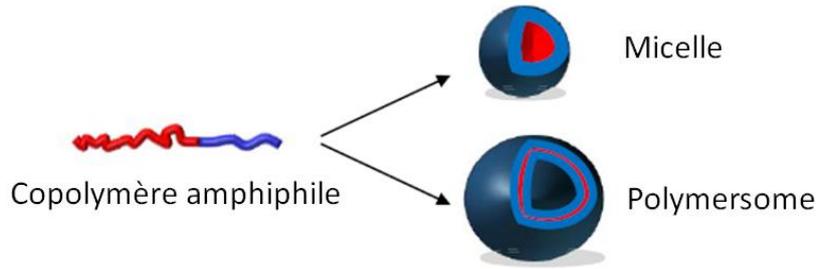


Figure 27: Schéma de la structure des micelles et polymersomes auto-assemblés à base de copolymères amphiphiles. Partie hydrophobe : rouge. Partie hydrophile : bleu. Adapté de la [thèse d'Ugo Till](#).

Les micelles, objets sphériques d'un diamètre de l'ordre 10-50 nm, possèdent un cœur hydrophobe et une couronne hydrophile. Leur cavité interne sert au transport de médicaments hydrophobes. Les polymersomes, objets usuellement d'une taille supérieure à la centaine de nanomètres, sont composés d'une membrane à cœur hydrophobe délimitant un espace hydrophile. Ces objets peuvent transporter aussi bien des molécules hydrophiles qu'hydrophobes grâce à la présence de la cavité interne et de la membrane.

Les nanoparticules polymères ont été formulées pour encapsuler soit grâce à leurs propriétés physico-chimiques soit par liaisons covalentes de petites molécules hydrophiles ou hydrophobes, ainsi que des macromolécules telles que des protéines et des acides nucléiques (Figure 28) [131].

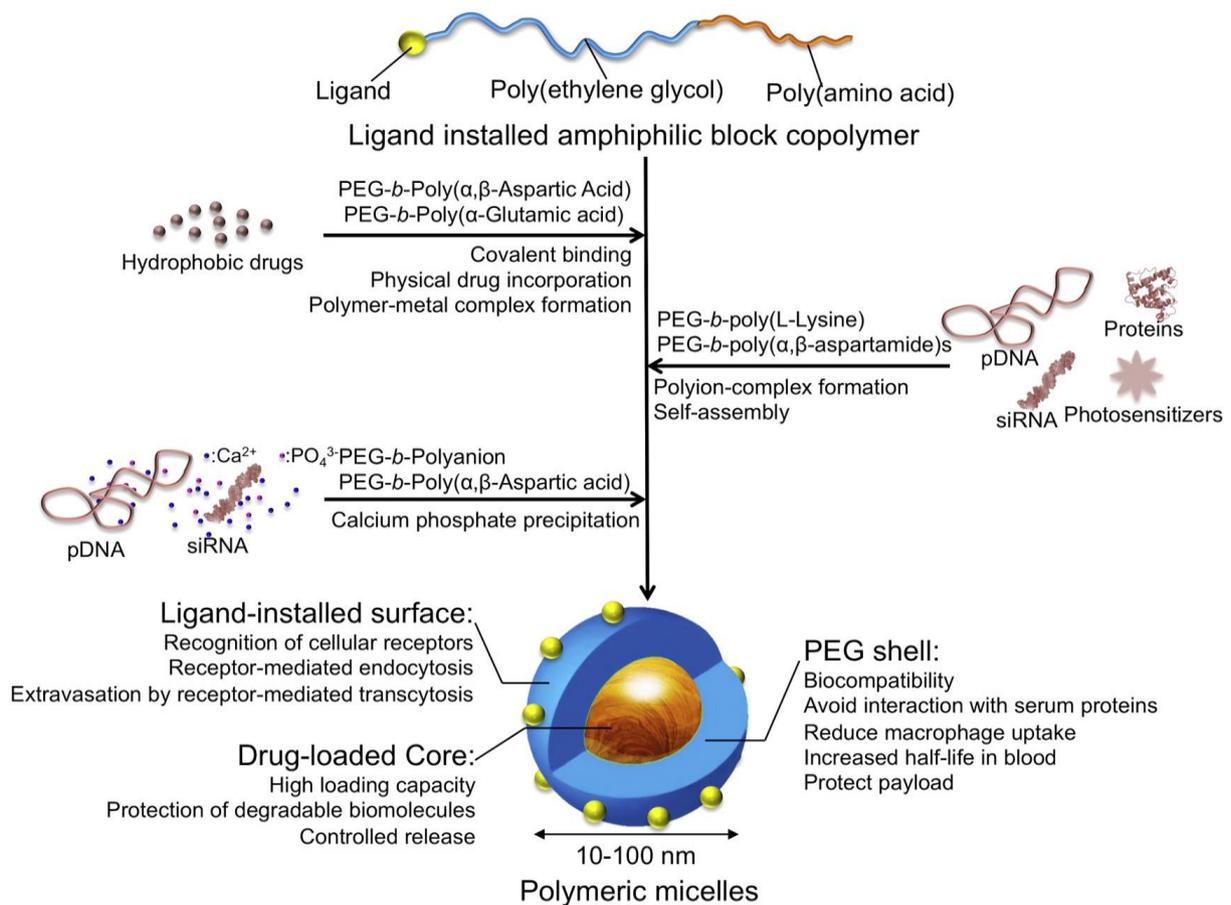


Figure 28: Les micelles polymères comme plateforme thérapeutique polyvalente. Les micelles auto-assemblées peuvent encapsuler diverses molécules thérapeutiques par interactions physico-chimiques ou liaison covalente. Tiré de [131].

Les caractéristiques physico-chimiques de ces nanovecteurs [132] expliquent leur succès en clinique une fois chargés avec la doxorubicine, le paclitaxel, le cisplatine ou l'oxaliplatine [131,133] :

- Le noyau/cœur hydrophobe est conçu pour incorporer et libérer efficacement les molécules-médicament hydrophobes.
- La couronne hydrophile dense et souple (le plus souvent composée de poly(éthylène glycol), PEG) forme une enveloppe qui protège les médicaments dans le cœur. Cette enveloppe présente aussi l'avantage de limiter l'interaction du nanovecteur avec les protéines et les cellules plasmatiques, évitant ainsi sa reconnaissance par les macrophages et prolongeant le temps de circulation dans l'organisme.
- Le diamètre des micelles polymères peut être conçu de 10 à 50 nm ce qui réduit leur risque de phagocytose et facilite le franchissement de la paroi des vaisseaux sanguins, en particulier grâce à l'effet EPR décrit dans l'introduction. Cette accumulation passive des micelles polymères dans les tissus tumoraux augmente l'efficacité des médicaments transportés.
- Le design de ces nanovecteurs et/ou le choix des médicaments transportés permet de délivrer sélectivement les médicaments à leurs cibles subcellulaires, ce qui permet de surmonter les mécanismes de résistance aux médicaments et d'améliorer l'efficacité des thérapies.
- Une fois leur cargaison libérée, les nanovecteurs sont voués à se dissocier en unité de polymères qui sont éliminées par filtration rénale, évitant ainsi tout effet secondaire à long terme.

Il est intéressant de noter que la possibilité d'incorporer des molécules fluorescentes est utile pour valider la conception et les performances biologiques des nanovecteurs polymères. En outre, la combinaison de molécules rapportrices et thérapeutiques au sein d'un même nanovecteur permet la génération d'une plateforme théranostique. Les nanovecteurs peuvent donc devenir des outils pour l'évaluation *in situ* en temps réel de la pharmacocinétique, de la pharmacodynamie, des réponses thérapeutiques chez les patients.

Pour comprendre les **enjeux de la thérapie photodynamique à l'échelle tissulaire**, il faut rappeler deux choses :

- la présence d'oxygène est indispensable à la production d'oxygène singulet par les photosensibilisateurs, mais l'oxygène peut manquer dans les régions hypoxiques des tumeurs. Il apparaît clairement que dans les études en monocouche les taux d'oxygène ne sont pas critiques. Ainsi, pour être les plus pertinentes possibles, de plus en plus d'expérimentations en PDT sont réalisées dans des modèles 3D mettant en place des gradients d'oxygénation, comme c'est le cas dans les sphéroïdes, les hydrogels ou certains dispositifs microfluidiques [134,135].
- la durée de vie de l'oxygène singulet est très courte. Elle a été mesurée *in vivo* chez le rat après irradiation de l'aluminium phtalocyanine tétrasulfonée et semble être de 0,03 à 0,17 μ s dans le foie et de 0,04 à 0,18 μ s dans la peau [136]. *In vitro*, le rayon d'action intracellulaire de l'oxygène singulet a été estimé entre 10 à 20 nm, ce qui correspond à une durée de vie de 0,01-0,04 μ s [137]. En raison de la faible diffusion et de la dégradation rapide des espèces réactives générées lors de la PDT, il apparaît indispensable que les photosensibilisateurs soient localisés le plus près possible de leur cible cellulaire. Pour atteindre le voisinage proche des cellules, les nanoparticules doivent donc diffuser à travers l'environnement tumoral, d'où la nécessité de travailler dans des modèles tissulaires 3D pour vérifier leur capacité à diffuser à travers la matrice extracellulaire par exemple.

3.2. Effets des propriétés physico-chimiques des nanovecteurs polymères sur l'efficacité anticancéreuse de la PDT dans un modèle 3D *in vitro*

Étudiant en thèse co-supervisé : Ugo Till. Financement : ANR P2N COPOPDT. Collaboration : Pr Frédéric Violleau (Ecole d'Ingénieurs de Purpan, Toulouse). Publications sur ce thème : [138–141].

Dans l'équipe, trois polymères sont classiquement utilisés (Figure 29A): le poly(oxyde d'éthylène- ϵ -caprolactone) (**PEO-PCL**) et le poly(oxyde d'éthylène- D,L -lactide) (**PEO-PDLLA**), couramment utilisés en nanomédecine en raison de leur biodégradabilité et enfin le poly(oxyde d'éthylène- b -styrène) (**PEO-PS**) qui présente une bonne clairance rénale étant donné que le polystyrène n'est pas dégradé par le corps. Par la suite les polymères utilisés seront notés par exemple PEO-PCL 5000-4000, chaque nombre représentant la masse molaire du bloc concerné.

Le photosensibilisateur utilisé dans les études subséquentes est le **phéophorbide a**, un catabolite de la chlorophylle, qui a démontré un haut potentiel en thérapie photodynamique [142] (Figure 29B). Puisqu'il présente des propriétés fluorescentes ($\lambda_{\text{exc}} = 406 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 672 \text{ nm}$), il peut être suivi en microscopie (confocale ou biphonique) et en cytométrie en flux.

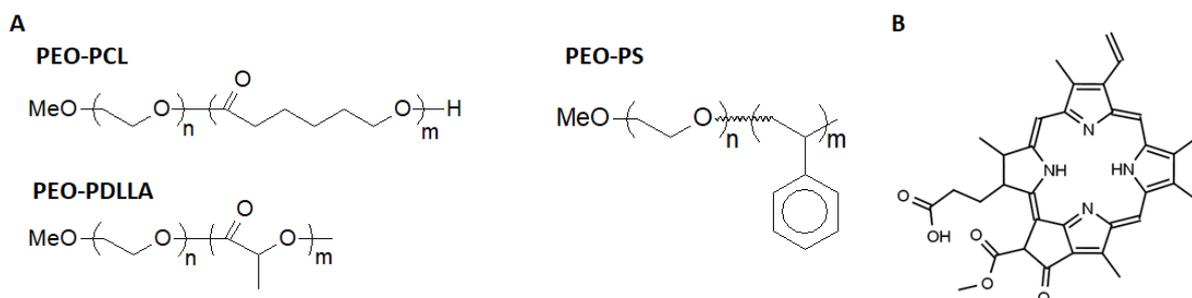


Figure 29 : Structure des copolymères amphiphiles et du photosensibilisateur utilisés dans l'équipe pour fabriquer les nanovecteurs auto-assemblés pour la thérapie photodynamique. A. PEO-PCL : poly(oxyde d'éthylène- ϵ -caprolactone) ; PEO-PLA : poly(oxyde d'éthylène- D,L -lactide) ; PEO-PS : poly(oxyde d'éthylène- b -styrène). B. Structure du phéophorbide a. Adapté de la [thèse d'Ugo Till](#).

L'objectif des différentes études menées ici, à l'interface de la chimie et de la biologie, est de comprendre le lien entre structure/propriétés physico-chimiques des nanovecteurs et réponses biologiques en thérapie photodynamique (PDT), afin de concevoir les nanovecteurs polymères les plus efficaces d'un point de vue thérapeutique. Pour ce faire, les nanovecteurs chargés en phéophorbide a ont été incubés sur des cellules humaines de cancer colorectal (HCT-116), de cancer tête et cou (FaDU) ou de cellules saines (fibroblastes dermiques) cultivées soit en monocouche, soit en 3D dans un modèle tumoral de sphéroïde. **Cette approche reposant sur la réponse biologique de cellules dans un modèle 3D signe une partie de l'originalité de nos travaux.**

Diverses micelles auto-assemblées (diamètre 20 nm) ont été formées à partir des copolymères amphiphiles mentionnés précédemment. Elles sont en routine caractérisées par diffusion statique et dynamique de la lumière (DLS), par microscopie électronique et ponctuellement par fractionnement asymétrique par couplage flux-force (AsFFFF). La capacité des micelles à délivrer le photosensibilisateur à des cellules cancéreuses HCT-116 a été observée par microscopie confocale pour les monocouches et par microscopie biphotonique pour les sphéroïdes (Figure 30A). Les micelles à base de PEO-PDLLA sont les plus efficaces pour délivrer le phéophorbide a aux cellules. La cytotoxicité et la photocytotoxicité ont été évaluées sur des monocouches pour les micelles, chargées ou non en

phéophorbide a au 1/30 mol/mol. Ainsi les concentrations 1, 10 et 100 μM de polymère correspondent à des concentrations respectives de 0.033, 0.33, et 3.3 μM de phéophorbide a. Les différents types de micelles, chargées ou non en phéophorbide a, ne présentent aucune cytotoxicité pour les cellules quelles que soient les concentrations (Figure 30A). Dans les expériences de phototoxicité, les cellules sont incubées pendant 30 minutes avec différentes concentrations de phéophorbide, puis illuminées 2 fois deux minutes ($\lambda > 400 \text{ nm}$, 8.2 J.cm^{-2}) et incubées pour 24h avant lecture de la viabilité (Figure 30B). On peut noter qu'aux concentrations appliquées (0.033, 0.33, et 3.3 μM), le **phéophorbide seul n'induit pas de toxicité significative**. Une fois encapsulé dans les micelles de PEO-PCL, PEO-PDLLA et PEO-PS il devient efficace dès 0.33 μM jusqu'à éliminer complètement les cellules à 3.3 μM . Ces résultats soulignent l'intérêt de vectoriser le photosensibilisateur pour augmenter son efficacité en PDT. Notons que bien qu'il y ait plus de photosensibilisateur dans les cellules lorsqu'il est délivré par les micelles PEO-PDLLA, les trois types de micelles sont aussi efficaces en PDT.

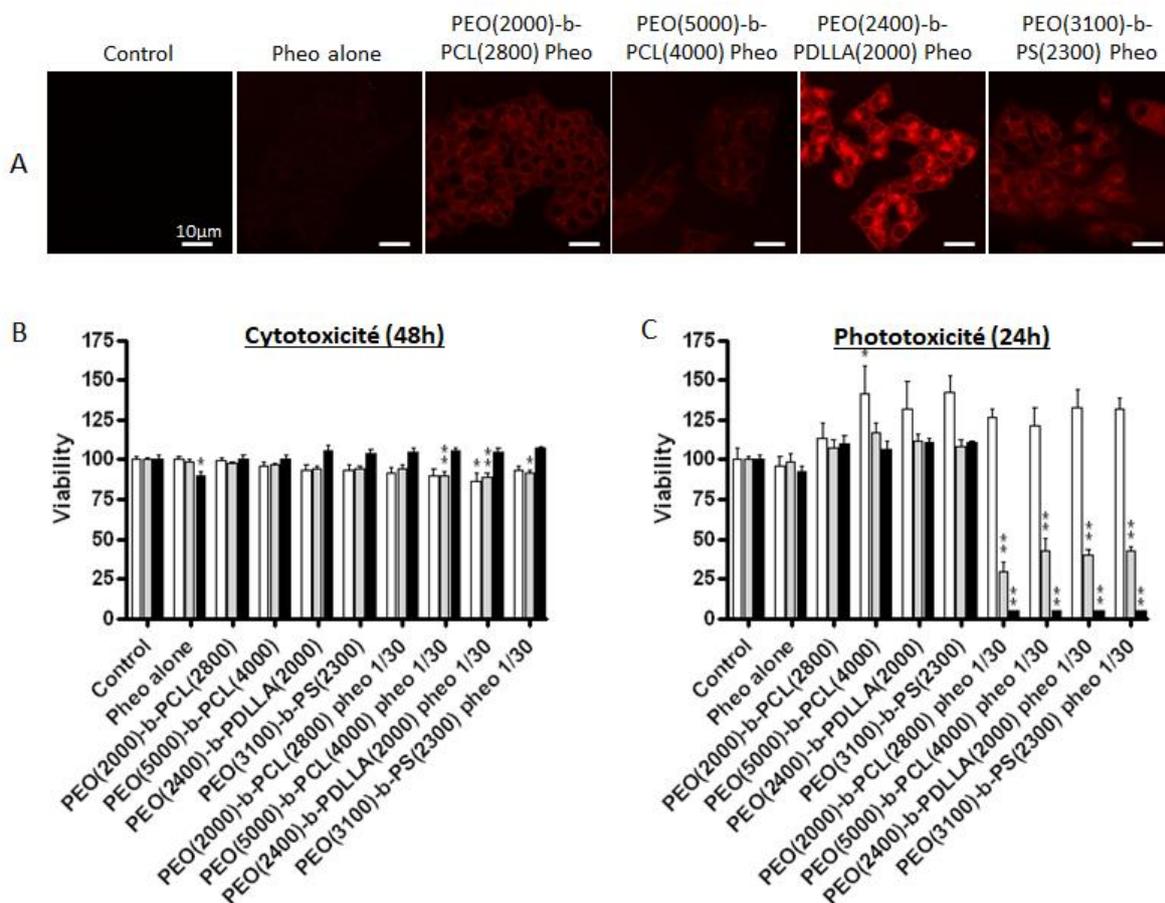


Figure 30: Localisation, cytotoxicité et phototoxicité de micelles de polymères seuls ou chargés de phéophorbide, quantifiés par PrestoBlue. A. Pénétration du Phéo dans des HCT-116, observée par microscopie confocale après 30 minutes d'incubation avec 5 μM de Phéo. B. Cytotoxicité après 48 h d'incubation. C. Phototoxicité 24h après photo-irradiation. Barre blanche, 1 μM de polymères ou 0,033 μM de Pheo seul ; barre grise, 10 μM de polymères ou 0,33 μM de Phéo seul ; et barre noire, 100 μM polymères ou 3,33 μM Phéo seul. Les nombres entre parenthèses indiquent la masse molaire du bloc concerné [138].

La vectorisation améliore la pénétration du phéophorbide a dans les sphéroïdes tumoraux par rapport au photosensibilisateur seul (Figure 31A). L'activité photodynamique sur des sphéroïdes a été évaluée en présence de phéophorbide a encapsulé ou non dans les micelles (Figure 31B). Bien que toutes les nanoparticules chargées en phéophorbide a induisent une mort cellulaire à la périphérie du

sphéroïde et une dissociation des cellules en surface, la diminution de la viabilité cellulaire est plus importante avec les micelles à base de polymère PEO-PDLLA.

