



HAL
open science

**Nouveaux dispositifs pour l'application contrôlée
d'impulsions électriques nanosecondes et pour la
détection de leurs effets sur les cellules : Nouveaux
résultats et hypothèses sur les paramètres contrôlant
l'électroperméabilisation des cellules biologiques**

Aude Silve

► **To cite this version:**

Aude Silve. Nouveaux dispositifs pour l'application contrôlée d'impulsions électriques nanosecondes et pour la détection de leurs effets sur les cellules : Nouveaux résultats et hypothèses sur les paramètres contrôlant l'électroperméabilisation des cellules biologiques. Médecine humaine et pathologie. Université Paris Sud - Paris XI, 2011. Français. NNT : 2011PA114834 . tel-00684394

HAL Id: tel-00684394

<https://theses.hal.science/tel-00684394v1>

Submitted on 2 Apr 2012

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.

UNIVERSITE PARIS-SUD

ÉCOLE DOCTORALE :

INNOVATION THÉRAPEUTIQUE : DU FONDAMENTAL A L'APPLIQUÉ (ED 425)

PÔLE : PHARMACOTECHNIE ET PHYSICO-CHIMIE PHARMACEUTIQUE

Laboratoire : *UMR 8203 Vectorologie et thérapeutiques anticancéreuses*

DISCIPLINE : Pharmacotechnie et Biopharmacie

ANNÉE 2011 - 2012

SÉRIE DOCTORAT N° 1145

THÈSE DE DOCTORAT

Soutenue le 23/11/2011

Par

Aude SILVE

Nouveaux dispositifs pour l'application contrôlée d'impulsions électriques nanosecondes et pour la détection de leurs effets sur les cellules. Nouveaux résultats et hypothèses sur les paramètres contrôlant l'électroperméabilisation des cellules biologiques.

Directeur de thèse :

Lluis M. MIR

Directeur de Recherche CNRS (UMR 8203)

Composition du jury :

Président du jury :

Noël BURAI

Professeur (section 63, Université Lyon 1)

Rapporteurs :

Justin TEISSIE

Directeur de Recherche CNRS (UMR 5089)

Thomas P.VERNIER

Research Associate Professor (USC)

Examineurs :

Wolfgang FREY

Research Associate Professor (KIT)

Brigitte TRETOUT

Directeur de Recherche (ONERA)

René VEZINET

Ingénieur (CEA)

Sommaire

1	État de l'art	5
1.1	La membrane: un point commun	5
1.2	Introduction à l'électroperméabilisation classique	10
1.2.1	Historique	10
1.2.2	Les grands concepts	11
1.2.3	Les méthodes de détection	12
1.2.4	Les applications	14
1.3	Les mécanismes	15
1.3.1	L'initiation	15
1.3.2	Au delà du seuil	21
1.3.3	L'état perméabilisé	23
1.3.4	La réparation de la membrane	23
1.3.5	Les paramètres influents	24
1.3.6	Le(s) modèle(s) classique(s) d'électroporation	26
1.4	Les pulses 'courts' : les nanopulses	30
1.4.1	L'intérêt des nanopulses	30
1.4.2	Action sur la membrane cytoplasmique	31
1.4.3	Effets intracellulaires	36
1.4.4	Autres observations	37
1.4.5	Simulation en dynamique moléculaire	38
1.5	Conclusion	40
2	Métrieologie et Instrumentation	43
2.1	Généralités	44
2.1.1	Nature des signaux traités	44
2.1.2	Mise en œuvre	44
2.2	Développement d'une métrieologie adaptée	50
2.2.1	Les besoins	50
2.2.2	Capteur de Champ : D-dot	51
2.2.3	Capteur de courant : B-dot	55

2.3	Étude de la possibilité d'exposer des cellules en suspension.	59
2.3.1	Nature des charges d'un point de vue électrique	59
2.3.2	Limites intrinsèques des milieux	59
2.3.3	Mesure d'impédance réelle	61
2.3.4	Détermination d'un modèle électrique équivalent	63
2.3.5	Transposition en haute tension.	64
2.3.6	Pertinence d'un modèle localisé	66
2.3.7	Conséquences des défauts de connectique.	67
2.3.8	Qu'en est il de l'homogénéité du champ ?	69
2.4	Protocoles d'exposition	71
2.4.1	Variation de l'amplitude	71
2.4.2	Variation de la fréquence de répétition	72
2.4.3	Variation de la conductivité	74
2.4.4	Remarque sur le choix des cuvettes.	75
2.4.5	Fiabilité	77
2.5	Exposition de tissus biologiques homogènes.	77
2.6	Exposition <i>in vivo</i>	81
2.7	Conclusion	82
3	Experimentation sur tissus	85
3.1	Detection of permeabilisation of tissue by electrical measurements . .	85
3.1.1	Impedance of a biological tissue (bioimpedance)	85
3.1.2	Correlation between bioimpedance and current value during exposition	86
3.1.3	Quantification of permeabilisation using the drop of bioimpedance	89
3.2	Repetition rate impact	92
3.2.1	Repetition rate impact on permeabilisation of potato tissue induced by micropulses	92
3.2.2	Assessment by bioimpedance measurement	92
3.2.3	Repetition rate impact on permeabilisation of potato tissue induced by nanopulses	94
3.2.4	Repetition rate impact on permeabilisation of mouse liver caused by micropulses	99
3.3	Discussion	102
3.3.1	Impact of the repetition rate on permeabilisation by microsec- ond pulses	102
3.3.2	Dependence to the repetition rate on permeabilisation by nanosecond pulses	103
3.3.3	Hypothesis regarding the repetition rate dependency	104

4	Expérimentation sur cellules en suspension	107
4.1	Principe des expériences	108
4.2	Travail à conductivité fixe	109
4.2.1	Rôle de l'amplitude	109
4.2.2	Rôle du nombre d'impulsions	109
4.3	Travail à champ constant et conductivité variable	112
4.3.1	Rôle de la conductivité en perméabilisation classique	112
4.3.2	Résultats préliminaires liés aux impulsions microsecondes	114
4.3.3	Impulsion de 10 ns à champ constant et conductivité variable	117
4.4	Expériences discriminatoires	126
4.4.1	Nombre de charges constant	126
4.4.2	Même Δ PTM maximum	128
4.4.3	Expériences à champ constant avec impulsions de 100 ns	131
4.5	Remarque sur le rôle d'un rebond secondaire	134
4.6	Remarque sur l'effet de la température	135
4.7	Discussion des expériences <i>in vitro</i>	135
4.8	Transposition <i>in vivo</i>	139
4.8.1	Principe des expériences	139
4.8.2	De la nécessité de contrôler en permanence le champ	139
4.8.3	Quelques résultats	140
4.8.4	Bilan sur les expériences <i>in vivo</i>	143
5	Développement d'un microscope CARS	145
5.1	Principes optiques	146
5.1.1	Niveaux énergétiques	146
5.1.2	Diffusion Rayleigh et Raman spontanée	148
5.1.3	Diffusion Raman anti-Stokes Cohérente	150
5.1.4	Expressions théoriques des signaux	151
5.1.5	Géométries d'illumination.	153
5.1.6	Résonant et non-résonant.	154
5.2	Le CARS pour l'étude des effets des nanopulses sur le vivant	157
5.2.1	Intérêt potentiel	157
5.2.2	Les lipides	158
5.2.3	L'eau	160
5.2.4	Choix technologiques	162
5.3	Les configurations existantes	165
5.4	Configuration optique	167
5.4.1	Première configuration	167
5.4.2	Observation de billes de polystyrène	167
5.4.3	Limite de la configuration	169
5.5	Configuration finale	170

5.5.1	Description de la configuration	170
5.5.2	Validation sur billes de polystyrène	172
5.6	Imagerie CARS des cellules	179
5.6.1	Aspect des images	179
5.6.2	Vers une meilleure résolution spatiale	179
5.7	Effet des impulsions lasers sur les cellules	180
5.7.1	Intégrité des membranes	182
5.7.2	Stabilité du signal sur cellules vivantes	182
5.8	Aspects pratiques du montage	184
5.8.1	Dispositif d'exposition aux nanosecondes	184
5.8.2	Synchronisation temporelle	185
5.8.3	Bruit de la caméra	186
5.9	Résultats préliminaires en diffusion Rayleigh	187
5.10	Conclusions	189
6	Conclusion générale	191
7	Matériels et Méthodes	197
7.1	Culture cellulaire	197
7.1.1	Lignées cellulaires	197
7.1.2	Milieux d'exposition	197
7.2	Générateurs	198
7.2.1	Générateur d'impulsions microsecondes	198
7.2.2	Générateur d'impulsions nanosecondes	199
7.3	Évaluation du champ dans les cuvettes	202
7.4	Mesures d'impédance	202
7.5	Expériences sur pomme de terre.	203
7.5.1	Préparation des échantillons de pomme de terre	203
7.5.2	Coloration à l'Iodure de Propidium	204
7.6	Procédure chirurgicale pour les expériences sur foie de souris	204
7.7	Protocole d'efficacité de clonage	204
7.7.1	Bléomycine	204
7.7.2	Expériences sans bléomycine ou à 30 nM de bléomycine	205
7.7.3	Expériences à 3 μM de bléomycine	205
7.8	Plasmide pour transfert de gène	205
7.9	Expérience de perméabilisation <i>in vivo</i>	206
7.9.1	Animaux	206
7.9.2	Anesthésie	206
7.9.3	Modèles de tumeurs murines	206
7.9.4	Traitement par impulsions ultra-courtes	206
7.9.5	Suivi de croissance tumorale	207

A	Impact de l'usure des cuvettes sur le transfert de gène	225
A.1	Contrôle de l'usure des cuvettes par mesure d'impédance	225
A.2	Impact de l'usure sur l'électrotransfert	228
B	Influence du type de cuvette sur les résultats biologiques	229
C	Implementation of a broad band, high level electric field sensor in biological exposure device	233
D	Permeabilisation obtained by microsecond and nanosecond electric pulses : experimental proofs of the relevance of current density.	239

Avant-propos

Ce travail de thèse est consacré aux effets des impulsions électriques dites 'ultra-courtes' sur le vivant. Leur durée est de quelques nanosecondes, et le plus souvent dans ce mémoire, de 10 ns.

Le chapitre introductif est un horizon de la recherche sur les effets des impulsions électriques sur le vivant. Une large partie de ce chapitre est consacrée aux effets des impulsions dites microsecondes ou millisecondes, socle de base pour la recherche sur les effets des impulsions plus courtes. La suite expose la littérature plus récente sur les effets des impulsions de quelques nanosecondes à quelques dizaines de nanosecondes.

Le chapitre 2 est intitulé Métrologie et Instrumentation. Il présente les aspects liés à l'application des impulsions nanosecondes et haut niveau de champ sur le vivant. Après quelques rappels généraux sur la propagation des impulsions nanosecondes, ce chapitre se focalise sur les contraintes spécifiques apportées par les objets biologiques à exposer. Des solutions pour le contrôle et la mesure des impulsions délivrées sont proposées.

Le chapitre 3 présente la perméabilisation d'un tissu végétal (la pomme de terre) par des impulsions de 10 ns. Cette perméabilisation est détectée au moyen de mesures électriques, et notamment d'impédance. Le rôle de la fréquence de répétition y est en particulier exploré. Cette étude sur la fréquence de répétition est également menée avec des impulsions de 100 μ s sur le même modèle, et également en partie sur un tissu animal, le foie de souris. L'efficacité des basses fréquences de répétition apparaît comme une constante au travers de ces expériences. Ces résultats sont comparés aux travaux antérieurs, et les raisons possibles de l'efficacité des basses fréquences de répétition sont discutées.

Le chapitre 4 est également consacré à la perméabilisation obtenue par des impulsions de 10 ns ou 100 ns. Le modèle d'étude consiste en des cellules en suspension. Les expériences rapportées indiquent qu'une seule impulsion de 10 ns

suffit à perméabiliser la membrane cellulaire à une molécule de taille moyenne, la bléomycine. En outre, ce chapitre explore les conditions requises pour obtenir une perméabilisation efficace. Le rôle de la dynamique de la différence de potentiel transmembranaire induite par le champ est évoqué, et de nouvelles hypothèses relatives aux seuils de perméabilisation sont proposées.

Le chapitre 5 présente un travail en amont de développement d'un microscope CARS. Ce microscope est développé dans le but d'explorer les effets des impulsions nanosecondes au niveau moléculaire, et ce pendant les impulsions de 10 ns. Sa conception a donc été réalisée sous d'importantes contraintes liées au fenêtrage temporel. L'ensemble des choix technologiques, les raisons qui ont motivé ces choix, ainsi que les résultats expérimentaux validant le fonctionnement du microscope sont exposés.

Enfin, deux annexes sont consacrées aux difficultés expérimentales liées au choix des cuvettes d'électroporation et à leur usure.

Notations

Différents générateurs d'impulsions nanosecondes ont été utilisés au cours de ce travail. Chacun d'entre eux est décrit en détail dans la section "matériel et méthodes". Une lettre est attribuée à chaque générateur. Cette notation est utilisée dans tout le manuscrit dans un but de simplification.

Les grandeurs exprimées dans le domaine temporel seront écrites en minuscules, les grandeurs associées dans le domaine fréquentiel en majuscules. Par exemple, v_a dans le domaine temporel devient V_a dans le domaine fréquentiel.

Nous parlerons de '*un* Δ PTM' pour évoquer *une* différence de potentiel transmembranaire.

Chapitre 1

État de l'art

Les travaux réalisés dans cette thèse s'inscrivent dans le cadre de l'étude des interactions entre impulsions nanosecondes et cellules vivantes. Ils font suite à l'ensemble des études qui traitent des mécanismes d'action sur le vivant des champs électriques pulsés de quelques microsecondes ou millisecondes. Les méthodes d'études ainsi que les moyens expérimentaux mis en œuvre dans le cadre de l'étude des actions des nanopulses sont souvent semblables à ceux qui ont déjà été éprouvés pour comprendre l'action des impulsions plus longues. La continuité historique est incontestable. Elle est moins évidente lorsqu'il s'agit des mécanismes d'interactions.

En premier lieu, ce chapitre a pour but de rappeler brièvement les bases cellulaires nécessaires à l'appréhension du sujet. La suite est un exposé de l'essentiel des travaux sur les impulsions millisecondes et microsecondes. Enfin sont résumés les travaux traitant des effets des impulsions nanosecondes sur le vivant.

1.1 La membrane: un point commun

Il existe une grande variété de types cellulaires, différant par la taille, la forme et les fonctionnalités. Qu'elles soient eucaryotes ou procaryotes, animales ou végétales, qu'elles constituent des êtres unicellulaires ou qu'elles coopèrent de façon complexe dans un organisme multicellulaire, les cellules présentent une très grande unité biochimique. Les mêmes molécules, les mêmes réactions enzymatiques sont impliquées, l'information génétique est toujours stockée dans des molécules d'ADN selon un code quasi universel. L'intégrité d'une cellule est également dans tous les cas assurée par une membrane cytoplasmique. Certaines cellules voient leur membrane complétée par d'autres structures, qui peuvent être une paroi cellulaire rigide comme chez les levures ou les végétaux, ou une structure minérale comme dans les cellules osseuses. La membrane cytoplasmique se retrouve sans exception dans toutes les cellules connues, avec toujours les mêmes caractéristiques. On pourrait la résumer

à une bicouche de lipides assurant la séparation entre les milieux intracellulaire et extracellulaire. Cette description est un peu courte, et en variant le point de vue, on pourrait dire bien des choses en somme (adapté de Rostand (1959)).

Du point de vue fonctionnel : elle assure les échanges entre l'intérieur et l'extérieur

Le rôle premier de cette membrane complexe est simple : il consiste à délimiter l'entité cellule et à protéger ainsi son contenu. De nombreux récepteurs placés dans la membrane permettent la communication entre une cellule et son environnement. La membrane doit également assurer les échanges indispensables entre l'intérieur et l'extérieur : une cellule a besoin de nutriments pour se développer, se diviser, se mouvoir, et elle doit également évacuer les déchets de son métabolisme.

Certaines molécules peuvent traverser la membrane par simple diffusion si leurs propriétés biochimiques le leur permettent. La membrane présente en effet une perméabilité à certaine molécules. Parmi les molécules les plus couramment transportées par diffusion passive, on trouve l'eau, l'urée, l'oxygène et le dioxyde de carbone. Par ailleurs, un ensemble de canaux et de pompes protéiques placés dans la membrane assument certains échanges de façon extrêmement sélective. Enfin, le transport de plus grandes molécules est assuré par les mécanismes d'endocytose (invagination de la membrane qui permet un transport vers l'intérieur) et d'exocytose (fusion d'une vésicule avec la membrane cytoplasmique qui permet un transport vers l'extérieur). Ces mécanismes sont illustrés sur la figure 1.1.



FIG. 1.1 : Représentation schématique des processus d'endocytose et d'exocytose. Illustration réalisée grâce à Servier Medical Art, www.servier.fr.

Du point de vue chimique : c'est un assemblage dynamique complexe

La structure universelle des membranes biologiques est basée sur la bicouche lipidique. Chaque lipide est constitué d'une ou deux chaînes hydrogénéocarbonée(s)

hydrophobe(s) (queue) et d'une tête hydrophile. Une molécule qui possède ainsi un domaine hydrophobe et un domaine hydrophile est dite amphipathique. C'est cette propriété très particulière qui conduit à l'assemblage en bicouche (figure 1.2). Cette configuration est énergétiquement avantageuse puisqu'elle limite au maximum le contact entre les queues hydrophobes et les molécules d'eau. Les lipides les plus répandus dans les membranes cellulaires sont les phospholipides dans lesquels la tête hydrophile est reliée à la queue hydrophobe par un groupement phosphate. Parmi les phospholipides les plus répandus on trouve les phosphatidylcholines (figure 1.3).

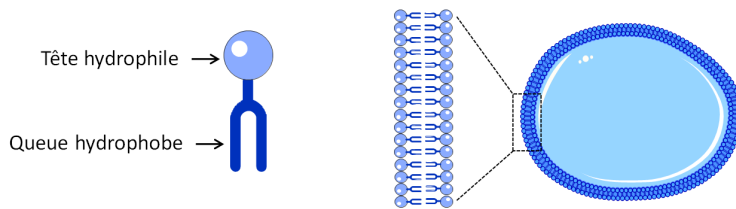


FIG. 1.2 : *Organisation en bicouche des phospholipides*

Les membranes des cellules présentent une grande asymétrie de composition entre les feuillets interne et externe. Dans les cellules eucaryotes, on trouve les phosphatidylcholines (PC) majoritairement sur le feuillet externe, alors que les phosphatidylsérines (PS) sont concentrées sur le feuillet interne. Cette distribution asymétrique caractérise une cellule saine. L'externalisation des PS constitue entre autres un signal précoce d'apoptose, c'est à dire d'un certain type de mort cellulaire (Leventis et Grinstein, 2010).

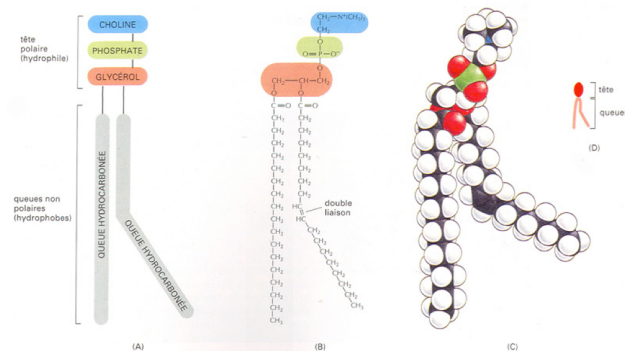


FIG. 1.3 : *A- Représentation schématique d'une phosphatidylcholine, B-Formule développée linéaire, C- Modèle moléculaire, D-Représentation symbolique. Extrait de Alberts et al. (2005)*

Les lipides ne sont pas répartis de façon homogène dans le plan de la membrane. Ils s'organisent en domaines dont l'origine et la complexité ne sont pas complètement élucidées. Les rafts, par exemple, sont des microdomaines caractérisés par des forts taux de lipides saturés et de cholestérol (Simons et Vaz, 2004).

Les lipides ne peuvent passer dans l'eau. En revanche, ils peuvent bouger librement dans le plan de la membrane. En conditions physiologiques, on estime la vitesse moyenne de diffusion des lipides à environ $2 \mu m/s$. La facilité avec laquelle les lipides se déplacent dans le plan de la membrane dépend de nombreux paramètres comme la température, la longueur des chaînes polycarbonées, leur degré de saturation ... La cellule peut d'ailleurs ajuster sa fluidité membranaire en modifiant ses lipides membranaires. C'est donc un système extrêmement dynamique.

De part et d'autre de la membrane, au niveau des têtes des phospholipides, l'eau n'est pas en phase liquide. On parle d'eau interfaciale. Elle est en moyenne orientée du fait de son interaction avec les têtes dipolaires des phospholipides. Sa mobilité est plus faible que celle de l'eau qui se trouve loin de la membrane (eau 'bulk'). Cette eau est constitutive de la membrane au même titre que les phospholipides.

La bicouche lipidique est la base des membranes cellulaires. Les protéines membranaires, qui représentent en moyenne 50% du poids sec des membranes, complexifient cette structure.

Du point de vue mécanique : des propriétés régulées et régulatantes

Les propriétés mécaniques globales des membranes lipidiques sont imposées par leur composition chimique. Réciproquement, les contraintes mécaniques peuvent induire des changements dans la répartition des lipides (Janmey et Kinnunen, 2006). Il a été suggéré par exemple qu'un changement de volume cellulaire pourrait suffire à induire l'externalisation des PS, uniquement à cause du changement du "lipid packing" (Elliott *et al.*, 2006).

A l'échelle d'une cellule, les propriétés mécaniques globales ne sont pas imposées uniquement par la membrane. Le cytosquelette, notamment, est un acteur fondamental de la rigidité d'une cellule.

Les contraintes mécaniques constituent des signaux pour la cellule. Elles interviennent dans l'adhésion cellulaire (Gimbrone *et al.*, 1997), le développement embryonnaire (Desprat *et al.*, 2008; Wozniak et Chen, 2009), le trafic membranaire (Apodaca, 2002; Rauch et Farge, 2000), l'oncogénèse (Whitehead *et al.*, 2008), et de manière générale dans la régulation de l'expression génique (Goldspink, 1999).

Du point de vue électrique : la membrane est un excellent isolant

Les membranes cytoplasmiques sont souvent décrites comme un diélectrique. Les valeurs données dans la littérature sont de l'ordre de $\varepsilon_m=4-5$ pour la permittivité relative, et de $\sigma_m = 10^{-5}$ S/m pour la conductivité. Ainsi, jusqu'à des fréquences de l'ordre de 300 MHz, la membrane d'une cellule se comporte comme une capacité (ordre de grandeur calculé d'après l'équation 1.1).

$$\omega = 2.\pi.f > \frac{\sigma_m}{\varepsilon_0.\varepsilon_m} \quad (1.1)$$

Cette propriété diélectrique de la membrane est également ce qui lui permet de tenir le fort champ qui existe en permanence dans la membrane. L'activité des pompes et canaux protéiques maintient en effet des concentrations ioniques différentes dans les milieux intra et extra cellulaire (tableau 1.1). Cette différence dans la répartition des ions est la source d'une différence de potentiel (Δ PTM) de part et d'autre de la membrane dit différence de potentiel transmembranaire de repos $\Delta\psi_0$. Sa valeur est comprise entre -20 mV et -100 mV selon le type cellulaire chez les cellules animales. Il peut atteindre jusqu'à -200 mV chez les cellules végétales (Fromm et Lautner, 2007). La valeur de la différence de potentiel transmembranaire au repos peut se mesurer grâce aux techniques de patch-clamp. Les cellules biologiques maintiennent donc en permanence un champ électrique de l'ordre de 20 MV/m sur leur membrane ...

TAB. 1.1 : Concentrations ioniques intracellulaire et extracellulaire. D'après Shechter (2004)

Ion	K^+	N_a^+	M_g^{2+}	C_a^{2+}	Cl^-	HCO_3^-
$C_{intracellulaire}$ (mM)	160	7-12	5	$10^{-4} - 10^{-5}$	4-7	8
$C_{extracellulaire}$ (mM)	4	144	1-2	2	120	26-28

En réalité, le champ électrique n'est pas uniforme dans la membrane. Le potentiel électrostatique ne décroît pas de façon uniforme (McLaughlin, 1989). En plus du potentiel transmembranaire $\Delta\psi_0$, on définit les potentiels dipolaire ψ_D et de surface ψ_S (figure 1.4).

Le potentiel de surface ψ_S est défini par la différence de potentiel entre les charges fixes à la surface de la membrane et le potentiel dans le milieu aqueux externe. Il est dû à la présence de charges fixes à la surface de la membrane. Dans le cas des cellules biologiques, les lipides chargés sont responsables de ce potentiel.

Le potentiel dipolaire ψ_D est défini par la différence de potentiel entre le centre de la membrane et l'interface eau/membrane. C'est la répartition des dipôles électrostatiques, notamment ceux de l'eau au niveau de l'interface, qui définit ce

potentiel.

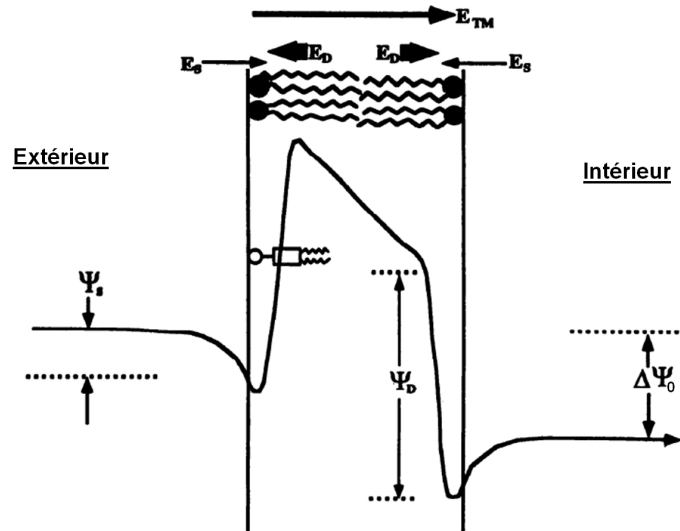


FIG. 1.4 : Représentation schématique du potentiel électrostatique au travers d'une membrane biologique. Les flèches au sommet du diagramme représentent les champs électriques associés aux différents potentiels $\Delta\psi_0$, ψ_D , ψ_S . Leur épaisseur représente la valeur relative du champ. Extrait de Gross et al. (1994)

Cette structure électrostatique participe directement à la cohésion de la membrane et à l'assemblage des protéines membranaires (Honig *et al.*, 1986; Murray *et al.*, 1997, 2002).

L'application d'un champ électrique externe peut modifier cette structure. Il apparaît cependant que c'est bien l'ensemble des propriétés d'une membrane qui peut être affecté par un stimulus électrique.

1.2 Introduction à l'électroperméabilisation classique

1.2.1 Historique

En 1958, le premier article décrivant le claquage réversible des membranes est publié (Stampfli, 1958). C'est le début des études portant sur les effets des 'impulsions électriques intenses' sur les cellules et les tissus biologiques. La notion vague de "intense" est très relative. Généralement, on peut considérer que les impulsions sont intenses dès lors qu'elles induisent dans les cellules des champs de valeur supérieure aux valeurs physiologiques. Il en résulte des effets non-linéaires, et notamment l'augmentation de la perméabilité de la membrane cytoplasmique décrite pour la

première fois en 1972 par Neumann *et al* (Neumann et Rosenheck, 1972). Le terme d'électroporation apparaît.

L'électroporation fut rapidement exploitée sur des cellules chromaffines pour l'extraction de différents composants intracellulaires comme les catecholamines, l'ATP et les protéines (Neumann et Rosenheck, 1972). Dix ans plus tard, alors que la manipulation génétique commence son essor, il est démontré que les impulsions électriques perméabilisantes permettent d'insérer de l'ADN nu dans des cellules (Neumann *et al.*, 1982; Wong et Neumann, 1982).

1.2.2 Les grands concepts

Sous l'effet d'une impulsion électrique, il est possible de rendre perméable la membrane extérieure d'une cellule. L'état perméable se définit par la diffusion (restreinte) des milieux intra et extra-cellulaires à travers la membrane. Il n'existe pas à ce jour de description précise de l'état perméabilisé. D'aucuns pensent que des pores hydrophobes sont créés dans la membrane. D'autres défendent l'hypothèse d'une augmentation de la perméabilité au sens physico-chimique. Les deux théories demeurent non départagées comme en témoigne la double appellation : **électroporation** et **électroperméabilisation**.

Les effets des impulsions électriques sont fonction de leur amplitude et de leur durée. La figure 1.5 donne un aperçu schématique des effets des impulsions électriques en fonction des paramètres durée de l'impulsion et amplitude du champ. Dans la zone de **perméabilisation réversible**, la membrane des cellules sous l'effet du champ devient perméable de façon transitoire et réversible. Lorsque l'amplitude du champ ou que la durée est augmentée, on atteint la zone de **perméabilisation irréversible**, dans laquelle les dommages induits dans la membrane sont trop importants et conduisent à la mort cellulaire. Au delà, l'élévation de température, conséquence de l'effet Joule, induit des effets dits thermiques. Les limites entre les différentes zones ne sont pas parfaitement tranchées et leur position varie en fonction par exemple du type cellulaire considéré. Par ailleurs, les effets du cumul des pulses ainsi que de la fréquence de répétition ne sont absolument pas représentés ici.

De nombreux modèles sont disponibles pour étudier l'électroporation. Les expériences peuvent être conduites sur des cellules attachées ou en suspension et sur tout type de cellules : animale, végétale, bactéries ou levures. Elles peuvent être conduites sur cellule unique ou sur des populations entières. Certaines peuvent être transposées *in vivo*. Enfin, des études plus fondamentales sur des vésicules ou des bicouches lipidiques permettent de compléter notre compréhension des mécanismes.

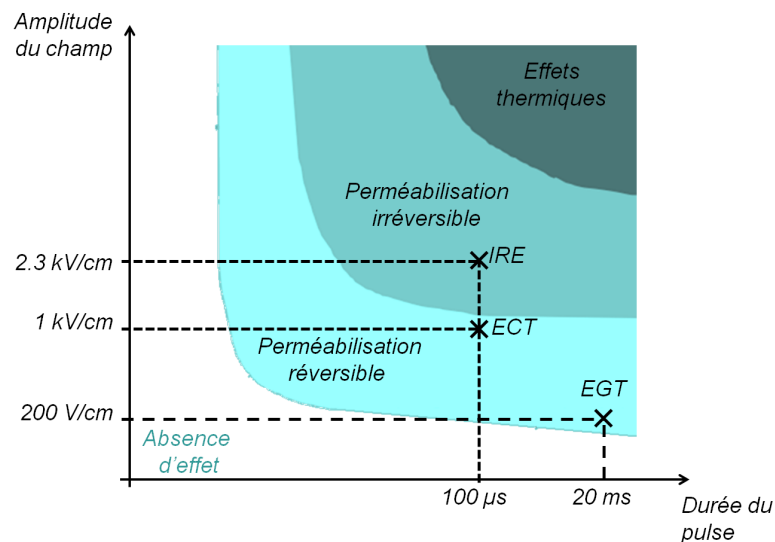


FIG. 1.5 : Schéma des différents effets obtenus lors de l'application d'une impulsion électrique sur une cellule. Des exemples d'impulsions utilisées dans les applications médicales les plus marquantes sont indiqués par des croix : Electrochimiothérapie (ECT), Electrogènetransfert (EGT), Electroporation irréversible pour l'ablation tumorale (IRE).

Peu de domaines de recherche disposent d'autant de possibilités. La littérature sur l'électroporation est donc particulièrement riche et ce qui suit ne reflète qu'une sélection de l'ensemble des travaux.

1.2.3 Les méthodes de détection

Les méthodes de détection de la perméabilisation sont essentiellement indirectes. On peut par exemple mesurer en patch-clamp les changements de conductivité des membranes associés à la perméabilisation. L'intérêt de cette méthode est sa grande sensibilité. Il suffit que les ions puissent traverser la membrane pour que la perméabilisation soit détectable en patch clamp. Elle peut être utilisée sur des cellules ou bien sur des systèmes modèles tels que les bicouches lipidiques. L'équivalent *in vivo* est la mesure d'impédance (Ivorra, 2010; Ivorra *et al.*, 2009).

Dans les travaux sur population de cellules, les méthodes les plus couramment utilisées sont l'internalisation ou le relargage de molécules normalement non perméantes. La plupart de ces molécules permettent traditionnellement de détecter la mortalité cellulaire puisqu'elles marquent les cellules ayant perdu leur intégrité membranaire. Par extension, elles permettent de détecter les membranes

électroperméabilisées.

- Internalisation de molécules fluorescentes ou colorées. Parmi les molécules couramment utilisées on trouve l'iodure de propidium (IP), agent qui s'intercale dans les acides nucléiques. (Cette molécule peut également être utilisée pour son interaction avec la membrane (Gabriel et Teissié, 1997).) On trouve également le Yo-pro ou le bleu trypan.
- Internalisation de molécules cytotoxiques. C'est une méthode utilisable *in vitro* ou *in vivo*. On peut utiliser par exemple la bléomycine (Poddevin *et al.*, 1991). Cette technique permet de discriminer facilement entre perméabilisation réversible et irréversible. En présence du cytotoxique, la perméabilisation conduit à l'entrée des molécules, et donc à la mort cellulaire. En l'absence du cytotoxique, en revanche, la cellule survit.
- Internalisation des ions extracellulaires. La détection se fait à l'aide d'une molécule préalablement chargée dans les cellules. On peut par exemple détecter l'influx de calcium extracellulaire en chargeant les cellules avec du calcium-green ou fluo4.
- Relargage de molécules fluorescentes préalablement chargées telle que la calceïne.
- Relargage de molécules cytosoliques comme le calcium intracellulaire.

