

# Déstabilisations électriques des membranes biologiques

## Aspects théoriques, développements expérimentaux et perspectives pratiques

Justin Teissié

**Résumé** L'électropulsation est un outil de routine pour introduire dans des cellules toutes sortes de molécules et de macromolécules. Elle apparaît comme un outil clinique du futur, suite au travail de pionnier de L. Mir dans le domaine du cancer. Néanmoins, si l'outil semble validé, l'aspect sécurité pour le patient exige une maîtrise des processus, car les mécanismes moléculaires conduisant à la création de défauts déstructurant l'assemblage membranaire restent mal connus. Cet aspect représente un défi à la physico-chimie. Cet article fait un bilan des connaissances. Une analyse critique des hypothèses actuelles met en évidence les incohérences des modèles proposés, surtout s'ils sont intégrés dans le cadre du vivant et s'il est tenu compte des échelles de temps mises en jeu. Une meilleure connaissance des mécanismes responsables de la cohésion membranaire apparaît donc nécessaire.

**Mots-clés** **Électroperméabilisation, électroporation, membrane biologique.**

**Abstract** **Electrical destabilization of biological membranes: basic aspects, experimental approaches and potential applications**

Electropulsation is routinely used at the bench level to introduce into cells all kinds of molecules and macromolecules. As first reported by L. Mir almost fifteen years ago, this may be a significant tool in cancer therapy. Therefore, there is an urgent need to get a full control of associated processes for the safety of patients. There is a general agreement in the scientific community to recognize that very few is known on the molecular mechanisms triggering the structural and dynamic defects supporting the membrane permeabilization. This is indeed a challenge for physical chemistry. This short review paper summarizes the present state of the art. The limits and drawbacks of current hypothesis are highlighted by taking into account the time scales of the phenomena and the complexity of the cellular organization. The final conclusion is that more basic investigations of the factors responsible on the cohesion of biological membranes are needed.

**Keywords** **Electropermeabilization, electroporation, biological membrane.**

Il est connu depuis plus de quarante ans que la perméabilité de la membrane plasmique d'une cellule se trouve dramatiquement augmentée si la suspension cellulaire est soumise à une impulsion électrique d'une durée de quelques micro- à millisecondes. Un choix rigoureux des paramètres électriques permet de définir des conditions où la viabilité de la cellule sera conservée. L'électropulsation est donc par excellence une approche physico-chimique permettant le transfert vers le cytoplasme de molécules exogènes [1-3].

Depuis les années 80 (en particulier suite à la publication de transfert de plasmides par E. Neumann), cette méthode est un outil de paillasse pour les biologies cellulaire et moléculaire. Il faut cependant reconnaître que rien n'est clairement établi sur les mécanismes moléculaires mis en jeu [3]. Son utilisation *in vivo* pour un transfert ciblé de médicaments, d'oligonucléotides, d'anticorps ou de plasmides en fait un nouvel outil de biotechnologie clinique [4-8]. C'est également un outil puissant dans le domaine de l'agro-industrie et de l'environnement [9].

Le problème d'une sécurité préventive dans ces développements impose une connaissance des mécanismes physico-chimiques mis en jeu au niveau membranaire et des réponses cellulaires. La modélisation de la membrane

cellulaire par la bicouche lipidique a servi d'outils dans cette approche au cours des trente dernières années [3]. Il convient de garder à l'esprit l'aspect modèle de cet objet d'étude par rapport à la réalité biologique.

Les méthodes physico-chimiques de conductance et de mesures optiques donnent des mesures directes des processus associés à l'électroperméabilisation. Les cinétiques seront donc suivies de l'échelle de la microseconde à celle des jours. Cela permet une description des événements comme la succession de cinq étapes (*figure 1*) :

1- *Phase d'induction* : le champ électrique externe provoque une modulation rapide du potentiel transmembranaire. Lorsqu'une valeur critique de ce terme électrique est atteinte, des défauts structuraux apparaissent, et l'organisation membranaire est alors modifiée. De plus, une contrainte mécanique peut être présente sous certaines conditions de milieu.

2- *Phase d'expansion* : il y a amplification de ces défauts aussi longtemps que le champ électrique externe reste appliqué avec une intensité subcritique. Une contrainte électromécanique contribue à ce processus.

3- *Étape de stabilisation* : dès que l'intensité du champ devient inférieure à la valeur caractéristique induisant les

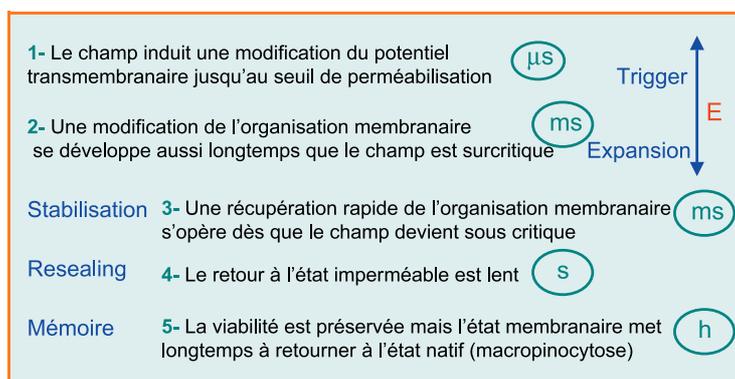


Figure 1 - Les étapes de l'électroperméabilisation.