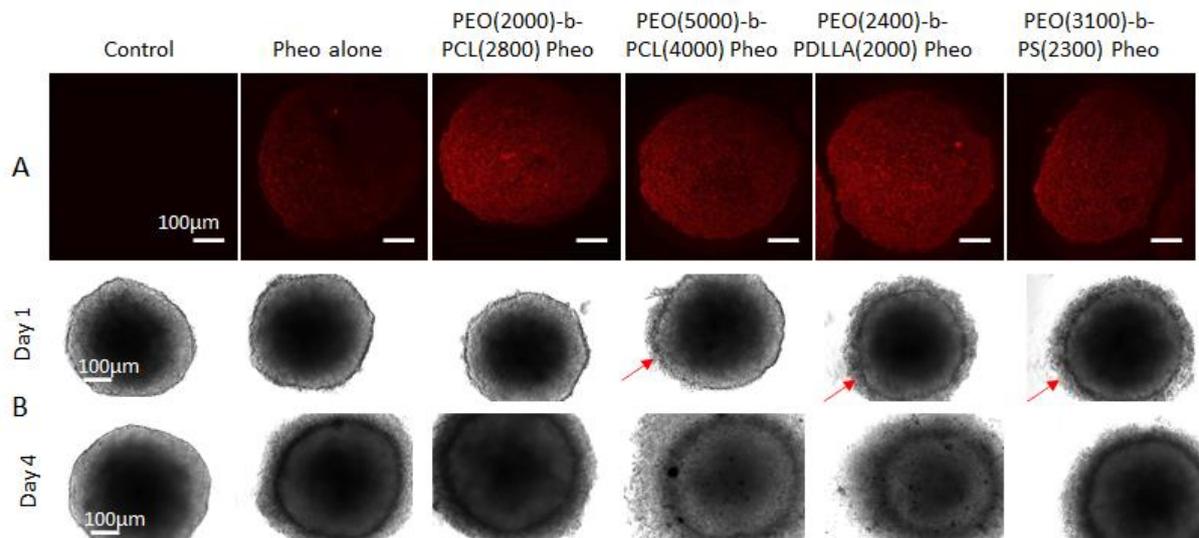


Figure 31: Efficacité PDT des micelles de copolymère pour délivrer le photosensibilisateur. A. Détection de la pénétration du phéo a après 30 min d'incubation à 37° avec 5µM de phéo, empilement de coupes optiques sur environ 150µm de profondeur. B. Observation de l'aspect macroscopique des sphéroïdes HCT-116 aux jours 1 et 4 après respectivement 1 et 3 photoactivations (Jour 0, Jour 1, Jour 2). Les micelles étaient présentes tout au long de l'expérience dans le puits. Le phéophorbide a non encapsulé et le PEO-PCL 2000-2800 sont les moins efficaces pour induire le détachement d'une couronne de cellules mortes (flèches rouges). Adapté de [138].

La pénétration cellulaire du phéophorbide a ainsi que l'efficacité de la thérapie photodynamique sur un sphéroïde cancéreux est variable en fonction de la nature du polymère utilisé pour former le nanovecteur. Des études mécanistiques plus fines sont nécessaires pour comprendre en particulier comment les nanovecteurs polymères interagissent avec les membranes plasmiques.

La suite du travail a été d'évaluer **la relation entre la pureté des nano-vecteurs polymères et leur efficacité en thérapie photodynamique**. Pour cela, des copolymères de PEO-PCL de différentes tailles ont été utilisés pour former des auto-assemblages de morphologie distincte (micelles, worm-like micelles ou polymersomes). Des mélanges contrôlés de micelles et de polymersomes ont été caractérisés à la fois en diffusion dynamique de la lumière et par fractionnement asymétrique par couplage flux-force. L'efficacité de la thérapie photodynamique de divers mélanges contrôlés, chargés en phéophorbide a, a été évaluée sur des sphéroïdes de HCT-116 et de FaDu. Alors que certains mélanges se sont révélés aussi efficaces que les systèmes monomorphes, d'autres mélanges ont montré une plus grande efficacité PDT par rapport aux nano-objets individuels, **révélant un effet synergique pour la délivrance et la fonctionnalité du photosensibilisateur** [139]. **Les mélanges de population de nanovecteurs peuvent donc être plus utiles pour des applications thérapeutiques.**

Ensuite, nous avons évalué **l'effet de la réticulation des micelles, modulant leurs propriétés mécaniques, sur l'efficacité en thérapie photodynamique** [140]. Divers auto-assemblages polymères réticulés à base de PEO-PCL ont été produits et caractérisés. Les micelles réticulées sont obtenues suite à l'introduction d'une fonction acrylate sur les polymères. Deux types de nanovecteurs rigidifiés ont été obtenus : des nanovecteurs à fonction acrylate polymérisée mais non réticulés et des systèmes

réellement réticulés par ajout d'éthylène glycol diméthacrylate (EGDMA). Par ailleurs, les homologues non réticulés sont utilisés comme éléments de comparaison.

Des micelles polymères d'une taille comprise entre 10 et 20 nm ont été obtenues, ainsi qu'un système allongé (worm-like structure) d'une longueur proche de 100 nm (Figure 32A,B). Ils ont tous été caractérisés par diffusion dynamique de la lumière mais aussi par fractionnement asymétrique par couplage flux-force afin de prouver qu'ils se présentaient en solutions pures de nanovecteurs. La microscopie électronique à transmission a montré que la réticulation (Figure 32B, C) ou la polymérisation en bout de chaînes n'induit **pas de changement morphologique ou de modification importante de la taille.**

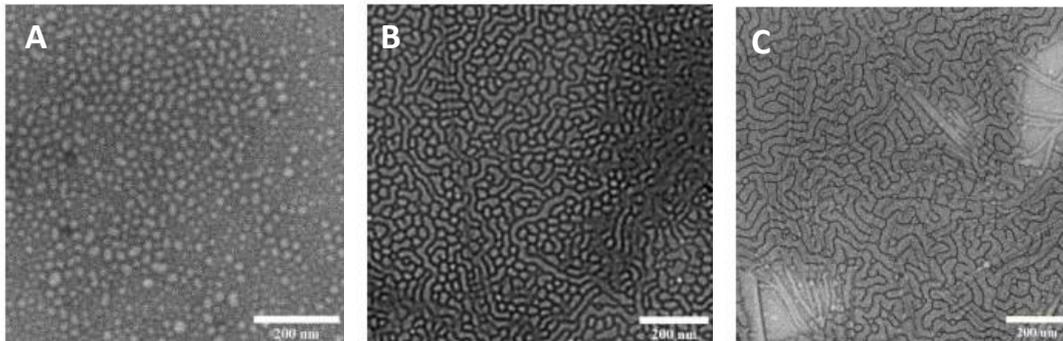


Figure 32: Caractérisation par microscopie électronique des nanovecteurs polymères réticulés ou non. A. Nanovecteurs de type micelle (PEO-PCL 5000-4000). B. Nanovecteurs de type worm-like structure non réticulés (PEO-PCL 2000-7000). C. Nanovecteurs de type worm-like structure réticulés à l'EGDMA (PEO-PCL 2000-7000). Les nombres entre parenthèses indiquent la masse molaire du bloc concerné. Adapté de [140].

Après encapsulation du Phéophorbide a dans les différents nanovecteurs, nous avons examiné leur efficacité en PDT sur des cultures de lignées cellulaires tumorales humaines (HCT-116 et FaDu), cultivées en monocouche (2D) et sphéroïdes (3D). Les vecteurs réticulés à l'EGDMA sont les plus efficaces contre les deux lignées cellulaires cultivées en sphéroïdes (3D), tandis que ceux polymérisés en bout de chaîne et ceux non-polymérisés sont moins efficaces. On peut imaginer qu'un vecteur stabilisé par réticulation aura une meilleure pénétration dans le sphéroïde et donc atteindra quantitativement plus de cellules. De façon intéressante, c'est l'inverse des résultats obtenus sur les mêmes cellules cultivées en monocouche (2D) : les micelles non-réticulées sont efficaces à une concentration plus faible que leur analogue polymérisé en bout de chaînes et les réticulées à l'EGDMA. **Ces résultats contradictoires entre les cultures en 2D et celles en 3D montrent l'importance du choix du modèle cellulaire utilisé dans une expérience.** Quelle que soit la morphologie du vecteur (micelle ou worm-like) l'efficacité en PDT était la même. Les vecteurs polymères réticulés (micelles ou worm-like structures) sont donc des vecteurs prometteurs pour le traitement des tumeurs dans un environnement 3D, notamment pour la thérapie photodynamique.

En conclusion, les nanovecteurs polymères auto-assemblés améliorent de manière significative la délivrance de médicaments anticancéreux à leur tissu cible, en particulier dans un environnement 3D. Cependant, pour atteindre le voisinage des tumeurs et délivrer efficacement le médicament qu'ils transportent, les nanovecteurs injectés par voie intraveineuse doivent traverser des barrières biologiques telles que l'endothélium des vaisseaux sanguins.

3.3. Passage de la barrière endothéliale par différents types de nanovecteurs polymères

Post-doc co-supervisée : Agathe Figarol. *Financement* : ANR Polytransflow ANR-13-BS09-0015.

Collaborations : Dr Marie-Pierre Rols (IPBS, Toulouse), Dr Pierre Joseph (LAAS-CNRS, Toulouse).

Publication sur ce thème : [143]

Nous avons analysé, *in vitro* et *in vivo*, la capacité des micelles de PEO-PCL 5000-4000 (20 nm diamètre) et polymersomes de PEO-PCL 5000-11000 (90 nm de diamètre) chargés en sonde fluorescente (DiO, qui émet dans le vert à 488nm) à **passer la barrière endothéliale et à pénétrer dans des cellules tumorales** [143]. Pour cette étude nous avons associé des cellules endothéliales humaines primaires (HUVECs) avec une lignée humaine de cancer colorectal (HCT-116).

La stratégie a été de développer des **modèles de complexité croissante** : monoculture en 2D, co-culture des HUVECs et HCT-116 en 2D, sphéroïde tumoral 3D, modèle d'endothélium sur insert, en condition inflammatoire (TNF α) ou en présence de cellules cancéreuses dans la chambre inférieure, et enfin un modèle *in vivo* de tumeur sous-cutanée.

Après 24h d'incubation avec les micelles-DiO et polymersomes-DiO, 100% de la population des HUVECs et des HCT-116 est marquée (Figure 33A). L'analyse des intensités de fluorescence (quantité de DiO à l'intérieur des cellules) montre que 1) dans les HUVECs le DiO est largement plus efficacement internalisé quand il est chargé dans des micelles, que 2) les cellules endothéliales HUVECs sont plus promptes à internaliser le DiO que les HCT-116, quel que soit le type de vecteur et 3) les HCT-116 internalisent avec la même efficacité le DiO chargé dans les micelles et les polymersomes (Figure 33B). Les expériences de co-culture (HUVECs + HCT-116) en monocouche indiquent que l'internalisation de la sonde fluorescente DiO n'est pas spécifique d'un type cellulaire (Figure 33C) et que la tendance de HUVEC à intégrer plus de DiO est maintenue, surtout lorsqu'il est chargé dans les micelles (Figure 33D).

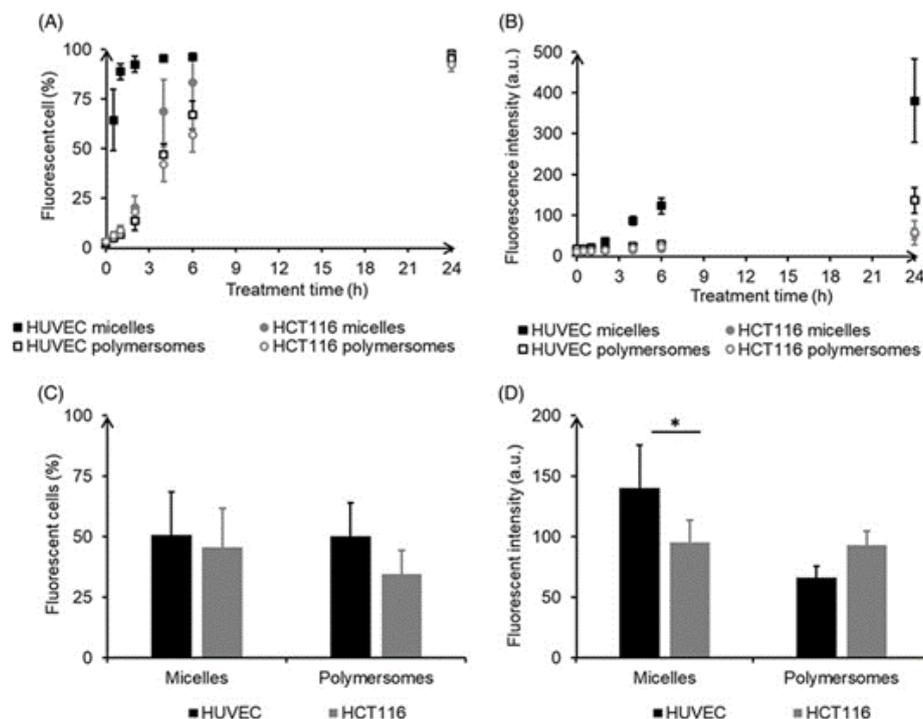


Figure 33: Quantification par cytométrie en flux de l'internalisation du DiO chargé dans des micelles et polymersomes, dans des HUVECs et HCT-116. A, B. cinétique en monoculture. C, D. internalisation en co-culture après 24h d'incubation (C,D). Tiré de [143].

La distribution du DiO dans un sphéroïde 3D n'a été analysée par microscopie biphotonique que pour le sphéroïde tumoral HCT-116 car les cellules endothéliales seules ne produisent pas de sphéroïde. Après 24h d'incubation avec les nano-objets chargés en DiO, on observe que **le DiO chargé dans les micelles a pénétré significativement plus profondément dans le sphéroïde que le DiO chargé dans les polymersomes** ($85 \pm 35 \mu\text{m}$ et $68 \pm 29 \mu\text{m}$, respectivement). Ces résultats obtenus *in vitro* signifient qu'une fois la barrière de l'endothélium franchie, les micelles auront tendance à se répandre plus largement que les polymersomes dans les cellules tumorales environnantes.

La translocation des nanovecteurs à travers la barrière endothéliale a été quantifiée grâce à un **modèle d'endothélium** développé sur des inserts de culture. Pour cela, des cellules endothéliales sont cultivées à post-confluence sur une membrane en polyester présentant des pores de $0.4\mu\text{m}$ de diamètre, assurant le passage des milieux de culture et nano-objets mais pas des cellules (Figure 34A).

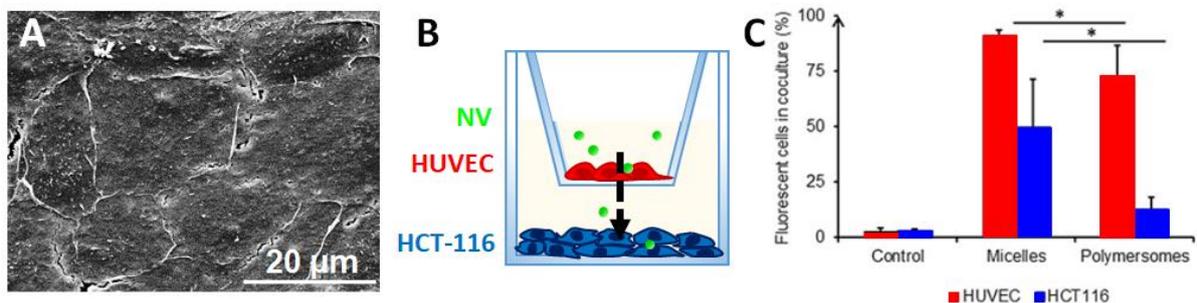


Figure 34: Translocation des nanovecteurs à travers un modèle d'endothélium sur insert. A. Observation par microscopie électronique à balayage de la monocouche jointive de cellules endothéliales cultivée sur la membrane séparant la chambre supérieure et inférieure du transwell. B. Schéma de la co-culture de cellules endothéliales dans la chambre supérieure (HUVECs en rouge) avec les cellules cancéreuses dans la chambre inférieure (HCT-116 en bleu). Les nanovecteurs (NV en vert) sont incubés dans la chambre supérieure. C. Proportion de cellules marquées au DiO dans un modèle d'endothélium en présence de cellules cancéreuses. Adapté de [143].

Dans un **modèle sain** (monocouche confluente de cellules endothéliales sur la membrane séparant les chambres supérieures et inférieures), après 24h d'incubation, le DiO chargé dans les polymersomes traverse l'endothélium presque deux fois plus que le DiO encapsulé dans les micelles (respectivement 15 % et 8 % de la quantité totale de DiO déposé dans la chambre supérieure). Nous avons vu dans la condition en monocouche que les HUVECs internalisent beaucoup plus le DiO des micelles que des polymersomes (Figure 33B), on peut donc imaginer qu'il est plus massivement piégé à l'intérieur des HUVECs et donc beaucoup moins disponible pour diffuser dans la chambre inférieure.

Dans un modèle pathologique où les cellules endothéliales sont cultivées en présence d'une cytokine **pro-inflammatoire** (TNF α), il n'y a pas de différence significative observée entre le passage du DiO chargé dans les micelles ou les polymersomes (respectivement 19 % et 21 % de la quantité totale de DiO déposé dans la chambre supérieure). En revanche, les quantités de DiO qui passent à travers l'endothélium sont plus élevées que dans le contexte sain, ce qui confirme la perturbation de la barrière endothéliale par le TNF α .

Pour mieux mimer les interactions cellulaires observées dans le **microenvironnement tumoral**, des cellules cancéreuses HCT-116 ont étéensemencées dans la chambre inférieure du dispositif (Figure 34B). Après 24h d'incubation, le DiO chargé dans les polymersomes traverse l'endothélium presque deux fois plus que le DiO encapsulé dans les micelles (respectivement 28 % et 15 % de la quantité totale de DiO déposé dans la chambre supérieure). Ces pourcentages indiquent qu'environ deux fois plus de DiO a été retrouvé dans la chambre inférieure que dans les conditions saines et ce aussi bien

avec les micelles qu'avec les polymersomes. Ces résultats soulignent un effet significatif des facteurs solubles libérés par les cellules tumorales sur l'intégrité de l'endothélium. La quantité de DiO dans les cellules dans ces conditions de co-culture a été mesurée par cytométrie en flux (Figure 34C). Le DiO chargé dans les micelles est significativement plus internalisé par les HUVECs et le HCT-116 que celui chargé dans les polymersomes. Une fois encore la tendance est à une plus forte internalisation du DiO (tout vecteur confondu) par les HUVECs que les HCT-116. Ainsi, même si nous avons vu que les polymersomes traversaient plus facilement la barrière endothéliale et que donc plus de DiO était disponible dans la chambre inférieure, les HCT-116 sont moins prompts à l'internaliser que celui contenu dans les micelles.

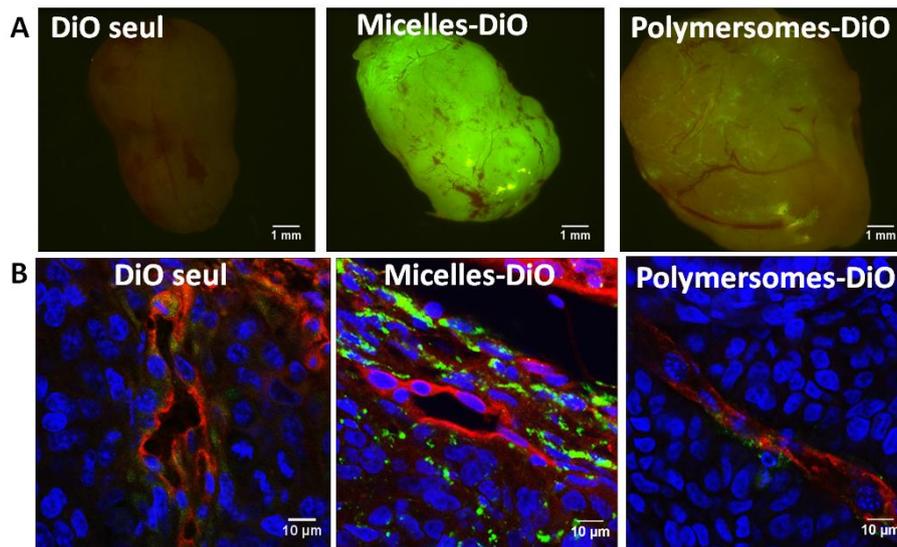


Figure 35: Devenir *in vivo* des micelles et polymersomes 24h après l'injection rétro-orbitale chez la souris de DiO seul ou des nanovecteurs chargés en DiO. A. Aspect global de la tumeur explantée, observée au microscope à fluorescence. Le DiO apparaît en vert. Le réseau sanguin apparaît en rouge. B. Visualisation sur des cryo-sections des cellules endothéliales murines (CD31, en rouge), du DiO (en vert) et des noyaux des cellules (Hoechst, en bleu). Adapté de [143].

Enfin dans une expérience *in vivo*, les micelles traversant l'endothélium se sont révélées être plus efficacement internalisées par les cellules tumorales que les polymersomes (Figure 35). En effet, le DiO qui était chargé dans les micelles diffuse largement dans les cellules endothéliales et le tissu tumoral de manière homogène, tandis que le DiO des polymersomes reste limité au voisinage des vaisseaux sanguins. Il est en effet remarquable d'observer à l'échelle de la tumeur entière que le signal du DiO est superposé au réseau sanguin (Figure 35A).