TAB. 1.2 : Poids des principaux marqueurs de perméabilisation

Molécule	Propidium	Yo-pro	Lucifer Yellow	Calcium	Bléomycine
Poids (Da)	540	375	457	40	1500

La plupart des molécules utilisées sont de petite taille (tableau 1.2). Il est cependant possible de faire pénétrer par simple diffusion des molécules de taille bien plus importante dans une cellule électroporée. Le tableau 1.3 liste différentes molécules qui ont pu être internalisées dans des cellules DC3F soumises aux mêmes impulsions : 8 impulsions de 100 μs et 140 V/mm (Orlowski *et al.*, 1988; Mir *et al.*, 1988; Bazile *et al.*, 1989; Poddevin *et al.*, 1991; Casabianca-Pignède *et al.*, 1991). Il est net que la taille de la molécule limite sa diffusion au travers de la membrane. Malgré tout, des molécules de 150 kDa peuvent pénétrer. C'est le cas de l'anticorps antiricin, dont le pourcentage internalisé n'est pas quantifiable mais dont l'internalisation est avérée par les effets biologiques qu'il entraîne.

TAB. 1.3 : Molécules internalisées dans des cellules DC3F soumises à 8 impulsions de $100\mu\text{s}$ et 140 V/mm . Le poids des différentes molécules ainsi que leur concentration intracellulaire en pourcentage de la concentration extracellulaire sont indiquées.

Molécule	Poids (Da)	C_{int} (% de C_{ext})
Lucifer Yellow	457	100
Bléomycine	1 500	33
Oligonucléotide	12 000	10
Pokeweed	30 000	1
Anticorps Antiricin	150 000	non quantifiable

1.2.4 Les applications

Les applications potentielles et effectives de l'électroporation ont largement contribué à stimuler les efforts de la communauté scientifique (quelques exemples d'applications sont illustrés sur la figure 1.6). La possibilité d'accéder simplement au compartiment intracellulaire ouvre en effet un large champ d'applications.

Tout d'abord, l'électroporation a très rapidement servi à la transfection de bactéries. C'est aujourd'hui une des techniques de biologie moléculaire les plus employées pour amplifier un plasmide.

L'électroperméabilisation a également donné lieu à des applications cliniques. On pourra citer notamment l'électrochimiothérapie, application clinique la plus aboutie. Ce traitement alternatif à la chimiothérapie classique consiste à perméabiliser de façon réversible des cellules cancéreuses afin de leur délivrer efficacement un médicament cytotoxique comme la bléomycine (Gothelf *et al.*, 2003; Marty, 2006). Depuis ses débuts en 1991, l'électrochimiothérapie a permis de traiter plus de 4000 patients dans plus de 70 hôpitaux et cliniques européens. L'électrotransfert de gènes, par ailleurs, fait ses début en essais précliniques et constitue le socle d'une nouvelle voie de thérapie génique (Mir, 2009; André *et al.*, 2008). Enfin, l'électroperméabilisation irréversible (IRE) est aujourd'hui exploitée en clinique (essentiellement aux Etats-Unis) pour l'ablation tumorale (Davalos *et al.*, 2005; Al-Sakere *et al.*, 2007). Les paramètres électriques classiquement utilisés en électrochimiothérapie (ECT), électrotransfert de gène (EGT) et électroporation irréversible (IRE) sont représentés sur la figure 1.5.

D'autres applications ont percé dans l'agroalimentaire. Des industriels utilisent l'électroporation pour l'extraction de jus de raisins, de jus de canne à sucre, la stérilisation de jus de fruit ou la stérilisation du lait (Jeyamkondan *et al.*, 1999; Schultheiss *et al.*, 2002).

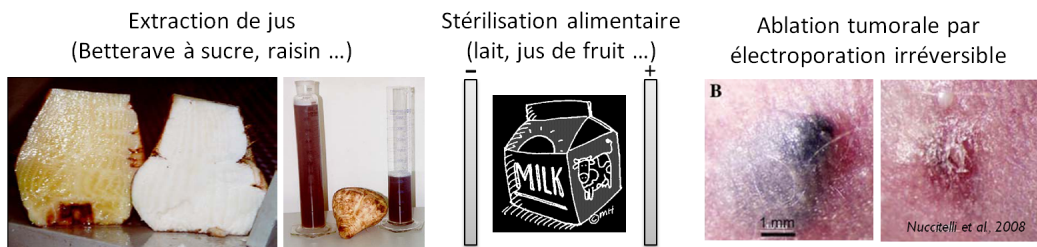


FIG. 1.6 : Illustrations des principales applications de l'électroperméabilisation réversible et irréversible.

1.3 Les mécanismes

1.3.1 L'initiation

1.3.1.1 Potentiel transmembranaire induit ; théorie

Lorsqu'une cellule est soumise à un champ électrique, les charges contenues dans les milieux intra et extra-cellulaires se déplacent sous l'action des forces électrophorétiques. La membrane, dont ses propriétés diélectriques font un isolant, va alors se charger. Un potentiel transmembranaire induit par le champ électrique $\Delta\psi_i$ vient donc s'ajouter au potentiel transmembranaire de repos $\Delta\psi_0$. Les modèles classiques permettant de décrire le potentiel transmembranaire induit sont issus des équations de Laplace. Si l'on considère une cellule sphérique de rayon r dont la membrane est d'épaisseur e , la différence de potentiel transmembranaire induite $\Delta\psi_i(\theta)$ par un champ électrique E constant et unidirectionnel est donnée par l'équation 1.2. L'angle θ est défini en tout point de la membrane comme l'angle entre la direction du champ électrique et la normale à la membrane au point considéré (figure 1.7). Le potentiel induit s'ajoute au potentiel de repos. La calotte de la cellule du côté de l'anode est donc hyperpolarisée, et celle du côté de la cathode est dépolarisée (figure 1.7).

$$\Delta\psi_i(\theta, t) = \frac{3}{2}.r.E.\frac{\sigma_e\sigma_i\frac{2e}{r}}{(2\sigma_e + \sigma_i)\sigma_m + \frac{2e}{r}(\sigma_e - \sigma_m)(\sigma_i - \sigma_m)}.cos(\theta) \quad (1.2)$$

avec σ_i σ_e conductivités intra et extra cellulaire, ε_m permittivité relative de la membrane, σ_m conductivité de la membrane, e épaisseur de la membrane, r rayon de la cellule

Si l'on considère que la membrane est une diélectrique parfait c'est à dire que sa conductivité est nulle ($\sigma_m = 0$), on peut en première approximation décrire la différence de potentiel transmembranaire induite $\Delta\psi_i(\theta)$ grâce à la formule 1.3.

$$\Delta\psi_i(\theta) = \frac{3}{2}.r.E.cos(\theta) \quad (1.3)$$

Pour une cellule de rayon $r = 10 \mu m$ et un champ extérieur de 10 V/mm, la formule 1.3 indique que la différence de potentiel induite au niveau des pôles anodique et cathodique est de 150 mV. Si l'on considère que la membrane a une épaisseur e de 5 nm, le champ induit est d'environ 30 kV/mm, soit 3000 fois supérieur au champ électrique extérieur initial. Ainsi, la géométrie de la cellule et ses propriétés électriques permettent d'obtenir, au niveau de la membrane, une forte amplification du champ électrique extérieur. En première approximation, le coefficient d'amplification α est fonction du rayon de la cellule et de l'épaisseur de la membrane (équation 1.4).

$$\alpha = \frac{3}{2}.\frac{r}{e} \quad (1.4)$$

La dynamique du potentiel transmembranaire est souvent décrite comme un premier ordre obéissant à l'équation 1.5. La constante de charge de la membrane τ dans un milieu physiologique est de l'ordre de la microseconde.

$$\Delta\psi_i(\theta, t) = \frac{3}{2}.r.E.cos(\theta)(1 - e^{-\frac{t}{\tau}}) \quad (1.5)$$

$$\text{avec } \tau = \frac{1}{2}.\frac{r\varepsilon_m\varepsilon_0}{e}.\frac{\sigma_i+2\sigma_e}{\sigma_i\sigma_e}$$

Il est possible de donner une formulation plus précise en tenant compte de la conductivité non nulle de la membrane (équation 1.6). L'utilisation de cette formule plus complète aboutit à des valeurs numériques de ΔPTM induit plus faibles, ainsi qu'à des temps de charge et décharge plus courts. Elle peut donc s'avérer utile si une grande précision est nécessaire.

$$\Delta\psi_i(\theta, t) = \frac{3}{2}.r.E.\frac{\sigma_e\sigma_i\frac{2e}{r}}{(2\sigma_e + \sigma_i)\sigma_m + \frac{2e}{r}(\sigma_e - \sigma_m)(\sigma_i - \sigma_m)}.cos(\theta)(1 - e^{-\frac{t}{\tau}}) \quad (1.6)$$

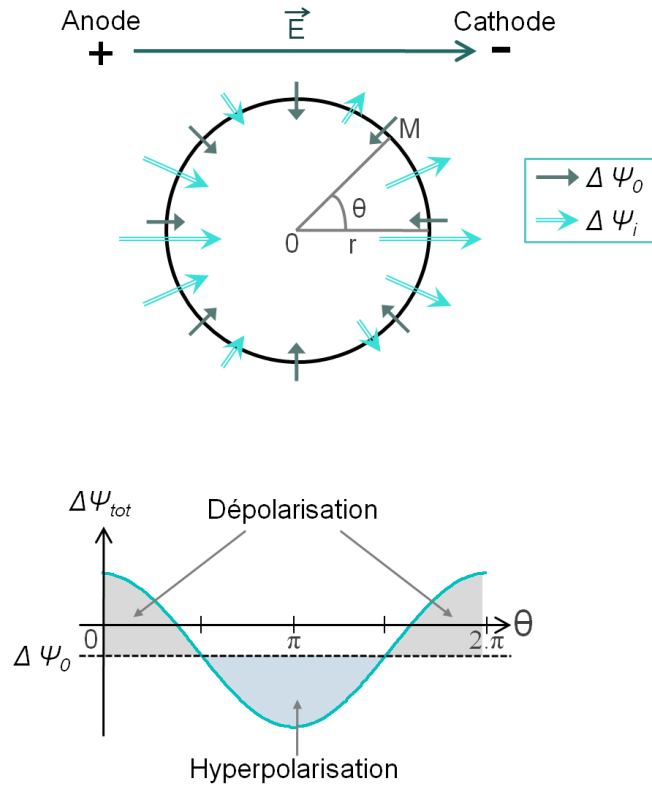


FIG. 1.7 : Représentation schématique des différences de potentiel transmembranaire de repos $\Delta\psi_0$ et induite $\Delta\psi_i$. La courbe du bas représente la différence de potentiel transmembranaire totale $\Delta\psi_{tot}$ en fonction de la position angulaire sur la membrane θ .

$$\text{avec } \tau = \frac{r\epsilon_m\epsilon_0}{e} \frac{\sigma_i + 2\sigma_e}{2\sigma_i\sigma_e + r\sigma_m(\sigma_i + 2\sigma_e)/d}$$

Enfin, il est possible de tenir compte du caractère diélectrique des milieux intra et extra cellulaires (Kotnik *et al.*, 1998). Il est alors plus facile d'exprimer le ΔPTM induit dans le domaine fréquentiel (équation 1.7). Le ΔPTM induit calculé à partir de cette formule est représenté dans le domaine fréquentiel sur la figure 1.8. Ce complément sur la formule du ΔPTM ne modifie les valeurs numériques qu'à partir du GHz. Pour des impulsions 'longues' de l'ordre de la microseconde, une telle précision est donc superflue. En revanche, cette formule complète devra être utilisée pour les impulsions dans le régime de la nanoseconde.

$$\Delta\psi_i(\theta, f) = \frac{3\Lambda_e[3er^2\Lambda_i + (3e^2r - e^3)(\Lambda_m - \Lambda_i)]}{2r^3(\Lambda_m + 2\Lambda_e)(\Lambda_m + \frac{1}{2}\Lambda_i) - 2(r - e)^3(\Lambda_e - \Lambda_m)(\Lambda_i - \Lambda_m)} r.E(f).cos(\theta) \quad (1.7)$$

où Λ est l'opérateur complexe $\Lambda = \sigma + j2\pi\epsilon_0\epsilon f$

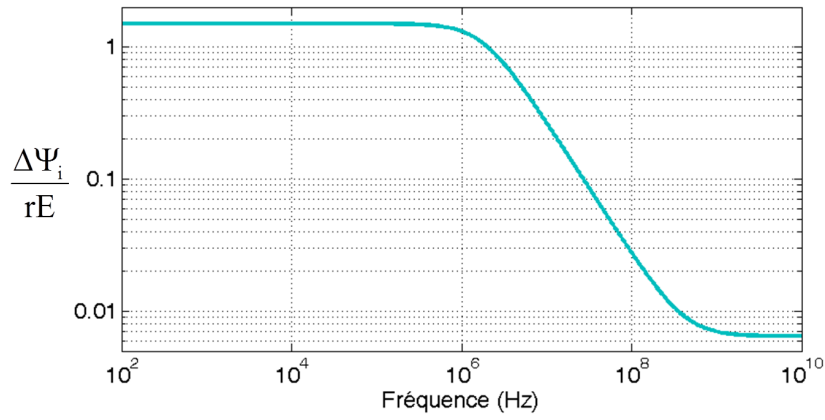


FIG. 1.8 : Représentation du ΔPTM induit $\Delta\psi_i$ en fonction de la fréquence, normalisé par l'amplitude du champ électrique E et par le rayon de la cellule r . Calcul effectué avec $r = 10 \mu m$, $\sigma_e = \sigma_i = 1,5 S/m$, $\sigma_m = 3.10^{-7} S/m$, $\epsilon_i = \epsilon_e = 65$, $\epsilon_m = 5$.

Les descriptions ci-dessus sont des descriptions linéaires de la cellule soumise à un champ électrique. Elles sont donc valables tant que la membrane n'est pas affectée. Au delà d'une certaine valeur seuil $\Delta\psi_{seuil}$ du potentiel transmembranaire, la membrane devient perméable et cette description n'est donc plus valable. Les lois décrivant les mécanismes après l'induction du potentiel transmembranaire sont essentiellement phénoménologiques.

1.3.1.2 La réalité de ce modèle ?

Dépendance au rayon Le seuil de perméabilisation évalué expérimentalement est très proche quel que soit le type de cellule. D'après les différentes expressions du ΔPTM , le dépassement de ce seuil pour les cellules de faibles diamètres nécessite des champs électriques plus importants. Expérimentalement, on observe en effet que pour perméabiliser des cellules eucaryotes dont les diamètres sont compris entre 10 et 20 μm , il faut des champs électriques de l'ordre de 100 V/mm. En revanche, pour perméabiliser des bactéries dont le diamètre se situe plutôt aux alentours de 1 à 5

μm , les champs nécessaires sont plutôt de l'ordre de 1000 V/mm . Par ailleurs, les mêmes cellules ne se perméabilisent pas pour les mêmes niveaux de champ selon qu'elles sont en suspension (70 V/mm pour des cellules CHO en suspension) ou bien adhérentes et étalées (30 V/mm pour des cellules CHO adhérentes) (Rols et Teissié, 1990).

Dépendance à la position La dépendance en $\cos(\theta)$ a été validée par plusieurs expériences utilisant des sondes fluorescentes qui s'intègrent dans la membrane et sont sensibles au champ électrique qui les entoure (Gross *et al.*, 1986; Hibino *et al.*, 1991). Les deux photos de la figure 1.9 sont celles d'œufs d'oursins de mer marqués avec une sonde fluorescente (RH292) en l'absence et en présence d'un champ électrique. En l'absence de champ, la membrane apparaît marquée uniformément. En présence du champ en revanche, l'intensité est fonction de la position. On devine la dépendance en cosinus.

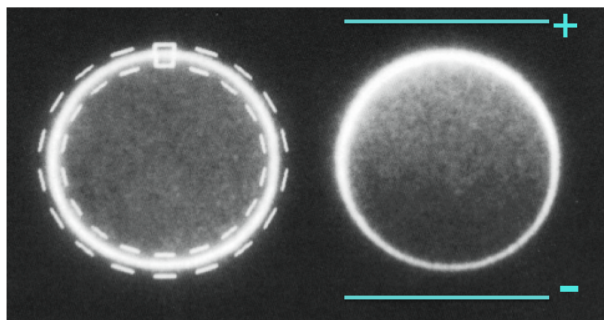


FIG. 1.9 : Images en fluorescence d'un œuf d'oursin de mer marqué avec la sonde RH292. L'image de gauche est en absence de champ électrique et l'image de droite $8\ \mu\text{s}$ après l'application d'une impulsion de 10 V/mm . Extrait de Hibino *et al.* (1991)

Il a en outre été mis en évidence que la zone perméabilisée présente la même asymétrie et la même dépendance angulaire. La zone perméabilisée est alors détectée par l'observation de l'interaction d'une molécule extracellulaire (IP) avec la membrane (Gabriel et Teissié, 1997, 1999). Ces expériences sont la validation directe du lien entre potentiel transmembranaire et perméabilisation.

Constantes de charge et décharge L'utilisation de sondes fluorescentes a également permis de valider les constantes de temps de charge et décharge de la membrane, et ce pour différentes conductivités du milieu extracellulaire (Kinosita *et al.*, 1988; Lojewska *et al.*, 1989; Hibino *et al.*, 1993).

Influence de la conductivité de la membrane Enfin, l'influence de la conductivité membranaire sur la statique et la dynamique du ΔPTM a été mise en évidence

sur des vésicules (Lojewska *et al.*, 1989). Pour moduler la conductivité de la membrane artificielle, les auteurs utilisent de la gramicidine, molécule qui s'incorpore dans les membranes et crée des canaux cationiques. Les conclusions expérimentales sont conformes aux prédictions théoriques. Sous l'effet d'un champ électrique, une membrane contenant de la gramicidine se charge plus vite et atteint un potentiel transmembranaire final plus faible (expériences conduites avec des champs suffisamment faibles pour ne pas induire de perméabilisation).

1.3.1.3 Le seuil

Il est difficile d'évaluer précisément un seuil de perméabilisation dans la mesure où celui-ci est fortement fonction de la méthode de détection de la perméabilisation. Les valeurs couramment annoncées se situent entre 200 mV et 1 V.

Un papier récent de Wegner *et al* étudie ce seuil de rupture en patch-clamp sur des cellules végétales (protoplastes dérivés de la lignée cellulaire du tabac 'Bright yellow-2'). L'utilisation d'une configuration cellule entière (whole cell) lui permet d'appliquer un potentiel uniforme sur l'ensemble de la membrane. En appliquant des impulsions de 10 ms de différentes amplitudes, il observe un changement de résistance de la membrane pour une hyperpolarisation, et une dépolarisation correspondant à des potentiels transmembranaires de +250 mV et -300 mV. Une étude similaire sur l'algue marine géante *Valonia utricularis* indique des seuils de perméabilisation réversible autour de +800 mV. Enfin, la fuite de sucrose dans de petites vésicules (100 nm de rayon) soumises à des impulsions exponentielles dont la décroissance est comprise entre 5 et 15 μs s'effectue lorsque le potentiel transmembranaire atteint environ 200 mV (Teissie et Tsong, 1981).

Il ressort de la littérature que le seuil au delà duquel la perméabilisation se produit est fortement dépendant de la durée de l'impulsion (Benz et Zimmermann, 1980). Une étude sur bicouches lipidiques planes (Alvarez et Latorre, 1978) rapporte que la rupture de la membrane s'effectue à 0,3 V pour des durées de quelques centaines de millisecondes et à 0,8 V pour des durées de quelques millisecondes. L'étude systématique de la durée de vie d'une bicouche lipidique planaire en fonction de la tension à ses bornes met également clairement en évidence cette dépendance (Abidor *et al.*, 1979). Pour une tension de l'ordre de 200 mV, la durée de vie est de l'ordre de 1 s, mais une tension de l'ordre de 1 V peut être maintenue pendant près de 100 μs seulement (voir figure 1.10).

Cette même étude met en évidence que pour une tension transmembranaire donnée, la durée de vie de la membrane est fonction du type de lipides qui la compose.

Il apparaît également que le cumul des impulsions abaisse le seuil de perméabilisation. Dans une étude (Rols et Teissié, 1990) sur cellules CHO, le champ seuil de

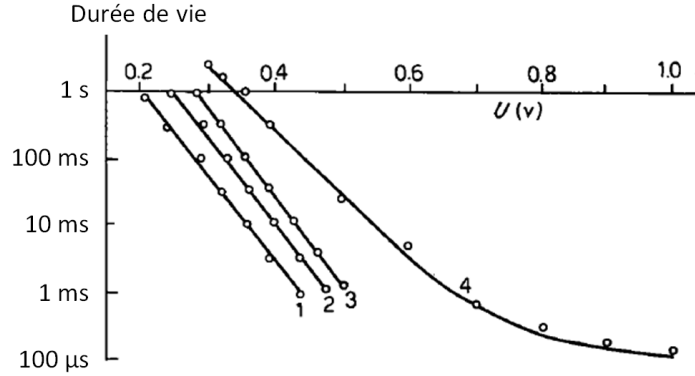


FIG. 1.10 : *Durée de vie moyenne d'une membrane lipidique en fonction de la tension à ses bornes et pour différents types de lipides (1. Lecithin, 2- Synthetic lecithin avec stearine hydrocarbon chains, 3-Cholesterol et Lecithin, 4- General Lipids. Adaptée de Abidor et al. (1979)*

perméabilisation E_{seuil} est défini comme la valeur minimum du champ nécessaire pour que 10 impulsions perméabilisent la cellule. Cette définition est basée sur l'observation que pour un nombre d'impulsions supérieur à 10, il apparaît une saturation de la perméabilisation. Les auteurs, grâce à cette étude, mettent très clairement en évidence qu'en plus de dépendre du nombre d'impulsions, le champ seuil E_{seuil} dépend de la durée du pulse T . La relation qu'ils proposent est donnée par l'équation 1.8.

$$E_{seuil}(kV/cm) = \frac{1,5}{T(\mu s)} + 0,3 \quad (1.8)$$

relation établie sur des cellules CHO adhérentes avec des durées de pulses allant de 2 μs à 20 μs

Enfin, il convient de souligner que la rupture de la membrane est un phénomène stochastique, comme le suggère la variabilité des résultats obtenus sur des couches planes de lipides (Abidor *et al.*, 1979) et également sur cellules (Towhidi *et al.*, 2008). Cette dernière étude estime que l'internalisation de Ca^{2+} dans des cellules CHO a lieu pour des potentiels transmembranaires variant entre 512 et 1028 mV d'une cellule à l'autre dans une même population.

1.3.2 Au delà du seuil

Vision globale à l'échelle d'une cellule La perméabilisation s'obtient lorsque le potentiel transmembranaire dépasse un certain seuil (ψ_{seuil}) non-physiologique au

niveau du pôle de la cellule. Notons le champ électrique associé E_{seuil} . Une impulsion d'amplitude plus élevée $E > E_{seuil}$ permet de dépasser le seuil de perméabilisation sur une surface de membrane plus importante. Pour une cellule sphérique d'aire totale A_{tot} , l'aire perméabilisée A_{perm} de la membrane est donnée par l'équation 1.9. Ceci a été confirmé expérimentalement en microscopie fluorescente (Gabriel et Teissié, 1997).

$$A_{perm} = A_{tot} \left(1 - \frac{E}{E_{seuil}}\right) \quad (1.9)$$

Localement au niveau de la membrane Lorsque le potentiel transmembranaire est suffisamment élevé pour induire la perméabilisation, des défauts apparaissent. Ces défauts permettent les échanges ioniques et agissent ainsi comme une boucle de rétroaction en abaissant le potentiel transmembranaire. D'après les études utilisant les sondes fluorescentes, il semblerait que le ΔPTM après perméabilisation se stabilise à une valeur non nulle (Kinosita *et al.*, 1988; Hibino *et al.*, 1991).

ΔPTM forcé La figure 1.11, est issue de Wegner *et al.* (2011). D'après cette étude en patch-clamp cellule entière, la conductivité de la membrane augmente d'un facteur 50 au passage des seuils de perméabilisation (négatif ou positif). Le fait de maintenir un potentiel sur la membrane n'augmente pas davantage la conductivité. Ceci semble indiquer que la taille des défauts n'est pas affectée par le niveau de ΔPTM .

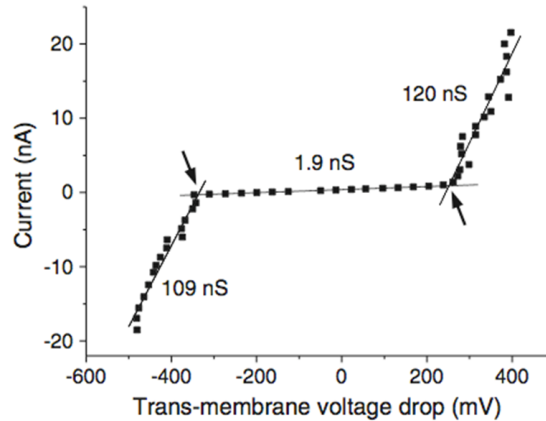


FIG. 1.11 : Expérience de patch-clamp en configuration cellule entière. Le potentiel trans-membranaire (axe des abscisses) est imposé sur les cellules (protoplastes, issus d'une lignée de tabac) pendant 10 ms. Le courant relevé à la fin de l'impulsion est reporté sur l'axe des ordonnées. Extrait de Wegner *et al.* (2011)

1.3.3 L'état perméabilisé

Peu d'études renseignent sur les changements induits au niveau moléculaire. D'après des expériences de spectroscopie, la queue des phospholipides n'est pas altérée. En revanche, il se produit des changements importants au niveau des têtes polaires (Lopez *et al.*, 1988; Stulen, 1981).

Les expériences d'électrofusion témoignent également de modifications au niveau moléculaire. L'électrofusion consiste à faire fusionner deux cellules ou vésicules préalablement électroporées. Le simple contact entre les deux membranes suffit à la fusion, ce qui indique que les forces répulsives d'hydratation des membranes doivent être diminuées voire supprimées dans l'état perméabilisé. Ainsi, la couche d'eau interfaciale est certainement affectée.

Enfin, il a également été observé une importante augmentation de la fluidité membranaire et de l'externalisation des phosphatidylserines (PS) (Stulen, 1981; Haest *et al.*, 1997), comme c'est le cas dans les transitions de phase. Ces observations sont souvent avancées pour justifier le modèle des pores. En effet, un flip-flop spontané de PS nécessite de franchir une haute barrière énergétique. Au niveau d'un pore, les PS peuvent passer d'un feuillet à l'autre de la membrane par simple diffusion, éventuellement aidées par l'action électrophorétique du champ du côté de l'anode (figure 1.12). La présence d'un pore n'est cependant pas une condition indispensable.

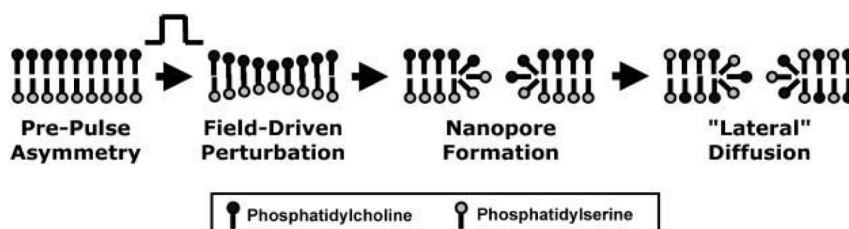


FIG. 1.12 : Externalisation des PS par simple diffusion Extrait de Vernier *et al.* (2004c)

1.3.4 La réparation de la membrane

La réparation peut s'effectuer dans les systèmes lipidiques (Teissie et Tsong, 1981; Benz et Zimmermann, 1981; Glaser *et al.*, 1988), elle est donc en partie passive. La réparation est beaucoup plus lente dans les cellules et peut prendre plusieurs minutes .

La durée de vie de la perméabilisation dépend de nombreux paramètres dont notamment :

- Les paramètres électriques : dans Rols et Teissié (1998), les auteurs montrent que le temps nécessaire pour que la moitié d'une population de CHO reverse la perméabilisation est fonction de la durée des impulsions et de leur nombre (voir figure 1.13). Ceci confirme que la perméabilisation n'est pas un phénomène tout ou rien.

- Le milieu extracellulaire : la réparation est d'autant plus rapide que le milieu est conducteur (Shirakashi *et al.*, 2004).

- La température : la réparation est bien plus rapide à 37 °C qu'à 21 °C et elle est complètement inhibée à 4 °C (Teissie et Rols, 1994).

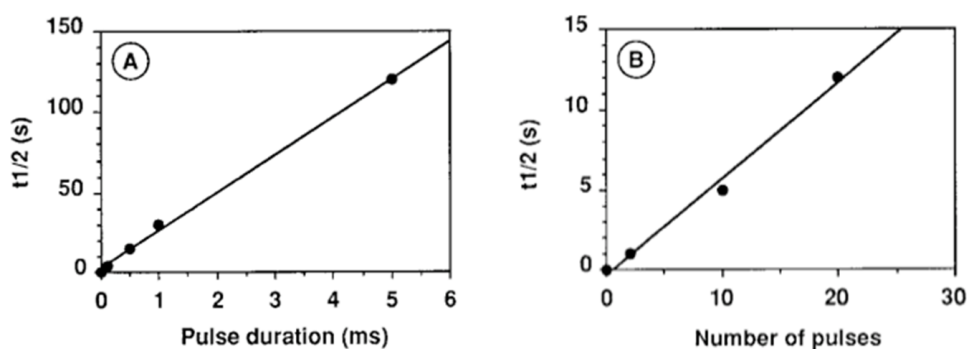


FIG. 1.13 : Effet du nombre de pulses et de leur durée sur la durée de vie de la perméabilisation de la membrane. Des cellules CHO sont pulsées à 1 Hz à 100 V/mm avec A-10 impulsions de durée variable ou B- un nombre variable d'impulsions de 1 ms. La durée $t_{1/2}$ correspond au temps au bout duquel la moitié de la population devient à nouveau imperméable. Extrait de Rols et Teissié (1998)

Dans le cas des cellules, la vitesse de réparation est également dépendante de la quantité ATP et ADP disponible (Teissie et Rols, 1994; Rols *et al.*, 1998), ce qui suggère qu'un mécanisme biologique actif intervient dans la réparation. En outre, le cytosquelette participe également à la dynamique de retour à l'équilibre. La destruction des microtubules avec de la colchicine accélère la réparation (Teissie et Rols, 1994).

1.3.5 Les paramètres influents

1.3.5.1 L'amplitude et la durée

L'amplitude de l'impulsion permet de dépasser le Δ PTM seuil $\Delta\psi_{seuil}$. Elle contrôle ensuite la surface de la membrane perméabilisée, puisqu'elle permet de dépasser le

seuil de perméabilisation sur une surface plus ou moins importante (section 1.3.2).

La durée de l'impulsion permet d'abaisser le potentiel transmembranaire seuil de perméabilisation (voir section 1.3.1.3). Par ailleurs, elle détermine le niveau de perméabilisation (Rols et Teissié, 1998) de la zone perméabilisée. Elle affecte peu la taille de l'aire perméabilisée (Gabriel et Teissié, 1997, 1999). Il demeure tout de même une légère influence de la durée sur l'aire perméabilisée, qui apparaît à condition de modifier la durée de plus d'une décade (Golzio *et al.*, 2002). Ceci peut probablement être rapproché du fait que le seuil de perméabilisation est abaissé lorsque la durée de l'impulsion augmente.

1.3.5.2 Nombre de pulses et fréquence de répétition

Il est possible de cumuler les effets des impulsions, ce qui permet notamment d'abaisser les seuils nécessaires à la perméabilisation. De façon générale, l'accumulation peut avoir lieu pour deux raisons distinctes: soit chaque pulse crée des défauts et l'on accumule ces défauts, soit une impulsion sensibilise et l'impulsion suivante induit une perméabilisation détectable. On pourrait parler d'effets cumulatifs "biologiques" et d'effet cumulatifs "physiques" (ou physico-chimiques ...).

Les effets cumulatifs physiques sont très bien illustrés par les expériences sur membrane artificielle. Lorsqu'une membrane est soumise à une tension de 500 mV, sa durée de vie est diminuée par l'application au préalable d'un pré-traitement, c'est à dire d'une tension d'amplitude inférieure qui ne l'a pas perméabilisée (Abidor *et al.*, 1979). La durée de vie décroît lorsque l'amplitude du pré-traitement augmente (tableau 1.4).

TAB. 1.4 : *Effet d'un pré-traitement de 200 ms sur la durée de vie d'une bicouche lipidique soumise à une impulsion de 500 mV. L'amplitude du pré-traitement est comprise entre 50 mV et 300 mV. D'après Abidor et al. (1979)*

Potential of a 200 ms pre-treatment (mV)	0	50	100	200	300
Mean lifetime (ms) at $U = 500mV$	18,0	14,2	12,8	9,36	9,0

Le cumul "biologique" apparaît nettement dans une étude sur la fréquence de répétition sur la survie cellulaire (Pakhomova *et al.*, 2011). Ces travaux indiquent que plus les impulsions sont appliquées à basse fréquence de répétition, plus leurs effets se cumulent. Ceci est vérifié pour des impulsions de durée allant de 0,3 à 9 μs . De même, il apparaît qu'un traitement fractionné, c'est à dire deux salves

d'impulsions délivrées à plusieurs minutes d'intervalle, est plus efficace qu'une seule salve contenant deux fois plus d'impulsions. Les auteurs proposent plusieurs causes possibles de cette 'sensibilisation' induite par les impulsions : un épuisement en ATP de la cellule lorsqu'elle répare les premiers dommages, une toxicité sur des temps prolongés de la haute concentration de calcium intracellulaire induite par perméabilisation, ou bien encore une simple augmentation de la taille de la cellule par influx d'eau entre deux pulses.

L'effet de la fréquence de répétition a été revisité pendant les travaux de cette thèse. Il sera davantage discuté dans le chapitre concerné (chapitre 3).

1.3.5.3 Conductivité extra-cellulaire

L'influence de la conductivité sur l'efficacité de la perméabilisation a été étudiée par plusieurs groupes (Neumann, 1992; Sukhorukov *et al.*, 1998; Pucihar *et al.*, 2001; Ferreira *et al.*, 2008). Les résultats de ces études sont repris dans un papier de synthèse (Ivorra *et al.*, 2010). Il apparaît qu'une diminution de la conductivité du milieu extra-cellulaire diminue légèrement l'efficacité de la perméabilisation. Cette influence ne s'observe en revanche que pour des valeurs très faibles de conductivité, typiquement inférieures à 0,01 S/m. Ivorra justifie de façon théorique cette dépendance en modélisant la dépendance de la conductivité de la membrane au potentiel transmembranaire (Ivorra *et al.*, 2010).