Ce tableau illustre le déroulement temporel des différentes modifications de l'édifice membranaire lors et suite à l'impulsion électrique externe.

défauts structuraux, une réorganisation membranaire a lieu en quelques millisecondes. La membrane demeure perméable aux petites molécules polaires.

4- *Étape de réparation* (« resealing ») : l'organisation membranaire évolue alors éventuellement vers une étape classique de perméabilité sélective médiée par des transporteurs et des canaux.

5- *État mémoire* : un comportement membranaire non classique demeure présent pendant plusieurs heures bien que les comportements cellulaires soient alors classiques.

Nous allons présenter un état des lieux critique de nos connaissances sur chacune de ces étapes et comparer des données et des conclusions entre les modèles lipidiques passifs et la réalité biologique.

## Chauffage par effet Joule

Ce processus élémentaire ne doit pas être oublié : le passage d'un courant lors de la décharge électrique correspond à une dissipation d'énergie sous forme de chaleur. Il convient de contrôler la contribution de ce phénomène en travaillant dans un milieu peu conducteur, avec des impulsions de courtes durées et des délais inter-impulsions longs pour faciliter la dissipation thermique lors de l'application d'un train d'impulsions. L'effet thermique peut être dramatique (brûlures) ou plus subtil (évolution du milieu, dénaturation de protéines, transition de phases).

## Modulation de la différence de potentiel membranaire

En bioélectrochimie, le point clé de l'électropulsation cellulaire est cette conséquence du caractère diélectrique des membranes biologiques. Une cellule peut être assimilée à une sphère de diélectrique contenant un milieu conducteur (le cytoplasme, conductivité  $\lambda_i$ ) et en suspension dans un milieu conducteur (conductivité  $\lambda_o$ ) (l'approximation est grossière dans le cas de tissus). Une cellule (ou une vésicule lipidique) se comporte comme une capacité sphérique qui va accumuler des charges sous l'effet du champ électrique externe. Ce terme physicochimique se traduit par l'induction d'une différence de potentiel électrique  $\Delta\Psi_E$  qui, à l'état stationnaire, s'écrit sous la forme :

$$\Delta\Psi_E = 1,5g(\lambda)rE\cos\theta \quad (1)$$

où la forme de la cellule est une sphère ;  $g$ , une fonction complexe des diverses conductivités  $\lambda$  ;  $r$ , le rayon de la sphère ;  $E$ , l'intensité du champ électrique externe ; et  $\theta$ ,

l'angle entre la normale à la membrane et la direction du champ. Ce dernier paramètre exprime la propriété que l'effet du champ (un vecteur) dépend du point considéré à la surface cellulaire. Cela veut dire qu'une hémisphère va être hyperpolarisée alors que l'autre sera dépolarisée. Ces prédictions électrochimiques ont été validées par vidéomicroscopie [10-11]. De plus, la différence de potentiel de repos de la cellule vient contribuer à cette distribution électrique complexe.

Cet état stationnaire de la différence de potentiel transmembranaire n'est bien sûr atteint qu'après un temps de charge capacitif de l'ordre des microsecondes :

$$\Delta\Psi_E(t) = 1,5g(\lambda)rE\cos\theta(1 - \exp(-t/\tau)) \quad (2)$$

Ce temps de charge  $\tau$  est sous le contrôle des propriétés diélectriques de la membrane, d'une complexité plus élevée qu'une « simple » bicouche lipidique, et des conductivités du milieu externe et du cytoplasme [1]. Sous l'hypothèse que la conductivité membranaire est nulle, alors :

$$\tau = rC_{\text{memb}}(\lambda_i + 2\lambda_o)/(2\lambda\lambda_o) \quad (3)$$

La prédiction de valeurs de l'ordre de la microseconde est confirmée par la mesure directe par vidéofluorescence [10].

L'électropulsation est donc une approche pour obtenir des modulations contrôlées du potentiel transmembranaire à l'échelle des microsecondes. Cette modulation est sous le contrôle direct de l'intensité du champ externe mais se caractérise par une répartition hétérogène à la surface cellulaire. Les prédictions de l'équation (1) sont valables dans le cadre des hypothèses restrictives suivantes : la cellule est de forme sphérique, et la membrane est un diélectrique parfait.

En fait, la membrane dans une cellule est un diélectrique à fuite. Ceci se traduit dans l'expression détaillée de  $g(\lambda)$  [1] :

$$g(\lambda) = [\lambda_o\lambda_i(2d/r)]/[(2\lambda_o + \lambda_i)\lambda_m + (2d/r)(\lambda_o - \lambda_m)(\lambda_i - \lambda_m)] \quad (4)$$

où  $d$  est l'épaisseur membranaire (de l'ordre de 5 nm).

Sachant que dans l'équation (4),  $\lambda_o$  et  $\lambda_i$  sont toujours élevées en raison de la présence de sels,  $g(\lambda)$  est sous le contrôle de  $\lambda_m$ , donc des fuites membranaires.  $g(\lambda)$  est donc inférieur à 1 et les effets du champ externe plus faibles que prédit par l'équation (1).