Nos expériences *in vitro* et *in vivo* indiquent qu'en fonction de leurs propriétés physico-chimiques (diamètre, charge de surface...), des systèmes de délivrance de médicaments à base de polymères auto-assemblés peuvent être utilisés pour cibler de manière passive des types cellulaires spécifiques. En effet, alors que les polymersomes restent bloqués à l'intérieur et à proximité des cellules endothéliales, les micelles sont plus aptes à diffuser vers les cellules du microenvironnement tumoral.

Ainsi, nos résultats indiquent qu'il y a de l'espace pour mieux concevoir les nanovecteurs, avec un meilleur *design* de leurs caractéristiques physico-chimiques pour diminuer leur internalisation par les cellules endothéliales et augmenter leur translocation pour une meilleure efficacité dans l'administration du médicament aux cellules tumorales.

Discussion

Cette discussion s'articulera autour de deux points : **1) pourquoi ne pas négliger de s'intéresser à l'effet intrinsèque des vecteurs (polymères) / technique physique de vectorisation (champ électrique seul) et 2) comment l'électroporation et la PDT peuvent moduler certaines des barrières rencontrées par les molécules-médicament jusqu'à leur cible.**

Le premier point de cette discussion peut sembler anecdotique mais il ne l'est pas ! Ainsi, il est important **de réfléchir à l'effet intrinsèque (*per se*) de la technique de vectorisation seule.** Cette question est somme-toute assez peu abordée dans la littérature, en tout cas en ce qui concerne l'électroporation et les nanovecteurs polymères. La difficulté rencontrée pour approfondir cette réflexion sur l'effet intrinsèque du vecteur est que **trop souvent malheureusement tous les contrôles adéquats n'ont pas été réalisés ou présentés dans les publications.** Il ne faut pas partir du postulat que le vecteur seul (champ électrique ou polymères voire irradiation lumineuse) n'aura pas d'effet et donc il faut construire des plans expérimentaux qui prennent en compte ces conditions contrôles.

Nous avons pu voir dans la partie 2.4 que la **composante électrique seule** n'est pas neutre en termes de modification du comportement des cellules soumises à **l'électroporation.** Nos résultats en **transcriptomique** montrent bien que l'expression de plus de 600 gènes est modulée suite à l'électroporation d'un modèle tissulaire ; modulation que l'on retrouve au niveau protéique pour les cibles analysées par nos soins (facteurs de croissance, protéines de la matrice extracellulaire...). Une **étude protéomique** sur plusieurs lignées cancéreuses humaines (HEK-293A, A549, SP2/0) cultivées en monocouches et soumises à l'électroporation (composante électrique seule) a démontré que l'application d'un champ électrique externe influence largement de nombreux processus biologiques, de la stabilisation des acides nucléiques à l'apoptose cellulaire, en passant par la synthèse des protéines, la dynamique du cytosquelette et l'inflammation [144].

De même, dans le cadre des nanovecteurs polymères, les **effets des polymères en tant que tels sur la modulation du comportement cellulaire**, en particulier au niveau de l'expression des gènes (on parle de « **polymer genomics** » [145]) sont très peu étudiés. Du point de vue de la modulation de l'expression des gènes suite à la vectorisation d'un agent thérapeutique, la majorité des études compare uniquement les effets du médicament à celui du médicament encapsulé dans les nanovecteurs polymères ce qui ne permet pas de quantifier/visualiser l'effet des polymères [146,147]. Pour information, les importantes différences observées dans l'expression génique entre la condition médicament libre et médicament encapsulé sont généralement expliquées par 1) la modification de la localisation subcellulaires de la drogue vectorisée et 2) la concentration intracellulaire en médicament en fonction du temps (cinétique de relargage). Cependant, Batrakova *et al* ont étudié les réponses génomiques de cellules MCF7 (résistantes ou non) exposées à la doxorubicine seule ou associée au pluronique P85 ainsi qu'au pluronique seul [148]. Les auteurs considèrent que l'expression de « peu de gènes » a été altérée lorsque les cellules sont cultivées en présence du polymère seul, ce qui est vrai en comparaison aux culturex avec la doxorubicine libre ou encapsulée. Néanmoins, l'expression de NRF1 (nuclear respiratory factor 1), impliqué dans le contrôle des gènes nécessaires à la respiration, la transcription et la réplication de l'ADN mitochondrial, et de la protéine du complexe II de la succinate déshydrogénase (SDHC) localisé dans la chaîne de respiration mitochondriale a été diminuée de quatre fois par rapport au contrôle. D'autres gènes impliqués dans la chaîne respiratoire comme les cassettes de liaison à l'ATP (ABCC1 et ABCG1) sont aussi sous exprimés. Il est apparu que grâce à leur caractère

amphiphile semblable à celui des lipides, les copolymères pluroniques peuvent s'incorporer dans la membrane plasmique et la fluidifier, entraînant une altération de l'affinité des pompes d'efflux de médicament de type Pgp pour le médicament et les molécules d'ATP [149]. Il semble que les pluroniques peuvent s'incorporer aussi dans la membrane des mitochondries, interférant alors avec la chaîne de respiration, entraînant une importante déplétion en ATP intracellulaire [150]. Sun *et al* ont montré *in vitro* que les pluroniques P123 et P85 réduisent fortement les capacités de migration et d'invasion de cellules métastatiques de cancer du sein (4T1) [151]. Ils inhibent aussi significativement le nombre de métastases pulmonaires dans un modèle *in vivo* de tumeur mammaire, notamment *via* la baisse d'expression de la MMP-9.

S'il est acquis que les copolymères à bloc de type pluronique agissent comme **des modificateurs de la réponse biologique plutôt que comme excipients inertes** lorsqu'associés à des molécules thérapeutiques, la question reste ouverte en ce qui concerne les PEO-PCL, PEO-PS et PEO-PDLLA que nous utilisons au laboratoire. Nous avons récemment comparé les mécanismes impliqués dans les interactions micelles / modèles membranaires pour des micelles PEO-PCL 5000-4000 et PEO-PS 2300-3100 [152]. Les études physico-chimiques d'interactions des micelles avec des LUVs indiquent que les micelles de PEO-PCL vides sont capables d'induire des défauts membranaires dans les liposomes, comme indiqué par la fuite d'une sonde fluorescente, contrairement aux micelles de PEO-PS. Ceci indique clairement que les micelles vides peuvent moduler les propriétés membranaires en fonction de la nature du polymère. Comme nous avons vu en introduction qu'il y a un lien direct entre membrane plasmique et fonctions cellulaires, des études plus approfondies sont nécessaires pour comprendre l'effet des polymères seuls sur le comportement cellulaire.

Le second point de cette discussion se concentre sur les **barrières physiques** rencontrées par les molécules-médicament de la circulation sanguine aux cellules cibles et **comment l'électroporation et la PDT peuvent les moduler directement ou indirectement**. Les stratégies pour **augmenter la pénétration de molécules-médicament dans une cible tissulaire** [153], quel que soit le mode de vectorisation choisi, devront viser à :

- Augmenter la perméabilité vasculaire, dans le cas des injections intra-veineuses.
- Dégrader ou altérer l'expression des composants de la matrice extracellulaire.

Les approches pharmacologiques ou physiques pour cibler les vaisseaux sanguins et améliorer les performances cliniques des nanomédicaments ciblant les tumeurs sont multiples [154]. Nous nous concentrerons sur l'électroporation et la thérapie photodynamique

Il a été démontré dans les tissus normaux et dans les tumeurs *in vivo* que la composante électrique de **l'électroporation** réduit de manière **drastique et transitoire le flux sanguin** des tissus traités, on parle de **vascular lock** [155–159]. Ces observations expérimentales sont étayées par des études cliniques démontrant l'arrêt rapide du saignement de nodule de mélanome hémorragique immédiatement après l'électroporation [160]. Cette perturbation du flux sanguin dans les vaisseaux irrigant la tumeur est **immédiate après l'application du champ électrique**, la perfusion redémarre environ 15 minutes après et son rétablissement intervient dans les 48 heures [159]. Des changements dans la forme des cellules endothéliales ont été observés 1h après l'application des impulsions électriques. Les cellules endothéliales étaient arrondies et gonflées et la lumière des vaisseaux sanguins était rétrécie. De plus, dans l'heure qui suit l'électroporation, les globules rouges

s'accumulent dans la zone traitée et les modifications vasculaires contribuent à une augmentation de l'infiltration de cellules immunitaires [161]. En effet, à cette perturbation du flux sanguin induite par l'électroporation est associée une **augmentation de la perméabilité vasculaire tumorale *in vivo*** [157,162,163]. De façon complémentaire, l'électroporation *in vitro* d'une monocouche de cellules endothéliales (HUVECs) a montré l'induction d'une perturbation du cytosquelette (filaments d'actine et microtubules) ainsi qu'une perte immédiate des jonctions intercellulaires telles que la VE-Cadhérine, augmentant la perméabilité d'un modèle d'endothélium sur insert [164]. Les effets observés avec l'électroporation seule sont bien entendu moins dramatiques qu'en présence d'un agent anticancéreux en condition électrochimiothérapie [165]. Le **remodelage des jonctions cellulaires** (CD31 ou PECAM) suite à l'électroporation a été confirmé *in vivo* et associé à une **perméabilité des vaisseaux** sanguins au dextran 70kDa [166].

Les résultats d'une **étude protéomique** sur plusieurs lignées cancéreuses humaines (HEK-293A, A549, SP2/0) soumises à l'**électroporation** montrent que le **panel de protéines dédié à la régulation de l'assemblage des jonctions serrées** (Rock1/Rock2, Rho-associated coiled-coil protein kinase-1 and -2) est un des plus sous-exprimés [144]. Il semble donc que l'électroporation affecte les jonctions intercellulaires non seulement des cellules endothéliales mais aussi des cellules tumorales.

Pour confirmer le bénéfice qu'apporte l'électroporation à la délivrance de médicaments, nous pouvons citer un article récent selon lequel **l'électroporation augmente le transport de nanoparticules de sorafenib** stabilisées par un colorant (SFB-IR783) à travers le système vasculaire, l'espace extracellulaire et la membrane cellulaire [167]. D'après les auteurs, l'électroporation augmente *in vitro* la perméabilité des monocouches de cellules endothéliales à ces nanoparticules et améliore leur diffusion à travers l'espace extracellulaire de sphéroïdes. Dans un modèle de tumeur HCT-116 *in vivo*, la pénétration accrue des nanoparticules dans la tumeur serait liée à l'électroperméabilisation des cellules tumorales mais surtout médiée par des changements dans la perméabilité vasculaire et la diffusion extracellulaire.

Il apparaît donc que **l'électroporation est efficace pour cibler plusieurs barrières physiques** à la délivrance de molécules-médicaments dans l'environnement tumoral, en particulier **les jonctions intercellulaires et la membrane plasmique** (Figure 36). Ceci indique que **l'électroporation seule pourrait être un outil purement physique pour faciliter la délivrance de molécules-médicament**.

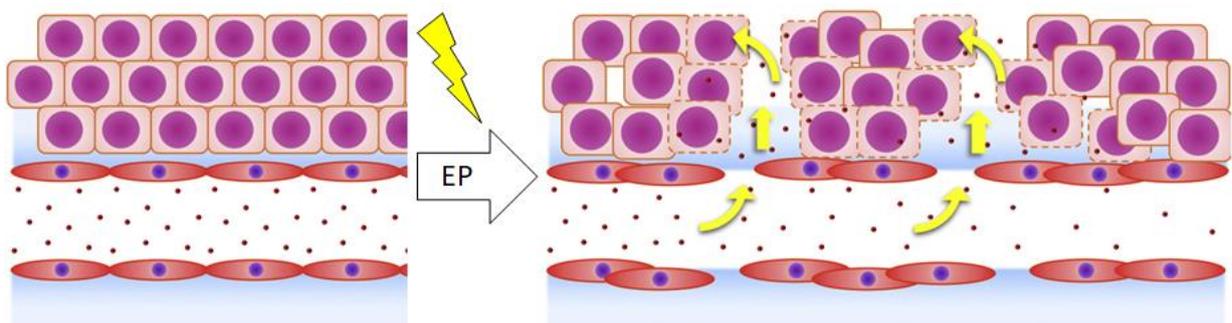


Figure 36: L'électroporation (EP) agit sur 3 barrières physiques à la délivrance de molécules-médicament. Les jonctions intercellulaires entre les cellules endothéliales du vaisseau sanguin et entre les cellules cancéreuses sont altérées et les membranes plasmiques sont électroperméabilisées. Les conséquences sont une amélioration de la pénétration des molécules-médicaments dans la tumeur. Adapté de [167].

La thérapie photodynamique présente aussi des **effets vasculaires non négligeables** car les cellules endothéliales sont en première ligne face au photosensibilisateur. Les dommages à l'endothélium déclenchent une cascade d'évènements physiologiques incluant une agrégation plaquettaire, la libération de molécules vaso-actives, l'adhésion des leucocytes, l'augmentation de la **perméabilité vasculaire** (ce qui présente un potentiel important pour accroître la diffusion des molécules-médicaments vers la tumeur) et la constriction des vaisseaux [168,169]. Les mécanismes menant aux dommages endothéliaux sont dépendants du photosensibilisateur. Dans des cellules endothéliales bovines traitées avec 25 mmol.l⁻¹ d'hématoporphyrine et irradiées, la microscopie électronique à transmission a permis d'observer une perturbation des membranes endosomales et lysosomales, le gonflement du réticulum endoplasmique et le gonflement de la membrane nucléaire, associé à la dégradation de la chromatine [170]. Leunig *et al* ont démontré que, dès 15 minutes après avoir été soumises *in vitro* à la PDT avec du photofrin, des HUVECs voyaient leur volume augmenter de 140% [171]. Une heure après la PDT des blebs étaient apparues à leur surface, accompagnées par une baisse de 20% du nombre de cellules viables. Sporn *et al* ont démontré sur des HUVECs que le photofrin (1µg/ml) induisait une dépolymérisation des microtubules, fonction de la dose de lumière, dès 15 minutes après l'irradiation lumineuse alors que les microfilaments d'actine n'étaient pas affectés [172]. On peut imaginer que **l'augmentation de la perméabilité vasculaire** observée *in vivo* après la PDT soit corrélée au **remodelage du cytosquelette et au gonflement des cellules endothéliales**.

Il est intéressant de noter qu'en raison de ses effets vasculaires importants, la PDT est de plus en plus utilisée pour des interventions hors contexte cancéreux, comme par exemple l'occlusion de vaisseaux, la thrombose dans l'hyperplasie intinale, la resténose, les plaques d'athérosclérose ou la néovascularisation cornéenne [127].

Après avoir traversé les vaisseaux sanguins au voisinage de la tumeur, **les molécules-médicament sont souvent retenues dans l'environnement de la tumeur** en raison de la densité de la **matrice extracellulaire** et ne peuvent donc pas pénétrer suffisamment loin pour exercer une activité antitumorale efficace. Par exemple, la faible pénétration de la doxorubicine à travers les tissus est due à sa grande affinité pour l'ADN et à sa séquestration dans les endosomes des cellules proches des vaisseaux sanguins, empêchant sa diffusion plus loin dans la tumeur [16]. L'intérêt de promouvoir la dégradation de la matrice extracellulaire est double [173]. Premièrement, la plus faible densité de **matrice facilitera la diffusion des molécules-médicaments au sein du tissu**. Deuxièmement, s'il y a moins de matrice, la pression interstitielle au sein de la tumeur sera moindre, les **vaisseaux sanguins seront moins comprimés et la distribution des molécules-médicaments sera améliorée**. Les preuves soutenant l'intérêt de remodeler la matrice pour **améliorer la délivrance d'agents thérapeutiques** ont été apportées *in vivo* avec l'injection chronique d'hormone comme la relaxine (sécritée par les femmes pendant la grossesse pour induire une régulation positive des MMPs) qui réduit le contenu en collagène des tumeurs [174], ou un inhibiteur pharmacologique de l'angiotensine appelé losartan qui diminue la quantité de collagène et d'acide hyaluronique [175]. Des stratégies ciblant les enzymes impliquées dans le remodelage de la matrice sont également à l'étude, par exemple l'inhibition de la lysyl oxydase-like 2 (LOXL2) à l'aide de l'anticorps simtuzumab a donné des résultats prometteurs dans des modèles murins de fibrose [176]. Les inhibiteurs des MMPs (tels que le marimastat et le prinomastat) n'ont malheureusement pas fait la preuve de leur efficacité anticancéreuses en clinique, notamment à cause de leur manque de spécificité et aussi à leur faible tolérance [177].

Dans le contexte de **l'électrotransfert de gènes**, l'intérêt de **remodeler la matrice extracellulaire** avant l'électroporation a déjà été mis en évidence dans plusieurs études *in vivo* dans le muscle squelettique [178] ou dans des modèles de tumeurs [179]. La stratégie employée est généralement l'injection préalable d'hormone (relaxine) ou d'enzymes telles que la collagénase ou la hyaluronidase. Par exemple, dans des modèles murins de tumeurs sous-cutanées, le prétraitement de tumeurs riches en matrice extracellulaire (fibrosarcome LPB) avec une combinaison de collagénase et de hyaluronidase augmentait significativement l'efficacité de l'électrotransfert d'un gène rapporteur, probablement grâce à **une amélioration de la distribution de l'ADN plasmidique au sein de la tumeur** [180]. Dans des tumeurs moins riches en matrice extracellulaire (fibrosarcome SA-1 et carcinome EAT), l'augmentation de l'efficacité de transfection suite à la pré-digestion enzymatique n'était pas aussi prononcée. De façon intéressante, dans des tumeurs de mélanome B16 où le collagène n'est présent qu'à l'état de trace, le prétraitement des tumeurs avec la hyaluronidase seule était plus efficace que le prétraitement avec les deux enzymes, soulignant **l'intérêt d'adapter la stratégie à la composition de la matrice extracellulaire du tissu**. Nos propres résultats indiquent que l'électroporation seule serait capable de **diminuer la production de nouveau collagène et d'augmenter sa dégradation via l'activité des MMPs**. **L'électroporation est donc un outil purement physique pertinent et original pour assurer le remodelage ciblé (entre les électrodes) de la matrice extracellulaire**, et peut être envisagée comme une **étape préalable à l'injection de molécules-médicaments** afin d'améliorer leur pénétration dans le tissu cible.

Une des études phares associant **remodelage matriciel et nanoparticules** a été publiée en 2010 par l'équipe de Jain. Les auteurs ont montré que l'injection de losartan, un antagoniste du récepteur de l'angiotensine II cliniquement approuvé et ayant une activité anti-fibrotique reconnue, diminuait les taux de collagène dans plusieurs modèles murins de tumeur (carcinome mammaire spontané, adénocarcinome pancréatique, fibrosarcome et mélanome) de manière dose-dépendante pendant une période d'au moins deux semaines [181]. Ils ont ainsi démontré que le losartan augmente la pénétration de liposomes chargés en doxorubicine (Doxil) dans la tumeur, en particulier dans l'espace interstitiel, et améliore son efficacité thérapeutique.

Une stratégie alternative pour remodeler la matrice dans le contexte de la nanomédecine consiste à **lier** (par adsorption ou liaison covalente) **des enzymes de remodelage de la matrice à la surface de nanoparticules**, principalement des collagénases et des hyaluronidases. Par exemple, des billes de polystyrène sur lesquelles était adsorbée une collagénase ont été utilisées comme nanoparticules modèles (de 20 à 200nm de diamètre) pour étudier leur pénétration dans un modèle sphéroïde [182]. L'association à la collagénase a augmenté la pénétration des particules de 20, 40 et 100 nm de diamètre, jusqu'à 4x par rapport au contrôle sans collagénase pour les particules de 100nm. Ces résultats démontrent que la pénétration des nanoparticules dans les tumeurs peut être significativement améliorée par l'incorporation d'enzymes modulant la matrice lors de la formulation, au moins *in vitro*. Toutefois, l'étude n'a pas examiné les performances de ce système *in vivo*. La **désorption rapide** d'une enzyme physiquement adsorbée en présence de **protéines plasmatiques** peut constituer une limitation importante de cette approche. Il faut donc plutôt envisager une **liaison covalente** de l'enzyme à la surface de la nanoparticule pour permettre de surmonter cette limitation. C'est ce qu'ont fait Kuhn *et al* en liant de façon covalente une collagénase à la surface de nanoparticule magnétique [183]. La présence de la collagénase améliore significativement la pénétration des nanoparticules dans un gel de collagène *in vitro*, et ce pendant plusieurs jours. Les données disponibles concernant les vecteurs polymères et la matrice extracellulaire (dans une perspective de remodelage)

sont rares, contrairement à celles décrivant des nanovecteurs intelligents pour lesquels le relargage de la molécule-médicament est soumis à l'action de MMPs [184]. Zhu *et al* ont démontré que des micelles de methoxy polyethylene glycol–polylactide (mPEG-PLA) (35 nm de diamètre) vides n'affectent pas *in vitro* l'expression protéique des MMP-2 et -9 dans des HUVECs et une lignée de cancer du poumon (A549) [185].