1.3.5.4 Autres paramètres

De nombreux autres paramètres peuvent influencer l'efficacité de la perméabilisation, et notamment le type de lipides (Abidor *et al.*, 1979) et le pourcentage de cholestérol (Needham et Hochmuth, 1989). L'oxydation des membranes suffit également à augmenter leur sensibilité vis-à-vis de l'électroporaison (Vernier *et al.*, 2009).

1.3.6 Le(s) modèle(s) classique(s) d'électroporation

Les modèles théoriques reposent sur la physique des membranes. Dans ces modèles, la perméabilisation est décrite en terme de densité de pores. Même s'ils n'ont pas pu à ce jour être validés, ils sont une intéressante piste de réflexion.

1.3.6.1 Pores hydrophobes et hydrophiles

Les deux grandes familles de pores habituellement décrites sont les pores hydrophobes et les pores hydrophiles. Ils sont représentés schématiquement sur la figure 1.14. Les pores hydrophobes peuvent apparaître sous l'effet de l'agitation thermique. Le coût énergétique $W_{hydrophobe}$ associé à la création d'un tel pore dépend du rayon de ce pore r_p au carré (équation 1.10) (Glaser *et al.*, 1988). Ceci implique que ces pores

ne sont pas stables et qu'ils se referment spontanément pour atteindre le minimum énergétique en $r_p = 0$.

$$W_{hydrophobe}(r_p) = kr_p^2 \quad (1.10)$$

Les pores hydrophiles correspondent à un réarrangement des lipides tel que les queues hydrophobes sont isolées de l'eau. La physique des membranes permet de décrire l'énergie associée à la présence d'un tel pore (Derjaguin et Prokhorov, 1981). Cette énergie $W_{hydrophile}$ est fonction du rayon du pore r_p et des propriétés de la membrane telle que sa tension de surface Γ_0 ainsi que la tension linéïque du pore γ_0 (équation 1.11). L'équation 1.11 prédit qu'un pore de rayon supérieur à $\frac{\gamma_0}{\Gamma_0}$ va s'accroître indéfiniment, tandis que les pores de rayon inférieur vont diminuer jusqu'à annihilation.

$$W_{hydrophile}(r_p) = -\Gamma_0\pi r_p^2 + 2\pi\gamma_0 r_p \quad (1.11)$$

En réalité, des pores hydrophobes de petite taille peuvent être stables. Pour le justifier énergétiquement, il est nécessaire d'affiner le modèle en prenant en compte les gênes électrostatiques des têtes lipidiques entre elles au sein d'un pore (Israelachvili, 1992; Weaver, 1995). Le terme qui s'ajoute est C/r^4 où C est une constante positive (équation 1.12). Il en résulte qu'il existe des pores hydrophobes stables de rayon $r_m \sim 1nm$.

$$W_{hydrophile}(r_p) = -\Gamma_0\pi r_p^2 + 2\pi\gamma_0 r_p + \frac{C}{r_p^4} \quad (1.12)$$

La figure 1.14 (DeBruin et Krassowska, 1999) représente les énergies associées aux pores hydrophobes et hydrophiles pour les petits rayons. Elle met en évidence que si le rayon d'un pore hydrophobe dépasse un rayon critique r_* (généralement donné autour de 0.5 nm), la configuration la plus favorable devient la configuration hydrophile. Le rayon du pore hydrophobe va alors s'étendre jusqu'à atteindre le rayon de moindre énergie r_m (Neu et Krassowska, 1999). Cette transition hydrophobe/hydrophile constitue l'hypothèse de base des modèles d'électroporation.

1.3.6.2 Conséquence de l'électrodéformation

Les contraintes mécaniques générées par un champ électrique peuvent être étudiées au moyen des tenseurs de Maxwell (Landau *et al.*, 1984). Si on introduit $\Delta\psi$, la différence de potentiel de part et d'autre d'une membrane d'épaisseur d , la tension de surface est augmentée de la quantité $\Delta\Gamma$ (équation 1.13).

$$\Delta\Gamma = \frac{(\varepsilon_e - \varepsilon_m)\pi\Delta\psi^2 r_p^2}{2d} \quad (1.13)$$

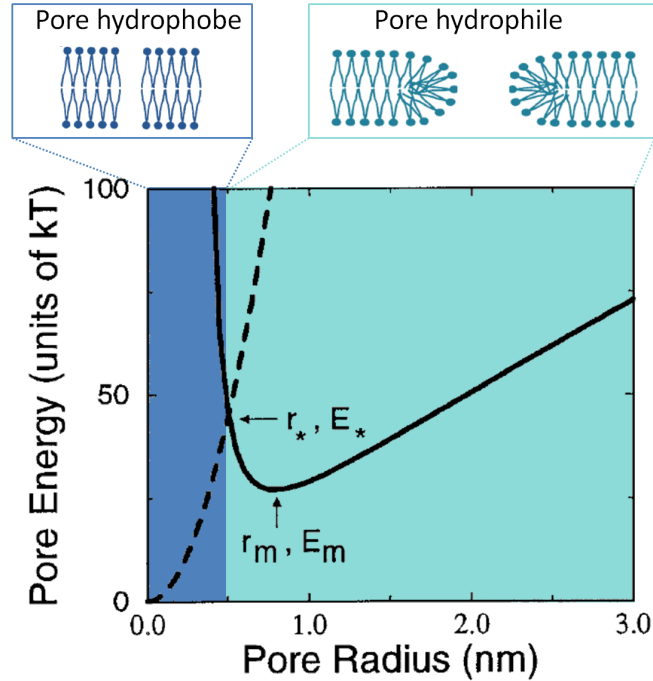


FIG. 1.14 : *Energie théorique d'un pore en fonction de son rayon. La courbe pointillée représente le cas d'un pore hydrophobe, le trait plein celui d'un pore hydrophile. Au delà du rayon r_* , la configuration hydrophile est plus avantageuse énergétiquement. L'énergie associée est notée E_* . Figure adaptée de DeBruin et Krassowska (1999)*

d : épaisseur de la membrane, $\Delta\psi$: différence de potentiel aux bornes de la membrane, ε_m : permittivité de la membrane, ε_e : permittivité de l'eau

L'énergie d'un pore pour différentes tensions $\Delta\psi$ aux bornes de la membrane est représentée sur la figure 1.15. En présence d'une tension, l'énergie des pores hydrophiles est globalement abaissée. Au delà d'une tension critique de 0,5 V, il n'existe plus de minimum local d'énergie, ce qui signifie que les pores s'écroulent. C'est une contre-réaction par laquelle les pores deviennent conducteurs et abaissent le potentiel transmembranaire qui permet de garder un état réversible.

1.3.6.3 Limites des modèles

La première limite de tels modèles est qu'ils considèrent un système purement passif, et non actif comme la cellule. Ils ne peuvent donc pas servir à décrire l'ensemble du phénomène d'électroperméabilisation et de réparation d'une cellule.

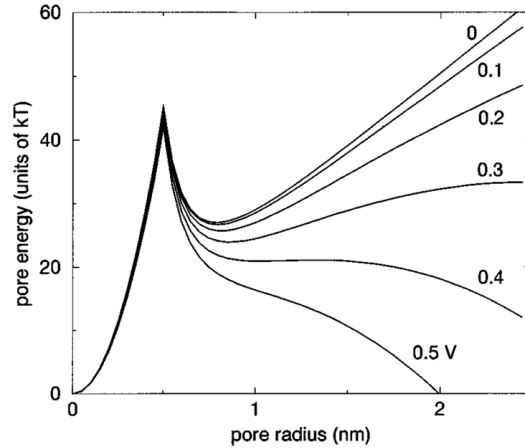


FIG. 1.15 : *Energie théorique d'un pore en fonction de son rayon et pour différents potentiels transmembranaires $\Delta\psi$ allant de 0 V à 0,5 V. Figure extraite de Neu et Krassowska (1999)*

Par ailleurs, ils ne tiennent pas compte de la complexité de la membrane cellulaire, et notamment de la présence des protéines. Si l'on admet que la perméabilisation affecte principalement et initialement les lipides, ils peuvent cependant renseigner sur les premières étapes de la perméabilisation. Ils sont de plus particulièrement intéressants pour étudier le comportement des bicouches lipidiques. Des simulations en dynamique moléculaire sont en accord avec les tailles des pores en l'absence de stimuli et sous l'effet d'une pression mécanique (Leontiadou *et al.*, 2004). Malgré tout certaines limites demeurent.

Tout d'abord, ces modèles décrivent la membrane comme un matériau homogène caractérisé par des grandeurs continues telles que conductivité, permittivité, tension surfacique ou linéique. Or, une telle description ne peut refléter complètement les phénomènes qui se produisent à l'échelle moléculaire dans l'assemblage complexe que constitue une bicouche lipidique.

Concernant la taille des pores, ces modèles prédisent des pores d'environ 1 nm de diamètre, ce qui ne semble pas en accord avec la taille des molécules (par exemple la bléomycine (Belehradek *et al.*, 1994)), qui pénètrent par simple diffusion après l'électroporation. Des modèles plus complexes tentent d'expliquer la création de pores plus larges qui permettraient l'internalisation de plus grandes molécules (Smith *et al.*, 2004; Krassowska et Filev, 2007).

Enfin, même si ces modèles permettent de retrouver certains résultats expérimen-

taux, notamment les seuils de perméabilisation, certaines contradictions demeurent. En particulier, les modèles n'expliquent pas les asymétries anode/cathode (DeBruin et Krassowska, 1999), et prédisent que cette asymétrie ne peut être vue qu'à très faible valeur de champ, quand le potentiel transmembranaire de repos n'est pas négligeable. Ceci contredit les observations expérimentales, y compris sur vésicules.

Seule une expérience permettra de trancher sur la pertinence de ces modèles. Malheureusement, il n'existe pas à l'heure actuelle de moyen expérimental pour observer une membrane avec une précision suffisante.

1.4 Les pulses 'courts' : les nanopulses

1.4.1 L'intérêt des nanopulses

Depuis le début des années 2000, plusieurs groupes étudient les effets des impulsions dites ultra-courtes. Ces impulsions sont regroupées sous l'appellation nanopulses ou nsPEF (nanosecond pulsed electric field). Elles regroupent des impulsions de durée très variable, allant de quelques nanosecondes à 600 ns. L'initiative revient au professeur Karl Schoenbach (Schoenbach *et al.*, 2001). L'intérêt de ces impulsions est la possibilité qu'elles offrent de toucher les organelles intracellulaires du fait de leur haut contenu spectral. En se basant sur un modèle électrique simple d'une cellule et de son noyau, les auteurs prédisent que l'utilisation d'impulsions de 60 ns permet d'atteindre des potentiels transmembranaires du même ordre de grandeur sur la membrane cytoplasmique et sur la membrane des organelles internes.

Les deux régimes de fonctionnement 'micropulses' et 'nanopulses' ont été étudiés en simulation dans de nombreux articles (Gowrishankar *et al.*, 2006; Chenguo *et al.*, 2009; Salimi *et al.*, 2010). La figure 1.16A est une simulation du potentiel électrique dans une cellule soumise à une impulsion de 100 μs , avec un temps de montée de 1 μs (d'après Gowrishankar *et al.* (2006)). Dès la fin du temps de montée, le régime permanent est atteint. Il y a induction d'un ΔP_{TM} sur la membrane cytoplasmique. En revanche, le potentiel à l'intérieur de la cellule est quasi uniforme. Au contraire, au cours d'une impulsion de 60 ns, le régime permanent n'a pas le temps de s'établir, et un champ comparable au champ extérieur est présent en permanence à l'intérieur de la cellule (figure 1.16 B).

L'utilisation des impulsions ultracourtes aux très forts champs nécessite de surmonter un grand nombre de difficultés technologiques. La maîtrise de la manipulation intracellulaire et les applications potentielles associées sont des motivations suffisantes. Parmi les applications déjà testées on trouve notamment l'inactivation bactérienne (Ulmer *et al.*, 2002) et le traitement de tumeurs (Nuccitelli *et al.*, 2006, 2009; Chen *et al.*, 2009; Nuccitelli *et al.*, 2010; Garon *et al.*, 2007). Une revue dé-

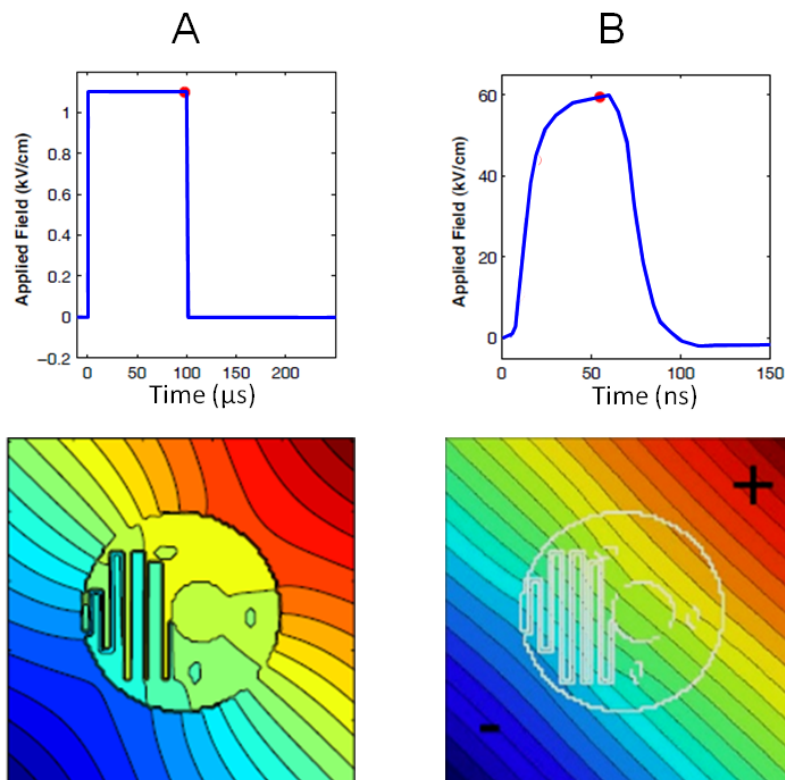


FIG. 1.16 : Lignes équipotentielles issues d'une simulation. A- dans le plateau d'un pulse de $100 \mu\text{s}$ de temps de montée $1 \mu\text{s}$. B- au cours d'un pulse de 60 ns , de temps de montée d'environ 20 ns . Les impulsions utilisées pour la simulation sont présentées de part et d'autre. D'après Gowrishankar et al. (2006)

taille l'ensemble des applications médicales (Breton et Mir, 2011). La majorité des expériences menées jusqu'à présent ont cependant été faites *in vitro* sur cellules. Ce sont ces expériences qui sont rapportées ici.

1.4.2 Action sur la membrane cytoplasmique

Les impulsions nanosecondes étaient initialement destinées à la manipulation intracellulaire. Les premières études *in vitro* abondaient dans ce sens, puisque des effets intracellulaires étaient observés sans que la membrane externe ne devienne perméable aux marqueurs habituels tel que le bleu Trypan ou le propidium (Beebe et al., 2003; Vernier et al., 2003, 2004b; Pakhomov et al., 2004). Rapidement, il est cependant apparu que les impulsions nanosecondes n'épargnaient pas la membrane cytoplasmique. La détection de la perméabilisation nécessite cependant l'utilisation de techniques très sensibles.

1.4.2.1 Et pourtant elle se charge !

Les sondes fluorescentes utilisées avec des impulsions microsecondes ou millisecondes ont été remises à l'épreuve pour les impulsions plus courtes (Frey *et al.*, 2006; Flickinger *et al.*, 2010). Lorsque ces sondes sont utilisées avec des lasers pulsés, il est possible d'obtenir des résolutions temporelles de quelques nanosecondes. Les premiers résultats (Frey *et al.*, 2006) sur cellules Jurkat pendant des impulsions de 100 ns et 9.5 kV/mm montraient une saturation du ΔPTM aux environs de 1,6 V du côté de l'anode. Les résultats plus récents sur des cellules végétales et 500 ns après l'établissement du champ indiquent une saturation du ΔPTM à des valeurs plus faibles, de l'ordre de 300 mV (Flickinger *et al.*, 2010).

Il est difficile de donner des valeurs absolues de potentiel transmembranaire, car il n'est pas possible d'effectuer de calibration dans les mêmes conditions. Les calibrations, en effet, sont faites en statique alors que pendant les impulsions nanosecondes, le ΔPTM n'a pas atteint son régime permanent. Malgré tout, il est possible de conclure de ces expériences que la membrane se charge bien pendant les impulsions nanosecondes.

1.4.2.2 Perméabilisation uniquement aux petites molécules

L'Iodure de Propidium Au vu de la littérature, il apparaît qu'il existe deux modes de pénétration de l'IP. Le première internalisation est immédiate. Elle est très faible, et certainement pas toujours détectée à cause de la trop faible sensibilité des détecteurs. La seconde est plus massive. Elle se produit avec un délai allant de 10 à 40 minutes (Chen *et al.*, 2004; Pakhomova *et al.*, 2011) et traduit certainement la mort cellulaire.

L'internalisation immédiate d'IP peut se faire après l'application d'un seul pulse de 11 ns (Müller *et al.*, 2001) de 16 kV/mm. La quantité internalisée est dépendante du niveau de champ et de la durée de l'impulsion. Même dans les conditions les plus fortes (95 ns et 16 kV/mm), l'internalisation reste bien inférieure à celle des cellules mortes.

Le Tallium et le Yo-pro pénètrent mieux que l'IP Le Tallium apparaît comme étant un marqueur plus sensible (Bowman *et al.*, 2010). Il pénètre à l'intérieur des cellules de façon massive dans des conditions où l'internalisation d'IP n'est pas détectée (Pakhomov *et al.*, 2009). Pour une impulsion de 600 ns, l'internalisation est détectée à partir de 1,4 MV/m et augmente avec le champ. L'ajout de Tallium après application du pulse a de plus permis d'évaluer la durée de vie de la perméabilisation à une dizaine de minutes.

De même, il est possible de détecter une internalisation de Yo-pro dans des conditions où l'IP ne rentre pas (Vernier *et al.*, 2006).

Influx d'eau Des articles ont insisté sur le changement de volume induit par la perméabilisation. Le gonflement de la cellule consécutif à la perméabilisation est dû au déséquilibre osmotique induit par la diffusion des ions. C'est également un des signes premiers de la perméabilisation classique. Il est possible d'empêcher le gonflement en utilisant un milieu extracellulaire contenant des molécules trop grandes pour pouvoir diffuser au travers de la membrane (Nesin *et al.*, 2011). Les polyéthylènes glycols (PEG) sont des molécules pour lesquelles il existe une gamme de poids moléculaires, et dont le rayon est approximativement proportionnel au poids. En utilisant ces molécules dans le milieu extracellulaire, les auteurs évaluent la taille des défauts induits par des impulsions de 60 ou 600 ns à 0,9nm (Nesin *et al.*, 2011). On pourra noter que les mêmes molécules utilisées pour évaluer la taille des pores induits lors de chocs osmotiques purs donnent des tailles de pores très proches : 0,74 nm (Sukhorukov *et al.*, 2009), et également que ces molécules, connues pour leur propriétés fusogènes, ont peut-être une action sur la membrane (Lentz, 1994; Lopez *et al.*, 1988).

1.4.2.3 Changement de conductivité de la membrane cytoplasmique

Patch clamp : Des expériences de patch-clamp en cellule entière après application d'impulsions de 60 ns (Pakhomov *et al.*, 2007) ou 600 ns (Pakhomov *et al.*, 2009) ont permis de détecter un changement de conductivité de la membrane après application des impulsions, même pour des valeurs relativement faibles de champ (maximum 0,5 kV/mm pour les impulsions de 600 ns et 1,3 kV/mm pour les impulsions de 60 ns). Ce changement de conductivité est fonction de l'amplitude et du nombre d'impulsions. Lorsque les cellules récupèrent, le retour à la normale s'effectue typiquement en quelques minutes. L'augmentation de conductivité a été décrite comme asymétrique : le courant entrant est augmenté alors que le courant sortant n'est pas modifié, voire légèrement diminué. Les auteurs émettent l'hypothèse d'une asymétrie structurelle ou fonctionnelle des pores.

Mesures d'impédance : Des mesures d'impédance sur cellules en suspension après l'application de 5 impulsions de 10 ns et 15 kV/mm dans une solution très peu conductrice indiquent une chute de la conductivité cytoplasmique (Garner *et al.*, 2007). Le chute de conductivité dans ces conditions est continue pendant tout le temps d'observation, soit 20 minutes.

Bilan sur le passage des ions : Les impulsions nanosecondes augmentent la conductivité de la membrane. Ainsi les ions peuvent la traverser plus facilement

sous l'effet d'une force électrophorétique. De plus, le gonflement osmotique traduit le fait que des ions diffusent librement au travers de la membrane. Il est remarquable cependant que les ions soient généralement peu ou mal détectés en fluorescence. La plupart des expériences conduites avec des marqueurs fluorescents rapportent des résultats négatifs : pour le calcium et le sodium (Vernier *et al.*, 2003) ou pour le manganèse (Vernier *et al.*, 2004a).

1.4.2.4 Autres actions sur la membrane externe

Parmi les effets bien décrits des nanopulses, se trouve l'externalisation de la phosphatidylsérine (Vernier *et al.*, 2003, 2004b). Elle s'observe à des doses non létales et dépend du nombre d'impulsions, de leur durée et de l'intensité du champ. Elle a été mise en évidence initialement avec 50 impulsions de 7 ns (Vernier *et al.*, 2004b). Elle apparaît immédiatement (5 minutes) et persiste au moins 5h après l'application des pulses. La présence de chélateur de calcium (EGTA) dans le milieu extra-cellulaire n'inhibe pas l'externalisation de PS, donc le mécanisme n'est pas lié à une entrée de calcium extra-cellulaire.

Des expériences menées avec des impulsions plus longues (30 ns) ont permis de visualiser l'externalisation des PS après l'application d'une seule impulsion (Vernier *et al.*, 2004a). L'utilisation de la sonde FM1-43, qui ne nécessite pas de lavage, a permis de faire du suivi sous microscope et ainsi de mettre en évidence que l'externalisation de PS se fait surtout à l'anode et un peu à la cathode. La répartition géométrique est bien visible aux temps courts (2s), mais disparaît au bout d'environ 5 minutes. Ainsi l'externalisation des PS est liée au potentiel transmembranaire. Il est à noter que dans ces conditions, la perméabilisation éventuelle est extrêmement faible, puisque même le manganèse n'est pas internalisé. Cette distribution anode/cathode est également visible avec des impulsions de 4 ns (Vernier *et al.*, 2006).

1.4.2.5 Effet du nombre d'impulsions et de la fréquence de répétition

Très peu d'expériences ont été conduites avec un seul nanopulse, car les effets étaient alors trop faibles pour être détectés. On peut donc en conclure que les effets des nanopulses sont cumulatifs. Contrairement aux impulsions microsecondes (Rols et Teissié, 1998), plusieurs impulsions courtes semblent moins efficaces qu'une longue. Par exemple, l'externalisation de PS se fait à partir de 4 MV/m pour 30 impulsions de 4 ns à 10 Hz contre 2 MV/m pour 4 impulsions de 30 ns à 10 Hz (Vernier *et al.*, 2006). De même, le volume d'une cellule est davantage affecté par 5 impulsions de 600 ns que par 50 de 60 ns (Nesin *et al.*, 2011).

L'effet de la fréquence de répétition n'apparaît pas de façon plus nette qu'avec les impulsions plus longues. Les basses fréquences sont parfois plus efficaces. C'est

ce qui ressort d'expériences de perméabilisation à l'IP avec des impulsions de 60 ns (Pakhomova *et al.*, 2011). L'externalisation des PS induite par des impulsions de 7 ns et 2,5 kV/mm est également plus efficace à basse fréquence de répétition (2 Hz) qu'à fréquence élevée (2 kHz) (Vernier *et al.*, 2004b). A l'inverse, certaines expériences mettent en évidence des tendances opposées. Des impulsions de 4 ns et 8 kV/mm perméabilisent au Yo-PRO, à condition que la fréquence de répétition soit suffisamment élevée : 30 impulsions appliquées à 10Hz ou 100 Hz ne perméabilisent pas, tandis que ces mêmes impulsions perméabilisent lorsqu'elles sont appliquées à 1kHz ou 10kHz (Vernier *et al.*, 2006).

1.4.2.6 Rôle de la conductivité

Très peu d'études ont analysé jusqu'à présent le rôle de la conductivité du milieu. Mueller *et al* ont étudié l'internalisation de l'IP dans des milieux dont la conductivité est comprise entre 1 mS/cm et 5 mS/cm. Ils rapportent que moins le milieu est conducteur, plus l'internalisation est marquée, et ce pour des durées d'impulsion allant de 11 ns à 95 ns (Müller *et al.*, 2001).

Dans un article théorique, les auteurs proposent une quantification des effets des impulsions courtes basée sur l'idée que les effets sont directement liés à la densité de charge qui traverse une cellule (Schoenbach *et al.*, 2009). Aucune étude expérimentale ne permet cependant d'étudier la pertinence de ce modèle.

1.4.2.7 Une perméabilisation mal faite ?

La perméabilisation obtenue par nanopulses pourrait en un sens être qualifiée de moins efficace. On peut noter de nombreux points communs avec la perméabilisation classique : augmentation du Δ PTM, changement de conductivité de la membrane, externalisation de PS, dépendance anode/cathode et perméabilisation aux mêmes molécules. En effet, même si l'internalisation de molécules est plus difficile à détecter, tous les marqueurs de perméabilisation utilisés à ce jour ont finalement donné des résultats positifs. On peut donc légitimement supposer que les impulsions courtes agissent de la même façon sur les membranes.

On peut cependant noter que les limites entre l'apparition de la perméabilisation et la mort cellulaire sont très rapprochées par rapport au cas des micropulses. Ceci peut s'expliquer éventuellement par des paramètres électriques mal ajustés. Une autre hypothèse est qu'avec des impulsions nanosecondes, la mort cellulaire est induite par des effets intracellulaires qui n'existent pas dans le cas des impulsions plus longues.

1.4.3 Effets intracellulaires

Pics calciques intracellulaires Les expériences de détection de pics calciques intracellulaires ont majoritairement été conduites avec des impulsions de 30 ns et 2,5 kV/mm (Vernier *et al.*, 2003). L'application d'une seule impulsion est suffisante pour déclencher un pic. L'utilisation de chélateur de calcium (EGTA), de bloqueurs de canaux calciques (La^{3+} , Ga^{3+} , Verapamil et Ruthenium Red) ou d'inhibiteur des transporteurs calciques mitochondriaux (Cyclosporin A) ne modifie pas les pics calciques obtenus après les impulsions. En revanche, l'utilisation de la Thapsigargin, inhibiteur des transporteurs calciques du réticulum endoplasmique, inhibe de moitié le pic calcique.

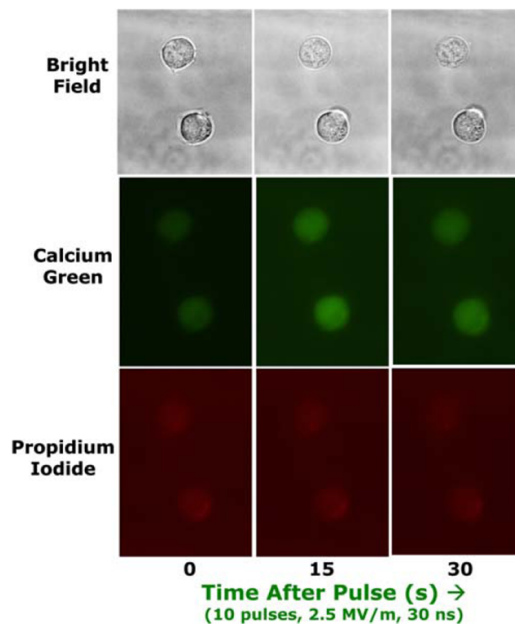


FIG. 1.17 : Observation de la libération de calcium intracellulaire suite à l'application de 10 pulses de 30 ns et 2,5 MV/m. Dans cette même expérience, aucune entrée de propidium n'est détectée. Extrait de Vernier *et al.* (2003)

D'autres expériences utilisant une impulsion de 300 ns montrent également un pic de calcium intracellulaire avec en plus une entrée de calcium extracellulaire (Zhang *et al.*, 2008).

Action sur le noyau Aucun effet sur le noyau n'a été décrit de façon précise. On peut rapporter cependant quelques observations indirectes. Tout d'abord, des mesures d'impédance dans un milieu très peu conducteur et très concentré en cellules permet d'estimer que des impulsions de 10 ns et 15 kV/mm font chuter la conductivité

du noyau des cellules. L'effet est continu pendant au moins 20 minutes après les impulsions (Garner *et al.*, 2007). Par ailleurs, des impulsions de 10 ns et 6,5 kV/mm ont peut-être une action sur l'ADN, car la fluorescence d'un marquage acridine orange (AO) diminue de façon continue pendant au moins 30 minutes après les impulsions (Chen *et al.*, 2004).

1.4.4 Autres observations

D'autres effets rapportés montrent la complexité de l'effet des impulsions ultracourtes. De nombreux effets secondaires à court terme ou à long terme indiquent en effet que les perturbations générées pendant quelques nanosecondes entraînent une cascade de modifications biologiques. Trois exemples sont rapportés ici.

Action sur les canaux membranaires ; non cumulative ? Un seul pulse de 4 ns, 8 kV/mm suffit à générer une augmentation du calcium intracellulaire dans les cellules chromaffin impliquant les canaux calciques 'L-type' (Vernier *et al.*, 2008; Craviso *et al.*, 2009). C'est un des seuls effets rapportés de la littérature qui n'est pas intensifié par l'application de plusieurs pulses (fréquence de 0,5 Hz à 1 kHz). De plus, une période réfractaire d'environ 30s est nécessaire pour qu'un nouveau pic puisse être produit. Le pic calcique généré suffit à stimuler la sécrétion par exocytose de catécholamines. Sa cause est toujours en discussion, mais il a été exclu que ce pic soit généré par de la perméabilisation ou par une libération de calcium intracellulaire. Les hypothèses proposées sont soit un flux de calcium via les canaux à sodium à cause de la dépolarisation de la cellule, soit une activation des canaux à calcium générée par l'influx de sodium qui suit la perméabilisation.

Effet à long terme Les spores bactériennes apparaissent résistantes aux impulsions ultracourtes (Vernier *et al.*, 2004a). Cependant, le temps de germination, habituellement de l'ordre de 8 h, peut être modifié par l'application d'un nombre élevé d'impulsions : un million d'impulsions (150 ns, 5 kV/mm) retardent la germination de 2 à 4 h.

Effets à très long terme L'exposition de graines de *Arabidopsis thaliana* peut dans certains cas stimuler la croissance de la plante (Eing *et al.*, 2009). Alors que dix impulsions de 100 ns et forte intensité (5 kV/mm) tuent les graines, des impulsions de plus bas voltage (0.5 kV/mm) stimulent la croissance au point de doubler la surface des feuilles à 5 et 7 jours (voir figure 1.18).

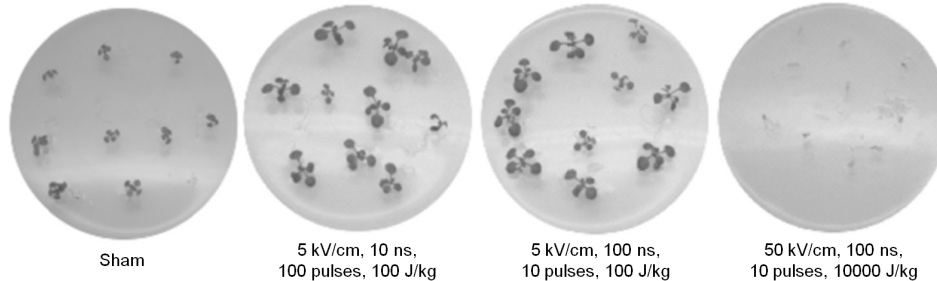


FIG. 1.18 : *Illustration des effets des impulsions nanosecondes sur la croissance des feuilles de Arabidopsis thaliana après exposition des graines. Extrait de Eing et al. (2009)*

1.4.5 Simulation en dynamique moléculaire

Plusieurs groupes utilisent aujourd’hui la dynamique moléculaire pour apporter de nouveaux éléments de compréhension au processus de l’électroporation. De grandes idées communes ressortent des différentes simulations. Tout d’abord, l’ensemble des simulations en dynamique moléculaire s’accordent sur le fait que sous l’effet du champ électrique externe, l’eau interfaciale s’oriente, ce qui donne naissance à un potentiel transmembranaire induit, et ce en l’absence d’ions. La figure 1.19 (Pakhomov *et al.*, 2010, Chap 7) illustre ce phénomène. On remarque en particulier que les têtes chargées des phospholipides ne semblent pas s’orienter immédiatement : le potentiel transmembranaire dû aux phospholipides, en effet, n’est pas modifié en présence du champ électrique. En revanche, l’orientation des molécules d’eau interfaciale modifie fortement le potentiel transmembranaire imposé par l’eau, qui du coup ne compense plus celui des lipides. Il en résulte une différence de potentiel nette entre l’intérieur et l’extérieur de la membrane. Ce phénomène d’orientation est quasiment instantané (environ 8 ps). De ce point de vue, la dynamique moléculaire modélise un phénomène différent de l’électroporation classique. En effet, nous sommes ici en présence d’un pur effet du champ électrique et non d’un effet ionique. C’est ce qui explique, peut-être en partie, pourquoi les champs extérieurs doivent prendre des valeurs aussi élevées. Les valeurs typiques de champ sont en effet de l’ordre du V/nm c’est à dire du GV/m. Des simulations plus récentes incluant les ions (Delemotte *et al.*, 2008) montrent un mécanisme de perméabilisation similaire à celui qui est obtenu lorsque le Δ P_{TM} est généré par un champ seul.