Un autre effet de ces fuites est une modulation du temps de charge capacitif. Son expression complète est [1] :

$$\tau = rC_m(\lambda_i + 2\lambda_o)/(2\lambda_i\lambda_o + r\lambda_m(\lambda_i + 2\lambda_o)/d) \quad (5)$$

Il sera donc plus court en raison des fuites électriques comme cela a été observé [10].

Un dernier problème théorique est celui de la forme de la cellule dont le caractère sphérique n'est qu'approximatif. Des simulations sur des modèles de sphéroïdes montrent la complexité de la distribution du potentiel induit et du rôle joué par l'orientation relative entre l'axe principal et la direction du champ [12-13]. Un accord avec l'expérience a été apporté.

## Électrodéformation

Une sphère flexible va se déformer sous l'effet de la contrainte imposée par le champ électrique (figure 2) [14]. Toutes les descriptions théoriques supposaient que la membrane était un vrai diélectrique. Des raffinements théoriques ont été apportés. La présence d'une électroperméabilisation a été prise en compte mais sous

l'hypothèse qu'elle était répartie de manière homogène à la surface cellulaire, ce qui est peu en accord avec le fait expérimental [15]. Cela permet cependant de fixer les temps de déformation et d'analyser leur contribution aux stress. Les contraintes dérivent du facteur de contrainte de Maxwell. La conclusion immédiate est que la direction de déformation est sous le contrôle du rapport entre les conductivités  $\lambda_i$  et  $\lambda_o$ . Si  $\lambda_o/\lambda_i < 1$ , la forme prolata a son axe principal le long de la direction du champ externe. La dimension de l'objet devient plus longue dans la direction du champ et le rend plus sensible selon l'équation (1). Cependant, si ces hypothèses sont validées sur des modèles lipidiques, il n'est pas possible de les observer sur les cellules.

Les expériences utilisant des impulsions très intenses mais d'une durée de quelques nanosecondes proposent qu'une contrainte électromécanique soit déclenchée lors de la phase de montée du champ électrique. La contrainte est également sous le contrôle du rapport  $\lambda_o/\lambda_i$ . Elle sera la plus élevée dans un milieu externe de faible conductivité [16-17]. Elle est très furtive (échelle des ns) et présente avant la modulation du potentiel électrique. Elle n'apparaît pas directement impliquée dans l'électroperméabilisation classique mais peut induire des effets mémoires dans l'édifice membranaire. Sa contribution aux effets des impulsions nanosecondes fait partie des questions à poser.

Une autre déformation affecte les cellules, mais comme résultat de leur perméabilisation : le gonflement osmotique. La conséquence est une diminution de la rugosité de surface et une augmentation de la tension surfacique, une contrainte mécanique [18-19].

## Électroperméabilisation

### Déclenchement

Les expériences sur les films plans lipidiques (films « noirs », BLM : « black lipid membrane ») ont établi qu'ils subissaient une transition de conductance aux environs de 200 mV. Cela conduisait à leur rupture « diélectrique » lors de l'application d'un échelon de tension [20].

Les travaux sur des vésicules lipidiques montrent que l'électropulsation induit des fuites de leur contenu [21]. Cela correspond à des ions mais aussi à de plus grosses molécules tels du saccharose ou des marqueurs fluorescents [21-22]. Si l'impulsion électrique a lieu sur une vésicule soumise à une contrainte (aspiration dans une micropipette), celle-ci est plus sensible au terme électrique. La perméabilisation se déclenche alors pour des intensités de champ plus faibles [23]. Il y a synergie entre tension hydraulique et stress électrique. La conclusion générale



Figure 2 - Le processus d'électrodéformation.

Une cellule est un objet viscoélastique, dont la forme est sensible à la contrainte physique externe représentée par l'impulsion de champ électrique. La cellule sphérique prend une forme allongée sous la contrainte imposée par le champ E.

demeure que l'impulsion électrique conduit à la création d'un état perméable si elle induit un potentiel transmembranaire de « rupture » (environ 200 mV en l'absence d'autres contraintes).

La création de cet état perméable est à l'échelle de la fraction de microseconde comme le montrent les mesures de conductance ou de diffusion de la lumière [24]. Cela semble en accord avec les observations associées aux impulsions nanosecondes (où d'autres contraintes semblent cependant présentes). Nous sommes donc dans le cas de transition d'organisation rapide comme dans le cas des transitions de phase.

Une caractéristique physique de la vésicule joue un rôle critique : son rayon. Une forte courbure facilite l'électroperméabilisation. Cela semble dériver de la différence des contraintes d'entassement entre les deux faces de la bicouche.

L'électropulsation de cellules conduit à cet état membranaire à « fuite » si le champ appliqué permet l'induction d'un potentiel transmembranaire critique [25]. Nous noterons les similitudes de cet aspect déclenchement entre vésicules et cellules : caractère ultrarapide, sensibilité aux contraintes mécaniques.