Une nouvelle approche de la nanomédecine vise à **cibler directement le microenvironnement tumoral plutôt que les cellules cancéreuses**, que ce soit les **cellules associées au cancer** comme les fibroblastes associés au cancer (CAF) [186] ou la **matrice extracellulaire elle-même** [187] (Figure 37). Le principal avantage de cette approche est qu'elle offre **la possibilité d'éliminer tous les types de cellules du microenvironnement tumoral** (cellules cancéreuses, fibroblastes et macrophages associés au cancer...). La revue de Raavé *et al* offre un aperçu des stratégies d'administration de médicaments ciblant la matrice extracellulaire tumorale [187]. Le challenge est de déclencher le relargage de la molécule-médicament une fois le nanovecteur lié à la matrice extracellulaire tumorale. Cela passe par la conception de vecteurs intelligents sensibles par exemple à certaines enzymes, au pH, à la chaleur, la lumière et les ultrasons.

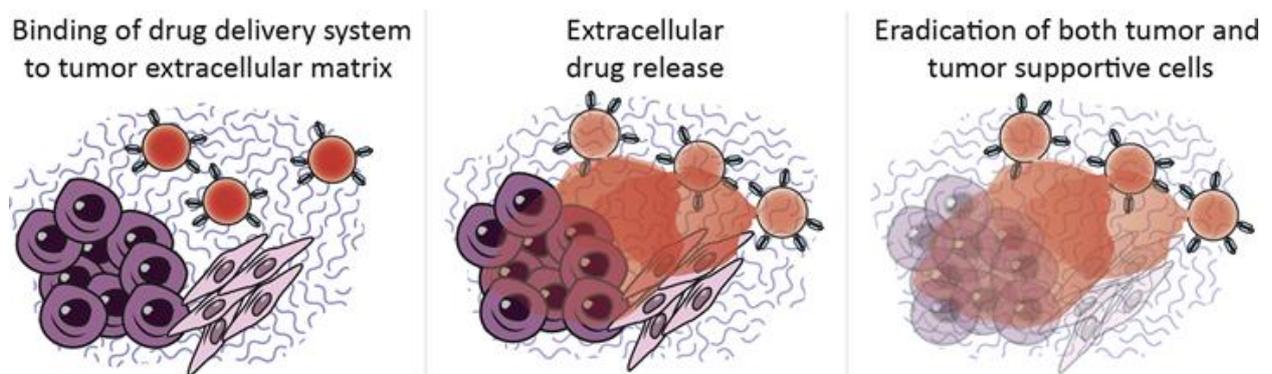


Figure 37: Aperçu schématique du ciblage de la matrice extracellulaire tumorale. Nanovecteurs se lient à une molécule abondamment présente dans la matrice extracellulaire tumorale. Une fois lié, la molécule-médicament est libérée et se diffuse dans les cellules, cancéreuses mais aussi associées (fibroblastes associés au cancer, les macrophages associés au cancer). Tiré de [187].

Pour conclure, si tout ce qui a été présenté ici l'a été dans le cadre des cellules eucaryotes, il faut voir l'intérêt de le transposer **aux cellules procaryotes**. Dans les **biofilms**, les bactéries sont enrobées dans une matrice extracellulaire dense même si la composition exacte des biofilms est très difficile à caractériser et dépend beaucoup des conditions de croissance [188]. Nous pouvons noter que les constituants fréquemment rencontrés dans la matrice extracellulaire des biofilms sont [189] : des acides nucléiques, des glycoprotéines, des polysaccharides, des protéines globulaires, des vésicules lipidiques... On peut imaginer que les outils et les savoir-faire acquis autour du remodelage de la matrice extracellulaire des eucaryotes *via* l'électroporation et la PDT seront des **atouts précieux pour l'étude des biofilms et plus particulièrement la pénétration et l'efficacité d'agents antibactériens** [190].

4. Objectifs scientifiques à moyen terme

Depuis fin 2018 j'ai intégré l'équipe IDeAS (Interfaces Dynamiques et Assemblages Stimulables) au sein du Laboratoire des Interactions Moléculaires et Réactivité Chimique et Photochimique (IMRCP), à Toulouse. Dans cet environnement de chimistes dédié à l'étude de la matière molle, je propose d'analyser **les interactions nanovecteurs polymères / vivant, que ce soit à l'échelle de la membrane, de la cellule ou du tissu.**

4.1. Évaluation de la PDT dans un substitut cutané cancéreux humain

Nous avons récemment évalué l'efficacité anticancéreuse des micelles PEO-PCL et PEO-PS, chargées en phéophorbide a, sur des sphéroïdes de mélanome humain produits avec la lignée cellulaire A375 [152] (Figure 38). Le phéophorbide encapsulé a clairement démontré une plus grande efficacité à induire la mort cellulaire que le photosensibilisateur libre et aucune différence n'a été observée en termes d'efficacité PDT entre les micelles PEO-PCL et PEO-PS.

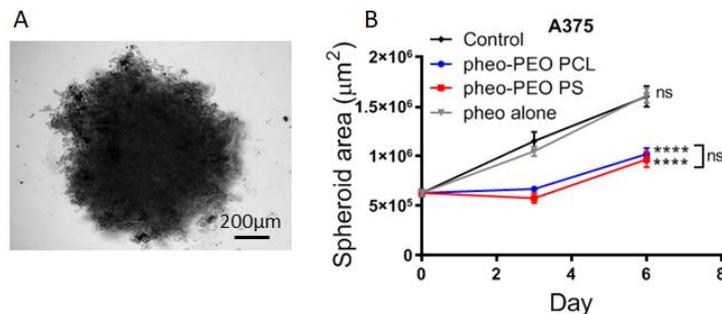


Figure 38: Efficacité PDT de micelles de polymères chargées en phéophorbide a sur des sphéroïdes cancéreux de mélanome (A375). A. Aspect macroscopique d'un sphéroïde A375. Les contours sont beaucoup moins nets que pour un sphéroïde produit avec des cellules épithéliales. B. Courbe de croissance des sphéroïdes après un unique traitement PDT. Adapté de [152].

Les expériences *in vitro* pour comprendre/améliorer la PDT sont majoritairement réalisées sur des monocouches cellulaires. Cependant, lorsque les nanoparticules et les médicaments sont appliqués à des cultures cellulaires en monocouches, ils sont capables d'atteindre les cellules dans des quantités beaucoup plus importantes qu'en condition *in vivo* car ils ne rencontrent pas les barrières physiques (matrice extracellulaire par exemple) et chimiques (acidification de l'environnement, hypoxie...) que nous avons décrites dans l'introduction. Une revue récente décrit l'intérêt croissant des modèles cancéreux 3D pour étudier *in vitro* le devenir et l'activité de nanovecteurs dans le contexte de la PDT [134]. Le modèle 3D le plus classique est le sphéroïde qui assure la mise en place de gradients (oxygène, nutriments, catabolites...) et le développement de nombreuses interactions cellules-cellules, potentiellement entre différents types cellulaires dans le cas des sphéroïdes mixtes. D'autres approches pour produire des modèles 3D sont basées sur des dispositifs microfluidiques, des hydrogels à base de Matrigel ou de collagènes ou alors sur l'utilisation de matrices dérivées de cellules décellularisées (*cell derived matrices* [191]) sur lesquelles sontensemencées les cellules cancéreuses. Ces deux derniers modèles sont prometteurs car ils prennent clairement en compte la matrice extracellulaire dans la délivrance des molécules-médicament aux cellules cancéreuses. Cet aspect est de plus en plus pris en compte dans les études sur la PDT [135].

Une récente étude a montré que selon la composition du modèle 3D (à base de collagène de type I ou de Matrigel) un même type cellulaire cancéreux ne répondait pas de la même façon (en termes de survie et de production de vésicules extracellulaires) suite à un traitement photodynamique à base d'acide aminolévulinique (ALA). Ceci souligne que le choix de la matrice extracellulaire pour construire les modèles 3D de tumeurs *in vitro* est crucial pour recueillir des informations cliniquement pertinentes [192].

Pour éviter d'avoir à choisir la nature de la matrice extracellulaire, je propose d'utiliser le modèle de substitut cutané généré par la technique d'auto-assemblage dans lequel ce sont les cellules d'intérêt qui produisent leur propre matrice extracellulaire. L'idée est de tirer parti du **modèle cutané humain microvascularisé cancéreux reconstruit par ingénierie tissulaire** (présenté en partie 1.3) (Figure 39) pour étudier le devenir et l'efficacité thérapeutique des nanovecteurs polymères dans un contexte tissulaire riche en matrice extracellulaire.

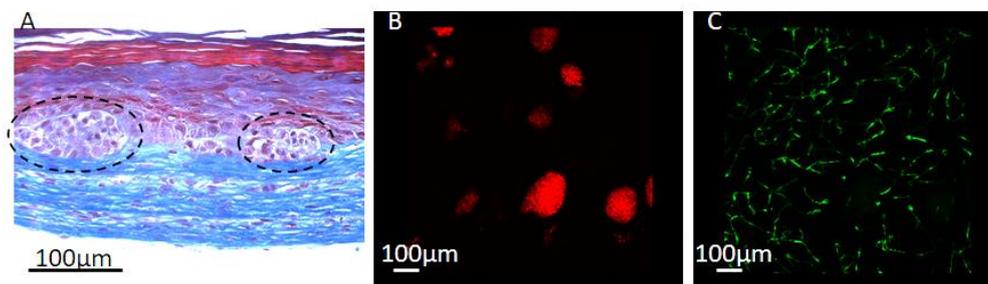


Figure 39: Substitut cutané humain cancéreux. Des cellules de mélanomes (A375-DsRed+) ont été ajoutées. A. Coloration au trichrome de Masson d'une coupe transversale de tissu. Les nodules cancéreux à la jonction dermo-épidermique sont entourés en pointillés. B et C. Vue du dessus d'un substitut cancéreux frais, observé par microscopie confocale. Les nodules cancéreux (rouges) sont facilement identifiables et quantifiables (B) ainsi que l'organisation du réseau microvasculaire (cellules endothéliales-GFP+, vertes) (C). Adapté de [35] et données non publiées.

Outre l'étude des **propriétés antitumorales de ces nanovecteurs**, je mettrai à profit mes compétences scientifiques et expérimentales pour déterminer les **effets de la PDT au niveau du remodelage de la matrice extracellulaire et du réseau microvasculaire** (lymphatique ou sanguin). En effet, les espèces réactives de l'oxygène sont connues pour jouer un rôle majeur dans le remodelage de la matrice extracellulaire et le processus d'angiogenèse, comme cela a été largement décrit dans le contexte de la cicatrisation [193]. Etant donné que l'efficacité de la thérapie photodynamique est basée sur la production de ROS, il semble indispensable d'analyser aussi ses effets sur les compartiments non-cancéreux du tissu. Il apparaît que les nanoparticules, polymères ou non, sont une voie prometteuse pour assurer une production locale et maîtrisée de ces ROS suite à un traitement PDT dans la perspective de la cicatrisation [194].

4.2. Interactions nanovecteurs polymères/membranes dans le contexte de la PDT

La **compréhension des interactions nanovecteurs/membranes cellulaires dans le contexte de la thérapie photodynamique** reste encore assez parcellaire et sera l'objet d'une partie de mes recherches. En collaboration avec des collègues physiciens et chimistes nous chercherons à **comprendre 1) ce qu'il advient des polymères et du photosensibilisateur au contact des cellules et 2) comment la cellule réagit à cette interaction, en s'intéressant plus particulièrement aux propriétés**

de la membrane plasmique. Un intérêt particulier sera porté à la condition polymères seuls (et lumière seule) pour identifier s'ils ont un effet *per se*.

Des approches classiques en biologie ont permis d'identifier une **perte précoce de l'intégrité membranaire suite à l'application de la PDT** (Figure 40), comme indiqué par la quantification au fil du temps dans le milieu extracellulaire de l'ATP (507 Da) par luminescence et de la lactate déshydrogénase LDH (140 kDa) par colorimétrie. Les cinétiques de relargage permettent de visualiser que les mécanismes d'action du photosensibilisateur seul, des micelles vides ou des micelles chargées en phéophorbide sont différents.

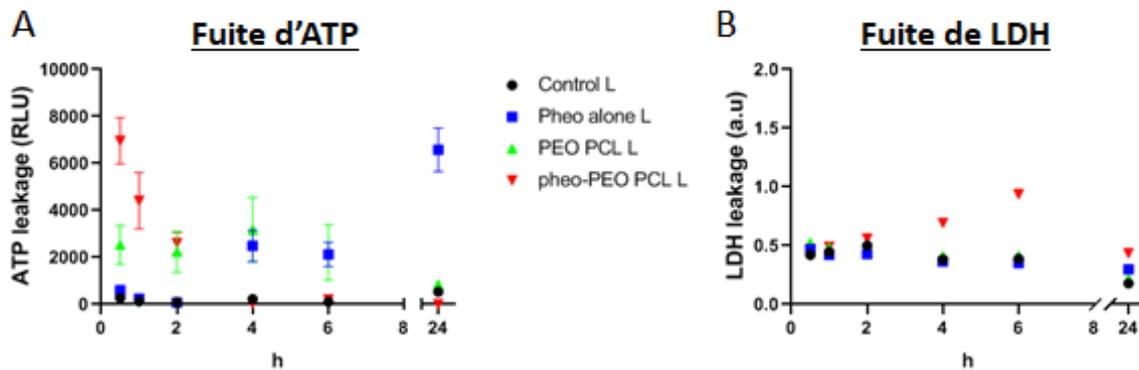


Figure 40: Détection de la perte d'intégrité membranaire rapidement après la PDT. Les fuites d'ATP (A) et LDH (B) sont suivies au fil du temps après l'irradiation de cellules MDCK1 en présence de phéophorbide libre (pheo alone), de micelles PEO-PCL vides (PEO-PCL) et de micelles chargées en phéophorbide (pheo-PEO-PCL). L : irradiation. Données non publiées.

Mes résultats préliminaires indiquent que seules les molécules de masse molaire faible furent immédiatement après le traitement PDT. Nous souhaitons approfondir cette question, notamment en nous intéressant aux flux d'ions mis en place suite à la PDT, indiquant une modification des propriétés de la membrane plasmique. Les seules études disponibles dans la littérature à ce sujet [195–197] se concentrent sur l'analyse d'un voire deux ions en particulier, notamment à cause de limitations techniques. Les informations actuelles indiquent une entrée massive d'ions K^+ dans la cellule sans fuite concomitante de Na^+ et une augmentation de la concentration intracellulaire en Ca^{2+} due à la fois à une entrée depuis le milieu extracellulaire et à un relargage des stocks intracellulaires. Nous proposons grâce à la Spectrométrie à Emission Optique couplée à l'analyse à plasma induit (ICP-OES) de caractériser les flux (entrants ou sortants) de la totalité des cations. La chromatographie ionique permettra sur les mêmes échantillons biologiques d'analyser les flux de la totalité des anions. Ces analyses exhaustives permettront de mieux comprendre la nature des défauts apparaissant au niveau de la membrane plasmique suite à la PDT.

La quantification de la luminescence, la colorimétrie ou l'ICP-OES étant des techniques indirectes, il n'est pas possible de **suivre en temps réel les évènements** qui semblent se produire précocement. C'est pourquoi, en collaboration avec le Dr Guilhem Gallot, physicien à l'école Polytechnique, nous souhaiterions observer les conséquences de la PDT, en temps réel, par **spectroscopie térahertz (THz)**. Les premiers résultats sont encourageants et confirment la mise en place **d'échange de matière** entre le milieu extracellulaire et intracellulaire immédiatement après la PDT associées aux micelles chargées en phéophorbide a. Nous souhaitons donc relier les signaux obtenus en THz avec des évènements cellulaires analysés par des approches plus classiques en biologie, notamment par microscopie électronique.

Toujours dans le but de comprendre comment les interactions micelles/membranes déterminent le devenir des nanovecteurs (adsorption, fusion, traversée) et la réponse membranaire globale (altérations mécaniques, réorganisation des domaines, perméabilité), nous utiliserons des modèles membranaires synthétiques ou biologiques. Les plus classiques sont les modèles membranaires lipidiques tels que des GUV (Giant Unilamellar Vesicles) à composition simple (DOPC) ou mixte (DOPC/DSPC/cholestérol). Cependant de nombreux composants de la membrane plasmique font défaut dans ces modèles simples de GUVs, comme la complexité des lipides ou la teneur en protéines. Pour cette raison, plusieurs chercheurs ont proposé de tirer parti des processus cellulaires naturels conduisant à la sécrétion de vésicules intactes de la membrane plasmique pour servir de modèle intermédiaire précieux entre les GUVs et les cellules. Ces **vésicules dérivées de membranes plasmiques** sont connues sous le nom de **Giant Plasma Membrane Vesicles (GPMVs)**. Il faut souligner que ces vésicules dérivées de la membrane plasmique en reproduisent plus précisément les propriétés physico-chimiques cellulaires que les GUVs synthétiques, notamment en termes de composition [198]. Les GPMVs sont classiquement produites en soumettant les cellules à un stress chimique (paraformaldéhyde 25 mM et dithiothréitol DTT 2 mM) et thermique (20h à température ambiante) [198]. Ces GPMVs chimiquement produites reproduisent les compositions protéiques et lipidiques des membranes plasmiques dont elles sont issues [199], mais ont été largement ignorées en tant que système modèle de membrane plasmique probablement en raison des modifications chimiques inhérentes à leur génération. **Mes observations préliminaires montrent qu'il est possible d'électroformer des GPMVs** (Figure 41) **à partir de sphéroïdes cancéreux suite à leur électroporation** (80 pulses de 100µs à 1500V/cm à une fréquence de 0.3Hz), au même titre que des films de phospholipides soumis à l'application d'un champ électrique externe (tension sinusoïdale 2V pic-pic, à 10hz, pendant 2h) produisent des GUVs (on parle d'électroformation des GUV [200]).

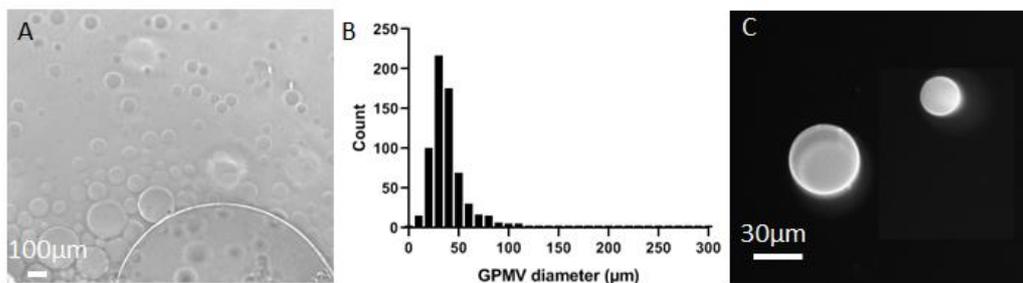


Figure 41: GPMV (Giant Plasma Membrane Vesicles) électroformées à partir de cellules tumorales humaines. A. Aspect morphologique des GPMV générées suite à l'électroporation de sphéroïdes cancéreux HCT-116. B. Distribution des tailles de 675 GPMV. C. GPMV marqués avec un colorant lipophile fluorescent, le DiO (méthodologie non publiée).

Ainsi, dans notre modèle de GPMVs électroformées, les vésicules reproduisent la complexité (lipides + protéines) de la membrane plasmique, tout en évitant les modifications chimiques inhérentes à l'utilisation de produits de type formol et DTT lors de la génération chimique des GPMVs dans l'approche usuelle. Les vésicules membranaires peuvent être introduites dans des dispositifs microfluidiques (en collaboration avec Dr Pierre Joseph au LAAS à Toulouse) permettant la visualisation (microscopie confocale) et la quantification (micropipette) simultanée des processus membranaires se produisant avant et après irradiation lumineuse en présence de micelles chargées en photosensibilisateur.