Les différentes simulations en dynamique moléculaire s’accordent par ailleurs sur le fait que la présence d’un potentiel transmembranaire élevé donne naissance à des pores hydrophiles dans la membrane (Tieleman, 2004; Levine et Vernier, 2010; Tarek, 2005). Les diamètres de ces pores vont de quelques nanomètres à une dizaine

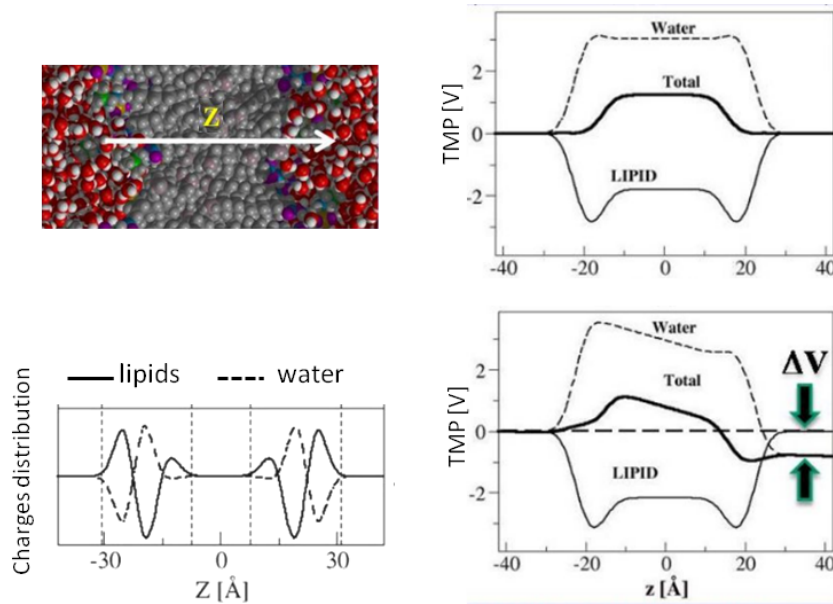


FIG. 1.19 : *A- Echantillon de membrane issu de la simulation en dynamique moléculaire. L'ensemble des atomes est représenté. B- Répartition des charges des lipides et de l'eau le long de la membrane. C- Potentiel électrostatique au travers de la membrane au repos. Les contributions de l'eau et des lipides sont présentées séparément. D- Potentiel électrostatique lorsque la membrane est soumise à un champ extérieur. Extrait de (Pakhomov et al., 2010, Chap 7)*

de nanomètres (Tieleman, 2004). Toutes les simulations présentent l'eau comme acteur principal et premier dans la formation de pores. La création d'un pore commence en effet par l'insertion de quelques molécules d'eau dans la membrane hydrophobe. Autour de ce défaut, le pore va alors croître. La création d'un pore est illustrée par la figure 1.20.

Pour comparer les différentes simulations, il est nécessaire de comparer les potentiels transmembranaires induits. Ceux-ci dépendent à la fois du champ extérieur imposé et de la taille de la boîte de simulation. De manière générale, un champ plus élevé donnera naissance à des pores plus rapidement (Tieleman, 2004; Levine et Vernier, 2010; Tarek, 2005). Les caractéristiques des pores sont les mêmes quel que soit le potentiel transmembranaire. D'après Tieleman, dans des simulations de 150 ns, la création de pores a lieu à partir d'un potentiel transmembranaire de l'ordre de 0,5 V (Tieleman, 2004). Levine, par ailleurs, précise que seule la phase d'initiation des pores est dépendante du champ donc du potentiel transmembranaire. Ainsi, plus une membrane est soumise à un champ élevé, plus le phénomène de poration est rapide. Quelques exemples de durée de la phase d'initiation en fonction du potentiel

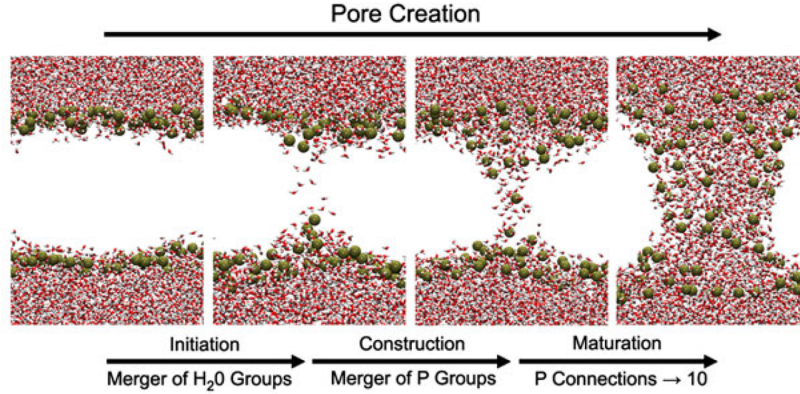


FIG. 1.20 : *Création d'un électropore. Illustration issue de Levine et Vernier (2010). Seules les molécules d'eau et les atomes de phosphate sont représentés. Ces extraits de simulation illustrent les différentes phases de création d'un pore tel que défini par les auteurs. Initiation : apparition de quelques molécules d'eau dans la partie hydrophobe de la membrane. Construction : Réorganisation des têtes des phospholipides dans les deux feuilletés autour du défaut. Maturation : migration supplémentaire de molécules d'eau et de têtes lipidiques.*

transmembranaire et du type de phospholipides sont donnés dans le tableau 1.5. Les délais les plus courts sont de l'ordre de 200 ps pour les DMPC soumis à un ΔPTM de 6 V. Les plus longs sont supérieurs à 15,4 ns pour les DOPC soumis à un ΔPTM de l'ordre de 3 V.

TAB. 1.5 : *Durée de la phase d'initiation des pores selon le potentiel transmembranaire et le type de phospholipides considérés.*

	Tarek (2005)		Levine et Vernier (2010)						
	DMPC		POPC				DOPC		
$\Delta\phi(V)$	3	6	3,2	4,2	5,3	6,3	3,0	3,7	4,4
Time of pore initiation (ns)	1	0.2	9.5	2	0,6	0,4	>15.4	3,9	1,1

1.5 Conclusion

L'électroperméabilisation obtenue par impulsions microsecondes ou millisecondes est la base d'applications abouties dans des domaines aussi variés que la biologie cellu-

laire, la médecine, l'agro-alimentaire. La maîtrise des effets induits sur le vivant à long terme est le gage de la fiabilité et de la sécurité de ces applications. Pour autant, il n'existe pas à ce jour de description précise à l'échelle moléculaire du phénomène d'électroperméabilisation. L'utilisation d'impulsions de quelques nanosecondes ouvre de nouvelles perspectives. La perméabilisation obtenue avec ces impulsions présente de nombreux points communs avec des impulsions plus longues. Les nanopulses constituent en ce sens un nouvel outil pour étudier par exemple la dynamique du processus de perméabilisation. Les picopulses, qui émergent à peine, constitueront peut-être l'étape suivante.

Bien entendu, l'utilisation de champs de plus en plus intenses aboutira nécessairement à l'apparition d'autres phénomènes physiques. L'initiative de l'ensemble des travaux sur les effets des impulsions nanosecondes revient à la communauté des champs pulsés et des plasmas et notamment au Pr Karl Schoenbach. Il est connu de cette communauté que les champs intenses engendrent des non-linéarités dans les gaz, et notamment l'ionisation et l'apparition de l'état plasma. Une comparaison directe entre une cellule biologique et un gaz serait certainement un raccourci considéré de mauvais goût par les biologistes, mais ce type de non-linéarité doit à ce jour être envisagé.

Chapitre 2

Méetrologie et Instrumentation

Lors des travaux sur les effets des impulsions microsecondes sur le vivant, il est vite devenu évident que la qualité des signaux appliqués était une donnée critique pour la compréhension des mécanismes ainsi que pour l'obtention d'effets ciblés et choisis. Preuve en est que les chercheurs travaillant à l'époque sur cette thématique ont été amenés à concevoir des générateurs adaptés (Jouan ou Cliniporator par exemple). L'étude des effets des impulsions nanosecondes (nanopulses ou nsPEF) sur le vivant nécessite un effort encore plus important. Certes, il existe des générateurs déjà performants, mais ils sont rarement dédiés à l'exposition d'objets biologiques. Les premières études ont ainsi été menées avec des générateurs initialement dédiés à la génération de plasma ou bien encore au brouillage électromagnétique, domaines dans lesquels on demande généralement de très hautes cadences de tir mais pas nécessairement une grande reproductibilité d'une impulsion à l'autre. La variabilité biologique étant déjà suffisamment contraignante, il n'est pas envisageable de rajouter de nouvelles composantes fluctuantes. De même que, dans une étude pharmacologique, on fixe précisément les concentrations des molécules utilisées, de même est-il nécessaire, lors de l'étude des effets des impulsions nanosecondes, de fixer amplitude, durée et forme de l'impulsion, surtout si l'on souhaite travailler avec de très faibles nombres d'impulsions. Bien entendu, fixer n'est pas choisir et ce sont les contraintes liées aux phénomènes de propagation et de réflexion qui choisiront souvent à notre place les paramètres électriques.

Dans ce chapitre, quelques fondamentaux d'électricité sont rapidement rappelés. Ils me paraissent utiles pour le lecteur, mais aussi pour un nouvel expérimentateur. La suite de ce chapitre décrit les moyens expérimentaux mis en œuvre au cours de ces travaux, dans le but d'aborder plus sereinement les expériences de biologie.

2.1 Généralités

2.1.1 Nature des signaux traités

Les expériences présentées dans ce travail de thèse ont été essentiellement conduites avec des impulsions monopolaires trapézoïdales de 10 ns. Ce chapitre sera donc essentiellement dédié à ce type d'impulsions, mais la plupart des résultats sont extrapolables à d'autres types de signaux.

La figure 2.1 présente les acquisitions temporelles ainsi que les spectres normalisés de deux impulsions typiques, l'une de 100 μ s (impulsion délivrée par le générateur Cliniporator), et l'autre de 10 ns (impulsion délivrée par le générateur A). On remarque que les deux impulsions ont des formes temporelles très proches, et donc des spectres d'allure similaire mais décalés de quatre décades en fréquence. Cette translation en fréquence induit de nouvelles contraintes expérimentales. En premier lieu, dans la mesure où les longueurs d'ondes deviennent comparables aux distances des montages, il devient nécessaire de prendre en compte les phénomènes de propagation lors de la mise en place des moyens de mesures¹. Par ailleurs, dans la nouvelle gamme de fréquences considérée (1 MHz-1 GHz), les impédances des échantillons biologiques deviennent complexes (au sens mathématique), car les milieux biologiques deviennent diélectriques. Enfin, les éléments parasites introduits par la connectique, habituellement transparents, commencent à intervenir dans cette gamme de fréquence.

2.1.2 Mise en œuvre

2.1.2.1 Banc expérimental

L'utilisation de nanopulses nécessite de soigner les montages et les mesures. La présence de défauts de connectique, un câble mal vissé ou exagérément courbé, sont autant d'éléments qui peuvent déformer de façon importante les signaux. Sur la photo du montage (figure 2.2) on remarquera par exemple que tous les câbles sont des câbles coaxiaux, et que la connectique est parfaitement figée. L'utilisation de fils standards ou de T est interdite.

Le générateur présenté sur la photo du montage provient de la société FID (FID GmbH, Model FPG 10-ISM10, Burbach, Germany). Son impédance de sortie est de 50 Ω . L'échantillon biologique (des cellules en suspension dans une cuvette dans l'exemple présenté) est connecté au moyen de deux plaques de cuivre soudées sur un connecteur N. Ce dispositif extrêmement court permet de limiter les éléments parasites de connectique. Le câble coaxial de liaison a également une impédance caractéristique de 50 Ω afin d'être adapté au générateur. Les moyens de mesures, un

¹On dit que l'approximation des régimes quasi-stationnaires n'est plus valable.

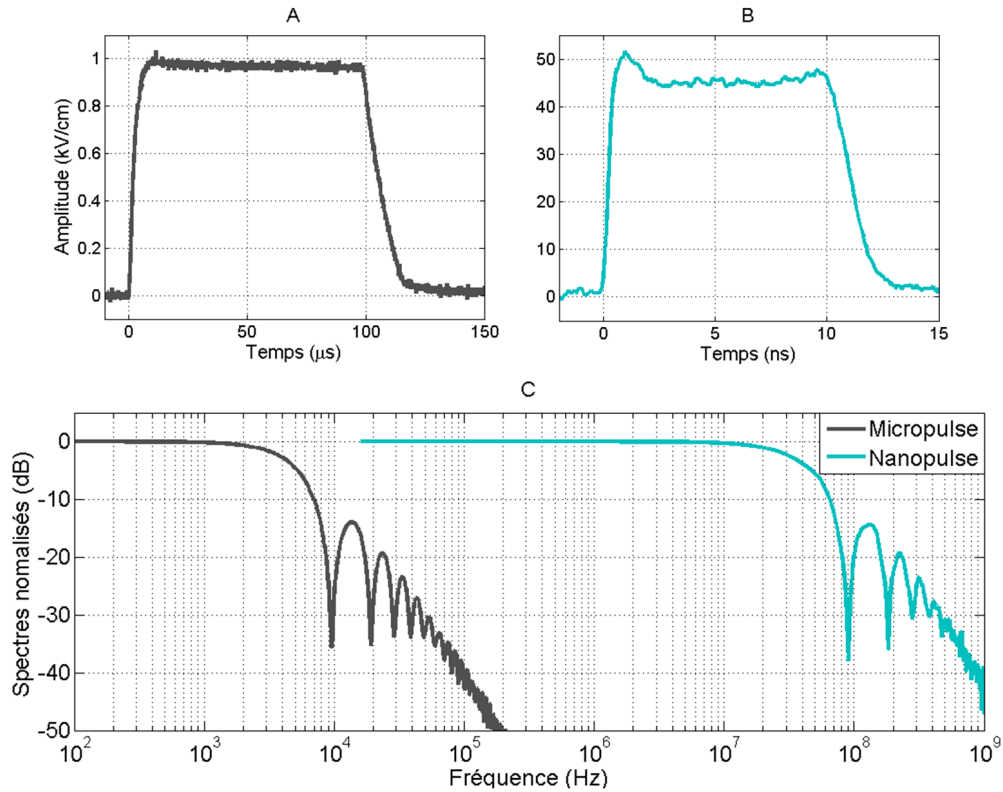


FIG. 2.1 : *A- Allure temporelle d'un micropulse typique de 100 μs délivré par le Cliniporator B- Allure temporelle d'un nanopulse typique de 10 ns délivré par le générateur A C- Spectres normalisés des deux impulsions*

extracteur et une sonde, sont connectés à l'oscilloscope par l'intermédiaire de câbles coaxiaux.

Le schéma de principe de ce montage est présenté sur la figure 2.3. Il permet de mieux comprendre le câblage et le fonctionnement des moyens de mesures. La sonde de tension mesure la tension en un point. Elle ne doit pas en condition normale perturber la mesure. Ceci est vérifié si son impédance d'insertion est grande devant l'impédance de l'échantillon sous mesure. L'extracteur s'insère sur un câble coaxial et prélève une fraction de ce qui transite sur ce câble. Son impédance caractéristique doit être la même que celle du câble.

2.1.2.2 Propagation et réflexions

Les signaux électriques se propagent dans les câbles coaxiaux à une vitesse de $2 \cdot 10^8$ m/s. Il faut donc 5 ns pour parcourir un mètre de câble. Dans l'exemple du mon-

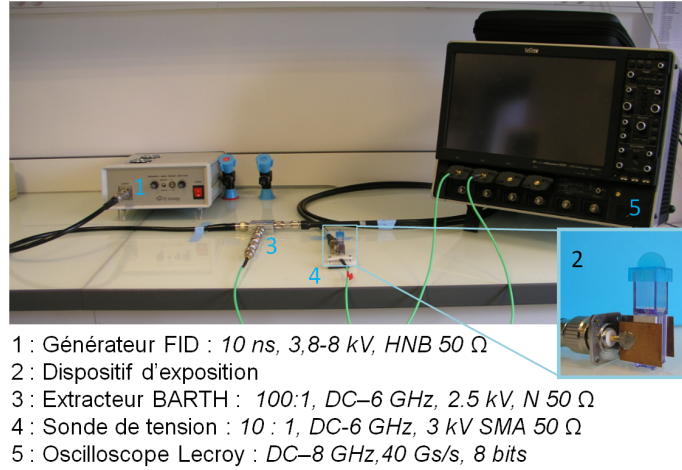


FIG. 2.2 : Photo du banc expérimental

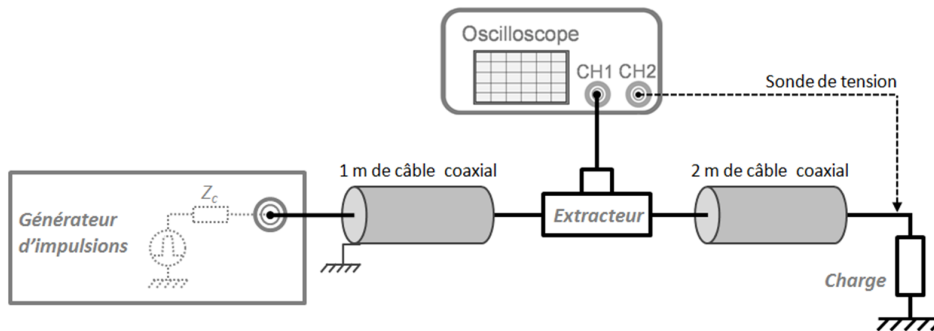


FIG. 2.3 : Schéma du banc expérimental

tage expérimental présenté à la figure 2.2, 3 m de câble séparent le générateur de l'échantillon. Ceci signifie que lorsque le générateur a fini de délivrer l'impulsion de 10 ns, le début de celle-ci n'a pas encore atteint l'échantillon. Lorsque l'impulsion incidente v_i atteint la charge (considérée comme ponctuelle) en bout de câble, elle peut être en partie, voire totalement, réfléchi. La tension réfléchi est notée v_r .

Au niveau de la charge, les tensions incidentes et réfléchies sont synchrones. La tension au niveau de la charge v_{charge} est donc la somme des deux tensions incidente et réfléchi (équation 2.1)

$$v_{charge} = v_i + v_r \quad (2.1)$$

Des mesures effectuées à l'aide d'un extracteur et d'une sonde lors de l'application d'une impulsion sur une charge quelconque non-adaptée sont présentées sur la figure

2.4-A. Le signal issu de l'extracteur, situé à deux mètres de la charge, permet de distinguer l'impulsion incidente v_i de l'impulsion réfléchie v_r . Une durée de 20 ns sépare les deux impulsions, ce qui correspond aux 4 mètres d'aller retour entre l'extracteur et la charge. La somme des tensions incidentes et réfléchies est représentée sur la figure 2.4-B. Elle se superpose à la tension mesurée à la sonde au niveau de la charge.

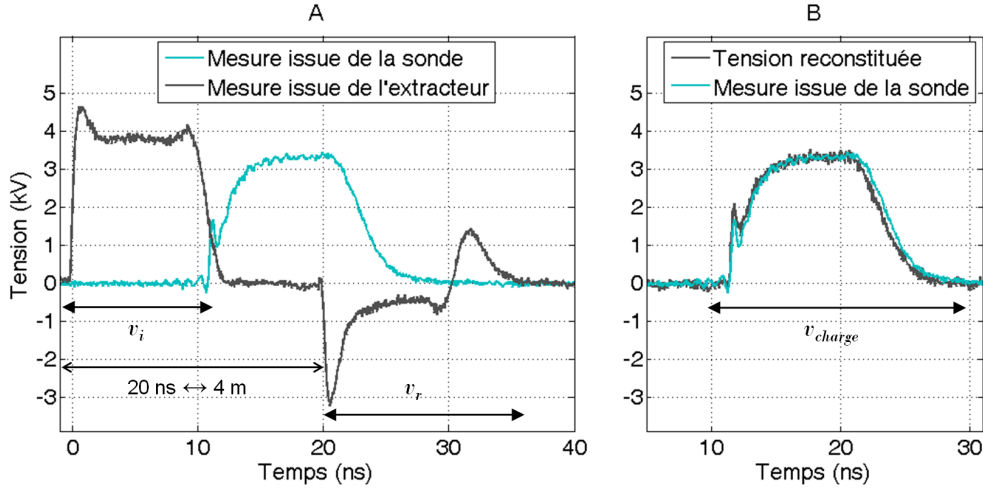


FIG. 2.4 : Exemple de mesures à l'aide d'un extracteur placé 2 m en amont de la charge et d'une sonde de tension au niveau de la charge. Le signal de l'extracteur met en évidence la tension incidente v_i et la tension réfléchie v_r .

Dans la plupart des cas, l'impédance de sortie du générateur est égale à l'impédance caractéristique du câble utilisé pour propager l'impulsion. L'impulsion incidente v_i est alors égale à celle délivrée par le générateur. La fraction de l'impulsion qui sera réfléchi en revanche est définie à la fois par les propriétés du câble (notamment son impédance caractéristique Z_c) et par l'impédance de la charge $Z(\omega)$. Le coefficient de réflexion S_{11} en tension est défini par l'équation 2.2. Il permet de calculer dans le domaine fréquentiel la tension réfléchi V_r à partir de la tension incidente V_i (équation 2.3).

$$S_{11}(\omega) = \frac{Z(\omega) - Z_c}{Z(\omega) + Z_c} \quad (2.2)$$

$$V_r = S_{11}(\omega) \cdot V_i \quad (2.3)$$

L'impédance caractéristique Z_c des câbles est dans la quasi totalité des cas égale à 50Ω (jusqu'à plusieurs GHz, l'impédance caractéristique des câbles est indépendante de la fréquence). Les charges, en revanche, peuvent présenter des impédances très différentes et le plus souvent fonction de la fréquence (nous en

verrons quelques exemples dans la section 2.3.3).

Le cas d'une charge purement résistive se traite simplement à l'aide des équations précédentes. Il est utile de le connaître pour anticiper le comportement de charges plus complexes. Considérons un générateur d'impédance caractéristique $Z_c = 50\Omega$ délivrant un signal sinusoïdal de fréquence ω quelconque sur une résistance R . Les amplitudes des tensions et courants au niveau de la résistance, ainsi que la puissance transmise à la résistance, sont données par les courbes de la figure 2.5. Les trois cas les plus simples sont les suivants :

Cas adapté : $R = Z_c$ Lorsque la résistance est rigoureusement égale à l'impédance caractéristique du générateur, on parle d'adaptation d'impédance. Les coefficients de réflexion en tension et en courant s'annulent. Ainsi, la tension délivrée par le générateur est rigoureusement égale à la tension appliquée. La puissance transmise à l'échantillon est maximale. Aucune onde n'est réfléchiée par la charge. L'utilisation d'une résistance de 50Ω (souvent appelée bouchon 50Ω) permet donc de supprimer toute réflexion et peut s'avérer utile dans certaines conditions expérimentales.

Court-circuit Lorsque la résistance tend vers 0Ω , la tension aux bornes de la résistance tend vers 0, et le courant vers deux fois le courant d'adaptation. La puissance transmise est nulle.

Haute impédance Lorsque la résistance tend vers $+\infty$, la tension aux bornes de la résistance tend vers le double de la tension incidente, et le courant s'annule. La puissance transmise est nulle.

Le cas d'un signal impulsionnel est présenté sur la figure 2.6. Le générateur (impédance de sortie Z_c) délivre une impulsion d'amplitude A .

Cas adapté : $R = Z_c$ La tension aux bornes de la charge est une impulsion d'amplitude A . Aucun signal n'est réfléchi.

Haute impédance L'impulsion est entièrement réfléchiée positivement. La tension aux bornes de la charge a une amplitude de $2A$.

Court-circuit L'impulsion est entièrement réfléchiée négativement. La tension aux bornes de la charge est nulle.

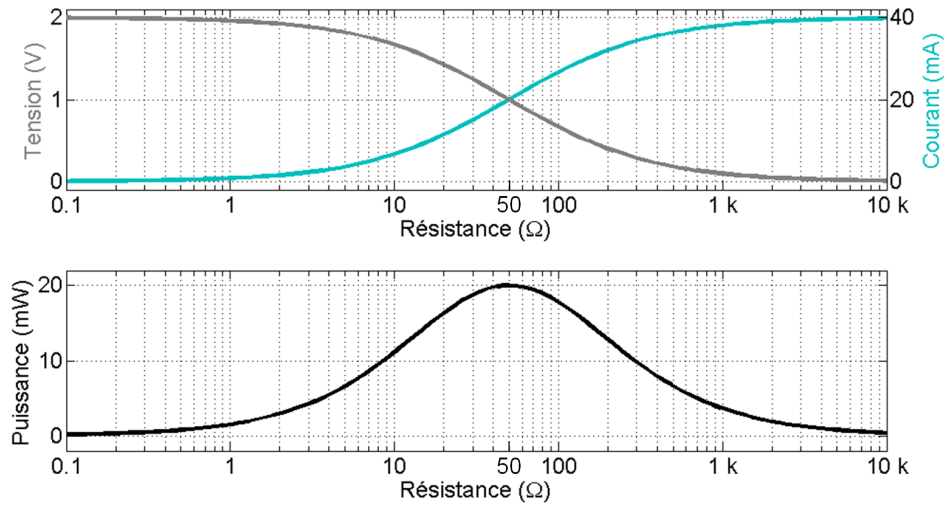


FIG. 2.5 : Tension, courant et puissance dans une résistance connectée à un générateur d'impédance de sortie 50Ω délivrant une tension V_i .

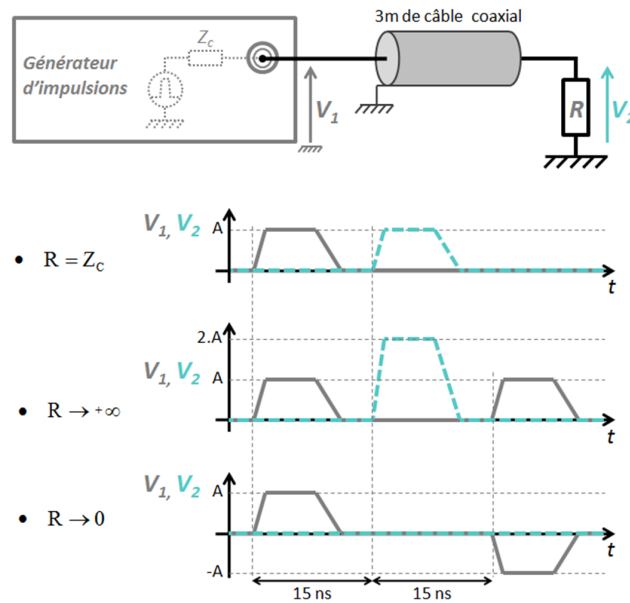


FIG. 2.6 : Application d'une impulsion de 10 ns sur une résistance. Formes d'onde schématiques des tensions. Les trois cas représentés sont l'adaptation, le circuit ouvert et le court-circuit.

2.1.2.3 Rebond secondaire

Lorsque l'impédance de l'échantillon n'est pas égale à l'impédance de sortie du générateur, une partie de l'impulsion incidente est réfléchiée par l'échantillon. La partie de l'impulsion réfléchiée par l'échantillon est renvoyée vers le générateur. Selon le générateur, cette impulsion réfléchiée peut être absorbée (en partie ou totalement) ou à nouveau renvoyée vers l'échantillon. Dans ce dernier cas, l'échantillon biologique sera alors soumis à une seconde impulsion, de plus faible amplitude.

Afin de s'affranchir de ce rebond secondaire, une première possibilité consiste à placer un atténuateur entre le générateur et l'échantillon. L'impulsion principale traversera une fois l'atténuateur et le 'rebond secondaire' encore deux fois avant d'atteindre l'échantillon biologique. Si l'atténuateur est par exemple de -20 dB, le rebond secondaire sera donc atténué d'un facteur 100 supplémentaire par rapport à l'impulsion principale. Cette solution nécessite cependant de pouvoir tolérer que l'impulsion principale soit atténuée. Etant donné les niveaux de tension délivrés par nos générateurs, cette solution n'était pas envisageable, puisque nous utilisons le maximum de la tension délivrée. Une autre solution est d'utiliser un circulateur à trois voies afin de diriger l'impulsion réfléchiée par l'échantillon biologique vers une charge adaptée qui puisse l'absorber. Ce type de dispositif est courant dans le domaine des hyperfréquences, mais son fonctionnement est alors limité à une bande étroite de fréquences et à de faibles niveaux de tensions. Nos requêtes répétées, auprès d'entreprises spécialisées, visant à en faire fabriquer un sur mesure pour un fonctionnement en bande large et en haute tension, n'ont pas abouti. Ainsi, nous n'avons pas pu nous affranchir de ce rebond secondaire. Son amplitude, dans nos conditions de travail, atteignait au maximum 30% de l'impulsion principale. De ce fait, dans la suite des travaux, le rebond secondaire est le plus souvent négligé. Lorsque sa valeur est importante, il sera mentionné.

2.2 Développement d'une métrologie adaptée

2.2.1 Les besoins

Pour générer des champs suffisamment intenses, les tensions manipulées peuvent aller jusqu'à 10 kV. Les courants associés peuvent atteindre la centaine d'ampères, et cela avec des temps de montée inférieurs à la nanoseconde. La mesure de tels signaux n'est le plus souvent pas possible car le matériel adéquat n'est pas disponible commercialement. Le laboratoire a pu cependant s'équiper d'un certain nombre de moyens de mesure. Leurs caractéristiques et leurs limites sont détaillées ci-dessous.

Sonde de tension Lecroy (Lecroy PMK 14KVAC, 1000:1, 100 MHz)

Cette sonde est dédiée aux hautes tensions et peut supporter jusqu'à 40 kV en impulsionnel. C'est donc une sonde robuste qui ne risque pas d'être endommagée. Son atténuation est de 1000. Son impédance d'insertion de $1\text{ M}\Omega$ permet de ne pas perturber la mesure. Sa limitation principale est liée à sa bande passante (100 MHz), à peine suffisante pour nos applications.

Sonde de tension Barth (Barth Electronics, INC, model: 2440 – 6 GHz, 10:1)

Cette sonde, de très faible encombrement, a une bande passante de 1 GHz. Elle est destinée à la mesure de hautes tensions impulsionnelles. En terme de tenue en tension, les constructeurs la garantissent pour 4 kV sur 400 ns, ce qui permet de mesurer des tensions légèrement plus hautes sur des temps plus courts. Sa limitation principale est liée à son impédance d'insertion de $500\ \Omega$, qui est un peu faible puisqu'il nous arrive de travailler avec des charges d'environ $200\ \Omega$.

Extracteur Barth (ref Barth Electronics, INC, Model: 245-NM FFP – 100, 2.5 kV/400 ns TAP-OFF 100/1)

C'est de loin le moyen de mesure le plus confortable à utiliser. En effet, il s'insère proprement et de façon figée dans les câbles reliant le générateur à la charge, et ne perturbe pas le système. Cependant, il n'est utilisable que sur des câbles $50\ \Omega$, avec des connectiques de type N. Par ailleurs, sa tenue en tension est limitée et en particulier, le travail à haute cadence peut l'endommager. Il permet donc de faire des mesures préalables, mais ne peut pas rester en permanence lors des expériences biologiques. Enfin, la mesure à l'extracteur est une mesure indirecte, qui donne une image de la réflexion sur un système mais ne permet pas d'avoir une mesure directe de la tension appliquée au niveau de l'échantillon.

Il est ainsi vite apparu nécessaire de mettre en œuvre une métrologie dédiée, afin de pouvoir faire des mesures fiables et de façon systématique. Ainsi, un capteur de champ de type D-dot a été développé et implanté dans tous nos systèmes d'exposition. Par la suite, dans le but d'étudier la part de la densité de courant sur l'obtention d'effets sur le vivant, un capteur de courant de type B-dot a également été développé et implanté dans nos systèmes d'exposition.

2.2.2 Capteur de Champ : D-dot

2.2.2.1 Principe du capteur

Les capteurs de type D-dot sont largement utilisés dans les communautés travaillant avec des champs rayonnés (Burkhart, 1985; Gajda et Stuchly, 1983). Ces capteurs passifs, d'une remarquable simplicité, sont particulièrement adaptés à la mesure de variations rapides de champs puisqu'ils mesurent la dérivée du champ par rapport

au temps. Physiquement, un D-dot est constitué d'un câble coaxial ouvert monté à ras sur l'électrode de masse (figure 2.7). L'âme du câble coaxial lorsqu'elle est immergée dans un champ électrique va se charger avec une charge Q proportionnelle au champ électrique. Lorsque le câble est connecté à une résistance (par exemple la résistance de $50\ \Omega$ d'entrée de l'oscilloscope), le courant résultant étant proportionnel à la dérivée de la charge, il sera l'image de la dérivée du champ électrique.

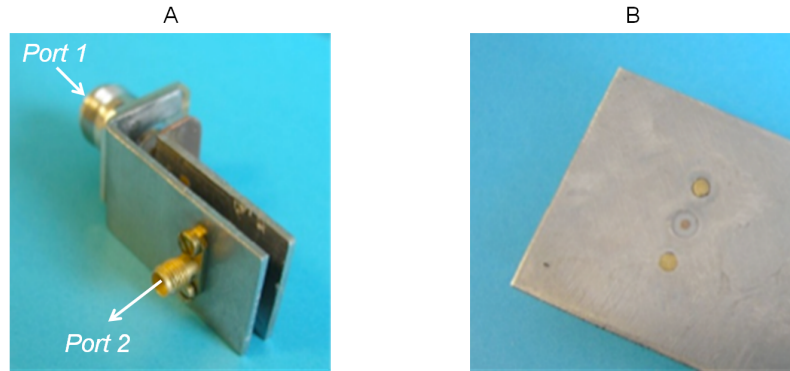


FIG. 2.7 : A- Système d'exposition constitué de deux électrodes en acier inoxydable. Un D-dot a été inséré dans l'électrode de masse. B- Zoom sur le détail du D-dot : un embout coaxial est monté à ras dans l'électrode de masse.