Le travail sur les cellules permet un suivi du processus par observation directe sous microscope. La perméabilisation n'a lieu que sur la fraction de la surface cellulaire où le champ induit une différence de potentiel supérieure à un seuil de « rupture » ( $\Delta\Psi_{perm}$ , environ 200 mV). En conséquence, il n'y aura perméabilisation que si le champ est supérieur à une valeur critique ( $E_p$ ) caractéristique de la cellule :

$$\Delta\Psi_{perm} = 1,5g(\lambda)rE_p \quad (6)$$

L'électroperméabilisation n'affecte qu'une fraction de la surface  $A_{tot}$ ,  $A_{perm}$ , définie par :

$$A_{perm} = A_{tot}(1 - E/E_p) \quad (7)$$

pour une valeur du champ E. Cette prédiction est validée par des observations en vidéomicroscopie rapide [26-28]. Elles confirment de plus la contribution de la différence de potentiel de repos qui induit une asymétrie dans les zones de la surface cellulaire électroperméabilisée [29-31].

### Expansion

La transition vers l'état membranaire perméabilisé est brutale mais n'est pas un processus en tout ou rien. Une évolution progressive a lieu au cours de l'application de l'impulsion électrique comme observée par conductimétrie, diffusion de la lumière et imagerie numérique [24-28]. La zone membranaire au sein de la cellule qui est perméabilisée est définie par l'intensité du champ et n'évolue pas au cours de l'impulsion. La durée de l'impulsion contrôle donc la densité de défauts structuraux qui permettent le transfert des espèces chargées.

### Stabilisation

Dès que l'intensité du champ externe est inférieure à la valeur critique de perméabilisation ( $E_p$ ), une chute dramatique de la conductance de la partie perméabilisée de la membrane cellulaire est détectée [28]. Elle est associée à une chute du flux transmembranaire des molécules chargées, mais pas à sa disparition [27]. Nous aboutissons à un état « faiblement » électroperméabilisé par une transition rapide (échelle de la milliseconde). Cela signifie que lors de la

présence de l'impulsion électroperméabilisante, la membrane est localement dans une organisation structurellement contrainte par le terme électrique externe.

### Réparation (« resealing »)

Ce nouvel état perméabilisé va disparaître lentement. La membrane va retrouver ses propriétés natives de perméabilité sélective. Le processus apparaît comme obéissant à une cinétique du premier ordre avec un contrôle très fort par la température. [32-34]. Dans une population, lorsque les contraintes électriques ont été drastiques, la perméabilisation peut être irréversible pour une sous-fraction dont les cellules sont lysées<sup>(1)</sup>. Cette réparation n'est pas un mécanisme simple. Elle apparaît dépendre de la structure du cytosquelette [35] et des réserves énergétiques de la cellule [36].

Pendant cette phase de réparation, le flux d'échange de molécules à travers la membrane s'exprime en utilisant la loi de diffusion de Fick (l'hypothèse est qu'il n'y a pas de composante électrophorétique, ce qui est restrictif et sans doute une grossière approximation). Nous aboutissons donc pour le flux de la molécule S, à l'instant t après l'impulsion ( $t \gg T$ ) pour une cellule assimilée à une sphère de rayon r, à :

$$\Phi(S,t) = 4\pi r^2 P_S \Delta S(T) (1 - E_p/E) \exp(-k(T)t) \quad (8)$$

où  $\Phi(S,t)$  est le flux,  $P_S$ , le coefficient de perméabilité de S à travers la membrane perméabilisée, et  $\Delta S$ , la différence de concentration de S entre l'intérieur et l'extérieur de la cellule [32, 37]. D'autres équipes proposent une autre écriture pour la fraction de la membrane perméabilisée (dite « électroporée ») [38]. Il convient de retenir que si l'action directe du champ est très brève (micro- à milliseconde), les termes d'échange durent sur l'échelle des secondes et à ce titre, le processus de chargement a lieu majoritairement dans une condition où le champ externe n'est plus présent. Les défauts responsables du transfert sont donc le résultat des altérations membranaires induites, mais existent et évoluent sans contribution directe du champ.

La complexité du processus de réparation s'oppose à une description simpliste du processus comme lié à un réarrangement des phospholipides pour donner un minimum énergétique en accord avec la contribution enthalpique fournie par le champ (théorie du pore toroïdal) [39]. Des données récentes expérimentales et théoriques font apparaître que ce processus de réparation fait jouer un rôle à toute la machinerie et au trafic cellulaires et ne résulte pas d'un simple processus viscoélastique [40-42]. Cette dimension cellulaire est de plus illustrée par la réponse à l'agression électrique sous forme de la génération surfacique de formes activées de l'oxygène dans les zones membranaires électroperméabilisées [43].

### Mémoire

Si la réparation membranaire permet de protéger contre la lyse cellulaire, des effets vont apparaître sur le plus long terme au-delà de la récupération de la perméabilité sélective [44]. La distribution asymétrique des phospholipides entre les deux feuillettes de la membrane est fortement affectée lors de l'électroperméabilisation de globules rouges [45]. Des processus d'endocytose<sup>(2)</sup> et de macropinocytose<sup>(3)</sup> sont présents sur des cellules « réparées » plusieurs heures après le choc électrique, alors qu'ils ne sont pas associés à l'état natif des cellules [46-47]. Si dans ces observations, le métabolisme cellulaire peut être mis en cause, il convient

d'insister sur la détection de fluctuations d'organisation de la bicouche détectées par la technique de courant imposé sur des films BLM [48].