Les connaissances générées par cet axe de recherche permettront de progresser dans la compréhension de la relation entre effets des nanovecteurs à l'échelle de la membrane et efficacité de la PDT.

5. Objectifs scientifiques à long terme

5.1. Effets des complexes polyioniques (PICs) métalliques sur la cicatrisation cutanée

L'équipe IDeAS dans laquelle j'évolue au sein de l'IMRCP depuis fin 2018 a développé de nouvelles familles de nanovecteurs à base d'ions métalliques¹ nommés PICs (poly-ionic complexes) [201]. Lors de ces premiers travaux, de nouveaux agents de contrastes pour l'IRM ont été obtenus en mélangeant un polymère comprenant une partie ionique avec des ions gadolinium. Ce mélange conduit à la formation de nano-agents de 20 à 30 nm de diamètre, biocompatibles, particulièrement stables dans l'organisme et présentant des performances bien meilleures que celles des agents de contraste commerciaux. Une telle stratégie a pu être étendue aux ions cuivre avec succès et a également conduit à la formation de nanovecteurs de type PICs (Figure 42).

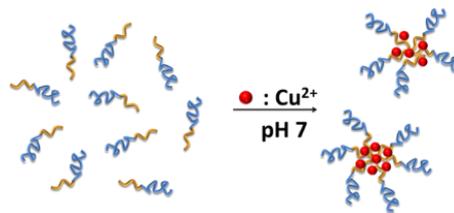


Figure 42: Complexes polyioniques chargés en cuivre obtenus par auto-assemblage à partir de copolymères à blocs doubles hydrophiles.

Pour générer ces PICs, des copolymères à bloc de type poly(oxyde d'éthylène) (PEO) et poly(acide acrylique) (PAA) sont utilisés, comme décrit précédemment par l'équipe (Figure 43) [201]. Les stratégies de l'équipe actuellement visent à mieux caractériser l'influence des masses molaires des blocs sur les objets obtenus en fonction de l'ion, et à élargir l'utilisation à d'autres types d'imagerie que l'IRM grâce à la variation des ions associés. Une collaboration en cours entre les équipes IDeAS et P3R du laboratoire propose de diversifier les copolymères utilisés en remplaçant le bloc PAA par un polymère acide phosphonique qui aura pour avantage d'augmenter encore plus la stabilité des PICs. Ces nouveaux polymères pourront être aussi testés dans le cadre de ce projet.

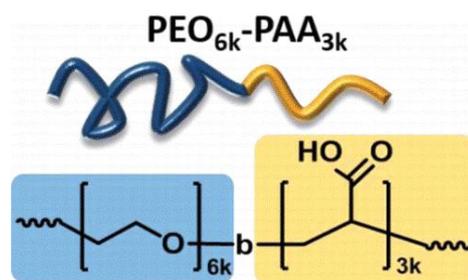


Figure 43: Structure chimique du copolymère di-bloc utilisé. Le bloc de poly(oxyde d'éthylène) (PEO) et le bloc de poly(acide acrylique) (PAA) ont des masses molaires moyennes de 6000 et 3000 g.mol⁻¹ respectivement. Le polymère est noté PEO_{6k}-b-PAA_{3k}. Tiré de [201].

Le projet que je propose vise à **étudier les effets de ces PICs métalliques sur la cicatrisation cutanée** car les plaies chroniques ont un impact significatif sur la qualité de vie des patients et de leurs

¹ : MINGOTAUD CHRISTOPHE, MARTY JEAN-DANIEL, FRANGVILLE CAMILLE, THALHAM DANIEL « AGENTS DE CONTRASTE POUR IMAGERIE MEDICALE » déposé le 5 novembre 2015 sous le n° 1560635 aux noms de l'Université Toulouse III - Paul Sabatier et du CNRS. FR3043330 - 2017-05-12 (BOPI 2017-19)

familles, provoquant douleur, perte de fonction et de mobilité, dépression, isolement social, charge financière et séjours prolongés à l'hôpital.

Les **ions métalliques** sont particulièrement intéressants du point de vue de la **cicatrisation** (Figure 44). Ainsi, les ions cuivre sont connus pour être efficaces d'un point de vue antibactérien [202]. Ils stimulent aussi la prolifération et la synthèse de la matrice extracellulaire par les fibroblastes de la peau [203], notamment car le cuivre est l'un des co-facteurs des enzymes impliquées dans la production et la maturation des collagènes. De plus, il a été démontré que les ions cuivre stimulent l'angiogenèse et la migration des cellules endothéliales [204], notamment car les activités des facteurs PDGF, VEGF et Angiogénine sont dépendantes du cuivre [205]. Le cuivre favorise aussi la prolifération et la migration des kératinocytes *via* la modulation des intégrines $\alpha 3$ et $\beta 1$ [206].

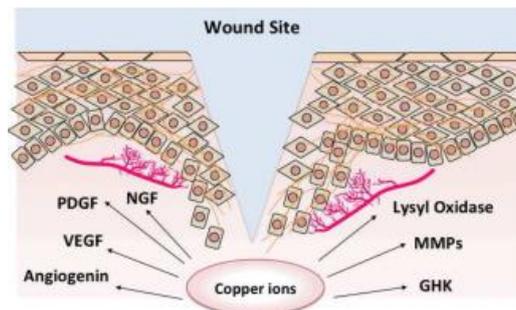


Figure 44: Rôle multiples des ions cuivre dans le processus de cicatrisation cutanée. GHK: Glycyl-L-histidyl-L-lysine; MMPs: Matrix metalloproteinase; NGF: Nerve Growth Factor; PDGF: Platelet-derived growth factor; VEGF: Vascular endothelial growth factor. Tiré de [205].

L'objectif est de profiter du savoir-faire de l'équipe en termes de formulation des PICs et des connaissances et des compétences expérimentales acquises au cours de mon ANR JCJC pour **étudier au niveau cutané l'effet de ces PICs cuivre sur 1) le remodelage de la matrice extracellulaire ; 2) l'angiogenèse et 3) la fonction barrière de l'épithélium**. Ces trois points sont **des paramètres majeurs dans le processus de cicatrisation et sont souvent altérés dans les plaies chroniques et dans les situations pathologiques**.

Si les PICs cuivre se révèlent efficaces pour stimuler le remodelage matriciel et/ou l'angiogenèse et/ou la fonction barrière de la peau, ils seraient une **modalité thérapeutique innovante pour améliorer la cicatrisation de plaies pathologiques**. De plus, une combinaison des PICs cuivre avec les PICs gadolinium utilisés en imagerie médicale de type IRM permettrait d'envisager la mise au point d'une plateforme théranostique.

5.2. Développement de vecteurs stimulables pour améliorer la cicatrisation cutanée

De nombreuses études cliniques ont confirmé le rôle central des facteurs de croissance dans la cicatrisation des plaies, en particulier *via* leur diminution d'expression dans un environnement de plaie chronique. Malgré des études préliminaires prometteuses traitant des plaies chroniques avec des facteurs de croissance, les résultats obtenus avec un unique facteur de croissance ne sont pas encourageants. Il semble que la courte demi-vie des protéines dans un microenvironnement hostile riche en protéases et un mode d'administration inadéquat ne parvenant pas à délivrer des doses efficaces dans le temps sont à l'origine de ces échecs. Il apparaît donc fondamental de vectoriser ces

facteurs de croissance pour assurer un relargage maîtrisé dans le temps et dans l'espace, à des doses efficaces [207].

L'idée de cette partie est **de développer des nanovecteurs stimulables pour assurer la délivrance efficace d'agents thérapeutiques dans le contexte de la cicatrisation cutanée**. Plusieurs pistes sont envisageables pour ce stimulus, notamment le pH ainsi que la température. Le pH de la surface des plaies chroniques a été mesuré dans une gamme allant de 7.15 à 8.9, soit un environnement basique. De façon intéressante, au fur et à mesure que la plaie progresse vers la guérison, l'environnement passe au neutre puis devient légèrement acide, comme la peau péri-lésionnelle [208]. Il faut noter que les enzymes responsables du remodelage de la matrice extracellulaire lors du processus de cicatrisation (les MMPs) voient leur efficacité largement modulée en fonction du pH environnant. De plus la littérature rapporte que les mesures de température sont plus élevées dans les plaies chroniques et aiguës alors que les niveaux diminuent à mesure que la plaie progresse dans les phases de cicatrisation [209]. Ainsi, le lit de la plaie peut par exemple présenter une température de 32.8°C alors que la peau contra-latérale n'est qu'à 28,9°C.

Nous souhaitons profiter de ces différences de pH et de température observés dans les plaies chroniques comme stimulus « intrinsèques » des nanovecteurs chargés en molécules-médicament. Des systèmes simples seront d'abord produits. Ils assureront la libération contrôlée des molécules-médicaments décrites dans le paragraphe suivant en fonction de la variation de pH ou de température de l'environnement. Ces systèmes seront ensuite incrémentés pour présenter deux fonctions stimulables : le relargage de la molécule-médicament et l'exposition d'un autre ligand à activité biologique, ce récepteur étant masqué dans des conditions non favorables en termes de pH ou de température. Le schéma suivant (Figure 45) présente le nano-objet final et les deux modes d'action possibles de ces vecteurs stimulables. L'idée serait de pouvoir associer une action biologique stimulant les cellules cutanées pour la cicatrisation et une autre présentant une forte activité antibactérienne, car les plaies chroniques présentent très souvent un microbiote altéré.

Les premiers systèmes étudiés seront basés sur les systèmes en cours de développement au sein de l'équipe IDeAS. Ceci inclut des vecteurs thermosensibles à base de poly(vinylcaprolactame) ou encore pH-sensibles comme les PICs déjà mentionnés à base de PEO-PAA. De plus, une première approche vers un vecteur à ligand rétractable a déjà été initiée à base de poly(oxyde d'éthylène)-*block*-poly(ϵ -caprolactone) PEO-PCL et de polymères thermosensibles de type poly(N-isopropylacrylamide), biocompatibles et dont la température de transition peut être aisément ajustée en jouant sur la composition chimique. Ce projet implique un très gros effort de synthèse car la masse molaire de chaque polymère doit être sélectionnée de façon très précise afin de pouvoir exposer le ligand de façon contrôlée. De même, le choix du ligand et la mise au point du relargage de la molécule-médicament demandera une longue mise au point.

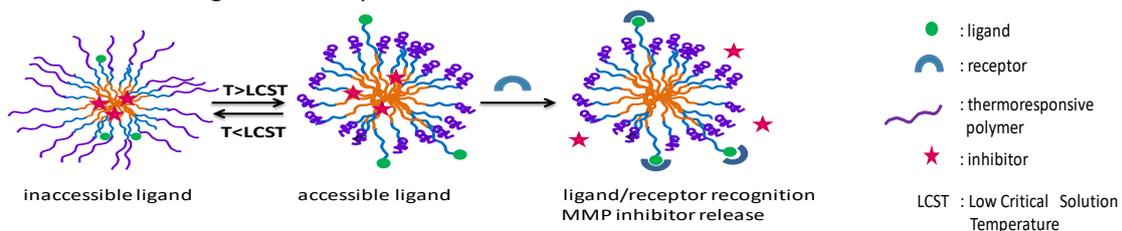


Figure 45: Nanovecteurs stimulables par le pH ou la température et présentant plusieurs activités biologiques. L'exemple de molécules-médicament décrit ici est celui d'un inhibiteur de MMP. LCST : lower critical solution temperature.

Voici maintenant quelques exemples de molécules-médicament qui pourraient être chargées dans les nanovecteurs stimulables.

- **Facteurs de croissance**

Les facteurs de croissance peuvent être apportés sous forme d'acides nucléiques (thérapie génique) [210] ou sous forme peptidique [207]. Suivant les propriétés physico-chimiques requises pour être chargé efficacement dans les nano-objets, on pourra s'intéresser au VEGF (vascular endothelial growth factor), au KGF (keratinocyte growth factor), à l'EGF (epidermal growth factor), au bFGF (basic fibroblast growth factor) ou au PDGF (platelet-derived growth factor), facteurs les plus classiquement utilisés pour promouvoir la cicatrisation.

- **Acides gras**

Les acides gras jouent un rôle prépondérant dans la biologie cutanée, notamment car ils constituent la couche cornée et modulent sa maturation. Ils inhibent la production d'éicosanoïdes pro-inflammatoires (médiateurs lipidiques), d'espèces réactives (ROS et RNS) et de cytokines, influençant ainsi la réponse inflammatoire et donc la cicatrisation [211]. Parmi les acides gras, beaucoup d'attention a été accordée aux acides gras de la famille des oméga-6 (ω -6) car ils peuvent moduler la migration et la prolifération cellulaire ainsi que la production de médiateurs inflammatoires [212]. Une attention particulière doit être portée à l'acide linoléique et arachidonique. En effet, l'application d'acide linoléique pur accélère la cicatrisation dans un modèle de plaie chez la souris, principalement grâce à une production accrue d'oxyde nitrique (NO) [213]. Le NO joue des rôles importants tels que l'activation des macrophages et des fibroblastes, l'induction de la synthèse du collagène et la prolifération des kératinocytes lors de la cicatrisation, accélérant ainsi la ré-épithélialisation [214].

- **Ions métalliques**

Les travaux initiés avec les PIC cuivre seront poursuivis avec d'autres ions métalliques. Les ions argent semblent aussi intéressants car ils présentent un puissant rôle antibactérien mais leur effet sur les cellules est plus controversé [215–218]. Il semble quand même que l'argent joue un rôle dans la régulation de certaines enzymes responsables du remodelage de la matrice extracellulaire (MMP) et dans la réduction de la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires (TNF- α et IL-12) [216].

5.3. Amélioration de la cicatrisation dans un contexte infecté

L'objectif à long terme sera de **développer par ingénierie tissulaire des modèles de plaies infectées** par des **bactéries planctoniques** (c'est-à-dire individuelles) ou organisées sous forme de **biofilm** (c'est-à-dire une communauté de bactéries protégées au sein d'une matrice extracellulaire). Mes résultats préliminaires en collaboration avec un bactériologiste sont très encourageants (Figure 46).

L'enjeu sera de développer des nano-objets qui **cibleront efficacement les bactéries pour délivrer leur molécule thérapeutique, tout en préservant l'intégrité des cellules de la peau**. Il sera primordial de visualiser et **comprendre la diffusion des nano-objets à travers la matrice extracellulaire du biofilm** pour élucider leurs mécanismes d'interaction et d'action sur les bactéries.

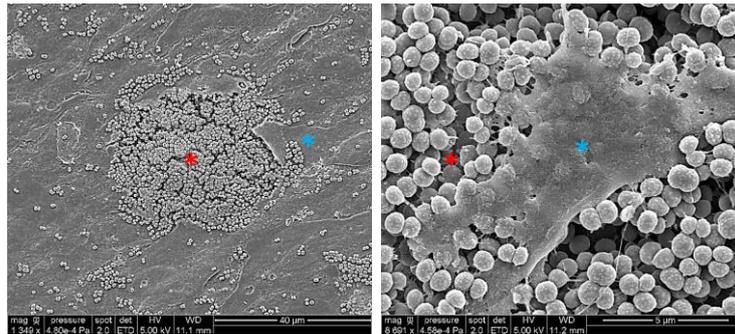


Figure 46: Modèle de plaie infectée dans une peau reconstruite humaine. Observation par microscopie électronique à balayage 16h après le dépôt des bactéries. Sur le grossissement à droite on observe une interaction très fine entre les bactéries et les cellules. * : Biofilm de *Staphylococcus epidermidis*. * : fibroblaste dermique humain. Données non publiées.

Idéalement, les molécules antibactériennes véhiculées par les nano-objets présenteraient une **double action : antibactérienne et pro-cicatrisante**. C'est le cas par exemple de certains **peptides antimicrobiens** (AMPs, antimicrobial peptides). La fonction la plus connue des AMPs est de contrôler la prolifération microbienne et de moduler la réponse immunitaire de l'hôte suite à une variété d'agressions biologiques ou physiques [219]. Mais certains AMPs sont capables d'activer la cicatrisation et l'angiogenèse, même si leurs fonctions les plus connues et documentées sont leurs propriétés anti-bactériennes, anti-fongiques et anti-virales [220]. C'est le cas par exemple du LL37, un peptide cationique de 37 acides aminés qui appartient à la famille des cathélicidines [221]. Il a été démontré *in vitro* que le LL37 stimule la prolifération, la migration et la formation de structures de type tubulaire par les cellules endothéliales et *in vivo* que l'application topique de LL37 synthétique et recombinant a amélioré la vascularisation et la ré-épithélialisation de plaie chez la souris [222]. La vectorisation et la délivrance au niveau d'une plaie de LL37 sous forme de peptide dans des nanoparticules de poly(lactic-co-glycolic acid) (PLGA) [223] ou l'électrotransfert d'un plasmide codant pour ce peptide [224] stimulent plusieurs paramètres de la cicatrisation comme la ré-épithélialisation par migration des kératinocytes, le remodelage de la matrice extracellulaire ou l'angiogenèse. D'autres AMPs présents au niveau cutané sont intéressants dans cette perspective : cathélicidine, β défensines...

Les retombées de cette approche seront majeures dans le contexte de la cicatrisation, plus particulièrement dans le cas des plaies infectées, mais aussi dans le cas des affections cutanées inflammatoires où la barrière cutanée est altérée comme la dermatite atopique et le psoriasis. En effet, de plus en plus d'études montrent que les AMPs jouent aussi un rôle immuno-modulateur majeur, assurant le lien entre immunité innée et adaptative [225].

Conclusion

Étant donné le rôle majeur de la matrice extracellulaire et des jonctions intercellulaires dans l'architecture et les fonctions des tissus, il est absolument primordial d'en tenir compte dans les expériences biologiques, en particulier celles qui ont trait à la vectorisation de molécules-médicament. La façon la plus efficace de prendre en compte ces deux paramètres, tout en limitant l'utilisation d'animaux de laboratoire, est de travailler avec des modèles produits par ingénierie tissulaire de plus en plus complexes associant plusieurs types cellulaires co-cultivés au sein d'un environnement tri-dimensionnel composé des différents éléments de la matrice extracellulaire endogène.