2.2.2.2 Réalisation et calibrations

Le capteur est réalisé avec un connecteur de type SMA haute tension (Radiall R124 464 273), qui peut être facilement inséré dans une électrode et coupé à ras. La masse du connecteur est soudée ou vissée à l'électrode de masse selon que celle-ci est réalisée en cuivre ou en acier inoxydable. La calibration du capteur a été effectuée sur un analyseur de réseaux (Agilent E5070B). Elle consiste en la mesure du couplage S_{12} entre l'entrée du système d'exposition et la sortie du capteur, respectivement notées port 1 et port 2 (figure 2.7). Lorsque la mesure est effectuée en utilisant un bouchon d'adaptation ($50\ \Omega$) entre les deux électrodes d'exposition, le champ électrique E est égal à la tension injectée $V_{injecte}$ divisée par la distance inter-électrodes d . La relation entre le champ E et la tension provenant du capteur V_{D-dot} est donc donnée par 2.4.

$$\frac{E}{V_{D-dot}} = \frac{V_{injecte}}{d \cdot V_{D-dot}} = \frac{1}{d} \cdot S_{12_50\Omega} \quad (2.4)$$

Quand les électrodes sont laissées en circuit ouvert (CO), la tension entre les électrodes est le double de la tension injectée (2.5).

$$\frac{E}{V_{D-dot}} = \frac{2.V_{injecte}}{d.V_{D-dot}} = \frac{2}{d}.S_{12_CO} \quad (2.5)$$

La fonction de transfert liant le champ à la tension du capteur devant être constante, l'équation 2.6 doit être vérifiée expérimentalement.

$$S_{12_50\Omega} = 2.S_{12_CO} \quad (2.6)$$

Les mesures de $S_{12_50\Omega}$ et S_{12_CO} sont présentées sur la figure 2.8. On retrouve bien deux droites avec des pentes de +20 dB par décade, typiques d'un comportement dérivateur. On retrouve également le décalage de 6 dB entre les deux courbes de calibration conformément à l'équation 2.6.

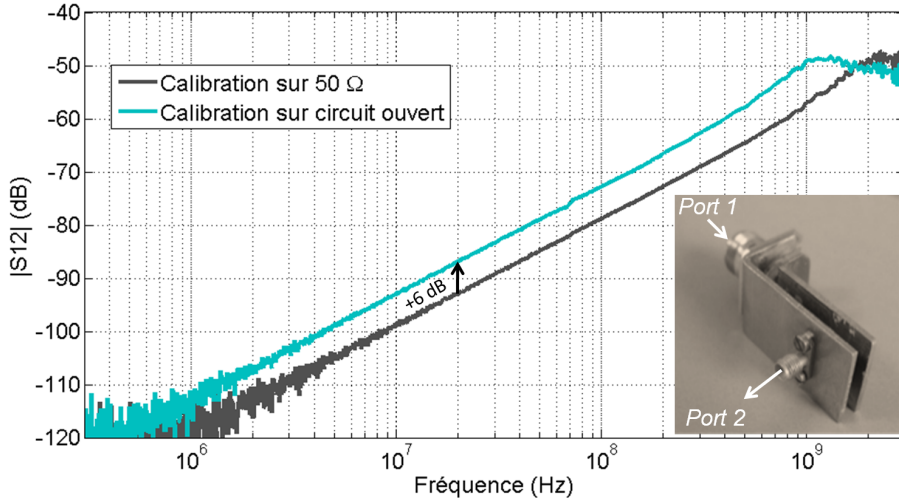


FIG. 2.8 : Courbes de calibration du capteur de champ D -dot. La calibration est effectuée soit sur charge adaptée (50Ω) soit en CO .

Un peu au delà de 1 GHz, les courbes de calibration ne suivent plus une pente régulière de +20 dB/décade. Ceci n'est pas une limite du capteur, mais la limite du système d'exposition lui même. A partir du GHz, en effet, les éléments parasites de la connectique commencent à intervenir et la tension sur les électrodes planes n'est plus égale à la tension injectée dans le connecteur. En simulation, nous estimons la limite du capteur à environ 20 GHz (la simulation par éléments finis réalisée grâce au logiciel COMSOL peut être trouvée dans Silve *et al.* (2010), annexe C). La bande passante de ce capteur est donc bien adaptée aux signaux utilisés au cours de ces travaux.

2.2.2.3 Validation dans le domaine temporel

La validation de la calibration du capteur a été effectuée dans le domaine temporel directement en utilisant des nanopulses. Le montage est présenté sur la figure 2.9. Le dispositif d'exposition muni du D-dot est relié au générateur FID au moyen d'un câble coaxial. Un extracteur est placé sur le câble coaxial à deux mètres du système d'exposition. Aucune charge n'est placée entre les deux électrodes.

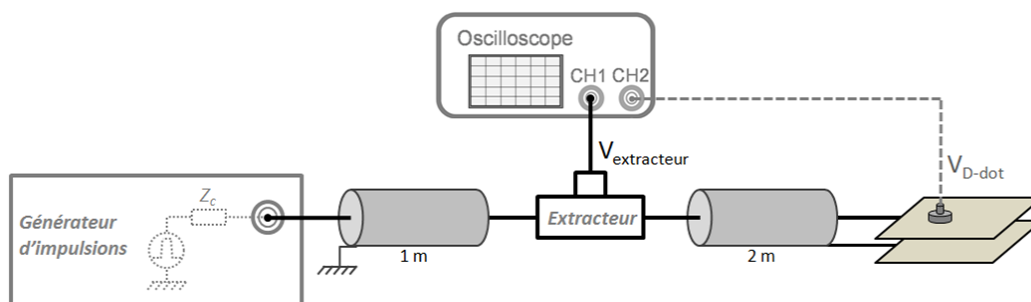


FIG. 2.9 : Schéma du montage réalisé pour la validation du D-dot dans le domaine temporel.

Lorsqu'un nanopulse est délivré dans cette configuration, les signaux de l'extracteur et du capteur sont ceux présentés sur la figure 2.10-A. Sur le signal de l'extracteur, on observe l'impulsion générée par le nanopulseur se propageant vers les électrodes, suivie de la réflexion totale qui a lieu au niveau des électrodes qui sont en circuit-ouvert. La somme de ces deux impulsions en phase correspond à la tension appliquée réellement sur les électrodes et permet, connaissant la distance inter-électrodes (7 mm dans ce cas), de remonter au champ électrique. Le champ ainsi estimé est superposé à celui obtenu par intégration du signal D-dot sur la figure 2.10-B. Les deux mesures sont parfaitement superposées au niveau des fronts de montée et descente, ce qui confirme la pertinence de ce type de capteur dérivatif pour la mesure de variations rapides de champ électrique. En revanche, on commet une légère erreur dans les paliers, qui sont intrinsèquement plus perturbés par le bruit de mesure.

2.2.2.4 Conclusion sur le capteur de champ électrique

Ce type de capteur présente le grand avantage d'être robuste et facile à implanter dans nos géométries. La bande passante de ces capteurs est liée au diamètre de l'embout coaxial utilisé. Dans notre cas, les connecteurs coaxiaux choisis ont un diamètre suffisamment large pour être manipulés facilement et suffisamment étroit pour que la fréquence de coupure soit au delà du contenu spectral des impulsions

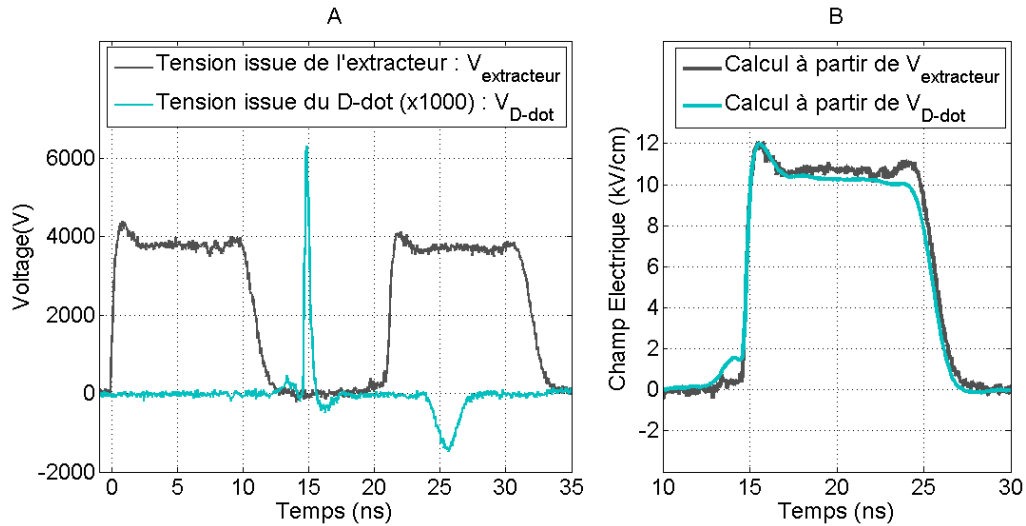


FIG. 2.10 : Courbes expérimentales de validation du D-dot dans le domaine temporel. L'écartement entre les électrodes est de 7mm. A- Signaux mesurés provenant de l'extracteur et du D-dot. B- Evaluation du champ électrique d'après les mesures de l'extracteur et du D-dot.

à étudier. Grâce à une calibration précise, il est possible de remonter à des valeurs exactes du champ électrique. Les hautes fréquences, notamment, seront très précisément décrites puisqu'elles sont peu atténuées.

En dehors de servir à la mesure, les capteurs D-dot sont utilisés comme moyen de contrôle systématique pendant les expériences. En effet, ils peuvent mesurer un nombre illimité d'impulsions et ce quel que soit l'amplitude ou la fréquence de répétition. Cela permet de garantir par exemple que l'ensemble des impulsions a bien été délivré et qu'il n'y a pas eu de claquage.

2.2.3 Capteur de courant : B-dot

2.2.3.1 Principe du capteur

Les capteurs de type B-dot consistent en une simple boucle captant une partie du champ magnétique B (Piejak *et al.*, 2001). Un exemple de réalisation est présenté sur la figure 2.11. En fonction de la gamme de fréquences, ce type de capteur produit un signal proportionnel à la dérivée du courant ou proportionnel au courant. La fréquence de transition entre ces deux régimes dépend de l'inductance de la boucle qui constitue le capteur (Reed Edgel, 1980).

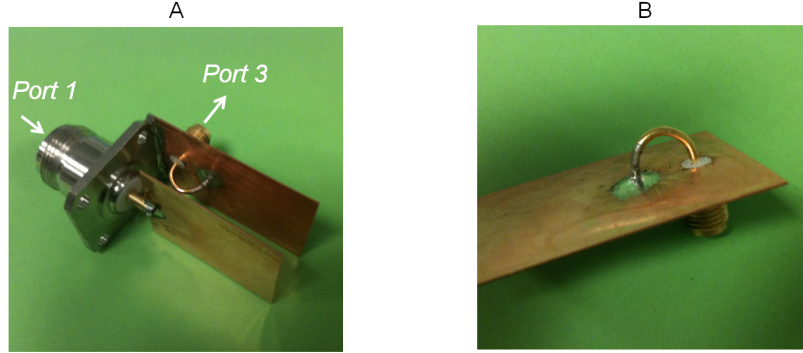


FIG. 2.11 : A-Systeme d'exposition constitué de deux électrodes en cuivre. Un B-dot a été inséré dans l'électrode de masse. B- Zoom sur le détail du B-dot.

2.2.3.2 Calibration

Le protocole de calibration du capteur est similaire à celui présenté pour le D-dot. On mesure à l'analyseur de réseaux le couplage S_{13} entre le port 1 entrée du système d'exposition et le port 3, sortie du capteur de courant (figure 2.11). Lorsque la mesure est effectuée en utilisant un bouchon d'adaptation (50Ω) entre les deux électrodes d'exposition, le courant est égal à la tension injectée $V_{injecte}$ divisée par 50Ω . La fonction de transfert liant le courant à la tension du capteur V_{B-dot} est donnée par l'équation 2.7.

$$\frac{I}{V_{B-dot}} = \frac{V_{injecte}}{50 \cdot V_{B-dot}} = \frac{1}{50} \cdot S_{13_50\Omega} \quad (2.7)$$

Si les électrodes sont court-circuitées (CC), la tension sur les électrodes s'annule et le courant est le double du courant dans une charge adaptée. La fonction de transfert est donnée par l'équation 2.8.

$$\frac{I}{V_{B-dot}} = \frac{2 \cdot V_{injecte}}{50 \cdot V_{B-dot}} = \frac{2}{50} \cdot S_{13_CC} \quad (2.8)$$

L'unicité de la fonction de transfert liant le courant à la tension du capteur aboutit à l'équation 2.9.

$$S_{13_50\Omega} = 2 \cdot S_{13_CC} \quad (2.9)$$

Les mesures de $S_{13_50\Omega}$ et S_{13_CO} sont présentées sur la figure 2.12. A nouveau, on trouve deux droites de pente $+20$ dB par décade décalées de 6 dB. Le capteur dans cette gamme de fréquence a donc un comportement dérivatif. Son atténuation intrinsèque est moins importante que l'atténuation du D-dot.

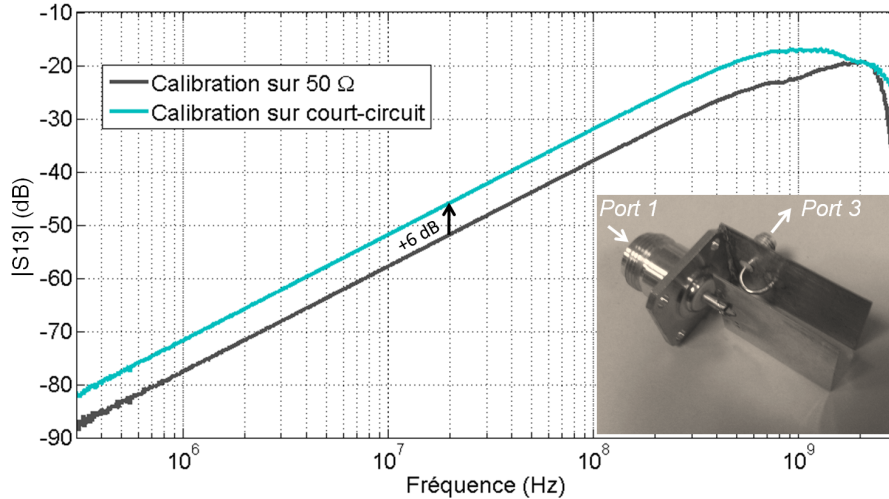


FIG. 2.12 : Courbes de calibration du capteur de courant B-dot. La calibration est effectuée soit sur charge adaptée (50Ω) soit en court-circuit.

2.2.3.3 Validation dans le domaine temporel

La validation dans le domaine temporel est effectuée sur un bouchon 50Ω dans un dispositif muni des deux capteurs D-dot et B-dot (figures 2.13 et 2.14).

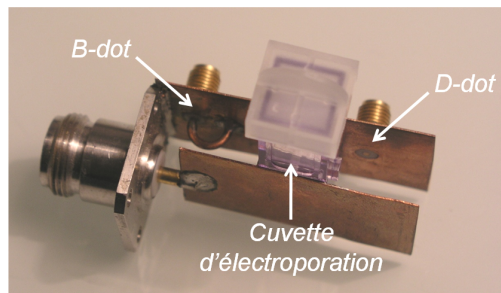


FIG. 2.13 : Photo du dispositif muni d'un capteur D-dot et d'un capteur B-dot.

La tension et le courant au niveau de la charge sont évalués d'après les mesures des capteurs (figure 2.15). La tension et le courant ont des formes trapézoïdales. Le rapport tension sur courant obtenu au niveau du plateau est de 52Ω , proche de la valeur théorique de 50Ω . Ainsi, le B-dot peut être utilisé pour évaluer les courants pour les impulsions délivrées par le générateur FID.

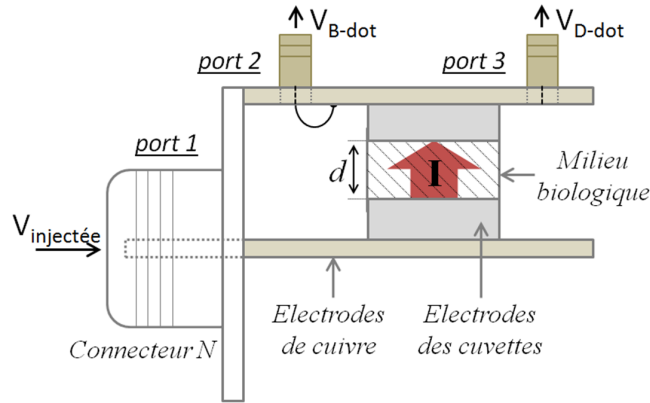


FIG. 2.14 : Schéma de principe du dispositif muni d'un capteur D-dot et d'un capteur B-dot.

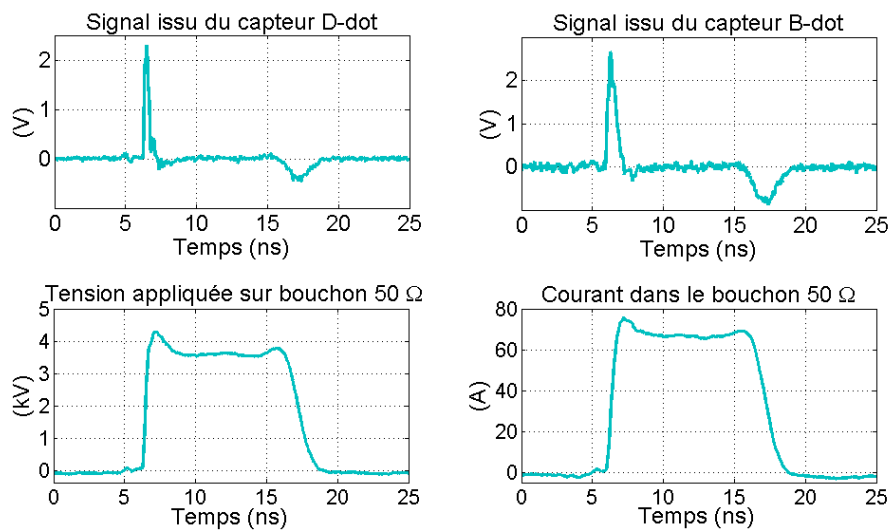


FIG. 2.15 : Haut : signaux des capteurs D-dot et B-dot lors de l'application d'une impulsion de 10 ns sur une résistance de 50 Ω. Bas : tension appliquée et courant dans la résistance.

2.2.3.4 Conclusion sur le capteur de courant

Ce type de capteur est bien adapté à nos signaux. Il permet de mesurer des courants élevés avec des dynamiques très rapides. De plus, il ne perturbe pas le système dans lequel il s'insère. C'est grâce à ce capteur que les courants circulant dans les cuvettes d'électroporation ont pu être mesurés.

2.3 Étude de la possibilité d'exposer des cellules en suspension.

2.3.1 Nature des charges d'un point de vue électrique

De manière générale, l'impédance (ou la charge) d'un objet biologique est fixée à la fois par sa géométrie et par ses propriétés électriques intrinsèques. Pour exposer des nombres importants de cellules, nous avons utilisé les cuvettes d'électroporation classiques, qui présentent l'avantage d'être disponibles en grand nombre et facilement stérilisables. Par ailleurs, les électrodes biplans garantissent un champ appliqué relativement uniforme sur l'ensemble des cellules. Un exemple de géométrie est donné sur la figure 2.16. On note d la distance inter-électrodes et S la surface des électrodes. Les propriétés électriques de nos échantillons sont celles des milieux biologiques. Ce sont des milieux aqueux et plus ou moins ioniques. Jusqu'à plusieurs GHz, ils sont caractérisés par une conductivité σ et une permittivité relative ε toutes deux indépendantes de la fréquence.

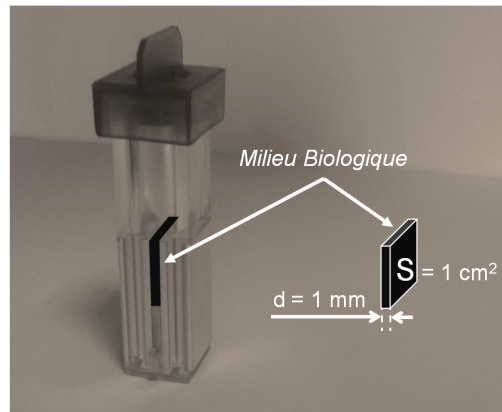


FIG. 2.16 : Cuvette d'électroporation classique.

2.3.2 Limites intrinsèques des milieux

Le modèle électrique le plus simple associé à un milieu biologique est une résistance R_{milieu} (2.10) en parallèle d'un condensateur C_{milieu} (2.11).

$$R_{milieu} = \frac{1}{\sigma} \frac{d}{S} \quad (2.10)$$

$$C_{milieu} = \varepsilon \varepsilon_0 \frac{S}{d} \quad (2.11)$$

Si l' on considère un dispositif d' exposition parfait, la charge présentée par un liquide biologique Z_{milieu} est donnée par l'équation 2.12.

$$Z_{milieu} = \frac{d}{S.(\sigma + j\omega\varepsilon\varepsilon_0)} \quad (2.12)$$

Pour un ensemble générateur/câble d'impédance caractéristique Z_c fixée, la fonction de transfert donnant la tension appliquée $V_{appliquée}$ en fonction de la tension incidente $V_{incidente}$ est donnée par l'équation 2.13 (obtenue en utilisant les équations 2.1, 2.2, 2.3).

$$\frac{V_{appliquée}}{V_{incidente}} = 1 + S_{11} = \frac{2.Z_{milieu}(\omega)}{Z_{milieu}(\omega) + Z_c} \quad (2.13)$$

En utilisant l'expression de Z_{milieu} , la fonction de transfert peut s'explicitier comme un filtre passe bas du premier ordre (équation 2.14).

$$\frac{V_{appliquée}}{V_{incidente}} = \frac{K}{1 + j.\omega.\tau_c} \quad (2.14)$$

$$\text{avec } K = \frac{2}{1 + \frac{Z_c.S.\sigma}{d}}$$

$$\text{et } \tau_c = \frac{\varepsilon.\varepsilon_0.\frac{Z_c.S}{d}}{1 + \frac{Z_c.S.\sigma}{d}}$$

La fréquence de coupure et le gain statique de ce filtre dépendent à la fois du milieu et de l'impédance caractéristique de l'ensemble câble/générateur. Les propriétés des milieux étant figées, nous avons évalué l'influence du générateur. Nous avons pour cela tracé l'évolution du gain statique et de la constante de temps en fonction de la conductivité du milieu pour trois valeurs d'impédance caractéristique (figure 2.17). La permittivité relative ε est fixée à 80 (celle de l'eau) et la géométrie de la cuvette à $d = 1 \text{ mm}$ et $S = 1 \text{ cm}^2$.

Pour une conductivité donnée, il apparaît ainsi que plus l'impédance du générateur est faible et plus la tension appliquée sera importante. Par ailleurs, la constante de temps diminue avec l'impédance caractéristique. Ainsi, un générateur de faible impédance de sortie permet d'appliquer des impulsions plus raides sur un milieu biologique. Afin de vérifier ce dernier point, une simulation a été effectuée. On considère un générateur délivrant soit une impulsion trapézoïdale (largeur à mi-hauteur 10 ns ; temps de montée 1 ns) soit une impulsion identique à celle du générateur A. On choisit une impédance caractéristique du générateur égale à 15 Ω , 50 Ω ou 100 Ω et un milieu tel que R_{milieu} soit égale à l'impédance caractéristique, afin de conserver un gain statique unitaire dans les trois cas (cas indiqués par des croix sur la figure 2.17). Cette simulation confirme que plus l'impédance caractéristique est faible, plus le milieu biologique peut être exposé à des fronts raides (figure 2.18).

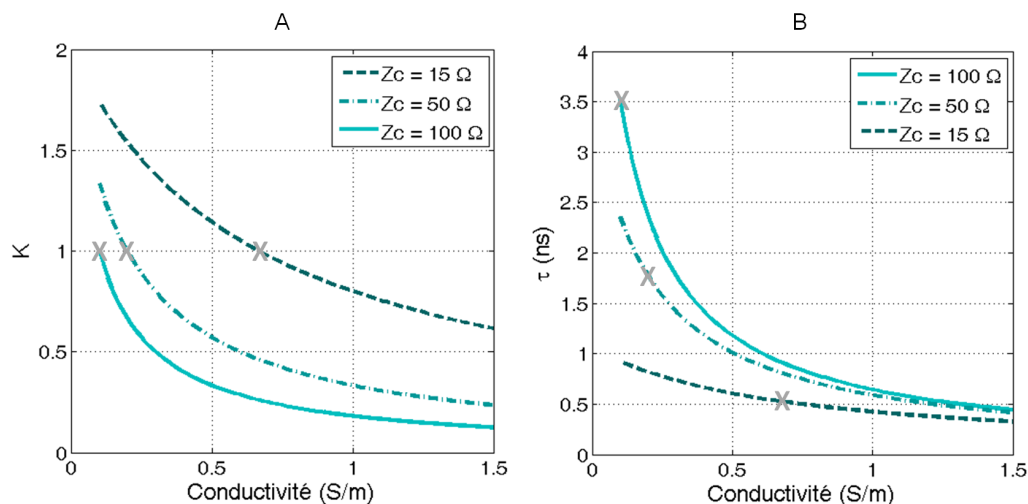


FIG. 2.17 : Évolution du gain K (A) et de la constante de temps τ (B) de la fonction de transfert associée à une cuvette d'électroporation de distance inter-électrodes 1 mm contenant 100 μL de milieu. Les courbes sont tracées en fonction de la conductivité du milieu et pour différentes impédances de générateur. La permittivité est fixée à 80.

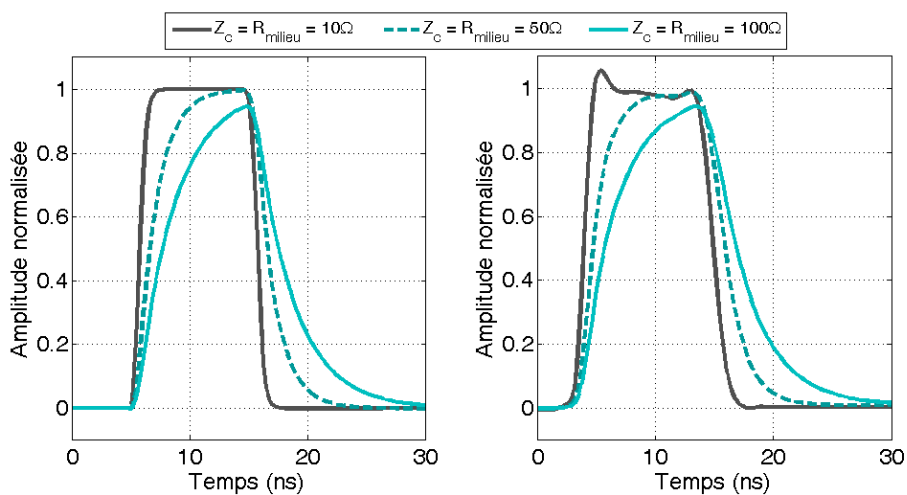


FIG. 2.18 : Simulation de l'influence de l'impédance caractéristique sur le temps de montée. La résistance du milieu est prise égale à l'impédance caractéristique. A-cas d'un trapèze parfait, B-cas d'une impulsion réelle.

2.3.3 Mesure d'impédance réelle

Afin de caractériser les charges réelles, des mesures d'impédance ont été effectuées. On considère des cuvettes de 1 mm (MBP, Molecular Bioproduct, Dutcher) con-

tenant $100 \mu\text{L}$ d'un milieu biologique. Les milieux utilisés sont du SMEM (conductivité $1,5 \text{ S/m}$), du STM (conductivité $0,1 \text{ S/m}$) ou un mélange des deux milieux. La cuvette est placée dans le dispositif d'exposition.

La caractérisation sur une large bande de fréquences nécessite la concaténation des mesures de deux appareils. Un analyseur d'impédance (HP4194A) permet d'obtenir directement l'impédance dans la gamme $[100 \text{ Hz}; 10 \text{ MHz}]$. Par ailleurs, l'impédance sur la gamme $[300 \text{ kHz}; 3 \text{ GHz}]$ peut être déduite du coefficient de réflexion S_{11} fourni par un analyseur de réseau (Agilent E5070B). Les deux appareils sont compensés afin de fixer le plan de référence à l'entrée du connecteur N (voir photo sur la figure 2.19). Quatre mesures correspondant à quatre milieux de conductivités différentes sont présentées sur la figure 2.19. De ces mesures il est possible de dégager trois zones distinctes notées A, B et C sur la figure.

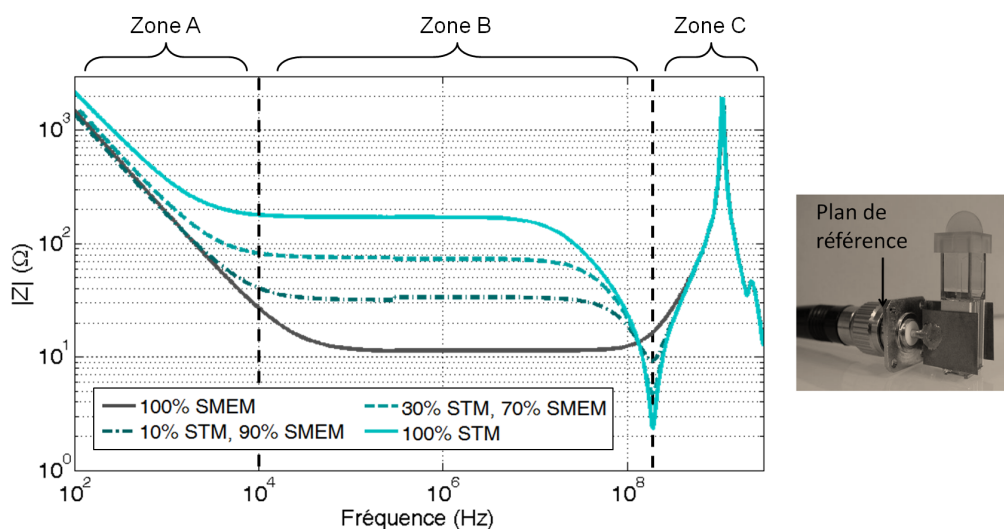


FIG. 2.19 : Mesures d'impédance de cuvettes contenant $100 \mu\text{L}$ de différents milieux biologiques. Le porte cuvette est inclus dans les mesures.

Zone A A basse fréquence (en deçà de 10 kHz), les impédances des cuvettes sont capacitives. Ce comportement est connu et lié aux effets électrochimiques. Aux interfaces électrode/milieu, en effet, les excès de charges sur les électrodes sont contrés par une couche d'ions s'accumulant à la surface. L'équivalent de cette double couche en terme de circuit électrique est un condensateur modulé par un coefficient de Cole-Cole (Martin *et al.*, 2008; Ivorra *et al.*, 2005) qui permet de rendre compte de l'état de surface des électrodes. En première approximation, on peut cependant modéliser ce domaine à l'aide d'un simple condensateur.

Zone B Dans la zone centrale, l'impédance est imposée par les milieux biologiques. On observe dans un premier temps un plateau puis une chute capacitive qui correspondent respectivement aux propriétés conductrice et diélectrique des milieux.

Zone C A plus haute fréquence (au delà de 200 MHz), l'impédance est imposée par les défauts de connectique. On peut remarquer notamment un fort comportement inductif.

2.3.4 Détermination d'un modèle électrique équivalent

Les éléments électriques du modèle équivalent peuvent être choisis d'après l'analyse présentée ci-dessus. Ils sont représentés sur la figure 2.20-A. Les interfaces électrodes/milieu sont modélisées par des condensateurs $2 \times C_{ec}$. Le milieu biologique est modélisé par une résistance R_{milieu} , qui traduit le caractère ionique de la solution, en parallèle d'un condensateur C_{milieu} , qui traduit son caractère diélectrique. Les éléments parasites sont : des inductances $0,5 \times L_p$ liées à la boucle de courant naturellement présente dans cette géométrie, des résistances $0,5 \times R_p$ dues aux imperfections des matériaux, et un condensateur C_p introduit par la sortie du connecteur N. Le modèle électrique équivalent réduit est présenté sur la figure 2.20-B. Les tensions aux bornes de la charge globale V_{charge} et aux bornes de la cuvette $V_{cuvette}$ sont fléchées sur ce schéma. Les valeurs des composants permettant de faire concorder le modèle avec les mesures sont données dans les tableaux 2.1.

TAB. 2.1 : *Eléments du modèle électrique équivalent d'une cuvette contenant 100 μ L de différents milieux.*

Milieu	100%	10% SMEM	30% SMEM	100%
Biologique	SMEM	90 % STM	70 % STM	STM
R_{milieu}	11 Ω	33 Ω	71 Ω	170 Ω

C_{milieu}	R_p	L_p	C_p	C_{ec}
42 pF	0,8 Ω	16 nH	1,45 pF	0,7 μ F

La superposition des mesures aux modèles est représentée sur la figure 2.21. Il apparaît globalement une très bonne correspondance entre les mesures et le modèle. On pourra noter cependant des différences aux très basses fréquences liées au fait que les interfaces électrodes/solution nécessitent une modélisation plus complexe qu'un simple condensateur. Cette gamme de l'impédance n'affectant pas les impulsions nanosecondes dont le spectre est bien plus haut en fréquence, il n'apparaît pas utile

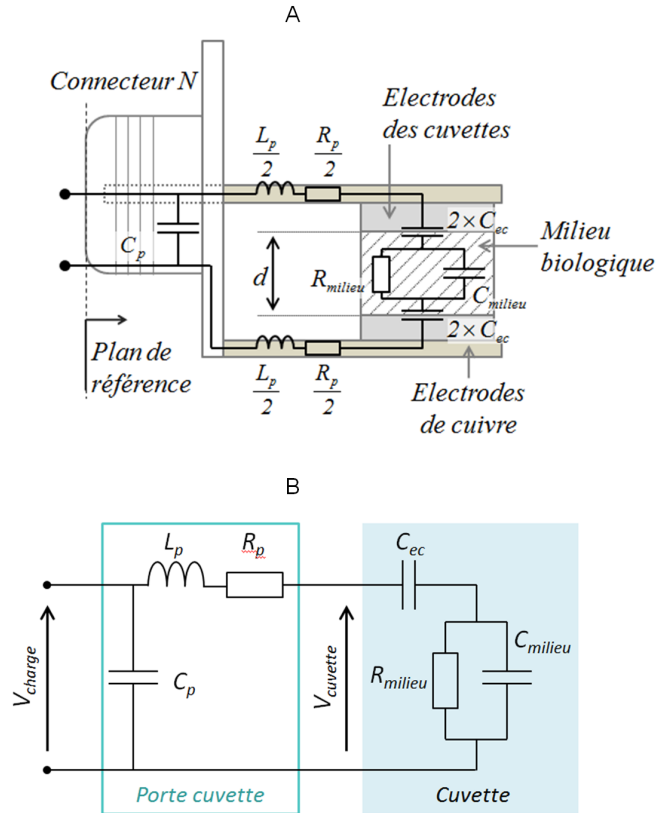


FIG. 2.20 : (A) Equivalence électrique de l'ensemble connectique/cuvette. (B) Modèle électrique global équivalent.