### Transfert de plasmides

Depuis maintenant vingt-cinq ans, l'électropulsation est l'une des techniques de référence pour l'électrotransfection, aussi bien *in vitro* qu'*in vivo*, avec des perspectives en clinique (thérapie génique par méthodes non virales).

Les mécanismes mis en jeu sont différents de ce qui peut être envisagé pour l'électroperméabilisation aux petites molécules. Il faut bien envisager que le défaut membranaire associé au transfert des deux classes de molécules n'est pas de la même nature vu la taille de la molécule à transférer. Cela est en accord avec les contraintes différentes pour les deux types de transfert. Un point clé est que le plasmide doit être présent pendant l'impulsion électrique pour que le transfert (l'expression) ait lieu alors que la diffusion transmembranaire de petites molécules se poursuit longtemps après la décharge. L'électrotransfert de plasmides nécessaire à leur expression est un mécanisme à multi-étapes et pas une simple diffusion libre au travers d'une membrane « déstabilisée » (figure 3). Ce modèle de mécanisme a été élaboré à partir des comportements sur des populations et validé directement par observation de cellules isolées [6, 49].

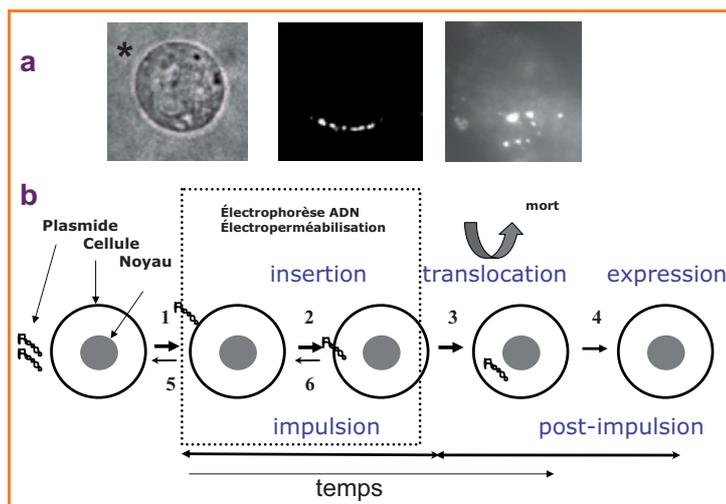


Figure 3 - Les étapes dans l'électrotransfert de plasmides.

a : photographies en microscopie de fluorescence de l'interaction d'un plasmide modifié par un marquage fluorescent (le cliché \* illustre la cellule observée en contraste de phase) ; b : dessins interprétatifs des observations directes, qui illustrent la complexité du mécanisme.

Pendant l'impulsion, il faut que la perméabilisation soit déclenchée (donc que le champ soit supérieur à un seuil  $E_p$ ). Le plasmide, un poly-électrolyte, migre électrophorétiquement pendant l'impulsion, ce qui le pousse au contact de la surface cellulaire. Un complexe membrane/ADN va alors se former pendant l'impulsion ou dans la fraction de seconde qui la suit. Cela se traduit par l'apparition d'agrégats d'ADN au niveau de la fraction de la membrane électroperméabilisée faisant face au flux électrophorétique d'ADN (donc une seule face de la cellule en condition unipolaire). Cet ADN complexé demeure accessible librement au milieu externe pendant environ une minute. La membrane subit alors sa phase de réparation. Une dissociation lente a lieu plusieurs minutes après l'impulsion et l'ADN diffuse (librement ?) dans

le cytoplasme pour atteindre le noyau. Il n'y a pas transfert direct sous l'effet du champ mais nécessité de formation locale de ces complexes ADN/membrane.

## Description en termes de mécanismes moléculaires

C'est le défi actuel car ce point demeure le plus souvent spéculatif. Les analyses initiales utilisaient le modèle de la rupture diélectrique assimilant la membrane à un solide homogène. Rapidement, il a été tenu compte de l'organisation plurimoléculaire de la bicouche lipidique pour aboutir au concept du pore toroïdal. Il y avait création d'un trou cylindrique rempli d'eau dans la bicouche. Son existence était validée énergétiquement par un équilibre entre tension de ligne du pore, tension membranaire et potentiel transmembranaire. Nous noterons qu'il supposait résulter de l'expansion de fluctuations thermiques de l'assemblage lipidique vers un pore dont les parois étaient les têtes polaires de phospholipides ayant basculé de 90°. Les contraintes résultantes dans le cœur hydrophobe des chaînes d'acides gras n'étaient pas prises en compte. Sous ces hypothèses, le travail de formation d'un tel pore de rayon  $r$  s'exprime comme [20] :

$$\Delta F = 2\pi r\gamma - \pi r^2\Gamma - \pi r^2 C_m (\epsilon_w/\epsilon_m - 1)\Delta\psi_m^2/2 \quad (9)$$