Références

1. Raper, S.E.; Chirmule, N.; Lee, F.S.; Wivel, N.A.; Bagg, A.; Gao, G.; Wilson, J.M.; Batshaw, M.L. Fatal systemic inflammatory response syndrome in a ornithine transcarbamylase deficient patient following adenoviral gene transfer. *Mol. Genet. Metab.* **2003**, *80*, 148–158.
2. Hacein-Bey-Abina, S.; Von Kalle, C.; Schmidt, M.; McCormack, M.P.; Wulffraat, N.; Leboulch, P. al; Lim, A.; Osborne, C.S.; Pawliuk, R.; Morillon, E. LMO2-associated clonal T cell proliferation in two patients after gene therapy for SCID-X1. *science* **2003**, *302*, 415–419.
3. Neumann, E.; Rosenheck, K. Permeability changes induced by electric impulses in vesicular membranes. *J. Membr. Biol.* **1972**, *10*, 279–290.
4. Lentacker, I.; De Cock, I.; Deckers, R.; De Smedt, S.C.; Moonen, C.T.W. Understanding ultrasound induced sonoporation: Definitions and underlying mechanisms. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2014**, *72*, 49–64, doi:10.1016/j.addr.2013.11.008.
5. Wang, J.; Hu, X.; Xiang, D. Nanoparticle drug delivery systems: an excellent carrier for tumor peptide vaccines. *Drug Deliv.* **2018**, *25*, 1319–1327, doi:10.1080/10717544.2018.1477857.
6. Carmeliet, P.; Jain, R.K. Angiogenesis in cancer and other diseases. *nature* **2000**, *407*, 249.
7. Konerding, M.A.; Miodonski, A.J.; Lametschwandtner, A. Microvascular corrosion casting in the study of tumor vascularity: a review. *Scanning Microsc.* **1995**, *9*, 1233–1243; discussion 1243-1244.
8. Matsumura, Y.; Maeda, H. A New Concept for Macromolecular Therapeutics in Cancer Chemotherapy: Mechanism of Tumorotropic Accumulation of Proteins and the Antitumor Agent Smancs. *Cancer Res.* **1986**, *46*, 6387–6392.
9. Maeda, H. Tumor-Selective Delivery of Macromolecular Drugs via the EPR Effect: Background and Future Prospects. *Bioconjug. Chem.* **2010**, *21*, 797–802, doi:10.1021/bc100070g.
10. Holle, A.W.; Young, J.L.; Spatz, J.P. In vitro cancer cell–ECM interactions inform in vivo cancer treatment. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2016**, *97*, 270–279, doi:10.1016/j.addr.2015.10.007.
11. Thomlinson, R.H.; Gray, L.H. The histological structure of some human lung cancers and the possible implications for radiotherapy. *Br. J. Cancer* **1955**, *9*, 539.
12. Gimbrone Jr, M.A.; Leapman, S.B.; Cotran, R.S.; Folkman, J. Tumor dormancy in vivo by prevention of neovascularization. *J. Exp. Med.* **1972**, *136*, 261–276.
13. Folkman, J.; Hochberg, M. Self-regulation of growth in three dimensions. *J. Exp. Med.* **1973**, *138*, 745–753.
14. Boedtker, E.; Pedersen, S.F. The Acidic Tumor Microenvironment as a Driver of Cancer. *Annu. Rev. Physiol.* **2020**, *82*, 103–126, doi:10.1146/annurev-physiol-021119-034627.
15. Gerweck, L.E.; Vijayappa, S.; Kozin, S. Tumor pH controls the in vivo efficacy of weak acid and base chemotherapeutics. *Mol. Cancer Ther.* **2006**, *5*, 1275–1279.
16. Minchinton, A.I.; Tannock, I.F. Drug penetration in solid tumours. *Nat. Rev. Cancer* **2006**, *6*, 583–592.
17. Jain, R.K. Delivery of Novel Therapeutic Agents in Tumors: Physiological Barriers and Strategies. *JNCI J. Natl. Cancer Inst.* **1990**, *81*, 570–576, doi:10.1093/jnci/81.8.570.
18. Heldin, C.-H.; Rubin, K.; Pietras, K.; Ostman, A. High interstitial fluid pressure - an obstacle in cancer therapy. *Nat. Rev. Cancer* **2004**, *4*, 806–813, doi:10.1038/nrc1456.
19. Berrier, A.L.; Yamada, K.M. Cell–matrix adhesion. *J. Cell. Physiol.* **2007**, *213*, 565–573, doi:10.1002/jcp.21237.
20. Raab-Westphal, S.; Marshall, J.F.; Goodman, S.L. Integrins as Therapeutic Targets: Successes and Cancers. *Cancers* **2017**, *9*, doi:10.3390/cancers9090110.
21. Theocharis, A.D.; Skandalis, S.S.; Gialeli, C.; Karamanos, N.K. Extracellular matrix structure. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2016**, *97*, 4–27, doi:10.1016/j.addr.2015.11.001.
22. Lu, P.; Weaver, V.M.; Werb, Z. The extracellular matrix: A dynamic niche in cancer progression. *J. Cell Biol.* **2012**, *196*, 395–406, doi:10.1083/jcb.201102147.

23. Burgstaller, G.; Oehrle, B.; Gerckens, M.; White, E.S.; Schiller, H.B.; Eickelberg, O. The instructive extracellular matrix of the lung: basic composition and alterations in chronic lung disease. *Eur. Respir. J.* **2017**, *50*, doi:10.1183/13993003.01805-2016.
24. Pampaloni, F.; Reynaud, E.G.; Stelzer, E.H. The third dimension bridges the gap between cell culture and live tissue. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2007**, *8*, 839.
25. Nelson, C.M.; Bissell, M.J. Of extracellular matrix, scaffolds, and signaling: tissue architecture regulates development, homeostasis, and cancer. *Annu Rev Cell Dev Biol* **2006**, *22*, 287–309.
26. Wang, N.; Tytell, J.D.; Ingber, D.E. Mechanotransduction at a distance: mechanically coupling the extracellular matrix with the nucleus. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2009**, *10*, 75.
27. Pasparakis, M.; Haase, I.; Nestle, F.O. Mechanisms regulating skin immunity and inflammation. *Nat. Rev. Immunol.* **2014**, *14*, 289–301, doi:10.1038/nri3646.
28. Gerber, P.A.; Buhren, B.A.; Schrumppf, H.; Homey, B.; Zlotnik, A.; Hevezi, P. The top skin-associated genes: a comparative analysis of human and mouse skin transcriptomes. *Biol. Chem.* **2014**, *395*, 577–591, doi:10.1515/hsz-2013-0279.
29. Lowenstein, P.R.; Castro, M.G. Uncertainty in the Translation of Preclinical Experiments to Clinical Trials. Why do Most Phase III Clinical Trials Fail? *Curr. Gene Ther.* **2009**, *9*, 368–374.
30. Mak, I.W.; Evaniew, N.; Ghert, M. Lost in translation: animal models and clinical trials in cancer treatment. *Am. J. Transl. Res.* **2014**, *6*, 114–118.
31. Seyhan, A.A. Lost in translation: the valley of death across preclinical and clinical divide – identification of problems and overcoming obstacles. *Transl. Med. Commun.* **2019**, *4*, 18, doi:10.1186/s41231-019-0050-7.
32. Langer, R.; Vacanti, J. Tissue engineering. *Science* **1993**, *260*, 920, doi:10.1126/science.8493529.
33. Tremblay, P.-L.; Hudon, V.; Berthod, F.; Germain, L.; Auger, F.A. Inosculation of Tissue-Engineered Capillaries with the Host's Vasculature in a Reconstructed Skin Transplanted on Mice. *Am. J. Transplant.* **2005**, *5*, 1002–1010, doi:10.1111/j.1600-6143.2005.00790.x.
34. Bulysheva, A.A.; Burcus, N.; Lundberg, C.; Edelblute, C.M.; Francis, M.P.; Heller, R. Recellularized human dermis for testing gene electrotransfer ex vivo. *Biomed. Mater.* **2016**, *11*, 035002.
35. Gibot, L.; Galbraith, T.; Huot, J.; Auger, F.A. Development of a tridimensional microvascularized human skin substitute to study melanoma biology. *Clin. Exp. Metastasis* **2013**, *30*, 83–90, doi:10.1007/s10585-012-9511-3.
36. Jones, J.R. 19 - Scaffolds for tissue engineering. In *Biomaterials, Artificial Organs and Tissue Engineering*; Hench, L.L., Jones, J.R., Eds.; Woodhead Publishing Series in Biomaterials; Woodhead Publishing, 2005; pp. 201–214 ISBN 978-1-85573-737-2.
37. O'Brien, F.J. Biomaterials & scaffolds for tissue engineering. *Mater. Today* **2011**, *14*, 88–95, doi:10.1016/S1369-7021(11)70058-X.
38. Badylak, S.F.; Gilbert, T.W. Immune response to biologic scaffold materials. In *Proceedings of the Seminars in immunology*; Elsevier, 2008; Vol. 20, pp. 109–116.
39. Costa, A.; Naranjo, J.D.; Londono, R.; Badylak, S.F. Biologic Scaffolds. *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* **2017**, *7*, doi:10.1101/cshperspect.a025676.
40. Crapo, P.M.; Gilbert, T.W.; Badylak, S.F. An overview of tissue and whole organ decellularization processes. *Biomaterials* **2011**, *32*, 3233–3243, doi:10.1016/j.biomaterials.2011.01.057.
41. Huleihel, L.; Hussey, G.S.; Naranjo, J.D.; Zhang, L.; Dziki, J.L.; Turner, N.J.; Stolz, D.B.; Badylak, S.F. Matrix-bound nanovesicles within ECM bioscaffolds. *Sci. Adv.* **2016**, *2*, e1600502, doi:10.1126/sciadv.1600502.
42. Athanasiou, K.A.; Eswaramoorthy, R.; Hadidi, P.; Hu, J.C. Self-organization and the self-assembling process in tissue engineering. *Annu. Rev. Biomed. Eng.* **2013**, *15*, 115–136, doi:10.1146/annurev-bioeng-071812-152423.
43. Abe, T.; Abe, Y.; Aida, Y.; Hara, Y.; Maeda, K. Extracellular matrix regulates induction of alkaline phosphatase expression by ascorbic acid in human fibroblasts. *J. Cell. Physiol.* **2001**, *189*, 144–151.
44. Dahl, S.L.M.; Rucker, R.B.; Niklason, L.E. Effects of copper and cross-linking on the extracellular matrix of tissue-engineered arteries. *Cell Transplant.* **2005**, *14*, 861–868.

45. Chabaud, S.; Marcoux, T.-L.; Deschênes-Rompré, M.-P.; Rousseau, A.; Morissette, A.; Bouhout, S.; Bernard, G.; Bolduc, S. Lysophosphatidic acid enhances collagen deposition and matrix thickening in engineered tissue. *J. Tissue Eng. Regen. Med.* **2015**, *9*, E65–E75, doi:10.1002/term.1711.
46. Kivirikko, K.I.; Myllylä, R. Collagen glycosyltransferases. In *International review of connective tissue research*; Elsevier, 1979; Vol. 8, pp. 23–72 ISBN 0074-767X.
47. Padh, H. Cellular functions of ascorbic acid. *Biochem. Cell Biol.* **1990**, *68*, 1166–1173.
48. Schwarz, R.I. Procollagen secretion meets the minimum requirements for the rate-controlling step in the ascorbate induction of procollagen synthesis. *J. Biol. Chem.* **1985**, *260*, 3045–3049.
49. Davidson, J.M.; LuValle, P.A.; Zoia, O.; Quaglino, D.; Giro, M. Ascorbate differentially regulates elastin and collagen biosynthesis in vascular smooth muscle cells and skin fibroblasts by pretranslational mechanisms. *J. Biol. Chem.* **1997**, *272*, 345–352.
50. Rheinwatd, J.G.; Green, H. Serial cultivation of strains of human epidermal keratinocytes: the formation keratinizing colonies from single cell is. *Cell* **1975**, *6*, 331–343.
51. L'heureux, N.; Paquet, S.; Labbe, R.; Germain, L.; Auger, F.A. A completely biological tissue-engineered human blood vessel. *FASEB J.* **1998**, *12*, 47–56.
52. Green, H.; Kehinde, O.; Thomas, J. Growth of cultured human epidermal cells into multiple epithelia suitable for grafting. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **1979**, *76*, 5665–5668.
53. Sutherland, R.M.; Durand, R.E. Growth and cellular characteristics of multicell spheroids. In *Spheroids in cancer research*; Springer, 1984; pp. 24–49.
54. Sutherland, R.M. Cell and environment interactions in tumor microregions: the multicell spheroid model. *Science* **1988**, *240*, 177–184.
55. Hirschhaeuser, F.; Menne, H.; Dittfeld, C.; West, J.; Mueller-Klieser, W.; Kunz-Schughart, L.A. Multicellular tumor spheroids: an underestimated tool is catching up again. *J. Biotechnol.* **2010**, *148*, 3–15, doi:10.1016/j.jbiotec.2010.01.012.
56. Tannock, I.F. The relation between cell proliferation and the vascular system in a transplanted mouse mammary tumour. *Br. J. Cancer* **1968**, *22*, 258.
57. Nederman, T.; Norling, B.; Glimelius, B.; Carlsson, J.; Brunk, U. Demonstration of an extracellular matrix in multicellular tumor spheroids. *Cancer Res.* **1984**, *44*, 3090–3097.
58. Kunz-Schughart, L.A.; Schroeder, J.A.; Wondrak, M.; van Rey, F.; Lehle, K.; Hofstaedter, F.; Wheatley, D.N. Potential of fibroblasts to regulate the formation of three-dimensional vessel-like structures from endothelial cells in vitro. *Am. J. Physiol.-Cell Physiol.* **2006**, *290*, C1385–C1398.
59. Chitcholtan, K.; Sykes, P.H.; Evans, J.J. The resistance of intracellular mediators to doxorubicin and cisplatin are distinct in 3D and 2D endometrial cancer. *J. Transl. Med.* **2012**, *10*, 38.
60. Olive, P.L.; Durand, R.E. Drug and radiation resistance in spheroids: cell contact and kinetics. *Cancer Metastasis Rev.* **1994**, *13*, 121–138.
61. Oloumi, A.; Lam, W.; Banath, J.P.; Olive, P.L. Identification of genes differentially expressed in V79 cells grown as multicell spheroids. *Int. J. Radiat. Biol.* **2002**, *78*, 483–492.
62. Kusamori, K.; Nishikawa, M.; Mizuno, N.; Nishikawa, T.; Masuzawa, A.; Tanaka, Y.; Mizukami, Y.; Shimizu, K.; Konishi, S.; Takahashi, Y.; et al. Increased Insulin Secretion from Insulin-Secreting Cells by Construction of Mixed Multicellular Spheroids. *Pharm. Res.* **2016**, *33*, 247–256, doi:10.1007/s11095-015-1783-2.
63. Park, J.-I.; Lee, J.; Kwon, J.-L.; Park, H.-B.; Lee, S.-Y.; Kim, J.-Y.; Sung, J.; Kim, J.M.; Song, K.S.; Kim, K.-H. Scaffold-Free Coculture Spheroids of Human Colonic Adenocarcinoma Cells and Normal Colonic Fibroblasts Promote Tumorigenicity in Nude Mice. *Transl. Oncol.* **2016**, *9*, 79–88, doi:10.1016/j.tranon.2015.12.001.
64. Khawar, I.A.; Park, J.K.; Jung, E.S.; Lee, M.A.; Chang, S.; Kuh, H.-J. Three Dimensional Mixed-Cell Spheroids Mimic Stroma-Mediated Chemoresistance and Invasive Migration in hepatocellular carcinoma. *Neoplasia N. Y. N* **2018**, *20*, 800–812, doi:10.1016/j.neo.2018.05.008.
65. Long, L.; Yin, M.; Min, W. 3D Co-culture System of Tumor-associated Macrophages and Ovarian Cancer Cells. *Bio-Protoc.* **2018**, *8*, doi:10.21769/BioProtoc.2815.
66. Gibot, L.; Madi, M.; Vézinet, R.; Rols, M.P. Mixed Spheroids as a Relevant 3D Biological Tool to Understand Therapeutic Window of Electrochemotherapy. In *Proceedings of the 1st World*

- Congress on Electroporation and Pulsed Electric Fields in Biology, Medicine and Food & Environmental Technologies; Springer, 2016; pp. 200–203.
67. Yakavets, I.; Jenard, S.; Francois, A.; Maklygina, Y.; Loschenov, V.; Lassalle, H.-P.; Dolivet, G.; Bezdetnaya, L. Stroma-Rich Co-Culture Multicellular Tumor Spheroids as a Tool for Photoactive Drugs Screening. *J. Clin. Med.* **2019**, *8*, doi:10.3390/jcm8101686.
 68. Lamberti, M.J.; Vasconsuelo, A.B.M.; Ferrara, M.G.; Vittar, N.B.R. Recapitulation of Hypoxic Tumor-stroma Microenvironment to Study Photodynamic Therapy Implications. *Photochem. Photobiol.* **2020**, *n/a*, doi:10.1111/php.13220.
 69. Vinci, M.; Gowan, S.; Boxall, F.; Patterson, L.; Zimmermann, M.; Lomas, C.; Mendiola, M.; Hardisson, D.; Eccles, S.A. Advances in establishment and analysis of three-dimensional tumor spheroid-based functional assays for target validation and drug evaluation. *BMC Biol.* **2012**, *10*, 29.
 70. Goodman, T.T.; Ng, C.P.; Pun, S.H. 3-D tissue culture systems for the evaluation and optimization of nanoparticle-based drug carriers. *Bioconjug. Chem.* **2008**, *19*, 1951–1959.
 71. Madi, M.; Rols, M.-P.; Gibot, L. Efficient In Vitro Electropermeabilization of Reconstructed Human Dermal Tissue. *J. Membr. Biol.* **2015**, *248*, 903–908, doi:10.1007/s00232-015-9791-z.
 72. Magnan, L.; Labrunie, G.; Marais, S.; Rey, S.; Dusserre, N.; Bonneau, M.; Lacomme, S.; Gontier, E.; L'Heureux, N. Characterization of a Cell-Assembled extracellular Matrix and the effect of the devitalization process. *Acta Biomater.* **2018**, *82*, 56–67, doi:10.1016/j.actbio.2018.10.006.
 73. Gibot, L.; Galbraith, T.; Huot, J.; Auger, F.A. A Preexisting Microvascular Network Benefits In Vivo Revascularization of a Microvascularized Tissue-Engineered Skin Substitute. *Tissue Eng. Part A* **2010**, *16*, 3199–3206, doi:10.1089/ten.tea.2010.0189.
 74. Gibot, L.; Galbraith, T.; Kloos, B.; Das, S.; Lacroix, D.A.; Auger, F.A.; Skobe, M. Cell-based approach for 3D reconstruction of lymphatic capillaries in vitro reveals distinct functions of HGF and VEGF-C in lymphangiogenesis. *Biomaterials* **2016**, *78*, 129–139, doi:10.1016/j.biomaterials.2015.11.027.
 75. Gibot, L.; Galbraith, T.; Bourland, J.; Rogic, A.; Skobe, M.; Auger, F.A. Tissue-engineered 3D human lymphatic microvascular network for in vitro studies of lymphangiogenesis. *Nat. Protoc.* **2017**, *12*, 1077.
 76. Auger, F.A.; Gibot, L.; Lacroix, D. The Pivotal Role of Vascularization in Tissue Engineering. *Annu. Rev. Biomed. Eng.* **2013**, *15*, 177–200, doi:10.1146/annurev-bioeng-071812-152428.
 77. Black, A.F.; Berthod, F.; L'heureux, N.; Germain, L.; Auger, F.A. In vitro reconstruction of a human capillary-like network in a tissue-engineered skin equivalent. *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* **1998**, *12*, 1331–1340, doi:10.1096/fasebj.12.13.1331.
 78. Hudon, V.; Berthod, F.; Black, A.F.; Damour, O.; Germain, L.; Auger, F.A. A tissue-engineered endothelialized dermis to study the modulation of angiogenic and angiostatic molecules on capillary-like tube formation in vitro. *Br. J. Dermatol.* **2003**, *148*, 1094–1104, doi:10.1046/j.1365-2133.2003.05298.x.
 79. Berthod, F.; Germain, L.; Tremblay, N.; Auger, F.A. Extracellular matrix deposition by fibroblasts is necessary to promote capillary-like tube formation in vitro. *J. Cell. Physiol.* **2006**, *207*, 491–498, doi:10.1002/jcp.20584.
 80. Pillet, F.; Gibot, L.; Madi, M.; Rols, M.-P.; Dague, E. Importance of endogenous extracellular matrix in biomechanical properties of human skin model. *Biofabrication* **2017**, *9*, 025017, doi:10.1088/1758-5090/aa6ed5.
 81. Neumann, E.; Kakorin, S.; Toensing, K. Principles of membrane electroporation and transport of macromolecules. In *Electrochemotherapy, Electrogenotherapy, and Transdermal Drug Delivery*; Springer, 2000; pp. 1–35.
 82. Yarmush, M.L.; Golberg, A.; Serša, G.; Kotnik, T.; Miklavčič, D. Electroporation-Based Technologies for Medicine: Principles, Applications, and Challenges. *Annu. Rev. Biomed. Eng.* **2014**, *16*, 295–320, doi:10.1146/annurev-bioeng-071813-104622.
 83. Orlowski, S.; Belehradek, J.; Paoletti, C.; Mir, L.M. Transient electropermeabilization of cells in culture: Increase of the cytotoxicity of anticancer drugs. *Biochem. Pharmacol.* **1988**, *37*, 4727–4733, doi:10.1016/0006-2952(88)90344-9.

