**Titre :** Développement d’un dispositif pour l’étude in vitro de l’électroporation de structures cellulaires 3D de type sphéroïdes

**Title:** Development of a microsystem for the in vitro study and electroporation of 3D cell aggregates called spheroids

**Mots clés :** microsystème – électroporation – sphéroïde – électrochimiothérapie – bio-impédance

**Key words:** microsystem – electroporation – spheroid – electrochemotherapy – bio-impedance

**Résumé**

Dans la recherche de nouveaux traitements contre le cancer, l'électrochimiothérapie (ECT) est apparue comme une alternative solide à la chimiothérapie classique, permettant de réduire les doses administrées et donc les effets indésirables. Cette méthode est basée sur le phénomène d'électroporation réversible (EPN), qui se produit lorsque des champs électriques pulsés de paramètres contrôlés sont appliqués à des cellules, entrainant une augmentation temporaire de leur perméabilité. L'intérêt grandissant pour ce type de traitement nécessite de développer des modèles tumoraux in vitro fiables. Les agrégats de cellules appelés sphéroïdes ont été identifiés comme pertinents pour étudier l'EPN, car ils reproduisent plus fidèlement la structure d'un micro-tissu, dans lequel les cellules interagissent entre elles, que les cellules cultivées en 2D. Les techniques les plus couramment utilisées pour l’EPN de sphéroïdes consistent d'abord à les fabriquer, avec des méthodes ne permettant pas toujours d’obtenir une taille régulière, puis à les introduire dans une cuvette d'EPN ou à les électroporer un à un avec des électrodes portatives. Cependant, ces techniques peuvent les endommager et conduire à une répartition inhomogène du champ. Notre approche, basée sur l’utilisation d’un microsystème, renfermant un hydrogel microstructuré où sont cultivés plusieurs centaines de sphéroïdes, vise à pallier ces inconvénients car, à notre connaissance, il n'existe pas de solution permettant la culture de sphéroïdes de taille, forme et emplacement contrôlés, leur suivi et leur EPN au sein d'un dispositif unique.

Après avoir caractérisé le microsystème du point de vue électrique et fluidique, une preuve de concept de son utilisation en tant que plateforme de test de traitement ECT a été réalisée, en utilisant de la bléomycine. Les résultats, obtenus par marquage fluorescent révélé par microscopie, sont cohérents avec la littérature car ils montrent une efficacité sur la mortalité des cellules en seulement quelques jours induite uniquement lorsqu'elle est associée à l’EPN.

Dans un deuxième temps, les travaux ont porté sur la complexification de l’environnement tumoral (TME) des sphéroïdes avec l’ajout de fibroblastes, dans le cadre du projet Inter-Carnot Impulse, axé sur l'amélioration du traitement du cancer du pancréas par des méthodes physiques. En effet, ce TME a une grande importance in vivo sur la résistance au traitement, surtout dans le cas du pancréas. Deux anticancéreux ont été comparés, la bléomycine et la gemcitabine, classiquement utilisée en chimiothérapie. Les résultats montrent que l’effet de cette dernière est augmenté lorsqu’elle est combinée à l’EPN, même si elle est aussi faiblement efficace en l’absence d’EPN. De plus, des résultats préliminaires semblent montrer un effet plus important du traitement sur les sphéroïdes sans fibroblastes, traduisant l’impact du TME, même si des développements sont nécessaires pour le rendre encore plus complexe.

En parallèle, l'adaptation du microsystème à la mesure d'impédance a été réalisée, ce qui permet un suivi des sphéroïdes sans observation, basé sur la caractérisation des leurs propriétés électriques. Cela devrait à terme permettre l’étude d'autres applications telles que l’électro-transfert de gènes, qui nécessite des électrodes faites de matériaux non transparents. Les résultats obtenus montrent la possibilité du suivi par bio-impédance de la croissance et de l’effet de molécules chimiques perméabilisant les cellules, comme première étape vers le suivi de l'effet de l’EPN, et ce dans un milieu de faible conductivité, afin d’améliorer la sensibilité de la mesure. Une perspective envisagée est la structuration des électrodes en réseaux de microélectrodes (MEA), afin de passer d'une mesure d'impédance globale à un suivi individuel plus précis.

**Abstract**

In the search for new cancer treatments, electrochemotherapy (ECT) has emerged as a solid alternative to conventional chemotherapy, reducing doses and hence side effects. This method is based on the phenomenon of reversible electroporation (EPN), which occurs when pulsed electric fields of controlled parameters are applied to cells, causing a temporary increase of their permeability. The growing interest in this type of treatment requires the development of reliable in vitro tumor models. Cell aggregates called spheroids have been identified as relevant, as they more closely mimic the structure of a micro-tissue, in which cells interact with each other, than cells grown in 2D. The most commonly used techniques to electroporate spheroids are first to fabricate them, using methods that do not always allow to obtain regular size, and then to introduce them into an EPN cuvette or electroporate them one by one with hand-held electrodes. However, these techniques can damage them and lead to inhomogeneous field distribution. Our approach, based on the use of a microsystem containing a microstructured hydrogel in which several hundred of spheroids are cultured, aims to overcome these drawbacks, since to our knowledge, there is no solution enabling culture of spheroids of controlled size, shape and location, their monitoring and their EPN in a single device.

After characterizing the microsystem from an electrical and fluidic point of view, a proof of concept for its use as an ECT treatment test platform was carried out, using bleomycin. The results, obtained by fluorescent labeling revealed by microscopy, are consistent with the literature, showing efficacy on cell mortality in just a few days only induced when combined with EPN.

In a second phase, research work was focused on the complexification of the tumor environment (TME) of spheroids with the addition of fibroblast cells, as part of the Inter-Carnot Impulse project aimed at improving the treatment of pancreatic cancer using physical methods. Indeed, this TME has a major impact in vivo on the resistance to cancer treatment, especially in the case of pancreatic cancer. Two anticancer drugs were compared: bleomycin and gemcitabine, a classic chemotherapy agent. The results show that the efficacy of the latter is increased when combined with EPN, although it is also weakly effective in the absence of EPN. Moreover, preliminary results seem to show a greater effect of the treatment on spheroids without fibroblasts, reflecting the reproduction of the impact of the TME, although further developments are still needed to make it even denser.

At the same time, the microsystem has been adapted for impedance measurement, enabling the monitoring of spheroids without observation, while characterizing their electrical properties. This should eventually enable the study of other applications such as electro-gene therapy, which requires the use of electrodes made of non-transparent materials. The results obtained show the possibility to monitor growth and the effect of chemical molecules permeabilizing cells with bio-impedance, as a first step towards monitoring the effect of EPN, using a low-conductivity medium, in order to improve measurement sensitivity. Future work will tackle the structuration of the electrodes with microelectrode arrays (MEA), in order to move from global impedance measurement to more precise individual monitoring.