à ce stade de complexifier le modèle². Celui-ci est en revanche très précis jusqu'à plusieurs GHz.

Remarque : Les résistances R_{milieu} mesurées ne correspondent pas tout à fait aux valeurs théoriques que l'on obtient en utilisant la formule 2.10. De nombreux paramètres peuvent expliquer les différences, et en particulier les imprécisions sur les dimensions des cuvettes ainsi que la déformation du liquide au niveau du ménisque (voir également annexe B).

2.3.5 Transposition en haute tension.

Les caractérisations présentées dans les sections précédentes ont été faites en petit signal et en fréquentiel. Il était donc intéressant de valider ces modèles pour des signaux impulsionnels et pour de forts niveaux de champ afin de vérifier la

²Cette partie de l'impédance sera cependant étudiée plus en détails dans la section 2.4.4

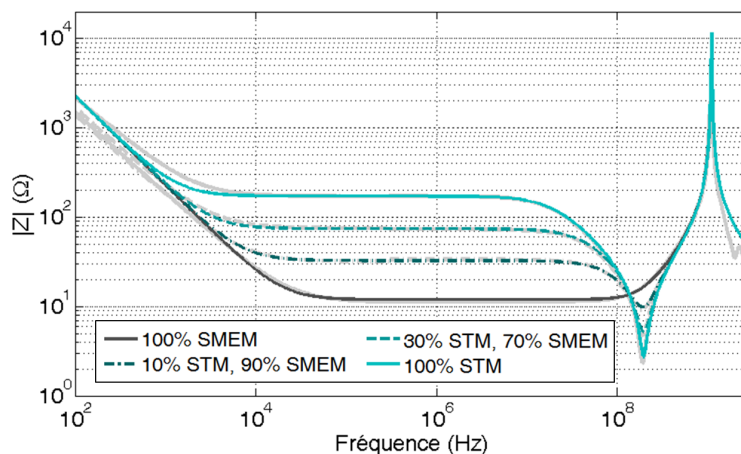


FIG. 2.21 : Superposition des impédances calculées grâce au modèle équivalent aux mesures.

linéarité des milieux biologiques au niveau du champ électrique. Pour cela, à partir du spectre d'une impulsion typique, nous avons calculé le spectre des impulsions réfléchies attendues en utilisant les fonctions de transfert construites à partir des mesures d'impédances. En utilisant une transformée de Fourier inverse, on peut alors calculer les formes temporelles attendues des signaux réfléchis (méthode décrite sur la figure 2.22). Ces tensions réfléchies calculées peuvent alors être comparées aux mesures.

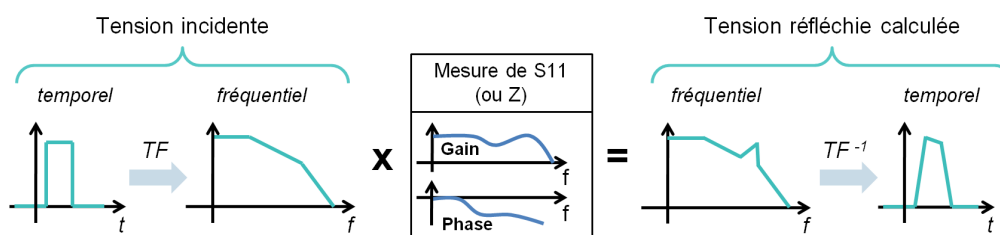


FIG. 2.22 : Evaluation des réflexions sur les cuvettes d'après les mesures d'impédances petit signaux.

La figure 2.23 est la superposition des signaux mesurés et calculés selon la méthode qui vient d'être évoquée. La concordance entre les mesures faites en haute tension et le calcul qui utilise la caractérisation petits signaux des échantillons montre que dans cette gamme de tension, les milieux biologiques restent linéaires ³.

³Il est à noter que les mesures de tensions et d'impédances ont été faites rigoureusement sur les mêmes cuvettes à quelques minutes d'intervalle. C'est ce qui justifie la concordance aussi parfaite.

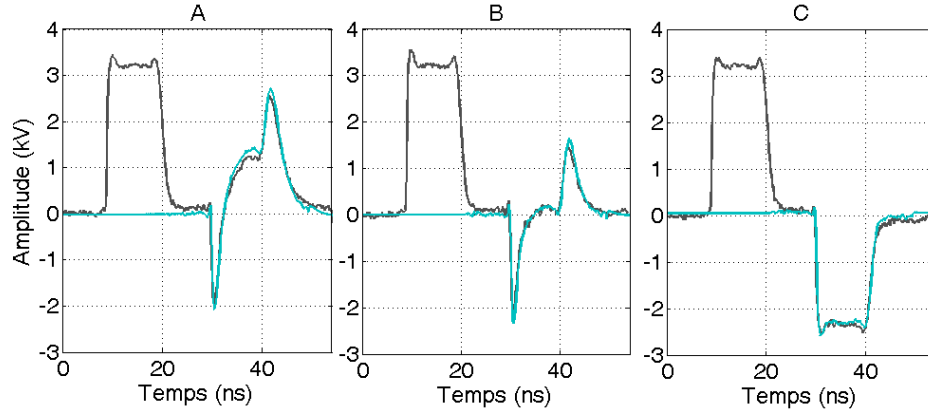


FIG. 2.23 : *Comparaison entre les signaux mesurés à l'extracteur et le calcul des réflexions d'après les mesures petits signaux. Les signaux présentés ici correspondent à des cuvettes de 2mm (MBP) remplies avec 400 μ L de (A) STM, (B) 10 % SMEM 90 STM, (C) SMEM.*

La mise en évidence de la linéarité des milieux biologiques est utile à plusieurs égards. Tout d'abord, elle valide le fait que les caractérisations en petits signaux peuvent servir à prévoir les tensions appliquées sur les échantillons. Ensuite, ces impédances peuvent être utilisées pour estimer les densités de courant circulant dans les échantillons. Enfin, le(s) milieu(x) intracellulaire(s) étant constitué(s) majoritairement d'eau, d'ions et de macromolécules non chargées, il est raisonnable d'extrapoler le résultat précédent et de supposer que le milieu intracellulaire se comporte linéairement avec l'amplitude du champ. Ceci permet donc d'utiliser les modèles de Schawn et Kotnik sans autres limites que celles considérées dans le domaine des micropulses.

2.3.6 Pertinence d'un modèle localisé

On peut se demander dans quelle mesure un modèle localisé est pertinent dans la mesure où les signaux considérés ont des spectres qui s'étendent jusqu'au GHz (longueur d'onde associée $\lambda = 20$ cm). Il est à noter que pour les impulsions de 10 ns, le spectre est déjà atténué de 20 dB à 220 MHz. Le système que nous utilisons pour exposer les cellules a une dimension principale de 2 cm, ce qui correspond dans un câble coaxial à la longueur d'onde d'un signal à 10 GHz. Il semble donc raisonnable de négliger la propagation dans notre système. Néanmoins, nous avons vérifié que la localisation des éléments était valable en simulant et en mesurant la tension au niveau du connecteur N et sur les électrodes de la cuvette. Les résultats sont présentés sur la figure 2.24. Il apparaît que le modèle en éléments discrets reflète bien la réalité. En particulier 'l'over-shoot' présent sur la charge et pas sur la cuvette est bien traduit

par la localisation de l'inductance.

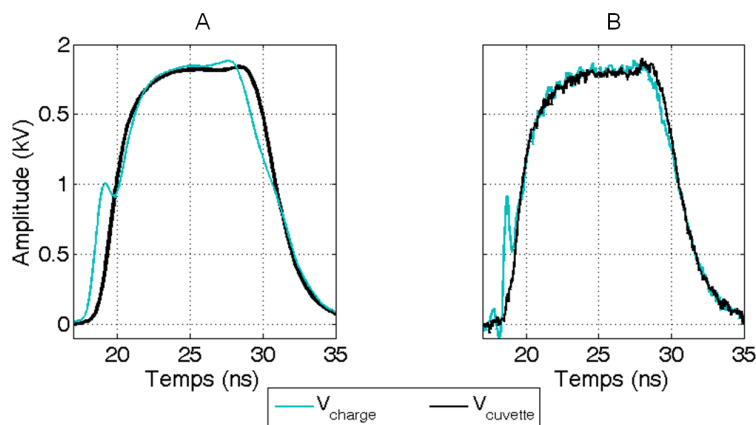


FIG. 2.24 : *Simulations et mesures des tensions au niveau du connecteur $N V_{charge}$ et sur les électrodes de la cuvette $V_{cuvette}$, pour une cuvette 1 mm contenant $100 \mu L$ de milieu 10% SMEM-90% STM. A- Simulation et B- mesures de la tension sur la charge globale et sur la cuvette.*

Enfin, il a été vérifié que la tension aux bornes des électrodes était bien l'image du champ dans la cuvette. Pour cela, une cuvette (STD 2 mm) a été munie d'un capteur de champ afin de mesurer le champ directement entre les électrodes. Le capteur est placé dans l'électrode de la cuvette qui est connectée à la masse, et fait face à l'air, juste au dessus du niveau du liquide. Le signal qu'il fournit permet de remonter à la tension aux bornes des électrodes, en supposant que la distance inter-électrodes est de 2 mm. Cette tension calculée est comparée à la tension mesurée à la sonde sur la figure 2.25. La différence de niveau (6-7 %) est attribuable à l'incertitude sur la distance inter-électrodes (voir aussi annexe B). En revanche, l'allure de l'impulsion est bien conservée. Cette étape peut sembler superflue dans notre cas, où il était parfaitement prévisible que le champ soit directement l'image de la tension mesurée sur les électrodes, mais ce type de mesure pourra s'avérer utile pour des impulsions plus courtes, à spectre encore plus large.

2.3.7 Conséquences des défauts de connectique.

Pour évaluer les conséquences des imperfections de la connectique, les fonctions de transfert suivantes ont été calculées :

TF1 : fonction de transfert théorique liant la tension sur la cuvette à la tension incidente en l'absence d'éléments parasites de connection.

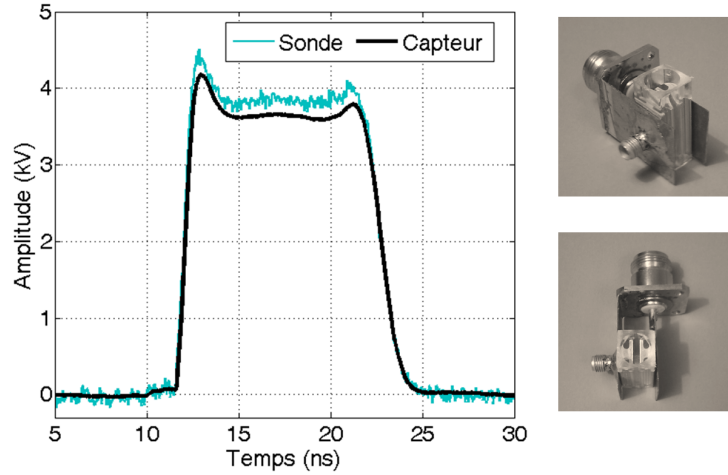


FIG. 2.25 : Comparaison de la tension mesurée à la sonde sur les électrodes de la cuvette et déduite de la mesure au capteur dans la cuvette. Mesure effectuée dans une cuvette 2 mm STD.

TF2 : fonction de transfert réelle liant la tension sur la cuvette à la tension incidente.

Les fonctions de transfert ont été calculées pour le S-MEM et le STM en utilisant les éléments du tableau 2.1 et une impédance caractéristique de 50Ω . Elles sont représentées sur la figure 2.26.

La présence des éléments parasites modifie très peu le gain de la fonction transfert. Leur effet principal est d'induire une coupure plus abrupte en haute fréquence. Etant donné le contenu spectral des impulsions utilisées, il y aura peu de répercussions. Ceci est confirmé par une simulation dans laquelle la charge est constituée soit uniquement de R_{milieu} , du couple R_{milieu} et C_{milieu} ou du modèle complet. La tension incidente est celle délivrée par notre générateur. Les tensions aux bornes de la cuvette pour ces trois cas sont représentées sur la figure 2.27. La figure de droite correspond au cas du S-MEM et la figure de gauche au STM. Il apparaît clairement sur cette simulation que les éléments parasites n'induisent pas de distorsion du signal.

Le dispositif d'exposition est donc parfaitement adapté à nos générateurs. En revanche, les éléments parasites deviennent influents lorsque l'impédance du générateur est faible ou lorsque la durée des impulsions est diminuée (ces points ont été vérifiés en simulation).

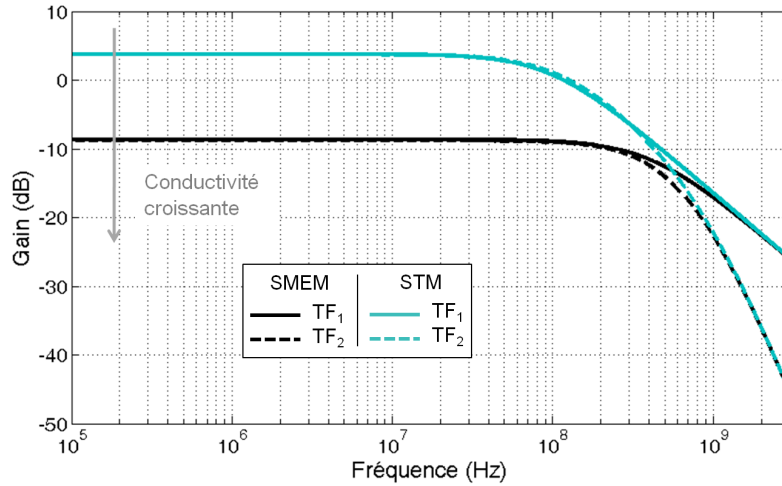


FIG. 2.26 : Fonctions de transfert liant la tension sur la cuvette à la tension incidente. TF_1 : fonction de transfert théorique en l'absence d'éléments parasites. TF_2 : fonction de transfert réelle.

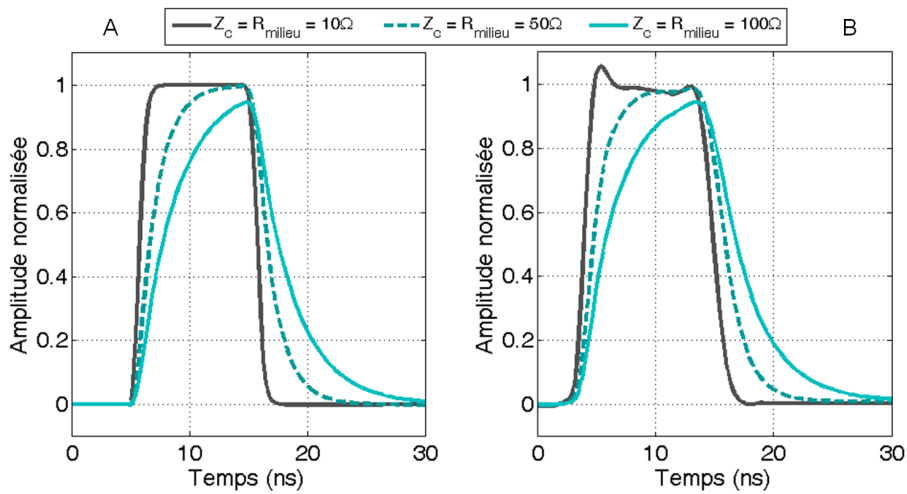


FIG. 2.27 : Simulations de la tension appliquée sur la cuvette en considérant un modèle partiel ou un modèle complet. A- Simulation pour une cuvette contenant $100 \mu\text{L}$ de STM B- Simulation pour une cuvette contenant $100 \mu\text{L}$ de S-MEM. Les paramètres de la simulation sont ceux du modèle établi précédemment (tableau 2.1).

2.3.8 Qu'en est il de l'homogénéité du champ ?

L'intérêt de la géométrie bi-plan des cuvettes (géométrie mal adaptée à la connexion à des câbles coaxiaux) est qu'elle garantit un champ relativement homogène sur

l'objet biologique. Afin de savoir quelle importance donner aux effets de bord, et n'étant pas en mesure de réaliser une cartographie de champ dans un espace aussi confiné, nous avons posé la question en simulation. Les simulations ont été réalisées grâce au logiciel CST microwaves, qui permet de prendre en compte la propagation. L'ensemble du connecteur et de la cuvette ont été modélisés (figure 2.28-A). Afin de nous permettre de mieux reproduire nos conditions d'utilisation, la source est constituée d'un port microwave inséré sur l'ouverture coaxiale (d'impédance caractéristique 50Ω), qui constitue le début du connecteur. Les simulations sont réalisées avec des signaux théoriques, mais le plus souvent avec les formes d'ondes réelles issues de la mesure, et légèrement filtrées afin de supprimer le bruit de mesure (figure 2.28-B).

Les simulations sont réalisées avec une fréquence haute de 10 GHz. Les valeurs de conductivité et de permittivité du milieu sont fixées à $\sigma = 0,06 \text{ S/m}$ et $\varepsilon = 65$.

Le champ électrique est estimé à différents endroits dans la cuvette, et notamment près des bords. Les points de référence sont disposés comme indiqué sur la figure 2.29-A, à $500 \mu\text{m}$ des bords. La lecture des trois composantes spatiales du champ (données non présentées) confirme que le champ est bien unidirectionnel et normal aux électrodes. Par ailleurs, la comparaison du champ électrique aux différents points montre que le champ est bien homogène (figure 2.29-B).

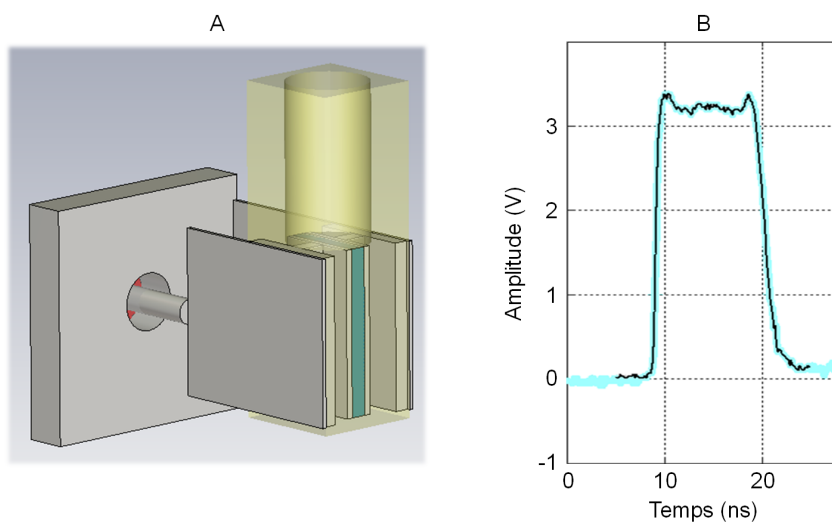


FIG. 2.28 : (A) Géométrie implantée dans le logiciel de simulation CST (B) Signal injecté dans la simulation.

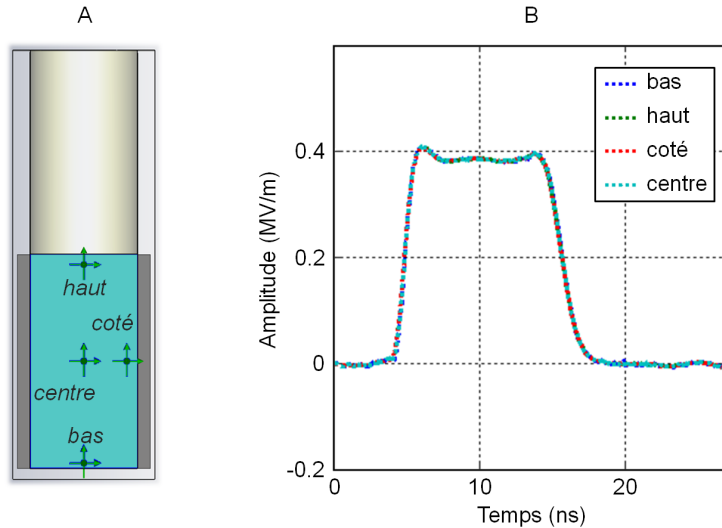


FIG. 2.29 : (A) Disposition des sondes de champ électrique dans la cuvette (B) Composante normale du champ électrique au niveau des différentes sondes.

2.4 Protocoles d'exposition

Dès lors qu'un effet biologique est observé pour une condition quelconque, il est intéressant de faire varier les différents paramètres mis en jeu afin d'en déterminer l'impact. Nous proposons dans la suite de ce manuscrit quelques règles de mise en œuvre afin de pouvoir faire varier un certain nombre de paramètres électriques. Ces protocoles ont été adaptés pour nos conditions de travail et en particulier notre générateur, mais certains pourront être avantageusement re-exploités par d'autres expérimentateurs avec les mêmes préoccupations.

2.4.1 Variation de l'amplitude

Le générateur FID utilisé (générateur A) permet de délivrer des impulsions ayant une amplitude variant entre 3,8 kV et 8 kV, sur une charge de 50Ω . Lorsque ce générateur est connecté à une cuvette STD d'espacement inter-électrodes de 1 mm contenant $100 \mu\text{L}$ de solution de type SMEM, les amplitudes résultantes appliquées varient entre 1,4 et 3 kV (en effet, la cuvette présente dans ce cas une résistance d'environ 11Ω et est donc largement sous-adaptée). Afin de faire davantage varier l'amplitude du champ, une possibilité est de faire varier le volume de solution. En diminuant la surface de contact liquide/électrode, il est ainsi possible d'augmenter la résistance globale présentée par la cuvette.

Pour une même tension incidente, il est donc possible d'obtenir facilement dif-

férents niveaux de tensions aux bornes de la cuvette, et donc différents champs appliqués sur les cellules. Les champs résultants dans une cuvette STD de 1 mm de distance inter-électrodes contenant différents volumes de S-MEM pour une même tension incidente de 3,8 kV sont présentés sur la figure 2.30.

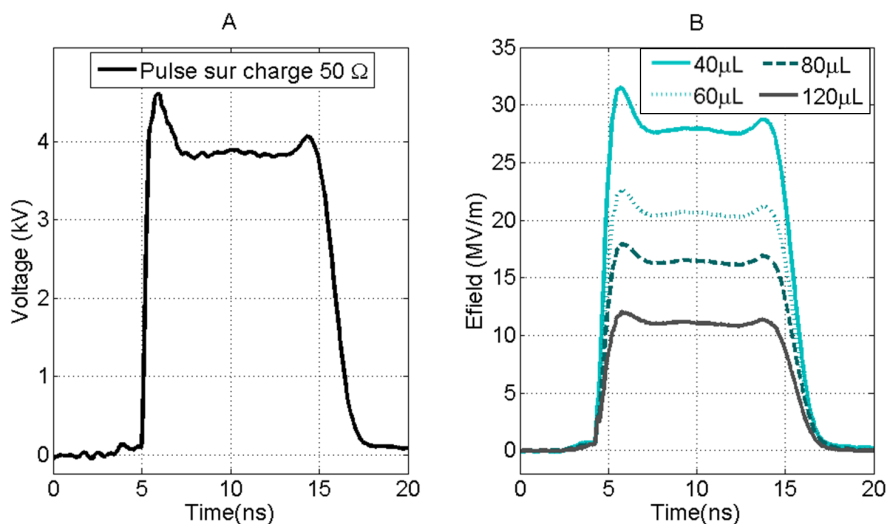


FIG. 2.30 : A-Tension délivrée par le générateur, mesurée sur charge adaptée. B- Champ résultant dans une cuvette de distance inter-électrodes de 1 mm pour différents volumes de S-MEM. Les mesures sont effectuées au capteur de champ.

2.4.2 Variation de la fréquence de répétition

Souvent, nous avons dû appliquer des séries d'impulsions (quelques dizaines à quelques centaines) pour détecter des effets biologiques. De l'expérience acquise par l'étude des effets des micropulses, nous savons que la fréquence de répétition est un paramètre électrique qui doit être pris en compte et qui peut largement modifier les résultats obtenus. Lors de l'exposition de cellules *in vitro*, nous avons donc naturellement cherché à faire varier ce paramètre. L'étude de l'impact de la fréquence de répétition nécessite cependant une certaine prudence. Tout d'abord, certains générateurs s'écroulent dès la centaine de Hz en fonction de l'alimentation continue qu'ils utilisent. Ce point est illustré sur la figure 2.31. On y voit la mesure des impulsions délivrées par le générateur B sur une charge adaptée. On observe que plus la fréquence de répétition est élevée, plus l'amplitude des impulsions chute.

L'utilisation de fréquences de répétition élevées peut également se révéler difficile à mettre en œuvre pour un nombre important d'impulsions et conduire à un échauffement global de la solution. La mesure de température dans un volume aussi réduit est difficile à mettre en œuvre, à moins de disposer de caméras

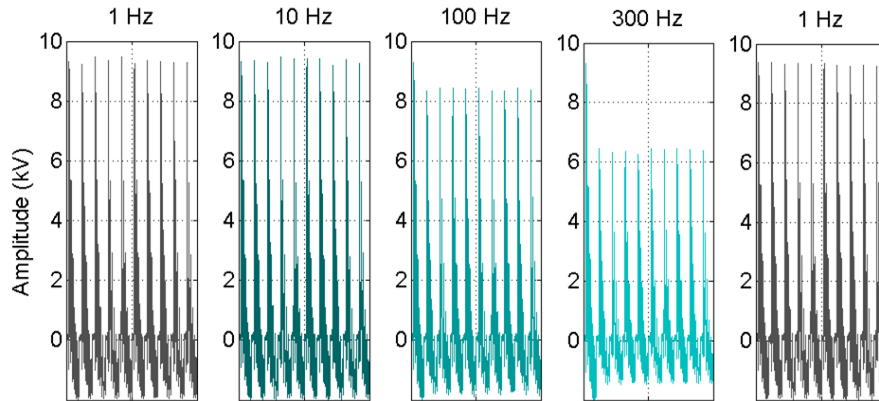


FIG. 2.31 : *Mesure des impulsions délivrées par le générateur B sur charge adaptée en fonction de la fréquence de répétition. Pour chaque fréquence, 10 impulsions mises bout à bout sont représentées.*

infrarouges sophistiquées, avec une résolution suffisante pour pouvoir viser l'espace de 1 mm situé entre les électrodes. L'acquisition systématique de la tension lors de l'application d'un grand nombre d'impulsions permet cependant de répondre en partie à la question de l'échauffement. Nous avons exposé des cuvettes contenant différents volumes de SMEM à des trains de 2000 impulsions à différentes fréquences de répétition, tout en mesurant, grâce au capteur, la tension sur la cuvette. La figure 2.32 donne l'évolution de l'amplitude de la tension en fonction du nombre d'impulsions et ce à trois fréquences de répétition : 10 Hz, 100 Hz, 1 kHz. Il apparaît sur cette figure qu'à haute fréquence, l'amplitude de l'impulsion chute rapidement.

La chute d'impédance traduit une diminution de la résistance globale de la solution. L'hypothèse la plus probable pour l'expliquer est de l'attribuer à un changement de conductivité causé par une élévation de température. Il est en effet connu que la conductivité des solutions salines est fonction de la température (Grimnes et Martinsen, 2008). Une autre hypothèse est que des réactions électrochimiques modifient la constitution de la solution. Une expérience simple pour discriminer entre les deux hypothèses consiste à envoyer un train d'impulsions, à attendre une dizaine de minutes afin de garantir un retour à la température ambiante, et à envoyer de nouveau quelques impulsions. Lors de cette expérience, il apparaît que la solution, après 10 minutes de repos, a retrouvé sa conductivité initiale, ce qui est en faveur de l'élévation de température.

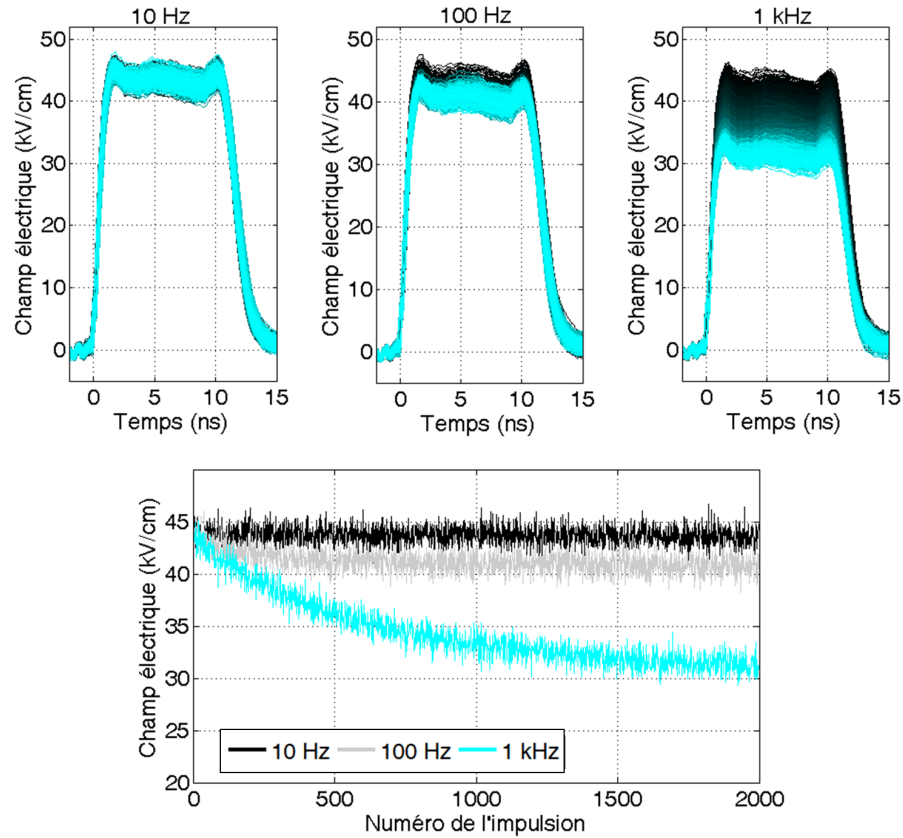


FIG. 2.32 : *Amplitude des impulsions en fonction de la fréquence de répétition. Les impulsions sont appliquées sur une cuvette de 1 mm contenant 60 μ L de SMEM. L'amplitude initiale est de 4,4 kV. Les mesures sont effectuées grâce au capteur de champ D-dot. Haut : Représentation des 2000 impulsions superposées. La couleur varie graduellement du noir (première impulsion) au bleu (dernière impulsion). Bas : Amplitudes en fonction du numéro de l'impulsion.*

2.4.3 Variation de la conductivité

Il est possible, à condition de respecter le maintien de l'osmolarité nécessaire à l'intégrité des cellules, de travailler dans des milieux de conductivités différentes (présentés plus haut). Dans la mesure où l'impédance de la charge va complètement modifier le niveau et la forme de la tension appliquée, une étude sur l'importance de la conductivité nécessite une méthodologie adéquate. Pour ce faire, nous proposons d'exposer les cellules dans les différents milieux de façon simultanée en parallèle. Ce point est détaillé dans le chapitre 4.

2.4.4 Remarque sur le choix des cuvettes.

2.4.4.1 Comparaison des cuvettes MBP et STD

Les deux types de cuvettes utilisées pour les expériences de biologie sont de la marque MBP (Molecular BioProduct, Dutcher, Issy les moulineaux, France) et de la marque STD (Cell Projects, Dutcher, Issy les moulineaux, France). Il est apparu que les effets biologiques étaient à la fois plus intenses et plus variables dans les cuvettes MBP. En conséquence, il nous est apparu utile de comparer les deux types de cuvettes. La figure 2.33 représente le module de l'impédance pour les cuvettes MBP et STD de distance inter-électrodes 1 mm et contenant 100 μL de SMEM. Chaque courbe correspond à la moyenne de trois mesures.