où  $\Delta F$  est l'énergie libre,  $\gamma$  la tension de ligne,  $\Gamma$  la tension membranaire,  $C_m$  la capacité spécifique de la bicouche,  $\epsilon_w$  et  $\epsilon_m$  les constantes diélectriques de l'eau et de la bicouche. Ce modèle considère la bicouche comme un assemblage rigide dont les propriétés n'évoluent pas lors de la contrainte électrique. Il apparaît donc loin du phénomène observé. De plus, il suppose un assemblage purement lipidique alors que les contributions protéiques ne peuvent être ignorées dans le cas cellulaire. Il suppose une dépendance quadratique vis-à-vis du potentiel transmembranaire induit, ce qui est en contradiction avec l'observation de défauts statistiquement homogènes dans une partie définie de la surface membranaire. Cette description purement énergétique ne traduit pas l'asymétrie des pores résultant sans doute du caractère vectoriel du champ électrique. Enfin, la taille de ces « pores » est de l'ordre d'un phospholipide, ce qui sème le doute sur les sens physiques des termes tension de ligne et tension membranaire.

La théorie du pore présentait l'avantage d'expliquer de manière directe le transfert transmembranaire (un trou assure la communication). La limite est que les molécules observées diffusant à travers la membrane étaient plus grosses que la limite stérique de « l'électropore ». La question ouverte est donc d'envisager d'autres mécanismes pour le transfert. Il convient de noter que des assemblages lipidiques permettent de tels transferts à leur température de transition. Cela résulterait de défauts d'assemblage et conduit à envisager que de tels processus pourraient être présents lors de l'électropéabilisation. Les simulations de dynamique moléculaire font en effet jouer un rôle critique à l'eau, qui serait « injectée » dans l'édifice membranaire par le champ externe agissant sur les dipôles de l'interface ou des molécules d'eau elles-mêmes. Cela conduit à une réorganisation de l'assemblage lipidique et des interactions protéines/lipide.

Il demeure crucial de comprendre les mécanismes mis en jeu. C'est un défi à la physico-chimie. Cependant, les progrès de la modélisation moléculaire, et en particulier de la simulation par blocs (« coarse grain »), devraient nous

proposer de nouvelles visions des perturbations induites au sein de l'assemblage dynamique multimoléculaire que représente une membrane biologique [50].

## Conclusion

Le processus d'électropéabilisation présente à la fois un potentiel d'applications très large en sciences du vivant et un niveau de compréhension théorique encore insuffisant. Le premier point est largement illustré par les contributions de mes collègues dans ce numéro. L'analyse des mécanismes mis en jeu demeure par contre un domaine à développer. Il repose sur une meilleure approche des paramètres structurants des édifices membranaires. Un point essentiel est qu'une membrane au sein d'une cellule n'est pas une simple bicouche lipidique, mais un assemblage protéolipidique dans un système thermodynamique ouvert. L'électropéabilisation devrait donc rester un domaine d'intérêt pour l'élaboration de nouveaux concepts dans la physico-chimie d'assemblages plurimoléculaires « complexes ».

## Remerciements

Ce travail a bénéficié du soutien de l'Association de recherche sur le cancer, de la Ligue contre le cancer de Midi-Pyrénées, de la Région Midi-Pyrénées, de l'Association française contre les myopathies, du PICS Slovénie CNRS et du projet européen Cliniporator. Il est le fruit de discussions avec mes collègues à l'IPBS CNRS.

## Notes et références

- [1] La lyse désigne la destruction de l'intégrité physique de la membrane plasmique de cellules eucaryotes ou bactéries par l'action d'un agent physique, chimique ou biologique, et menant à la mort de la cellule (source : Wikipédia).
- [2] L'endocytose (ou internalisation) a lieu quand une partie de la membrane plasmique entoure complètement une particule mineure, sans gros volume, et la fait pénétrer vers l'intérieur d'une cellule (source : Wikipédia).
- [3] La macropinocytose est un type d'endocytose non spécifique pour le transport de gouttelettes d'environ 1  $\mu\text{m}$  de diamètre (source : Wikipédia).
- [4] Neumann E., Sowers A.E., Jordan C.A., *Electroporation and Electrofusion in Cell Biology*, Plenum, 1989.
- [5] Chang D.C., Chassy B.M., Saunders J.A., Sowers A.E., *Guide to Electroporation and Electrofusion*, Academic Press, San Diego, 1992.
- [6] Zimmermann U., Electric field mediated fusion and related electrical phenomena, *Biochim. Biophys. Acta*, 1982, 694, p. 227.
- [7] Belehradek M., Domenge C., Luboinski B., Orłowski S., Belehradek J., Mir L.M., Electrochemotherapy, a new antitumor treatment; First clinical phase I-II trial, *Cancer*, 1993, 72, p. 3694.
- [8] Sixou S., Teissié J., Specific electroporation of leucocytes in a blood sample and application to large volumes of cells, *Biochim. Biophys. Acta*, 1990, 1028, p. 154.
- [9] Wolf H., Rols M.P., Neumann E., Teissié J., Control by pulse parameters of electric field mediated gene transfer in mammalian cells, *Biophys. J.*, 1994, 66, p. 524.
- [10] Zeira M., Tozi P.F., Moumeine Y., Lazarte J., Sneed L., Volsky D.J., Nicolau C., Full length CD4 electroinserted in the red blood cell membrane as a long-lived inhibitor of HIV infection, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1991, 88, p. 4409.
- [11] Gothelf A., Mir L.M., Gehl J., Electrochemotherapy: results of cancer treatment using enhanced delivery of bleomycin by electroporation, *Cancer Treat Rev.*, 2003, 29, p. 371.
- [12] Teissié J., Eynard N., Vernhes M.C., Benichou A., Ganeva V., Galutzov B., Cabanes P.A., Recent biotechnological developments of electroporation. A prospective review, *Bioelectrochemistry*, 2002, 55, p. 107.
- [13] Lojewska Z., Farkas D., Ehrenberg B., Loew L.M., Analysis of the effect and membrane conductance on the amplitude and kinetics of membrane potentials induced by externally applied electric fields, *Biophys. J.*, 1989, 56, p. 121.
- [14] Gross D., Loew L.M., Webb W.W., Optical imaging of cell membrane potential changes induced by applied electric fields, *Biophys. J.*, 1986, 51, p. 339.
- [15] Bernhard J., Pauly H., On the generation of potential difference across the membranes of ellipsoidal cells in an electric field, *Biophysik*, 1973, 10, p. 89.