84. Paganin-Gioanni, A.; Bellard, E.; Escoffre, J.-M.; Rols, M.-P.; Teissie, J.; Golzio, M. Direct visualization at the single-cell level of siRNA electrotransfer into cancer cells. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2011**, *108*, 10443–10447.
85. Marty, M.; Sersa, G.; Garbay, J.R.; Gehl, J.; Collins, C.G.; Snoj, M.; Billard, V.; Geertsen, P.F.; Larkin, J.O.; Miklavcic, D.; et al. Electrochemotherapy – An easy, highly effective and safe treatment of cutaneous and subcutaneous metastases: Results of ESOPE (European Standard Operating Procedures of Electrochemotherapy) study. *Eur. J. Cancer Suppl.* **2006**, *4*, 3–13, doi:10.1016/j.ejcsup.2006.08.002.
86. Gehl, J.; Sersa, G.; Matthiessen, L.W.; Muir, T.; Soden, D.; Occhini, A.; Quaglino, P.; Curatolo, P.; Campana, L.G.; Kunte, C.; et al. Updated standard operating procedures for electrochemotherapy of cutaneous tumours and skin metastases. *Acta Oncol.* **2018**, *57*, 874–882, doi:10.1080/0284186X.2018.1454602.
87. Jafari, S.M.S.; Lak, F.J.; Gazdhar, A.; Shafighi, M.; Borradori, L.; Hunger, R.E. Application of electrochemotherapy in the management of primary and metastatic cutaneous malignant tumours: a systematic review and meta-analysis. *Eur. J. Dermatol.* **2018**, *28*, 287–313, doi:10.1684/ejd.2018.3291.
88. Glass, L.F.; Jaroszeski, M.; Gilbert, R.; Reintgen, D.S.; Heller, R. Intralesional bleomycin-mediated electrochemotherapy in 20 patients with basal cell carcinoma. *J. Am. Acad. Dermatol.* **1997**, *37*, 596–599, doi:10.1016/S0190-9622(97)70178-6.
89. Kis, E.; Baltás, E.; Kinyó, Á.; Varga, E.; Nagy, N.; Gyulai, R.; Kemény, L.; Oláh, J. Successful Treatment of Multiple Basaliomas with Bleomycin-based Electrochemotherapy: A Case Series of Three Patients with Gorlin-Goltz Syndrome. *Acta Derm Venereol* **2012**, *92*, 648–51, doi:10.2340/00015555-1361.
90. Mir, L.M. Electroporation-based gene therapy: recent evolution in the mechanism description and technology developments. In *Electroporation Protocols*; Springer, 2014; pp. 3–23.
91. Mir, L.M.; Bureau, M.F.; Gehl, J.; Rangara, R.; Rouy, D.; Caillaud, J.-M.; Delaere, P.; Branellec, D.; Schwartz, B.; Scherman, D. High-efficiency gene transfer into skeletal muscle mediated by electric pulses. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **1999**, *96*, 4262–4267.
92. Golzio, M.; Teissie, J.; Rols, M.-P. Direct visualization at the single-cell level of electrically mediated gene delivery. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2002**, *99*, 1292–1297.
93. Šatkauskas, S.; Ruzgys, P.; Venslauskas, M.S. Towards the mechanisms for efficient gene transfer into cells and tissues by means of cell electroporation. *Expert Opin. Biol. Ther.* **2012**, *12*, 275–286.
94. Escoffre, J.-M.; Teissie, J.; Rols, M.-P. Gene transfer: how can the biological barriers be overcome? *J. Membr. Biol.* **2010**, *236*, 61–74.
95. Frandsen, S.K.; Gibot, L.; Madi, M.; Gehl, J.; Rols, M.-P. Calcium Electroporation: Evidence for Differential Effects in Normal and Malignant Cell Lines, Evaluated in a 3D Spheroid Model. *PLoS One* **2015**, *10*, e0144028, doi:10.1371/journal.pone.0144028.
96. Gibot, L.; Montigny, A.; Baaziz, H.; Fourquaux, I.; Audebert, M.; Rols, M.-P. Calcium Delivery by Electroporation Induces In Vitro Cell Death through Mitochondrial Dysfunction without DNA Damages. *Cancers* **2020**, *12*, 425, doi:10.3390/cancers12020425.
97. Chopinet, L.; Wasungu, L.; Rols, M.-P. First explanations for differences in electrotransfection efficiency in vitro and in vivo using spheroid model. *Int. J. Pharm.* **2012**, *423*, 7–15, doi:10.1016/j.ijpharm.2011.04.054.
98. Marrero, B.; Heller, R. The use of an in vitro 3D melanoma model to predict in vivo plasmid transfection using electroporation. *Biomaterials* **2012**, *33*, 3036–3046, doi:10.1016/j.biomaterials.2011.12.049.
99. Gibot, L.; Wasungu, L.; Teissie, J.; Rols, M.-P. Antitumor drug delivery in multicellular spheroids by electropermeabilization. *J. Controlled Release* **2013**, *167*, 138–147, doi:10.1016/j.jconrel.2013.01.021.
100. Gibot, L.; Wasungu, L.; Teissie, J.; Rols, M.-P. Antitumor drug delivery in multicellular spheroids by electropermeabilization. *J. Controlled Release* **2013**, *167*, 138–147, doi:10.1016/j.jconrel.2013.01.021.

101. Gibot, L. 3D Tissue Models to Bridge the Gap Between Cell Culture and Tissue in Assessing Electroporation. *Handb. Electroporation* **2017**, 255–269.
102. Znidar, K.; Bosnjak, M.; Jesenko, T.; Heller, L.C.; Cemazar, M. Upregulation of DNA Sensors in B16.F10 Melanoma Spheroid Cells After Electrotransfer of pDNA. *Technol. Cancer Res. Treat.* **2018**, *17*, 1533033818780088–1533033818780088, doi:10.1177/1533033818780088.
103. Fiorentzis, M.; Viestenz, A.; Siebolts, U.; Seitz, B.; Coupland, S.E.; Heinzelmann, J. The Potential Use of Electrochemotherapy in the Treatment of Uveal Melanoma: In Vitro Results in 3D Tumor Cultures and In Vivo Results in a Chick Embryo Model. *Cancers* **2019**, *11*, doi:10.3390/cancers11091344.
104. Frandsen, S.K.; Gissel, H.; Hojman, P.; Tramm, T.; Eriksen, J.; Gehl, J. Direct Therapeutic Applications of Calcium Electroporation to Effectively Induce Tumor Necrosis. *Cancer Res.* **2012**, *72*, 1336, doi:10.1158/0008-5472.CAN-11-3782.
105. Falk, H.; Matthiessen, L.W.; Wooler, G.; Gehl, J. Calcium electroporation for treatment of cutaneous metastases; a randomized double-blinded phase II study, comparing the effect of calcium electroporation with electrochemotherapy. *Acta Oncol. Stockh. Swed.* **2018**, *57*, 311–319, doi:10.1080/0284186X.2017.1355109.
106. Frandsen, S.K.; Vissing, M.; Gehl, J. A Comprehensive Review of Calcium Electroporation -A Novel Cancer Treatment Modality. *Cancers* **2020**, *12*, doi:10.3390/cancers12020290.
107. Szewczyk, A.; Gehl, J.; Daczewska, M.; Saczko, J.; Frandsen, S.K.; Kulbacka, J. Calcium electroporation for treatment of sarcoma in preclinical studies. *Oncotarget* **2018**, *9*, 11604–11618, doi:10.18632/oncotarget.24352.
108. Frandsen, S.K.; Krüger, M.B.; Mangalanathan, U.M.; Tramm, T.; Mahmood, F.; Novak, I.; Gehl, J. Normal and Malignant Cells Exhibit Differential Responses to Calcium Electroporation. *Cancer Res.* **2017**, *77*, 4389–4401, doi:10.1158/0008-5472.CAN-16-1611.
109. Frandsen, S.K.; Gissel, H.; Hojman, P.; Eriksen, J.; Gehl, J. Calcium electroporation in three cell lines: a comparison of bleomycin and calcium, calcium compounds, and pulsing conditions. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Gen. Subj.* **2014**, *1840*, 1204–1208, doi:10.1016/j.bbagen.2013.12.003.
110. Madi, M.; Rols, M.-P.; Gibot, L. Gene Electrotransfer in 3D Reconstructed Human Dermal Tissue. *Curr Gene Ther* **2016**, *16*, 75–82, doi:10.2174/1566523216666160331125052.
111. Valladeau, J.; Saeland, S. Cutaneous dendritic cells. In *Proceedings of the Seminars in immunology*; Elsevier, 2005; Vol. 17, pp. 273–283.
112. Denet, A.-R.; Vanbever, R.; Pr eat, V. Skin electroporation for transdermal and topical delivery. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2004**, *56*, 659–674.
113. Gothelf, A.; Gehl, J. Gene electrotransfer to skin; review of existing literature and clinical perspectives. *Curr. Gene Ther.* **2010**, *10*, 287–299.
114. Golzio, M.; Teissi e, J.; Rols, M.-P. Cell synchronization effect on mammalian cell permeabilization and gene delivery by electric field. *Biochim. Biophys. Acta BBA-Biomembr.* **2002**, *1563*, 23–28.
115. Rols, M.-P.; Delteil, C.; Golzio, M.; Dumond, P.; Cros, S.; Teissie, J. In vivo electrically mediated protein and gene transfer in murine melanoma. *Nat. Biotechnol.* **1998**, *16*, 168–171.
116. Mesojednik, S.; Pavlin, D.; Sersa, G.; Coer, A.; Kranjc, S.; Grosel, A.; Tevz, G.; Cemazar, M. The effect of the histological properties of tumors on transfection efficiency of electrically assisted gene delivery to solid tumors in mice. *Gene Ther.* **2007**, *14*, 1261–1269.
117. Zaharoff, D.A.; Barr, R.C.; Li, C.Y.; Yuan, F. Electromobility of plasmid DNA in tumor tissues during electric field-mediated gene delivery. *Gene Ther.* **2002**, *9*, 1286–1290.
118. Gouarderes, S.; Doumard, L.; Vicendo, P.; Mingotaud, A.-F.; Rols, M.-P.; Gibot, L. Electroporation does not affect human dermal fibroblast proliferation and migration properties directly but indirectly via the secretome. *Bioelectrochemistry* **2020**, *134*, 107531, doi:10.1016/j.bioelechem.2020.107531.
119. Campana, L.G.; Mocellin, S.; Basso, M.; Puccetti, O.; De Salvo, G.L.; Chiarion-Sileni, V.; Vecchiato, A.; Corti, L.; Rossi, C.R.; Nitti, D. Bleomycin-Based Electrochemotherapy: Clinical

- Outcome from a Single Institution's Experience with 52 Patients. *Ann. Surg. Oncol.* **2009**, *16*, 191–199, doi:10.1245/s10434-008-0204-8.
120. Gibot, L.; Rols, M.-P. Gene transfer by pulsed electric field is highly promising in cutaneous wound healing. *Expert Opin. Biol. Ther.* **2016**, *16*, 67–77, doi:10.1517/14712598.2016.1098615.
 121. Marti, G.; Ferguson, M.; Wang, J.; Byrnes, C.; Dieb, R.; Qaiser, R.; Bonde, P.; Duncan, M.D.; Harmon, J.W. Electroporative transfection with KGF-1 DNA improves wound healing in a diabetic mouse model. *Gene Ther.* **2004**, *11*, 1780–1785, doi:10.1038/sj.gt.3302383.
 122. Lee, P.-Y.; Chesnoy, S.; Huang, L. Electroporatic Delivery of TGF- β 1 Gene Works Synergistically with Electric Therapy to Enhance Diabetic Wound Healing in db/db Mice. *J. Invest. Dermatol.* **2004**, *123*, 791–798, doi:10.1111/j.0022-202X.2004.23309.x.
 123. Foulds, I.S.; Barker, A.T. Human skin battery potentials and their possible role in wound healing Available online: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/j.1365-2133.1983.tb07673.x> (accessed on Aug 19, 2019).
 124. Zhao, M.; Song, B.; Pu, J.; Wada, T.; Reid, B.; Tai, G.; Wang, F.; Guo, A.; Walczysko, P.; Gu, Y. Electrical signals control wound healing through phosphatidylinositol-3-OH kinase- γ and PTEN. *Nature* **2006**, *442*, 457.
 125. Naba, A.; Clauser, K.R.; Ding, H.; Whittaker, C.A.; Carr, S.A.; Hynes, R.O. The Extracellular Matrix: Tools and Insights for the “Omics” Era. *Matrix Biol. J. Int. Soc. Matrix Biol.* **2016**, *49*, 10–24, doi:10.1016/j.matbio.2015.06.003.
 126. Hinz, B.; Phan, S.H.; Thannickal, V.J.; Galli, A.; Bochaton-Piallat, M.-L.; Gabbiani, G. The myofibroblast: one function, multiple origins. *Am. J. Pathol.* **2007**, *170*, 1807–1816, doi:10.2353/ajpath.2007.070112.
 127. Rkein, A.M.; Ozog, D.M. Photodynamic therapy. *Dermatol. Clin.* **2014**, *32*, 415–425.
 128. Demazeau, M.; Gibot, L.; Mingotaud, A.-F.; Vicendo, P.; Roux, C.; Lonetti, B. Rational design of block copolymer self-assemblies in photodynamic therapy. *Beilstein J. Nanotechnol.* **2020**, *11*, 180–212, doi:10.3762/bjnano.11.15.
 129. Grabnar, P.A.; Kristl, J. The manufacturing techniques of drug-loaded polymeric nanoparticles from preformed polymers. *J. Microencapsul.* **2011**, *28*, 323–335, doi:10.3109/02652048.2011.569763.
 130. Dionzou, M.; Morère, A.; Roux, C.; Lonetti, B.; Marty, J.-D.; Mingotaud, C.; Joseph, P.; Goudouneche, D.; Payré, B.; Léonetti, M. Comparison of methods for the fabrication and the characterization of polymer self-assemblies: what are the important parameters? *Soft Matter* **2016**, *12*, 2166–2176.
 131. Cabral, H.; Kataoka, K. Progress of drug-loaded polymeric micelles into clinical studies. *J. Controlled Release* **2014**, *190*, 465–476, doi:10.1016/j.jconrel.2014.06.042.
 132. Kataoka, K.; Harada, A.; Nagasaki, Y. Block copolymer micelles for drug delivery: design, characterization and biological significance. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2012**, *64*, 37–48.
 133. Varela-Moreira, A.; Shi, Y.; Fens, M.H.A.M.; Lammers, T.; Hennink, W.E.; Schiffelers, R.M. Clinical application of polymeric micelles for the treatment of cancer. *Mater. Chem. Front.* **2017**, *1*, 1485–1501, doi:10.1039/C6QM00289G.
 134. Mohammad-Hadi, L.; MacRobert, A.J.; Loizidou, M.; Yaghini, E. Photodynamic therapy in 3D cancer models and the utilisation of nanodelivery systems. *Nanoscale* **2018**, *10*, 1570–1581, doi:10.1039/C7NR07739D.
 135. Čunderlíková, B. Extracellular Matrix Containing in vitro Three-dimensional Tumor Models in Photodynamic Therapy-related Research. *Photochem. Photobiol.* **2018**, *94*, 398–403, doi:10.1111/php.12859.
 136. Niedre, M.; Patterson, M.S.; Wilson, B.C. Direct Near-infrared Luminescence Detection of Singlet Oxygen Generated by Photodynamic Therapy in Cells In Vitro and Tissues In Vivo. *Photochem. Photobiol.* **2002**, *75*, 382–391, doi:10.1562/0031-8655(2002)0750382DNILDO2.0.CO2.

137. Moan, J.; Berg, K. The photodegradation of porphyrins in cells can be used to estimate the lifetime of singlet oxygen. *Photochem. Photobiol.* **1991**, *53*, 549–553, doi:10.1111/j.1751-1097.1991.tb03669.x.
138. Gibot, L.; Lemelle, A.; Till, U.; Moukarzel, B.; Mingotaud, A.-F.; Pimienta, V.; Saint-Aguet, P.; Rols, M.-P.; Gaucher, M.; Violleau, F.; et al. Polymeric Micelles Encapsulating Photosensitizer: Structure/Photodynamic Therapy Efficiency Relation. *Biomacromolecules* **2014**, *15*, 1443–1455, doi:10.1021/bm5000407.
139. Till, U.; Gibot, L.; Mingotaud, C.; Vicendo, P.; Rols, M.-P.; Gaucher, M.; Violleau, F.; Mingotaud, A.-F. Self-assembled polymeric vectors mixtures: characterization of the polymorphism and existence of synergistic effects in photodynamic therapy. *Nanotechnology* **2016**, *27*, 315102, doi:10.1088/0957-4484/27/31/315102.
140. Till, U.; Gibot, L.; Vicendo, P.; Rols, M.-P.; Gaucher, M.; Violleau, F.; Mingotaud, A.-F. Crosslinked polymeric self-assemblies as an efficient strategy for photodynamic therapy on a 3D cell culture. *RSC Adv* **2016**, *6*, 69984–69998, doi:10.1039/C6RA09013C.
141. Till, U.; Gibot, L.; Mingotaud, A.-F.; Ehrhart, J.; Wasungu, L.; Mingotaud, C.; Souchard, J.-P.; Poinso, A.; Rols, M.-P.; Violleau, F.; et al. Drug Release by Direct Jump from Poly(ethylene-glycol-b-ε-caprolactone) Nano-Vector to Cell Membrane. *Mol. Basel Switz.* **2016**, *21*, 1643, doi:10.3390/molecules21121643.
142. Xodo, L.; Rapozzi, V.; Zacchigna, M.; Drioli, S.; Zorzet, S. The chlorophyll catabolite pheophorbide a as a photosensitizer for the photodynamic therapy. *Curr. Med. Chem.* **2012**, *19*, 799–807.
143. Figarol, A.; Gibot, L.; Golzio, M.; Lonetti, B.; Mingotaud, A.-F.; Rols, M.-P. A journey from the endothelium to the tumor tissue: distinct behavior between PEO-PCL micelles and polymersomes nanocarriers. *Drug Deliv.* **2018**, *25*, 1766–1778, doi:10.1080/10717544.2018.1510064.
144. Zhao, M.; Zhao, D.; Ma, Y.; Hu, Z.; Wei, Z. Quantitative Proteomic Analysis of Cell Responses to Electroporation, a Classical Gene Delivery Approach. *PROTEOMICS* **2018**, *18*, 1800127, doi:10.1002/pmic.201800127.
145. Kabanov, A.V. Polymer Genomics: An Insight into Pharmacology and Toxicology of Nanomedicines. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2006**, *58*, 1597–1621, doi:10.1016/j.addr.2006.09.019.
146. Nishiyama, N.; Koizumi, F.; Okazaki, S.; Matsumura, Y.; Nishio, K.; Kataoka, K. Differential Gene Expression Profile between PC-14 Cells Treated with Free Cisplatin and Cisplatin-Incorporated Polymeric Micelles. *Bioconjug. Chem.* **2003**, *14*, 449–457, doi:10.1021/bc025555t.
147. Minko, T.; Kopečková, P.; Kopeček, J. Preliminary evaluation of caspases-dependent apoptosis signaling pathways of free and HPMA copolymer-bound doxorubicin in human ovarian carcinoma cells. *J. Controlled Release* **2001**, *71*, 227–237, doi:10.1016/S0168-3659(01)00220-6.
148. Batrakova, E.V.; Kelly, D.L.; Li, S.; Li, Y.; Yang, Z.; Xiao, L.; Alakhova, D.Y.; Sherman, S.; Alakhov, V.Yu.; Kabanov, A.V. Alteration of Genomic Responses to Doxorubicin and Prevention of MDR in Breast Cancer Cells by a Polymer Excipient: Pluronic P85. *Mol. Pharm.* **2006**, *3*, 113–123, doi:10.1021/mp050050g.
149. Kabanov, A.V.; Batrakova, E.V.; Alakhov, V.Y. Pluronic® block copolymers for overcoming drug resistance in cancer. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2002**, *54*, 759–779.
150. Rapoport, N.; Marin, A.P.; Timoshin, A.A. Effect of a polymeric surfactant on electron transport in HL-60 cells. *Arch. Biochem. Biophys.* **2000**, *384*, 100–108.
151. Sun, H.; Meng, Q.; Tang, S.; Su, J.; Yin, Q.; Chen, L.; Gu, W.; Yu, H.; Zhang, Z.; Wang, S.; et al. Inhibition of Breast Cancer Metastasis by Pluronic Copolymers with Moderate Hydrophilic–Lipophilic Balance. *Mol. Pharm.* **2015**, *12*, 3323–3331, doi:10.1021/acs.molpharmaceut.5b00319.
152. Gibot, L.; Demazeau, M.; Pimienta, V.; Mingotaud, A.-F.; Vicendo, P.; Collin, F.; Martins-Froment, N.; Dejean, S.; Nottelet, B.; Roux, C.; et al. Role of Polymer Micelles in the Delivery of Photodynamic Therapy Agent to Liposomes and Cells. *Cancers* **2020**, *12*, 384, doi:10.3390/cancers12020384.
153. Choi, I.-K.; Strauss, R.; Richter, M.; Yun, C.-O.; Lieber, A. Strategies to Increase Drug Penetration in Solid Tumors. *Front. Oncol.* **2013**, *3*, doi:10.3389/fonc.2013.00193.