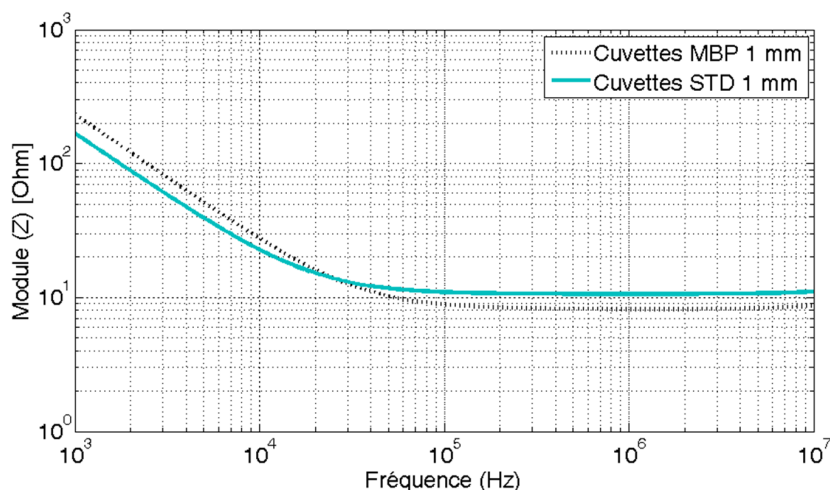


FIG. 2.33 : *Module de l'impédance des cuvettes de distance inter-électrodes 1 mm des marques MBP et STD. Les cuvettes contiennent 100 μL de milieu SMEM. Les courbes sont la moyenne des mesures sur 3 cuvettes.*

Il apparaît tout d'abord que la résistance moyenne présentée par la cuvette à 1 MHz est différente d'un type de cuvette à l'autre. On trouve $8,2 \pm 0,33 \Omega$ dans les cuvettes MBP, contre $10,6 \pm 0,07 \Omega$ pour les cuvettes STD, c'est à dire une différence de la valeur moyenne d'environ 20%. Le milieu et le volume étant les mêmes, d'après la formule cela correspond donc à une différence d'environ 4,5 % sur la distance inter-électrodes. Si une même tension est appliquée sur ces deux types de cuvettes, la différence de champ sera donc de 4,5 % en moyenne. La dispersion sur la valeur de la résistance est par ailleurs plus importante dans les cuvettes MBP que dans les cuvettes STD.

$$R = \frac{1}{\sigma} \cdot \frac{l}{S} = \frac{1}{\sigma} \cdot \frac{l^2}{V} \quad (2.15)$$

avec V volume de liquide

L'analyse de la capacité électrochimique peut également renseigner sur la qualité des cuvettes. Les mesures d'impédance de 100 Hz à 1 kHz, pour les deux types de cuvettes considérés, sont tracées dans la représentation de Nyquist sur la figure 2.34. Dans cette représentation, l'impédance est une droite de pente p . L'équivalent électrique précis d'une telle impédance est une capacité C_{ec} modulée par un coefficient de Cole-cole α_{ec} compris entre 0 et 1 (2.16). Ce coefficient α_{ec} est fonction de nombreux paramètres, dont : les ions dans la solution, le matériau qui compose l'électrode, l'état de surface de l'électrode. Il se déduit facilement de la pente p grâce à l'équation 2.17. D'après la figure 2.34, il apparaît une dispersion importante sur la pente de l'impédance dans les cuvettes MBP, mais pas sur les cuvettes STD. Le calcul de α_{ec} donne 0.92 ± 0.03 pour les cuvettes MBP et 0.95 ± 0.005 pour les cuvettes STD. Toutes choses étant égales par ailleurs, le coefficient α_{ec} est d'autant plus petit que l'état de surface est irrégulier. Nous comparons ici deux types de cuvettes dont les matériaux sont différents : il n'est donc pas possible de tirer de conclusion sur la qualité intrinsèque de chaque type de cuvettes. En revanche, il est certain que les cuvettes MBP présentent une plus grande dispersion dans leur état de surface.

$$Z = \frac{1}{(jC_{ec}\omega)^{\alpha_{ec}}} \quad (2.16)$$

$$\alpha_{ec} = \frac{2}{\pi} \cdot \arctan(p) \quad (2.17)$$

Cette analyse comparative a été effectuée du fait du constat de différences de résultats biologiques en fonction du type de cuvette. En pratique, il apparaît que pour des conditions d'impulsions identiques, les effets biologiques sont plus intenses et plus dispersés dans les cuvettes MBP. Ce résultat est bien en accord avec l'analyse des impédances.

2.4.4.2 Comparaison des cuvettes STD 1 mm et 2 mm

La figure 2.35 montre la comparaison des impédances des cuvettes STD de 1 mm et 2 mm remplies avec respectivement 100 μ L et 400 μ L de S-MEM. On observe une différence sur la valeur moyenne de la résistance dans la zone plate de l'impédance (de 100 kHz à 1 MHz). La contribution plus importante du ménisque dans les cuvettes de 1 mm est probablement un des éléments qui peut expliquer cette légère différence.

Le calcul du coefficient de Cole-cole donne 0.95 ± 0.005 pour les cuvettes de 1 mm et 0.94 ± 0.007 pour les cuvettes de 2 mm. D'une manière générale donc, il semble

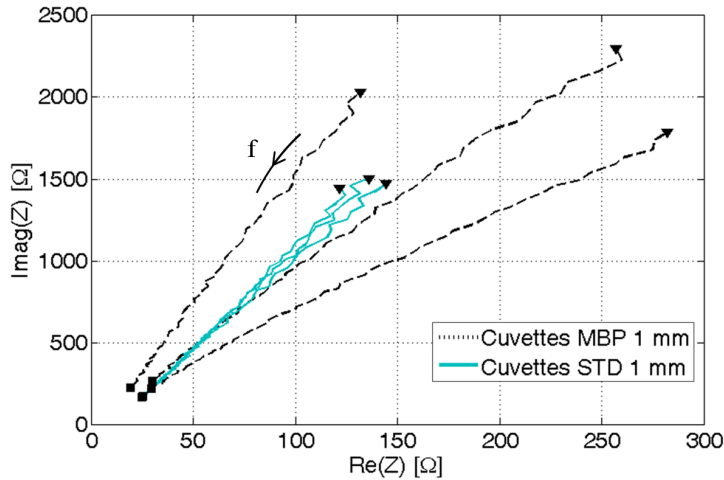


FIG. 2.34 : Impédance des cuvettes de distance inter-électrodes 1 mm des marques MBP et STD. Les cuvettes contiennent 100 μ L de milieu SMEM. Les impédances sont représentées dans le diagramme de Nyquist, elles sont paramétrées en fréquence. Les points marqués d'un triangle correspondent à la fréquence de 100 Hz, les points marqués par un carré à 1 kHz.

que la marque STD présente une moins grande variabilité entre cuvettes. Depuis cette analyse, ce sont les seules qui sont utilisées dans les expériences biologiques.

2.4.5 Fiabilité

De nombreux paramètres pouvant modifier les signaux appliqués ont été évoqués : conductivité des solutions, volume de solution, type de cuvette, fréquence de répétition, température, système d'exposition. De plus, même si tous ces paramètres sont fixés, il peut demeurer une variabilité. Pour comparaison, la précision des composants électroniques standards est de 5% pour les résistances, et 10% pour les condensateurs. Enfin, les générateurs peuvent s'écrouler, et des claquages intempestifs peuvent avoir lieu. Ainsi, il nous semble nécessaire de recourir à la mesure systématique des grandeurs électriques. Les modèles électriques peuvent cependant être utilisés à bon escient pour prédire l'allure attendue des signaux, et déterminer des conditions expérimentales.

2.5 Exposition de tissus biologiques homogènes.

Au cours de cette thèse, une partie des expériences a été réalisée sur de la pomme de terre. Parmi ses nombreux intérêts (qui seront développés dans le chapitre 3), la pomme de terre a l'avantage d'être relativement homogène. La figure 2.37

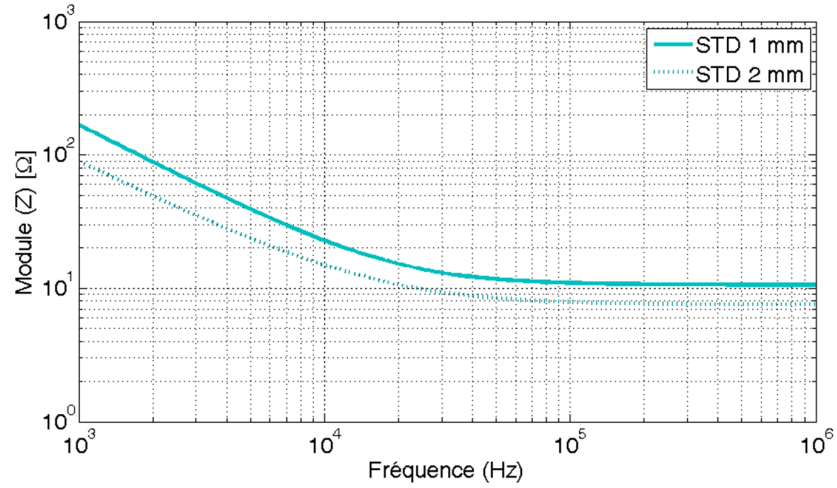


FIG. 2.35 : *Module de l'impédance des cuvettes de distance inter-électrodes 1 mm ou 2 mm de la marque STD. Les cuvettes contiennent 100 μ L (cuvette de 1 mm) ou 400 μ L (cuvette de 2 mm) de milieu S-MEM. Les courbes sont la moyenne des mesures sur 3 cuvettes.*

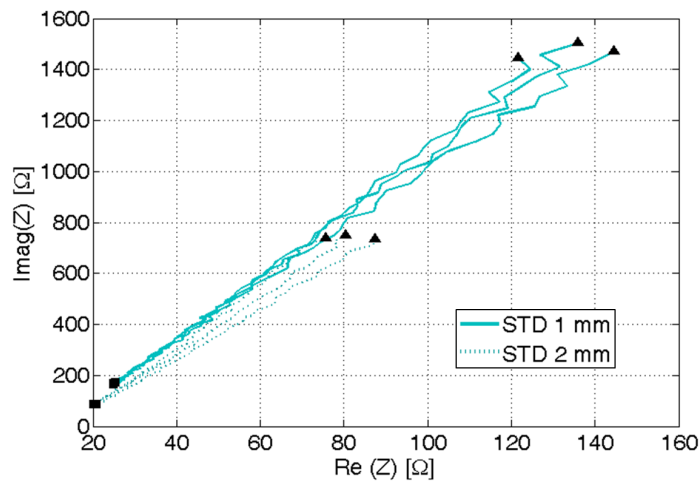


FIG. 2.36 : *Module de l'impédance des cuvettes de distance inter-électrodes 1 mm ou 2 mm de la marque STD. Les cuvettes contiennent 100 μ L (cuvette de 1 mm) ou 400 μ L (cuvette de 2 mm) de milieu S-MEM. Les impédances sont représentées dans le diagramme de Nyquist, elles sont paramétrées en fréquence. Les points marqués d'un triangle correspondent à la fréquence de 100 Hz, les points marqués par un carré à 1 kHz*

présente une allure typique d'impédance mesurée sur un morceau de pomme de terre (épaisseur 4 mm, section 1,1 cm² (8 mm×14 mm) placé entre deux électrodes planes. Le dispositif utilisé pour la mesure est présenté sur la figure 2.38.

Le modélisation électrique équivalente d'un tissu a été initialement proposée par Fricke (Fricke, 1924; Gabriel *et al.*, 1996a,b,c). Le schéma équivalent électrique est présenté sur la figure 2.37.

A basse fréquence, un tissu a un comportement résistif imposé par la conductivité extra-cellulaire, et modélisé par une résistance R_e . A partir de la dizaine de kHz, les propriétés diélectriques des membranes et la conductivité intracellulaire interviennent. Ils se modélisent en parallèle de R_e par un condensateur C_m en série avec une résistance R_i . A plus haute fréquence, à partir de la centaine de MHz, le caractère diélectrique de l'eau commence à intervenir. Il peut être représenté à l'aide d'un condensateur C_e en parallèle. L'ajustement de ce modèle pour décrire une impédance réelle est présenté sur la figure 2.37. Un ajustement plus précis nécessite de moduler la capacité C_m à l'aide d'un coefficient de Cole-cole (figure 2.37) afin de traduire le fait que la chute capacitive entre 10⁴ Hz et 10⁶ Hz n'est pas à -20 dB/décade.

Nous avons établi ce modèle équivalent sur un nombre important d'échantillons de sections et d'épaisseurs variées. La figure 2.39 montre l'évolution de la valeur des résistances R_i et R_e en fonction du rapport de l'épaisseur sur la section, ainsi que l'évolution de la valeur des condensateurs C_m et C_e en fonction du rapport de la section sur l'épaisseur. Il est remarquable de voir que l'on trouve des comportements linéaires, ce qui permet d'extraire des conductivités et permittivités équivalentes définies par les équations 2.18 à 2.21. Ces conductivités et permittivités équivalentes sont fonction à la fois des propriétés électriques intrinsèques du tissu et de sa géométrie interne.

$$R_e = \frac{d}{\sigma_{e_eq} \cdot S} \quad (2.18) \quad R_i = \frac{d}{\sigma_{i_eq} \cdot S} \quad (2.20)$$

$$C_e = \varepsilon_{e_eq} \varepsilon_0 \cdot \frac{S}{d} \quad (2.19) \quad C_m = \varepsilon_{m_eq} \varepsilon_0 \cdot \frac{S}{d} \quad (2.21)$$

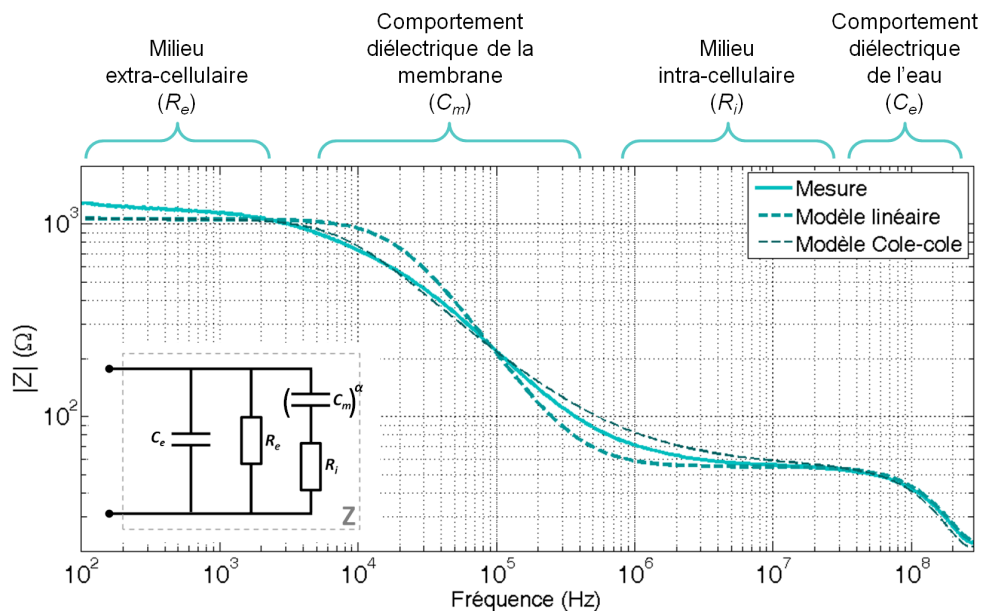


FIG. 2.37 : *Mesure et modèle d'un échantillon de pomme de terre (épaisseur 4 mm, section 1,1 cm²). Le modèle linéaire n'utilise pas le coefficient de Cole-cole α . Dans le modèle de Cole-cole, α est égal à 0,66 . Il permet d'ajuster la pente associée aux propriétés capacitives des membranes.*

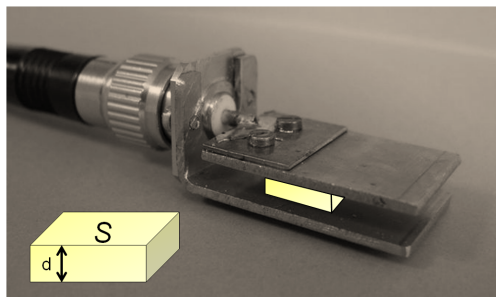


FIG. 2.38 : *Dispositif d'exposition pour la mesure d'impédance.*

Les conductivités et permittivités équivalentes peuvent servir à déterminer l'impédance d'un échantillon de dimensions quelconques. La figure 2.40-A représente les modules de l'impédance calculés pour trois échantillons d'épaisseur fixe ($d = 5 \text{ mm}$) et de sections différentes ($S = 0,3 \text{ cm}^2$, $1,1 \text{ cm}^2$ ou $1,9 \text{ cm}^2$). Les fonctions de transfert donnant la tension appliquée en fonction de la tension incidente pour un générateur d'impédance 50Ω sont représentées sur la figure 2.40-B.

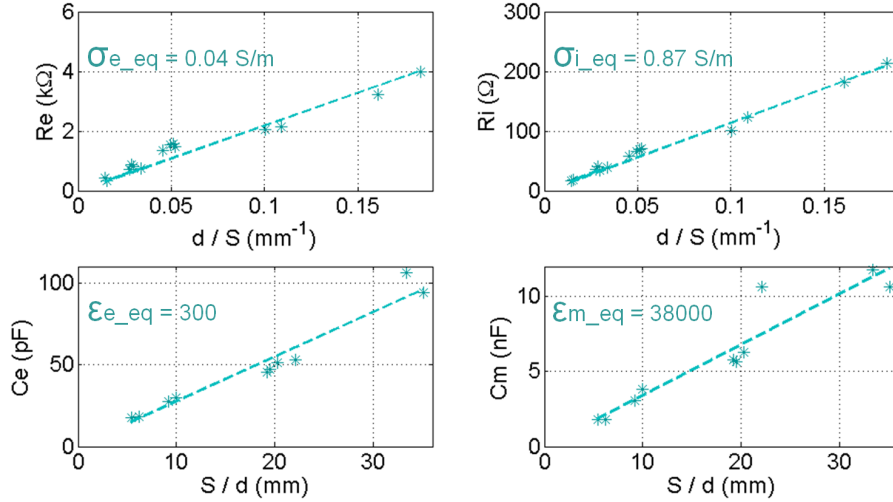


FIG. 2.39 : *Evaluation des conductivités et permittivités équivalentes associées à la pomme de terre.*

En comparant les fonctions de transfert ainsi calculées au contenu fréquentiel des impulsions de 10 ns, nous pouvons déduire que les paramètres électriques qui vont imposer la tension sont σ_{i_eq} et ε_{e_eq} . Ainsi, la prédétermination de l'amplitude d'une impulsion sur un tissu biologique nécessite la connaissance de ses propriétés à hautes fréquences, c'est à dire R_i et C_e dans le modèle équivalent.

D'une façon plus globale, on peut remarquer que vis à vis des impulsions de quelques nanosecondes, la pomme de terre se comporte comme un couple conductivité et permittivité. Ainsi l'étude menée sur l'exposition de milieux biologiques en cuvette est transposable (résultats biologiques présentés dans le chapitre 3).

2.6 Exposition *in vivo*

Dès lors que l'on souhaite mener des expériences *in vivo*, il est bien plus complexe d'établir une modélisation préalable. En effet, les tissus mis en jeu cette fois peuvent rarement être considérés comme homogènes (sauf peut-être dans le cas du foie). Par ailleurs, contrairement à la pomme de terre, la souris ne supporte pas d'être découpée en morceaux d'épaisseur et de section calibrées. Lors des expériences *in vivo* (pratiquées sur des tumeurs sous-cutanées), nous avons choisi de conserver des électrodes biplans. On ne peut cependant pas considérer pour autant que le champ électrique soit homogène dans le tissu traité. En effet, le champ va se répartir de

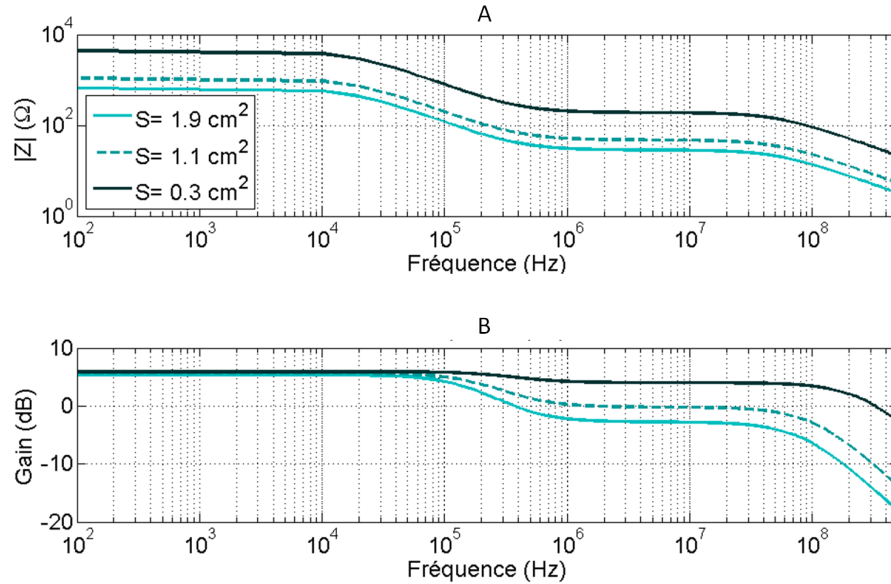


FIG. 2.40 : *A-Module de l'impédance pour trois échantillons d'épaisseur 5 mm et de différentes sections et B-fonctions de transfert associées pour un générateur d'impédance caractéristique de 50 Ω .*

façon complexe entre les différents types de tissus rencontrés. Ceci n'est d'ailleurs pas spécifique aux impulsions nanosecondes, et l'on retrouve les mêmes incertitudes avec les impulsions plus classiques de 100 μs . Le recours à la modélisation permettrait d'avoir une idée de la distribution du champ, à condition toutefois de connaître parfaitement les propriétés électriques des différents tissus ainsi que leur géométrie. La mesure systématique du champ global entre les électrodes au moyen du D-dot permet cependant de fixer une référence et de garantir le bon passage des impulsions.

2.7 Conclusion

En conclusion de ce chapitre, il me paraît important de souligner qu'il n'est pas possible à ce jour de choisir entièrement les paramètres électriques que l'on souhaite. Les contraintes intrinsèques telles que les propriétés diélectriques des milieux biologiques ne sont pas contournables, de même que le respect de l'osmolarité. Par ailleurs, le souci de travailler en champ homogène afin de faciliter l'interprétation biologique ne permet pas tous les ajustements. La compréhension de l'aspect purement électrique des situations a conduit à définir des protocoles, qui ont permis par la suite d'aborder sereinement les questions de biologie. Par ailleurs, la mesure systématique rendue possible grâce aux multiples capteurs de champ qui ont été

installés dans toutes les électrodes du laboratoire, permet de se prémunir contre les artefacts trop fréquents avec ce type d'impulsions.

Chapitre 3

Experimentation sur tissus

Cette partie des travaux à déjà été mise en forme et discutée en anglais. J'ai pris la liberté de ne pas la traduire en français.

We propose in this chapter to analyze how repetition rate impacts on the permeabilisation of tissues by measuring changes of electrical bioimpedance. We compare, on potato tuber, the permeabilisation obtained by two types of pulses with a duration of either 100 μ s or 10 ns. The generators used are the cliniporator and generator B (see chapter 7) They will be referred to as microsecond pulses (or micropulses) and nanosecond pulses (or nanopulses) respectively. In addition, the repetition rate impact on permeabilisation in mice liver is investigated using micropulses.

3.1 Detection of permeabilisation of tissue by electrical measurements

3.1.1 Impedance of a biological tissue (bioimpedance)

Electrical passive properties of biological tissues have been described with very good precision up to several megahertz. Fricke proposed a remarkably simple electrical model that allows to transcribe the electrical behavior of a tissue (figure 3.1). It consists in a resistor (R_{ext} [ohm, Ω]) in parallel with a capacitor (C_e [farad, F]) and with a series association of a capacitor (C_m [farad, F]) and a resistor (R_{int} [ohm, Ω]). The resistors R_{ext} and R_{int} are directly linked to the conductive properties of respectively the extracellular and intracellular media which are both ionic solutions. The capacitor C_e represents the dielectric behavior of the water in the tissue at high frequencies. Finally, the capacitor C_m represents the dielectric properties of the membranes of cells. In fact, to describe precisely the behavior of a tissue, the capacitance needs to be corrected with a Cole-Cole coefficient (α).

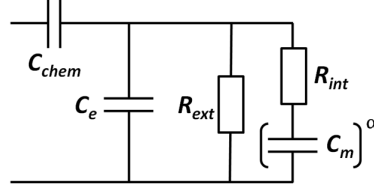


FIG. 3.1 : *Electrical model of the passive properties of a biological tissue*

A typical bioimpedance measurement of a potato sample as well as its associated electrical model are represented in the Bode plot (magnitude versus frequency) on figure 3.2-A and in the Wessel plot (imaginary part of the impedance versus real part) on figure 3.2-B. The graphical representation of the impedance allows to bring out R_0 [ohm, Ω] and R_{inf} [ohm, Ω], the resistances at low and high frequencies respectively. On an unaltered tissue, R_0 and R_{inf} can be expressed by 3.1. Those values will be used to quantify the permeabilisation level.

$$R_0 = R_{ext} \quad \text{and} \quad R_{inf} = \frac{R_{ext}R_{int}}{R_{ext} + R_{int}} \quad (3.1)$$

3.1.2 Correlation between bioimpedance and current value during exposition

The two types of electric pulses applied in the experiments have a duration of either 100 μs (micropulse) or 10 ns (nanopulse). Their normalized spectral representation (figure 3.3) is relevant of the two very different durations. Although both spectrums have similar shapes, the decrease following the initial plateau begins at a frequency directly dependant on the pulse duration. When looking at the impedance of a potato sample (figure 2-A), it stands out that the two types of pulses excite the sample on two different frequency bands.

The two theoretical currents that would be obtained when applying 1V micropulse or nanopulse on the sample presented in figure 3.2 have been calculated. This calculation has been done assuming that the impedance would not change during the exposure to the pulses. The current level reached during the micropulse is approximately 0.6 mA (figure 3.4-A) which reveals that the current level is imposed by R_0 (which is around 1.7 k Ω in the sample that is considered). On the other hand, the theoretical current level obtained when considering a nanopulse is around 18 mA (figure 3.4-B), as it is imposed by R_{inf} which is approximately 55 Ω in the considered example. Current level during microsecond pulse excitation will thus be used to evaluate R_0 in order to quantify the permeabilisation level (see section 4.1.2).

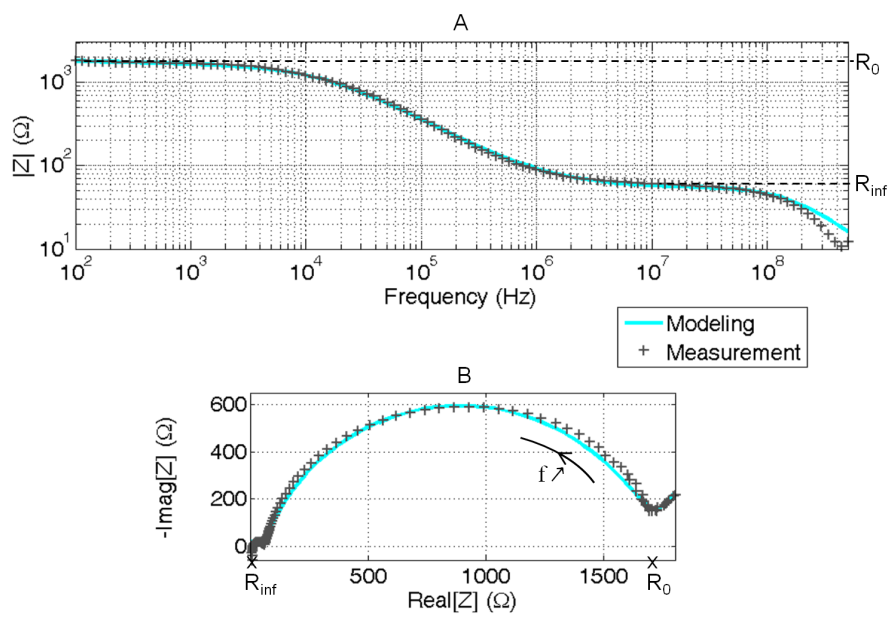


FIG. 3.2 : Example of electrical impedance of a potato sample. Crosses indicate experimental measurements and the dashed line the Cole-Cole model. A- Bode representation of the magnitude of the impedance. B- Wessel representation of the complex impedance. The arrow indicates increasing frequencies.

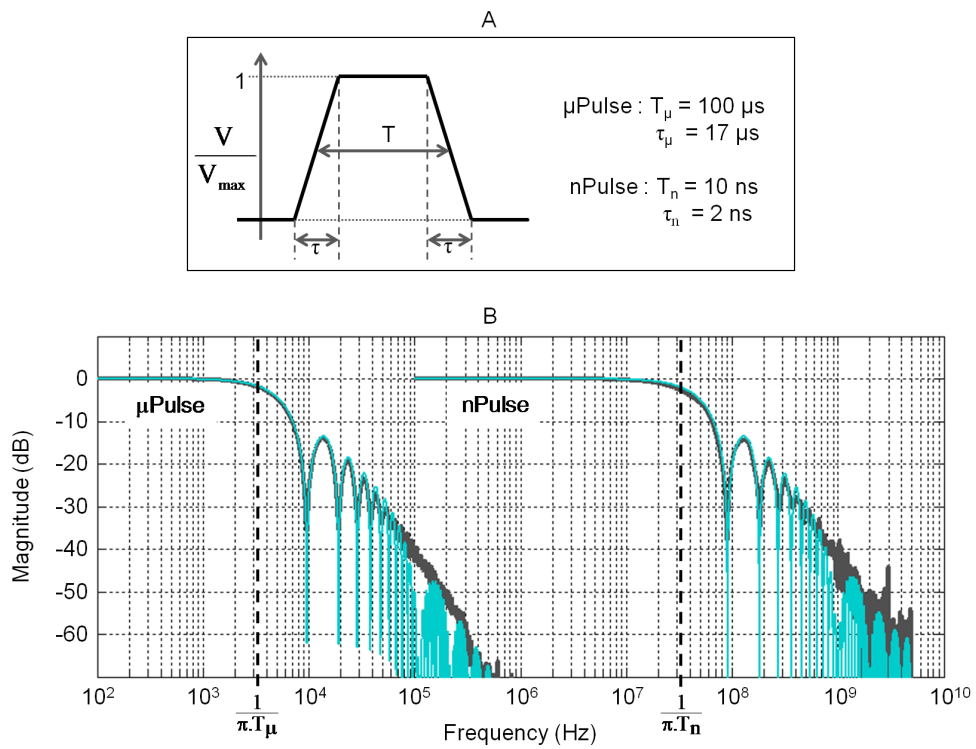


FIG. 3.3 : (A) Time domain features of normalized applied pulses. (B) Associated spectral representation of the pulses. The black lines correspond to measured pulses and the gray lines to the best fit by a trapezoidal pulse.

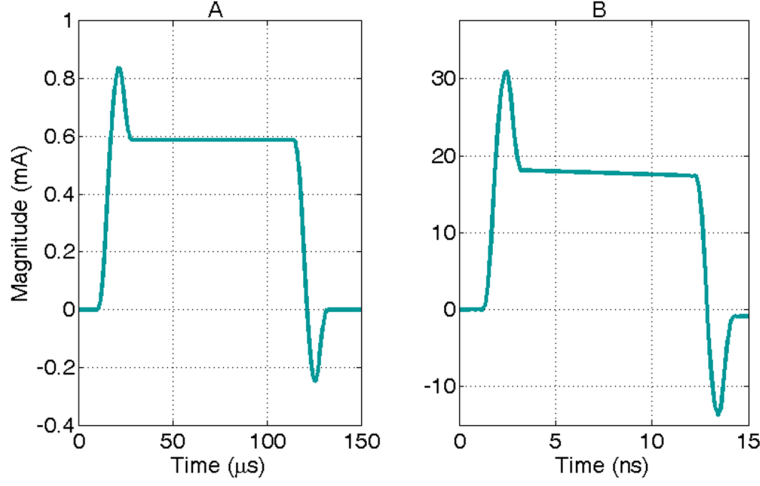


FIG. 3.4 : Theoretical current calculated when applying either a micropulse (A) or a nanopulse (B) as defined in figure 3.3, with a 1V magnitude on the impedance represented on figure 3.2.

3.1.3 Quantification of permeabilisation using the drop of bioimpedance

3.1.3.1 Normalized impedance drop

Changes in membranes electrical properties was one of the earliest method to detect permabilisation (Abidor *et al.*, 1979). Indeed, as permeabilisation is an alteration of the membranes, it can be seen from an electrical point of view as a partial or complete short-circuiting of the capacitor C_m . In consequence, permeabilisation increases the conductivity of tissues at low frequencies. Thus, after permeabilisation, the resistance of the tissue at low frequencies (R_{0perm}) should be between the initial values of R_0 and R_{inf} : the more efficient the permeabilisation, the more important the drop of the resistance at low frequencies. To quantify the level of permeabilisation the normalized impedance drop (NID) defined by 3.2 is used. Admitting no other change in the impedance other than the drop due to permeabilisation, the value of the NID should be between 0 and 1; 1 being no permeabilisation at all and 0 the limit reached when going towards complete permeabilisation.

$$NID = \frac{R_0^{perm} - R_{inf}^{perm}}{R_0 - R_{inf}} \quad (3.2)$$

For the sake of simplicity, bioimpedance measurements are not systematically fitted to extract R_0 and R_{inf} . Indeed it turns out that on potato samples R_0 and R_{inf} are approximately equal to the real part of the impedance at 100 Hz (Z_{100Hz}) and

400 kHz (Z_{400kHz}) respectively. The normalized impedance drop was thus computed using 3.3.

$$NID = \frac{R_{eal}(Z_{100Hz}^{perm}) - R_{eal}(Z_{400kHz}^{perm})}{R_{eal}(Z_{100Hz}) - R_{eal}(Z_{400kHz})} \quad (3.3)$$

Figure 3.5 gives a typical example of a change of impedance due to partial permeabilisation ($NID = 0.77$).

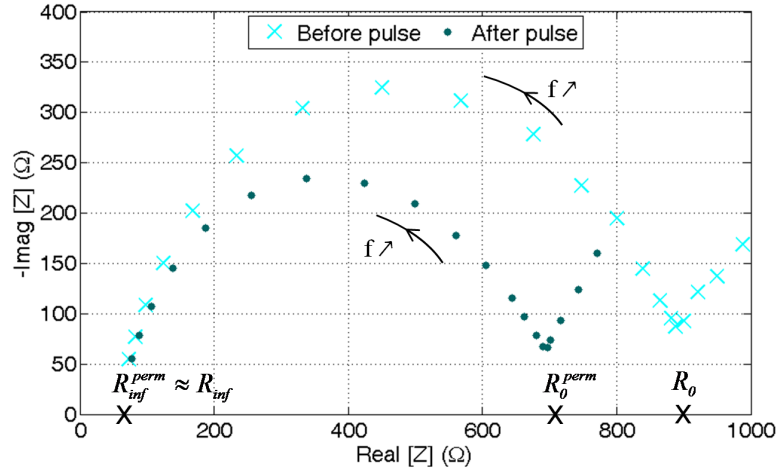


FIG. 3.5 : Impedance of a potato sample shown before and after the exposition to one single microsecond pulse of $100 \mu s$ duration and with a magnitude of $120 V/cm$. The arrow indicates increasing frequencies.

3.1.3.2 NID evolution with the number and the magnitude of micropulses

In order to check whether the proposed normalization is relevant, potatoe samples were submitted to various numbers of micropulses with different magnitudes. Duration of the pulses was fixed at $100 \mu s$ and repetition rate at 1 Hz (figure 3.6). This experiment allows to verify that for a low number of pulses and a low electric field magnitude, the impedance is not much affected (the NID is around 1) whereas when the number of pulses or the field magnitude is increased the NID can reach almost zero. NID tendencies with field magnitude or number of pulses are thus the expected ones since it is decreasing when pulsing parameters become harsher.