- [13] Kotnik T., Miklavcic D., Analytical description of transmembrane voltage induced by electric fields on spheroidal cells, *Biophys. J.*, **2000**, *79*, p. 670.
- [14] Harbich W., Helfrich W., Alignment and opening of giant lecithin vesicles by electric fields, *Z. Naturforsch.*, **1979**, *34a*, p. 1063.
- [15] Hyuga H., Kinoshita K., Wakabayashi N., Deformation of vesicles under the influence of strong electric fields II, *Jap. J. Appl. Phys.*, **1991**, *30*, p. 1333.
- [16] Sukhorukov V.L., Mussauer H., Zimmermann U., The effect of electrical deformation forces on the electroporation of erythrocyte membranes in low- and high-conductivity media, *J. Membr. Biol.*, **1998**, *163*, p. 235.
- [17] Muller K.J., Sukhorukov V.L., Zimmermann U., Reversible electroporation of mammalian cells by high-intensity, ultra-short pulses of submicrosecond duration, *J. Membr. Biol.*, **2001**, *184*, p. 161.
- [18] Kinoshita Jr K., Tsong T.Y., Hemolysis of human erythrocytes by transient electric field, *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, **1977**, *74*, p. 1923.
- [19] Golzio M., Mora M.P., Raynaud C., Delteil C., Teissié J., Rols M.P., Control by osmotic pressure of voltage-induced permeabilization and gene transfer in mammalian cells, *Biophys. J.*, **1998**, *74*, p. 3015.
- [20] Abidor I.G., Arakelyan V.B., Chernomordik L.V., Chizmadzhev Y.U., Pastushenko V.F., Tarasevich M.R., Electric breakdown of bilayer lipid membranes. I: The main experimental facts and their qualitative discussion, *Bioelectrochem. Bioenerg.*, **1979**, *6*, p. 37.
- [21] Teissié J., Tsong T.Y., Electric field induced transient pores in phospholipid bilayer vesicles, *Biochemistry*, **1981**, *20*, p. 1548.
- [22] Raffy S., Teissié J., Insertion of glycophorin A, a transmembrane protein, in lipid bilayers can be mediated by electroporation, *Eur. J. Biochem.*, **1995**, *230*, p. 722.
- [23] Needham D., Hochmuth R.M., Electromechanical permeabilization of lipid vesicles, *Biophys. J.*, **1989**, *55*, p. 1001.
- [24] Asgharian N., Schelly Z.A., Electric field-induced transient birefringence and light scattering of synthetic liposomes, *Biochim. Biophys. Acta*, **1999**, *1418*, p. 295.
- [25] Kinoshita Jr K., Tsong T.Y., Voltage-induced conductance in human erythrocyte membranes, *Biochim. Biophys. Acta*, **1979**, *55*, p. 479.
- [26] Hibino M., Shigemori M., Itoh H., Nagayama K., Kinoshita Jr K., Membrane conductance of an electroporated cell analyzed by submicrosecond imaging of transmembrane potential, *Biophys. J.*, **1991**, *59*, p. 209.
- [27] Gabriel B., Teissié J., Time courses of mammalian cell electroporation observed by millisecond imaging of membrane property changes during the pulse, *Biophys. J.*, **1999**, *76*, p. 2158.
- [28] Hibino M., Itoh H., Kinoshita Jr K., Time courses of cell electroporation as revealed by submicrosecond imaging of transmembrane potential, *Biophys. J.*, **1993**, *64*, p. 1789.
- [29] Gabriel B., Teissié J., Direct observation in the millisecond time range of fluorescent molecule asymmetrical interaction with the electroporated cell membrane, *Biophys. J.*, **1997**, *73*, p. 2630.
- [30] Djuzenova C.S., Zimmermann U., Frank H., Sukhorukov V.L., Richter E., Fuhr G., Effect of medium conductivity and composition on the uptake of propidium iodide into electroporated myeloma cells, *Biochim. Biophys. Acta*, **1996**, *1284*, p. 143.
- [31] Tekle E., Astumian R.D., Chock P.B., Electro-permeabilization of cell membranes: effect of the resting membrane potential, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **1990**, *172*, p. 282.
- [32] Rols M.P., Teissié J., Electroporation of mammalian cells. Quantitative analysis of the phenomenon, *Biophys. J.*, **1990**, *58*, p. 1089.
- [33] Neumann E., Toensing K., Kakorin S., Budde P., Frey J., Mechanism of electroporative dye uptake by mouse B cells, *Biophys. J.*, **1998**, *74*, p. 98.