154. Ojha, T.; Pathak, V.; Shi, Y.; Hennink, W.E.; Moonen, C.T.W.; Storm, G.; Kiessling, F.; Lammers, T. Pharmacological and physical vessel modulation strategies to improve EPR-mediated drug targeting to tumors. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2017**, *119*, 44–60, doi:10.1016/j.addr.2017.07.007.
155. Ramirez, L.H.; Orłowski, S.; An, D.; Bindoula, G.; Dzodic, R.; Ardouin, P.; Bognel, C.; Belehradec, J.; Munck, J.N.; Mir, L.M. Electrochemotherapy on liver tumours in rabbits. *Br. J. Cancer* **1998**, *77*, 2104–2111.
156. Serša, G.; Beravs, K.; Čemazar, M.; Miklavčič, D.; Demsar, F. Contrast enhanced MRI assessment of tumor blood volume after application of electric pulses. *Electro- Magnetobiology* **1998**, *17*, 299–306.
157. Parkins, C.S.; Chaplin, D.J. Tumour blood flow changes induced by application of electric pulses. *Eur. J. Cancer* **1999**, *35*, 672–677.
158. Gehl, J.; Skovsgaard, T.; Mir, L.M. Vascular reactions to in vivo electroporation: characterization and consequences for drug and gene delivery. *Biochim. Biophys. Acta BBA-Gen. Subj.* **2002**, *1569*, 51–58.
159. Sersa, G.; Jarm, T.; Kotnik, T.; Coer, A.; Podkrajsek, M.; Sentjerc, M.; Miklavcic, D.; Kadivec, M.; Kranjc, S.; Secerov, A.; et al. Vascular disrupting action of electroporation and electrochemotherapy with bleomycin in murine sarcoma. *Br. J. Cancer* **2008**, *98*, 388–398, doi:10.1038/sj.bjc.6604168.
160. Gehl, J.; Geertsen, P.F. Efficient palliation of haemorrhaging malignant melanoma skin metastases by electrochemotherapy. *Melanoma Res.* **2000**, *10*, 585–589.
161. Markelc, B.; Bellard, E.; Sersa, G.; Pelofy, S.; Teissie, J.; Coer, A.; Golzio, M.; Cemazar, M. In vivo molecular imaging and histological analysis of changes induced by electric pulses used for plasmid DNA electrotransfer to the skin: a study in a dorsal window chamber in mice. *J. Membr. Biol.* **2012**, *245*, 545–554, doi:10.1007/s00232-012-9435-5.
162. Sersa, G.; Krzic, M.; Sentjerc, M.; Ivanusa, T.; Beravs, K.; Kotnik, V.; Coer, A.; Swartz, H.M.; Cemazar, M. Reduced blood flow and oxygenation in SA-1 tumours after electrochemotherapy with cisplatin. *Br. J. Cancer* **2002**, *87*, 1047–1054.
163. Sersa, C.; Cemazar, M.; Miklavcic, D.; Chaplin, D.J. Tumor blood flow modifying effect of electrochemotherapy with bleomycin. *Anticancer Res.* **1999**, *19*, 4017–4022.
164. Kanthou, C.; Kranjc, S.; Sersa, G.; Tozer, G.; Zupanic, A.; Cemazar, M. The endothelial cytoskeleton as a target of electroporation-based therapies. *Mol. Cancer Ther.* **2006**, *5*, 3145–3152.
165. Meulenber, C.J.W.; Todorovic, V.; Cemazar, M. Differential cellular effects of electroporation and electrochemotherapy in monolayers of human microvascular endothelial cells. *PLoS One* **2012**, *7*, e52713, doi:10.1371/journal.pone.0052713.
166. Markelc, B.; Bellard, E.; Sersa, G.; Jesenko, T.; Pelofy, S.; Teissie, J.; Frangez, R.; Rols, M.-P.; Cemazar, M.; Golzio, M. Increased permeability of blood vessels after reversible electroporation is facilitated by alterations in endothelial cell-to-cell junctions. *J. Control. Release Off. J. Control. Release Soc.* **2018**, *276*, 30–41, doi:10.1016/j.jconrel.2018.02.032.
167. Kodama, H.; Shamay, Y.; Kimura, Y.; Shah, J.; Solomon, S.B.; Heller, D.; Srimathveeravalli, G. Electroporation-induced changes in tumor vasculature and microenvironment can promote the delivery and increase the efficacy of sorafenib nanoparticles. *Bioelectrochemistry Amst. Neth.* **2019**, *130*, 107328, doi:10.1016/j.bioelechem.2019.107328.
168. Fingar, V.H. Vascular effects of photodynamic therapy. *J. Clin. Laser Med. Surg.* **1996**, *14*, 323–328.
169. Krammer, B. Vascular effects of photodynamic therapy. *Anticancer Res.* **2001**, *21*, 4271–4277.
170. Malik, Z.; Faraggi, A.; Savion, N. Ultrastructural damage in photosensitized endothelial cells: Dependence on hematoporphyrin delivery pathways. *J. Photochem. Photobiol. B* **1992**, *14*, 359–368, doi:10.1016/1011-1344(92)85114-A.
171. Leunig, A.; Staub, F.; Plesnila, N.; Peters, J.; Feyh, J.; Goetz, A. Effect of photodynamic treatment of human endothelial cells on cell volume and cell viability. *Int. J. Oncol.* **1996**, *8*, 1217–1221, doi:10.3892/ijo.8.6.1217.

172. Sporn, L.A.; Foster, T.H. Photofrin and Light Induces Microtubule Depolymerization in Cultured Human Endothelial Cells. *Cancer Res.* **1992**, *52*, 3443–3448.
173. Jain, R.K. Normalizing Tumor Microenvironment to Treat Cancer: Bench to Bedside to Biomarkers. *J. Clin. Oncol.* **2013**, *31*, 2205–2218, doi:10.1200/JCO.2012.46.3653.
174. Brown, E.; McKee, T.; diTomaso, E.; Pluen, A.; Seed, B.; Boucher, Y.; Jain, R.K. Dynamic imaging of collagen and its modulation in tumors in vivo using second-harmonic generation. *Nat. Med.* **2003**, *9*, 796–800, doi:10.1038/nm879.
175. Chauhan, V.P.; Martin, J.D.; Liu, H.; Lacorre, D.A.; Jain, S.R.; Kozin, S.V.; Stylianopoulos, T.; Mousa, A.S.; Han, X.; Adstamongkonkul, P.; et al. Angiotensin inhibition enhances drug delivery and potentiates chemotherapy by decompressing tumour blood vessels. *Nat. Commun.* **2013**, *4*, 1–11, doi:10.1038/ncomms3516.
176. Barry-Hamilton, V.; Spangler, R.; Marshall, D.; McCauley, S.; Rodriguez, H.M.; Oyasu, M.; Mikels, A.; Vaysberg, M.; Ghermazien, H.; Wai, C. Allosteric inhibition of lysyl oxidase–like-2 impedes the development of a pathologic microenvironment. *Nat. Med.* **2010**, *16*, 1009.
177. Coussens, L.M.; Fingleton, B.; Matrisian, L.M. Matrix metalloproteinase inhibitors and cancer—trials and tribulations. *Science* **2002**, *295*, 2387–2392.
178. Mennuni, C.; Calvaruso, F.; Zampaglione, I.; Rizzuto, G.; Rinaudo, D.; Dammassa, E.; Ciliberto, G.; Fattori, E.; La Monica, N. Hyaluronidase increases electrogene transfer efficiency in skeletal muscle. *Hum. Gene Ther.* **2002**, *13*, 355–365.
179. Henshaw, J.; Mossop, B.; Yuan, F. Relaxin treatment of solid tumors: effects on electric field–mediated gene delivery. *Mol. Cancer Ther.* **2008**, *7*, 2566–2573.
180. Cemazar, M.; Golzio, M.; Sersa, G.; Escoffre, J.-M.; Coer, A.; Vidic, S.; Teissie, J. Hyaluronidase and collagenase increase the transfection efficiency of gene electrotransfer in various murine tumors. *Hum. Gene Ther.* **2012**, *23*, 128–137.
181. Diop-Frimpong, B.; Chauhan, V.P.; Krane, S.; Boucher, Y.; Jain, R.K. Losartan inhibits collagen I synthesis and improves the distribution and efficacy of nanotherapeutics in tumors. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2011**, *108*, 2909–2914.
182. Goodman, T.T.; Olive, P.L.; Pun, S.H. Increased nanoparticle penetration in collagenase-treated multicellular spheroids. *Int. J. Nanomedicine* **2007**, *2*, 265.
183. Kuhn, S.J.; Finch, S.K.; Hallahan, D.E.; Giorgio, T.D. Proteolytic surface functionalization enhances in vitro magnetic nanoparticle mobility through extracellular matrix. *Nano Lett.* **2006**, *6*, 306–312.
184. Yao, Q.; Kou, L.; Tu, Y.; Zhu, L. MMP-Responsive ‘Smart’ Drug Delivery and Tumor Targeting. *Trends Pharmacol. Sci.* **2018**, *39*, 766–781, doi:10.1016/j.tips.2018.06.003.
185. Zhu, W.-T.; Liu, S.-Y.; Wu, L.; Xu, H.-L.; Wang, J.; Ni, G.-X.; Zeng, Q.-B. Delivery of curcumin by directed self-assembled micelles enhances therapeutic treatment of non-small-cell lung cancer. *Int. J. Nanomedicine* **2017**, *12*, 2621–2634, doi:10.2147/IJN.S128921.
186. Guo, J.; Zeng, H.; Chen, Y. Emerging Nano Drug Delivery Systems Targeting Cancer-Associated Fibroblasts for Improved Antitumor Effect and Tumor Drug Penetration. *Mol. Pharm.* **2020**, *17*, 1028–1048, doi:10.1021/acs.molpharmaceut.0c00014.
187. Raavé, R.; van Kuppevelt, T.H.; Daamen, W.F. Chemotherapeutic drug delivery by tumoral extracellular matrix targeting. *J. Controlled Release* **2018**, *274*, 1–8, doi:10.1016/j.jconrel.2018.01.029.
188. Branda, S.S.; Vik, Å.; Friedman, L.; Kolter, R. Biofilms: the matrix revisited. *Trends Microbiol.* **2005**, *13*, 20–26, doi:10.1016/j.tim.2004.11.006.
189. Seviour, T.; Derlon, N.; Dueholm, M.S.; Flemming, H.-C.; Girbal-Neuhausser, E.; Horn, H.; Kjelleberg, S.; van Loosdrecht, M.C.M.; Lotti, T.; Malpei, M.F.; et al. Extracellular polymeric substances of biofilms: Suffering from an identity crisis. *Water Res.* **2019**, *151*, 1–7, doi:10.1016/j.watres.2018.11.020.
190. Koo, H.; Allan, R.N.; Howlin, R.P.; Hall-Stoodley, L.; Stoodley, P. Targeting microbial biofilms: current and prospective therapeutic strategies. *Nat. Rev. Microbiol.* **2017**, *15*, 740–755, doi:10.1038/nrmicro.2017.99.

191. Fitzpatrick, L.E.; McDevitt, T.C. Cell-derived matrices for tissue engineering and regenerative medicine applications. *Biomater. Sci.* **2014**, *3*, 12–24, doi:10.1039/C4BM00246F.
192. Čunderlíková, B.; Filová, B.; Kajo, K.; Vallová, M.; Balázsiová, Z.; Trnka, M.; Mateášik, A. Extracellular matrix affects different aspects of cell behaviour potentially involved in response to aminolevulinic acid-based photoinactivation. *J. Photochem. Photobiol. B* **2018**, *189*, 283–291, doi:10.1016/j.jphotobiol.2018.08.017.
193. Dunnill, C.; Patton, T.; Brennan, J.; Barrett, J.; Dryden, M.; Cooke, J.; Leaper, D.; Georgopoulos, N.T. Reactive oxygen species (ROS) and wound healing: the functional role of ROS and emerging ROS-modulating technologies for augmentation of the healing process. *Int. Wound J.* **2017**, *14*, 89–96, doi:10.1111/iwj.12557.
194. Shanmugapriya, K.; Kang, H.W. Engineering pharmaceutical nanocarriers for photodynamic therapy on wound healing: Review. *Mater. Sci. Eng. C* **2019**, *105*, 110110, doi:10.1016/j.msec.2019.110110.
195. Dubbelman, T.M.A.R.; Van Steveninck, J. Photodynamic effects of hematoporphyrin-derivative on transmembrane transport systems of murine L929 fibroblasts. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Biomembr.* **1984**, *771*, 201–207, doi:10.1016/0005-2736(84)90534-0.
196. Malik, Z.; Babushkin, T.; Sher, S.; Hanania, J.; Ladan, H.; Nitzan, Y.; Salzberg, S. Collapse of K⁺ and ionic balance during photodynamic inactivation of leukemic cells, erythrocytes and *Staphylococcus aureus*. *Int. J. Biochem.* **1993**, *25*, 1399–1406.
197. Hu, S.-L.; Du, P.; Hu, R.; Li, F.; Feng, H. Imbalance of Ca²⁺ and K⁺ fluxes in C6 glioma cells after PDT measured with scanning ion-selective electrode technique. *Lasers Med. Sci.* **2014**, *29*, 1261–1267, doi:10.1007/s10103-014-1518-3.
198. Sezgin, E.; Kaiser, H.-J.; Baumgart, T.; Schwille, P.; Simons, K.; Levental, I. Elucidating membrane structure and protein behavior using giant plasma membrane vesicles. *Nat. Protoc.* **2012**, *7*, 1042–1051, doi:10.1038/nprot.2012.059.
199. Scott, R.E. Plasma membrane vesiculation: a new technique for isolation of plasma membranes. *Science* **1976**, *194*, 743–745, doi:10.1126/science.982044.
200. Stein, H.; Spindler, S.; Bonakdar, N.; Wang, C.; Sandoghdar, V. Production of Isolated Giant Unilamellar Vesicles under High Salt Concentrations. *Front. Physiol.* **2017**, *8*, doi:10.3389/fphys.2017.00063.
201. Frangville, C.; Li, Y.; Billotey, C.; Talham, D.R.; Taleb, J.; Roux, P.; Marty, J.-D.; Mingotaud, C. Assembly of double-hydrophilic block copolymers triggered by gadolinium ions: new colloidal MRI contrast agents. *Nano Lett.* **2016**, *16*, 4069–4073.
202. Li, M.; Liu, X.; Tan, L.; Cui, Z.; Yang, X.; Li, Z.; Zheng, Y.; Yeung, K.W.K.; Chu, P.K.; Wu, S. Noninvasive rapid bacteria-killing and acceleration of wound healing through photothermal/photodynamic/copper ion synergistic action of a hybrid hydrogel. *Biomater. Sci.* **2018**, *6*, 2110–2121.
203. Philips, N.; Samuel, P.; Parakandi, H.; Gopal, S.; Siomyk, H.; Ministro, A.; Thompson, T.; Borkow, G. Beneficial Regulation of Fibrillar Collagens, Heat Shock Protein-47, Elastin Fiber Components, Transforming Growth Factor- β 1, Vascular Endothelial Growth Factor and Oxidative Stress Effects by Copper in Dermal Fibroblasts. *Connect. Tissue Res.* **2012**, *53*, 373–378, doi:10.3109/03008207.2012.665970.
204. McAuslan, B.R.; Reilly, W. Endothelial cell phagocytosis in response to specific metal ions. *Exp. Cell Res.* **1980**, *130*, 147–157.
205. Kornblatt, A.P.; Nicoletti, V.G.; Travaglia, A. The neglected role of copper ions in wound healing. *J. Inorg. Biochem.* **2016**, *161*, 1–8, doi:10.1016/j.jinorgbio.2016.02.012.
206. Tenaud, I.; Leroy, S.; Chebassier, N.; Dreno, B. Zinc, copper and manganese enhanced keratinocyte migration through a functional modulation of keratinocyte integrins. *Exp. Dermatol.* **2000**, *9*, 407–416, doi:10.1034/j.1600-0625.2000.009006407.x.
207. Dinh, T.; Braunagel, S.; Rosenblum, B.I. Growth factors in wound healing: the present and the future? *Clin. Podiatr. Med. Surg.* **2015**, *32*, 109–119.

208. Jones, E.M.; Cochrane, C.A.; Percival, S.L. The effect of pH on the extracellular matrix and biofilms. *Adv. Wound Care* **2015**, *4*, 431–439.
209. Power, G.; Moore, Z.; O'Connor, T. Measurement of pH, exudate composition and temperature in wound healing: a systematic review. *J. Wound Care* **2017**, *26*, 381–397.
210. Branski, L.K.; Pereira, C.T.; Herndon, D.N.; Jeschke, M.G. Gene therapy in wound healing: present status and future directions. *Gene Ther.* **2007**, *14*, 1–10.
211. Calder, P.C. Omega-3 fatty acids and inflammatory processes: from molecules to man. *Biochem. Soc. Trans.* **2017**, *45*, 1105–1115, doi:10.1042/BST20160474.
212. Silva, J.R.; Burger, B.; Kühl, C.; Candreva, T.; dos Anjos, M.B.; Rodrigues, H.G. Wound healing and omega-6 fatty acids: From inflammation to repair. *Mediators Inflamm.* **2018**, *2018*.
213. Ribeiro Barros Cardoso, C.; Aparecida Souza, M.; Amália Vieira Ferro, E.; Favoreto JR, S.; Deolinda Oliveira Pena, J. Influence of topical administration of n-3 and n-6 essential and n-9 nonessential fatty acids on the healing of cutaneous wounds. *Wound Repair Regen.* **2004**, *12*, 235–243.
214. Frank, S.; Kämpfer, H.; Wetzler, C.; Pfeilschifter, J. Nitric oxide drives skin repair: novel functions of an established mediator. *Kidney Int.* **2002**, *61*, 882–888.
215. Demling, R.H.; Desanti, L. Effects of silver on wound management. *Wounds* **2001**, *13*, 4–15.
216. Franková, J.; Pivodová, V.; Vágnerová, H.; Juráňová, J.; Ulrichová, J. Effects of silver nanoparticles on primary cell cultures of fibroblasts and keratinocytes in a wound-healing model. *J. Appl. Biomater. Funct. Mater.* **2016**, *14*, 137–142.
217. González, A.G.; Mombo, S.; Leflaive, J.; Lamy, A.; Pokrovsky, O.S.; Rols, J.-L. Silver nanoparticles impact phototrophic biofilm communities to a considerably higher degree than ionic silver. *Environ. Sci. Pollut. Res.* **2015**, *22*, 8412–8424.
218. Kirsner, R.; Orsted, H.; Wright, J.B. The role of silver in wound healing part 3 matrix metalloproteinases in normal and impaired wound healing: a potential role of nanocrystalline silver. *Wounds* **2001**, *13*.
219. Mangoni, M.L.; McDermott, A.M.; Zasloff, M. Antimicrobial peptides and wound healing: biological and therapeutic considerations. *Exp. Dermatol.* **2016**, *25*, 167–173, doi:10.1111/exd.12929.
220. Vandamme, D.; Landuyt, B.; Luyten, W.; Schoofs, L. A comprehensive summary of LL-37, the factotum human cathelicidin peptide. *Cell. Immunol.* **2012**, *280*, 22–35, doi:10.1016/j.cellimm.2012.11.009.
221. Iacob, S.A.; Iacob, D.G. Antibacterial function of the human cathelicidin-18 peptide (LL-37) between theory and practice. *Protein Pept. Lett.* **2014**, *21*, 1247–1256.
222. Ramos, R.; Silva, J.P.; Rodrigues, A.C.; Costa, R.; Guardão, L.; Schmitt, F.; Soares, R.; Vilanova, M.; Domingues, L.; Gama, M. Wound healing activity of the human antimicrobial peptide LL37. *Peptides* **2011**, *32*, 1469–1476, doi:10.1016/j.peptides.2011.06.005.
223. Chereddy, K.K.; Her, C.-H.; Comune, M.; Moia, C.; Lopes, A.; Porporato, P.E.; Vanacker, J.; Lam, M.C.; Steinstraesser, L.; Sonveaux, P.; et al. PLGA nanoparticles loaded with host defense peptide LL37 promote wound healing. *J. Control. Release Off. J. Control. Release Soc.* **2014**, *194*, 138–147, doi:10.1016/j.jconrel.2014.08.016.
224. Steinstraesser, L.; Lam, M.C.; Jacobsen, F.; Porporato, P.E.; Chereddy, K.K.; Becerikli, M.; Stricker, I.; Hancock, R.E.; Lehnhardt, M.; Sonveaux, P. Skin electroporation of a plasmid encoding hCAP-18/LL-37 host defense peptide promotes wound healing. *Mol. Ther.* **2014**, *22*, 734–742.
225. Hancock, R.E.W.; Diamond, G. The role of cationic antimicrobial peptides in innate host defences. *Trends Microbiol.* **2000**, *8*, 402–410, doi:10.1016/S0966-842X(00)01823-0.