- [34] Puc M., Kotnik T., Mir L.M., Miklavcic D., Quantitative model of small molecules uptake after *in vitro* cell electroporation, *Bioelectrochemistry*, **2003**, *60*, p. 1.
- [35] Freeman S.A., Wang M.A., Weaver J.C., Theory of electroporation of planar bilayer membranes: predictions of the aqueous area, change in capacitance, and pore-pore separation, *Biophys. J.*, **1994**, *67*, p. 42.
- [36] Rols M.P., Teissié J., Experimental evidence for the involvement of the cytoskeleton in mammalian cell electroporation, *Biochim. Biophys. Acta*, **1992**, *1111*, p. 45.
- [37] Lopez A., Rols M.P., Teissié J., <sup>31</sup>P NMR analysis of membrane phospholipid organization in viable, reversibly electroporated Chinese hamster ovary cells, *Biochemistry*, **1988**, *27*, p. 1222.
- [38] Rols M.P., Delteil C., Golzio M., Teissié J., Control by ATP and ADP of voltage-induced mammalian-cell-membrane permeabilization, gene transfer and resulting expression, *Eur. J. Biochem.*, **1998**, *254*, p. 382.
- [39] Teissié J., Rols M.P., Manipulation of cell cytoskeleton affects the lifetime of cell membrane electroporation, *Ann. NY Acad. Sci.*, **1994**, *720*, p. 98.
- [40] Huynh C., Roth D., Ward D.M., Kaplan J., Andrews N.W., Defective lysosomal exocytosis and plasma membrane repair in Chediak-Higashi/beige cells, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **2004**, *101*, p. 16795.
- [41] Rosenheck K., Evaluation of the electrostatic field strength at the site of exocytosis in adrenal chromaffin cells, *Biophys. J.*, **1998**, *75*, p. 1237.
- [42] Ramos C., Bonato D., Winterhalter M., Stegmann T., Teissié J., Spontaneous lipid vesicle fusion with electroporated cells, *FEBS Lett.*, **2002**, *518*, p. 135.
- [43] Gabriel B., Teissié J., Spatial compartmentation and time resolution of photooxidation of a cell membrane probe in electroporated Chinese hamster ovary cells, *Eur. J. Biochem.*, **1995**, *228*, p. 710.
- [44] Gabriel B., Teissié J., Control by electrical parameters of short and long-term cell death associated to chinese hamster ovary cell electroporation, *Biochim. Biophys. Acta*, **1995**, *1266*, p. 171.
- [45] Dressler V., Schwister K., Haest C.W., Deuticke B., Dielectric breakdown of the erythrocyte membrane enhances transbilayer mobility of phospholipids, *Biochim. Biophys. Acta*, **1983**, *732*, p. 304.
- [46] Rols M.P., Femenia P., Teissié J., Long-lived macropinocytosis takes place in electroporated mammalian cells, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **1995**, *208*, p. 26.
- [47] Glogauer M., Lee W., McCulloch C.A., Induced endocytosis in human fibroblasts by electrical fields, *Exp. Cell Res.*, **1993**, *208*, p. 232.
- [48] Koronkiewicz S., Kalinowski S., Bryl K., Programmable chronopotentiometry as a tool for the study of electroporation and resealing of pores in bilayer lipid membranes, *Biochim. Biophys. Acta*, **2002**, *1561*, p. 222.
- [49] Golzio M., Teissié J., Rols M.P., Direct visualization at the single-cell level of electrically mediated gene delivery, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **2002**, *99*(3), p. 1292.
- [50] Tieleman D.P., Leontiadou H., Mark A.E., Marrink S.J., Simulation of pore formation in lipid bilayers by mechanical stress and electric fields, *J. Am. Chem. Soc.*, **2003**, *125*, p. 6382.

# IJ Cambria Scientific Ltd



Leaders in electrochemical instrumentation:

Potentiostats/bipotentiostats

Galvanostats

EQCM

Multichannel Potentiostats

SECM

ECDs

and a very large range of accessories

More info at:

[www.ijcambria.com](http://www.ijcambria.com)

Contact:

IJ Cambria Scientific Ltd, 11  
Gwscwm Road, Burry Port,  
Carms, SA16 OBS, UK

Phone: 01554 835050

Fax: 01554 835060



**Justin Teissié**

est directeur de recherche CNRS à l'Institut de pharmacologie et de biologie structurale (IPBS), Narbonne\*, où il dirige le département « Biologie structurale-Biophysique ».

\* IPBS, UMR 5089 CNRS UPS, 205 route de Narbonne, 31077 Toulouse.  
Courriel : [justin.teissie@ipbs.fr](mailto:justin.teissie@ipbs.fr)