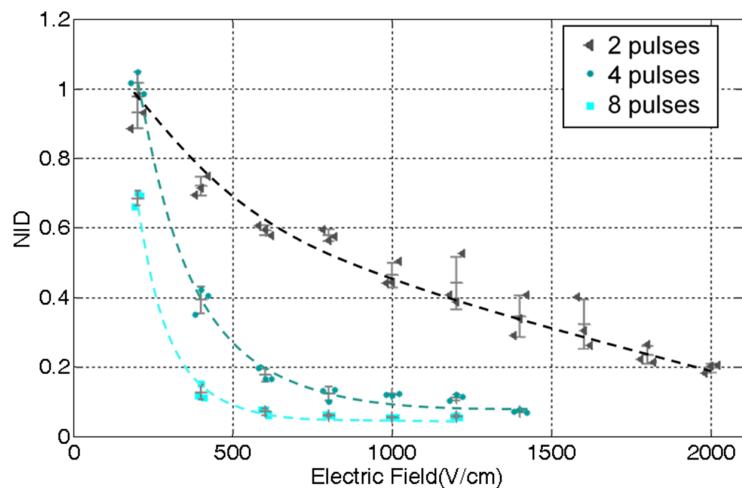


FIG. 3.6 : Normalized impedance drop following the application of 2, 4 or 8 micropulses ($100 \mu s$) with different magnitudes applied at a 1 Hz repetition rate. Results are mean \pm standard deviation ; each marker is an individual sample.

3.1.3.3 Correlation between NID and propidium iodide staining penetration

In order to validate that the NID quantifies permeabilisation, it was compared to a traditional method of permeabilisation detection: the propidium iodide (PI) staining of the cells inside, in particular of the cell nucleus (Galindo *et al.*, 2008, 2009). Potato samples, previously dipped in a 0,1 mM PI solution, were submitted to nanopulses. Either 100 or 1000 at 30 kV/cm were applied at 10 Hz. The comparison between PI staining and NID measurements is displayed on figure 3.7. It appears that with 1000 nanopulses, the high impedance drop can be correlated to a large amount of PI reaching the inside of potato cells and staining the nuclei. Moreover, when 100 nanopulses are applied, no staining is observed whereas the impedance already starts to drop. Impedance drop is thus a possible way of quantifying permeabilisation even at low levels, before it can be detected by a more common technique like PI staining.

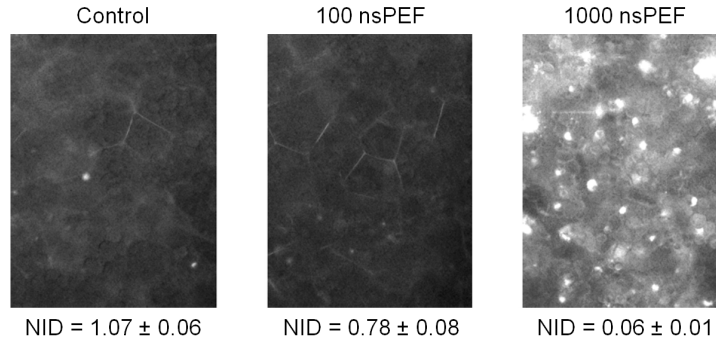


FIG. 3.7 : *Permeabilisation of potato tissue assessed by penetration of propidium iodide and by the computation of the NID. The samples were submitted to either 100 or 1000 nsPEF with a 30 kV/cm magnitude, applied at 10 Hz.*

3.2 Repetition rate impact

3.2.1 Repetition rate impact on permeabilisation of potato tissue induced by micropulses

3.2.2 Assessment by bioimpedance measurement

In order to study the impact of the repetition rate on the permeabilisation of the potato, samples were submitted to four micropulses with an electric field magnitude of 800 V/cm. The maximum repetition rate that could be reached with the generator was 7 kHz. Starting from this value the repetition rate was then gradually reduced to 1 Hz (figure 3.8). For each condition, eight samples were treated. The impedance was measured before the pulses delivery and approximately 7 seconds after the last pulse. The computation of the impedance drop shows a very low change in impedance for repetition rates between 300 Hz and 7 kHz. Below 300 Hz, NID then gradually decreases with the decrease of the repetition rate, the same pulses provoking therefore a very important change of impedance at 1 Hz. Other samples were submitted to only one micropulse keeping the magnitude at 800 V/cm. It appears that the NID drop obtained with four pulses at high repetition rate is surprisingly close to the one reached with only one pulse, as if the three following pulses were inefficient when applied extremely quickly after the first one.

In order to investigate even lower rates, it seemed more appropriate to lower the magnitude of the pulse so that a further increase in permeabilisation could be measured. Four micropulses of 300 V/cm were thus applied on the potato samples. Repetition rates between 1Hz and 0.02 Hz were investigated. This resulted in treatments lasting between 3 s and 150 s. Because of the important difference of

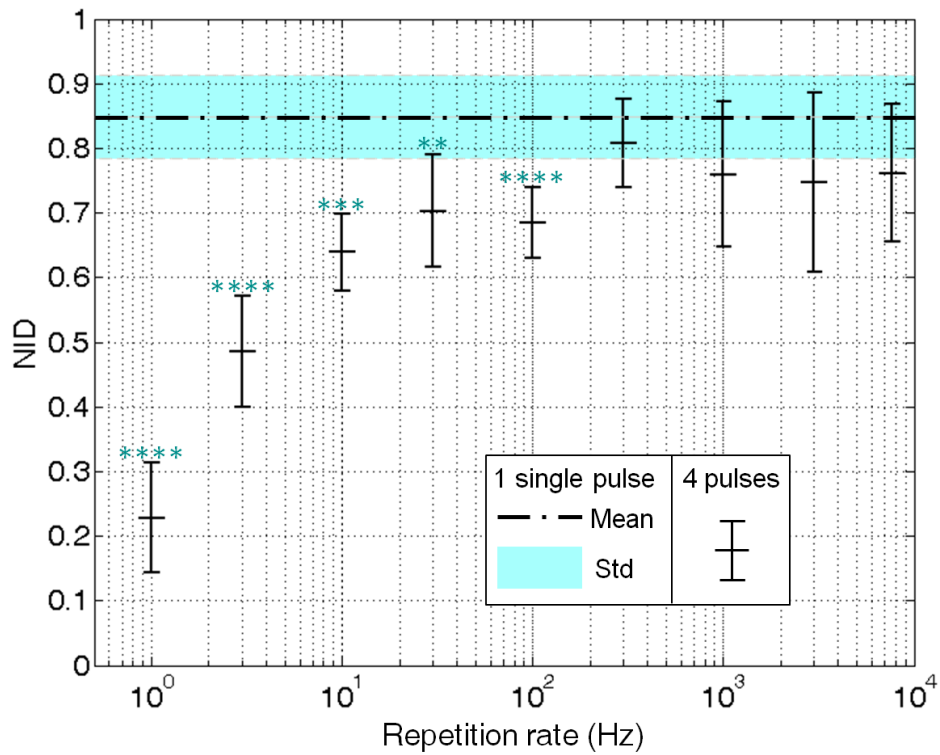


FIG. 3.8 : Pulse repetition rate impact. The grey zone represents the effect of one single micropulse of $100 \mu\text{s}$ and 800 V/cm . The crosses represent the mean and standard deviation obtained when applying four identical micropulses at different repetition rates. Statistical analyses compare the effects of four pulses at different repetition rates versus only one pulse. (**** $p < 0.0001$; *** $p < 0.001$; ** $p < 0.01$ with unpaired t-test)

treatment duration, the impedance of the samples after treatment was checked both 7 s after the last pulse and 3 minutes after the first one in order to eliminate possible artifacts due to the samples drying or to an evolution of the bioimpedance due to other metabolic changes occurring after the delivery of the first pulse. It appears that repetition rates below 1 Hz are even more efficient in permeabilising the potato tissue (figure 3.9). At 0.1 Hz and below, saturation appears. Results are similar whether measurements are made 7 s after the last pulse or 3 minutes after the first one. Rates below 0.02 Hz were not tested in order to limit the duration of the treatment.

3.2.2.1 Correlation with current measurements during pulses application.

As shown in section 3.1.2, the current level during micropulse is representative of the instantaneous value of R_0 (which is neither the value before the pulse nor just after). During experiments with micropulses, the current delivered through the sample was recorded for the four delivered pulses. For all samples, the current value at the end of each pulse was divided by the current value at the end of the first pulse, and the relative current increase in pulses 2, 3 and 4 was then analyzed. The pulses parameters used where the same as in previous experiments were bioimpedance changes were followed. At 800 V/cm, five different repetition rates were tested (figure 3.10-A). At 10 Hz, 100 Hz and 1 kHz, the current increase from one pulse to the next one is identical. This increase becomes more important at 1 Hz and even more at 0.1 Hz (figure 3.10-B). The same experiment performed using lower rates and a field magnitude of only 300 V/cm showed saturation in the current increase for rates below 0.1 Hz which is consistent with the observations in bioimpedance changes.

3.2.3 Repetition rate impact on permeabilisation of potato tissue induced by nanopulses

Permeabilisation on potato tissue was then tested using the 10 ns duration electric pulses. A first screening was done with a repetition rate fixed at 100 Hz. Because of reflection phenomena, the exact voltage depends on the initial global impedance of the sample. Thanks to the regularity in the calibration and to the good homogeneity in the electrical properties of all samples, the global impedance was not too different from one sample to another. The fluctuation of the voltage applied was thus of less than 10% between all the samples treated with a given condition.

Bioimpedance measurements were made before the pulses as well as 7 s after. Figure 3.11 shows the NID obtained for three different field magnitudes and

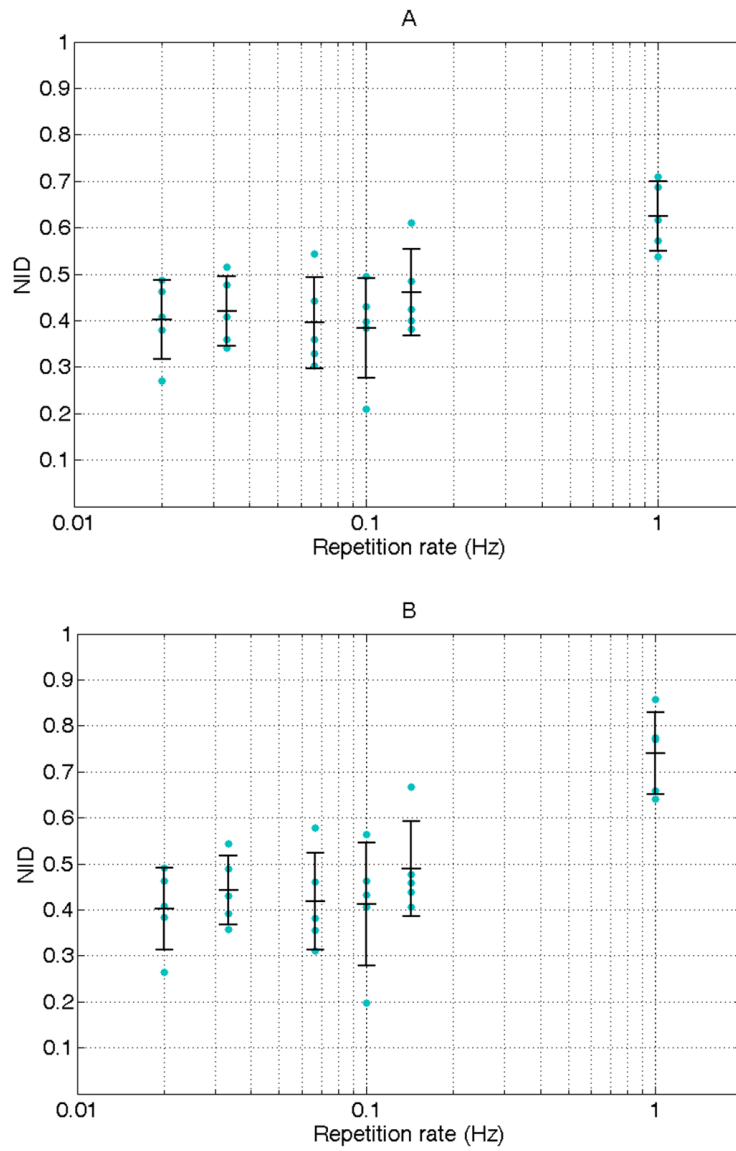


FIG. 3.9 : *NID at very low pulse repetition rates. Samples were exposed to four micropulses of $100\ \mu\text{s}$ and $300\ \text{V/cm}$. Each individual sample is represented with a gray dot. The bars indicate mean value \pm standard deviation. NID is computed either according to measurements – A – 7 s after the last pulse – B – 3 minutes after the first pulse.*

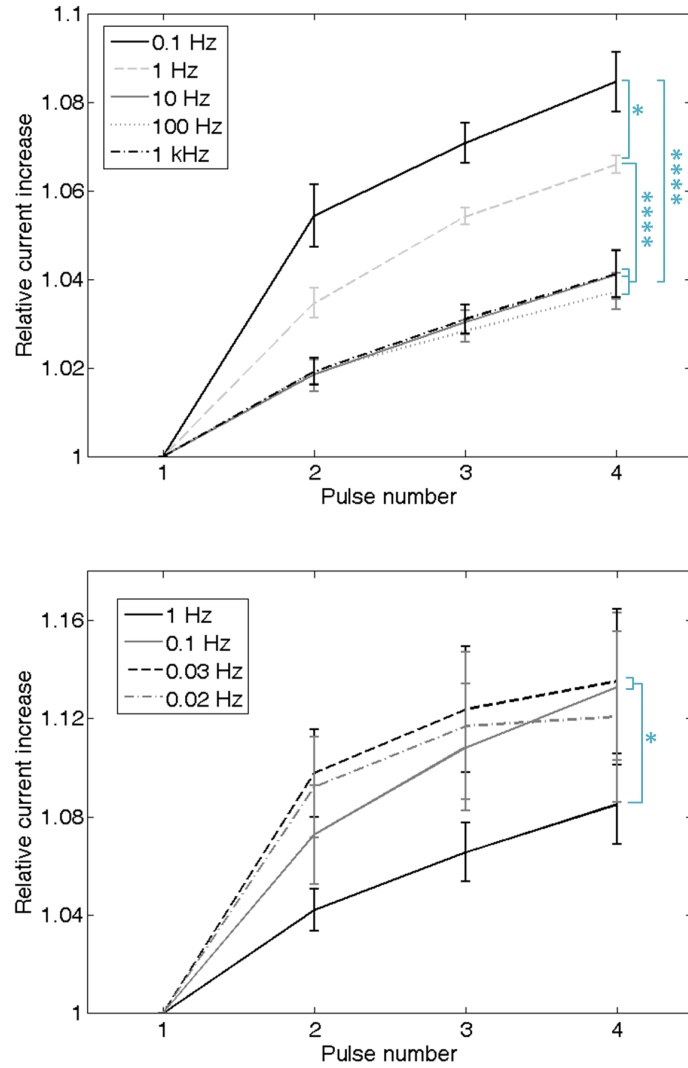


FIG. 3.10 : Relative current increase from one pulse to another during exposure to four micropulses of $100 \mu\text{s}$ of (A) 800 V/cm and (B) 300 V/cm . Mean values \pm standard deviations are represented. Statistical analyses indicate the significance of the relative current increase on pulse 4. (**** $p < 0.0001$; *** $p < 0.001$; ** $p < 0.01$; * $p < 0.05$ with unpaired t-test)

for various numbers of pulses. Even for the highest magnitude that could be achieved (40 kV/cm) an important number of pulses was necessary to achieve NID values similar to the ones obtained with micropulses. Like for micropulses, drop of impedance increases with the field magnitude or with the number of pulses applied.

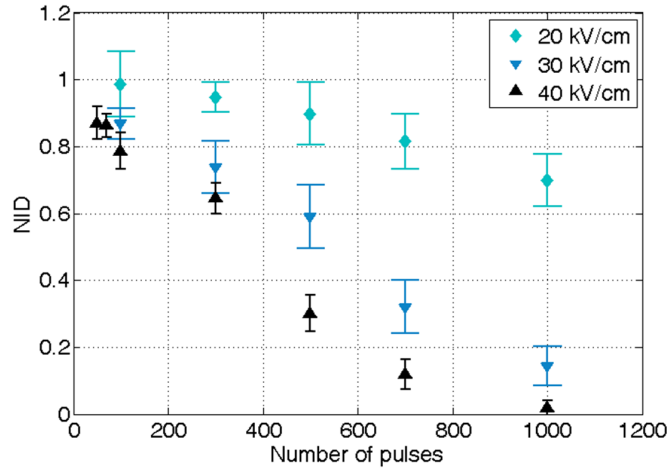


FIG. 3.11 : *NID obtained by applying nanopulses (10 ns) of about 20 kV/cm, 30 kV/cm or 40 kV/cm with a repetition rate of 100 Hz. Bars represent mean value \pm standard deviation*

The impact of the repetition rate was studied with a magnitude fixed at 40 kV/cm. First, 300 nsPEF were applied and the repetition rate was varied between 2 Hz and 300 Hz (rates above 300 Hz could not be delivered because of technological restrictions of the nanopulse generator). In this range, NID evolved from about 0.7 at 300 Hz to almost 0 at 2 Hz (figure 3.12-A). In order to explore lower repetition rates, between 0.1 Hz and 10 Hz, a lower number of pulses (only 50) was applied to limit experiments durations (figure 3.12-B). The lowest repetition rates had again the larger impact on the bioimpedance change and saturation of this effect could not be reached as the testing of still lower rates would have implied too long experiments. It was nevertheless decided to challenge an extremely low repetition rate, 0.01 Hz. This implied that one pulse was applied every 100 s. The number of pulses was thus limited to five. In the same experiment, other samples were submitted to five pulses applied at 100 Hz (figure 3.12-C). In both cases the post-treatment impedance was measured 100 s after the last pulse. A remarkable significant change in bioimpedance was actually detected at 0.01 Hz, which allows to conclude that even a very low number of nanopulses can produce large biological effects if they are applied at a sufficiently low repetition rate.

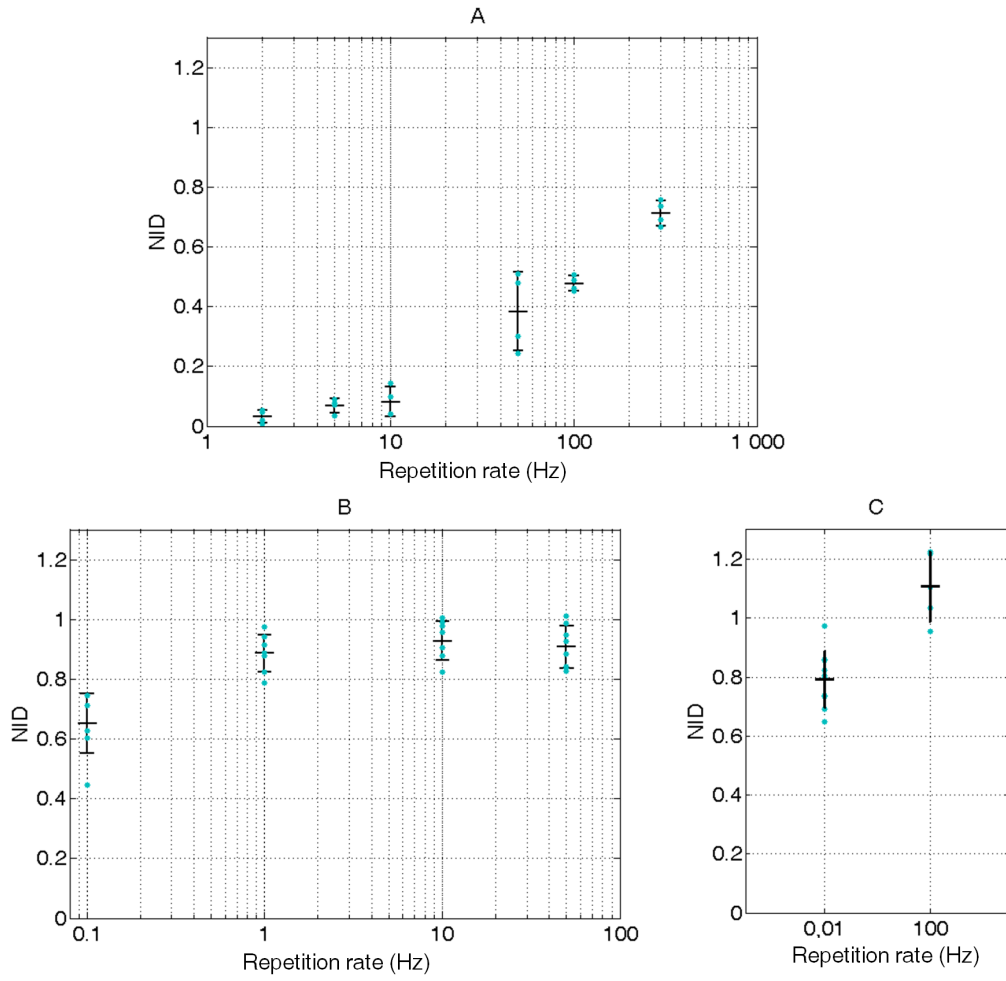


FIG. 3.12 : *Pulse repetition rate impact during the exposure to 10 ns nanopulses of 40 kV/cm. -A - 300 pulses applied -B - 50 pulses applied -C- 5 pulses applied at either 0.01 Hz or 100 Hz. Grey dots represents each individual samples. Crosses are the mean values \pm standard deviation*

3.2.4 Repetition rate impact on permeabilisation of mouse liver caused by micropulses

Experiments on mice liver were performed on living mice, under anesthesia. Bioimpedance measurements could not be done using the previous four needles electrodes mainly because the blood leaking on the needles caused short-circuit. The measurements were thus done between the two plate electrodes used to apply the electric pulses. This way of measuring increases considerably the impact of the electrochemical capacitor. The Cole-Cole model can still be used to fit the data. Figure 3.13 gives an example of fit. The model without the electrochemical capacitor is also drawn on the figure. It appears that the distortion induced by the electrochemical capacitor is important. However, the low frequency value of the impedance of the liver could be easily extracted since it corresponds exactly to the interception of the tangent to the low frequency measurements with the real axes. For the sake of simplicity, the high frequencies impedance was considered as equal to the real part of the measurement at 400 kHz.

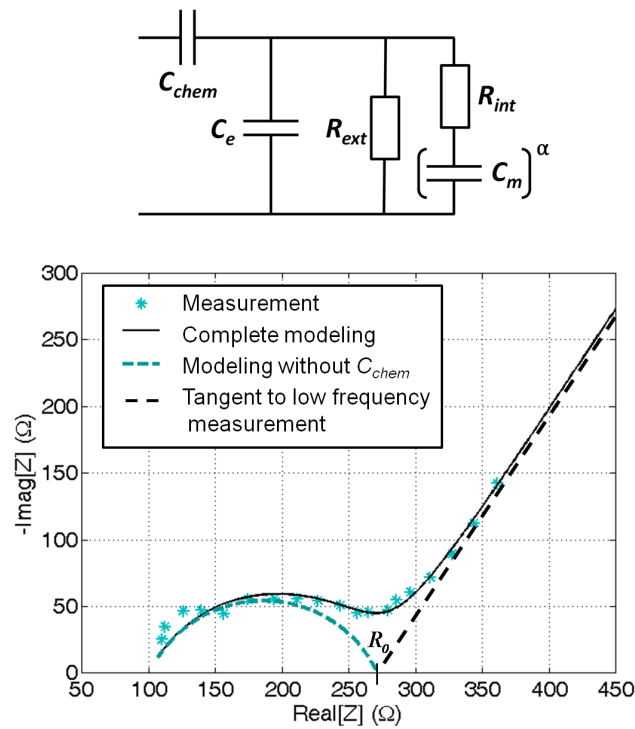


FIG. 3.13 : Example of a bioimpedance measurement on a rat liver. The fit model is presented as well as the same model without the electrochemical capacitor.

The treatment performed on the liver consisted in 4 pulses of $100\ \mu\text{s}$ and

1000 V/cm applied at different repetition rate. Following the delivery of the pulses, impedance was not stable over time. An example of evolution of R_0 after applying the four pulses at 10 Hz is given in figure 3.14. This behavior is very different from that of the potato tissue which on the contrary has a very stable impedance over time after permeabilisation. This impedance evolution of liver after pulses had already been reported in Ivorra et Rubinsky (2007). Authors mentioned that the evolution is very different depending on the intensity of permeabilisation reached. Since the measurement device did not allow monitoring bioimpedance over time with a millisecond dynamic, only relative current increase was analyzed in order to determine the dependency to repetition rate. Reasons for such evolution will be discussed in section 3.3.

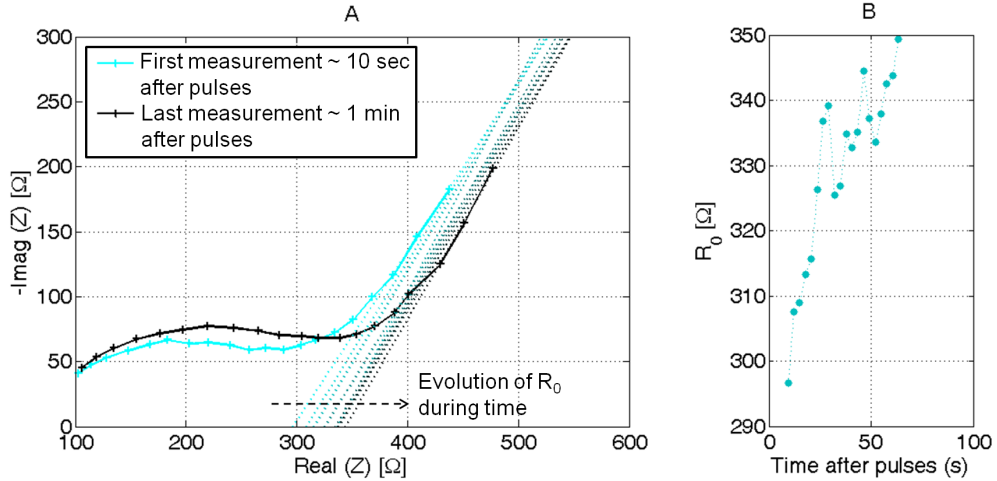


FIG. 3.14 : *Example of the evolution of R_0 in time after application of four micropulses of $100 \mu\text{s}$ of 1000 V/cm with a repetition rate of 10 Hz.*

Five different repetition rates were tested. Results presented on figure 3.15 are the concatenation of four independent experiments (representing a total of 120 mice). Each pulse is analysed on a separated graph which represents the relative current increase normalised to the first pulse. Effect of the repetition rate is not as well marked as on potato samples. At 0.1 Hz the relative current increase is much lower than at 1 Hz and with high statistical significance. According to statistical analysis, it seems moreover that 1 Hz and 10 Hz lead to a slightly higher current increase than 100 Hz and 1 kHz, at least on the second and the third pulse. On pulse four, apart from the 0.1 Hz, only the 1 kHz repetition rate detaches itself, and presents a lower relative current increase.

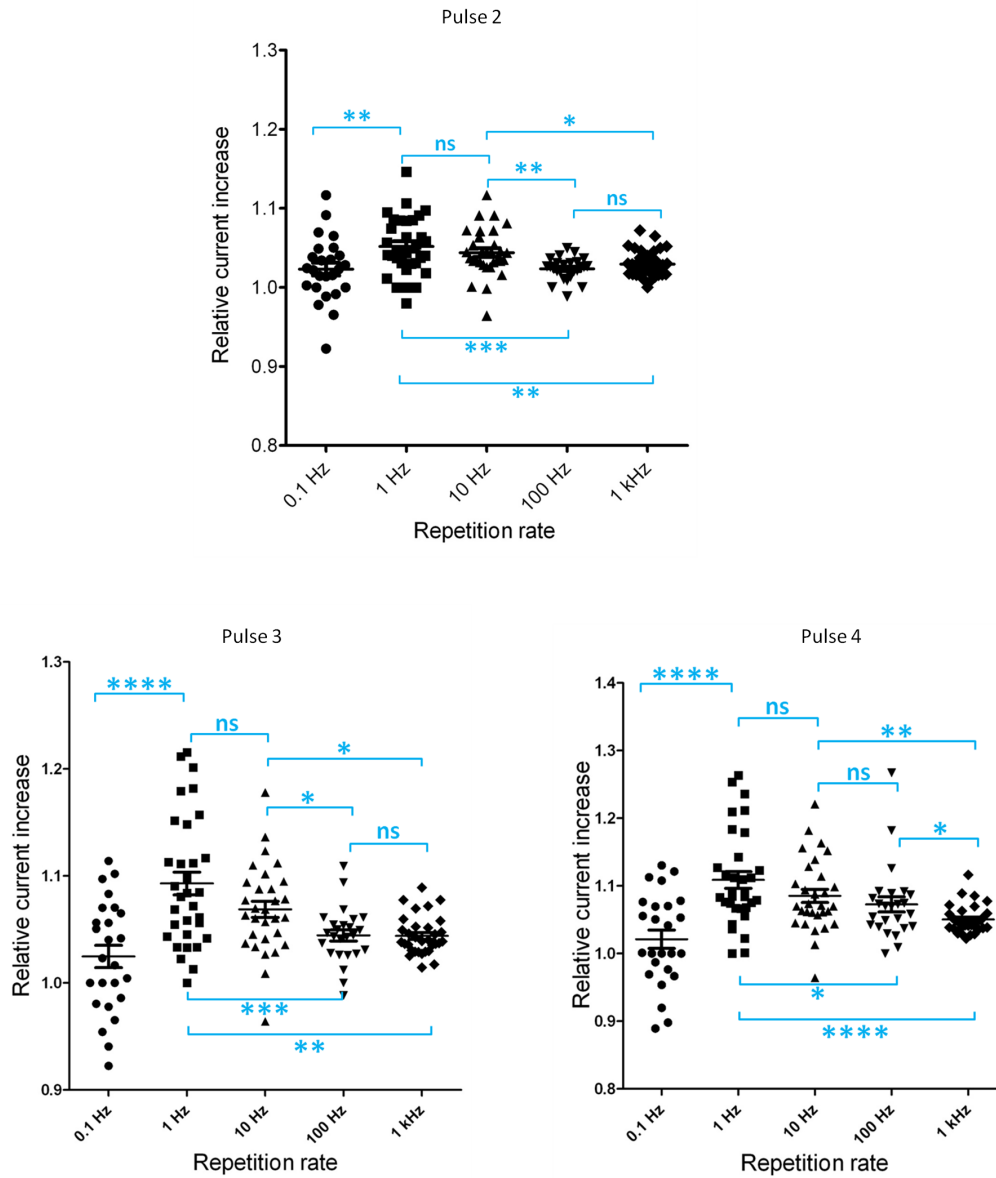


FIG. 3.15 : Relative current increase during exposure to four micropulses of $100 \mu\text{s}$ of 1000 V/cm . Each graph represents the current increase normalised to the first pulse. Mean values \pm standard errors are represented as well as individual samples. Statistical analyses are performed with unpaired *t*-test (**** $p < 0.0001$; *** $p < 0.001$; ** $p < 0.01$; * $p < 0.05$).

3.3 Discussion

3.3.1 Impact of the repetition rate on permeabilisation by microsecond pulses

In this chapter, the correlation between NID and permeabilisation has been experimentally validated by comparing impedance measurement to penetration of propidium iodide in potato tissue. Moreover, electrical modeling of permeabilisation also predicts a drop of impedance at low frequencies when a tissue is permeabilised (Ivorra, 2010). We thus believe that permeabilisation intensity in potato, can be directly related to the value of the NID.

In view of this result, it was possible to study the repetition rate impact on permeabilisation on potato tissue. Moreover, the correlation between impedance drop and relative current increase from pulse to pulse allowed to transpose this study *in vivo* on mice liver. In the case of potato, data show that for pulses of 100 μ s, very low repetition rates are more efficient to permeabilise. Rates from 0.02 Hz to 7 kHz have been tested and a saturation was observed below 0.1 Hz.

The impact of repetition rate on mice liver has only been tested by using the current increase pulse after pulse. The evolution of the current increase was not, as in the case of potato, a monotonic function of the repetition rate. We observed that the current increase was maximum at 1 Hz and that group treated at 1 Hz and 10 Hz had a close behaviour. The groups treated at 100 Hz and 1 kHz showed a lower current increase and the group treated at 0.1 Hz an even lower one. The difficulty of interpretation relies here on the fact that the impedance of the liver, unlike potatoes impedance, can evolve very quickly after pulse application as we have illustrated in figure 3.14. In Ivorra et Rubinsky (2007), the authors show that after electroporation of liver in living animals, the conductivity of the liver tends to increase, whether the electroporation is reversible or irreversible. This conductivity increase after the delivery of pulses was suggested to be related first to some membrane resealing (during up to 10 s) and then to both blood occlusion and cell swelling (that can spread over tens of s). As a consequence, we cannot rule out that these phenomena are responsible for the behavior of the group treated at 0.1 Hz since the treatment duration in this case is 30 s. This highlights the fact that the response of the whole organism, and in particular the blood flow systems, might hide the cells and the membrane response to the pulses. Focusing on the other repetition rates, we can make the hypothesis that, like in potato, current increase from one pulse to the other, reflects the efficiency of the permeabilisation. This would thus indicate that 1 Hz and 10 Hz are more efficient than 100 Hz or 1 kHz, pushing towards the higher efficiency of low repetition rates. More experiments, for example histological analysis of the permeabilised area would help to reinforce this conclusion.

Many studies have already been investigating the effect of the repetition rate. In Rols et Teissié (1998), the authors had shown a similar tendency *in vitro* on CHO cells. For each rate between 1 Hz and 500 Hz, the number of pulses and their duration were adjusted in order to keep a cumulative duration of exposure constant as well as the time between the first pulse and the last pulse (in order to avoid artifacts due to cell rotation). Permeabilisation was assessed by penetration of propidium iodide and transfection of a plasmid coding for β -galactosidase (β -Gal) was also tested. Concerning penetration of propidium iodide, it decreased by a factor 4 when increasing the rate from 1 Hz to 500 Hz. Permeabilisation of cells to β -Gal was even more sensitive as it decreased by a factor 10 simply by increasing the repetition rate from 1 Hz to 5 Hz. Those results are thus in favor of greater efficiency of permeabilisation at low repetition rate. In Pucihar *et al.* (2002) repetition rate impact on the uptake of Lucifer Yellow in DC3F was tested. According to the authors, for 8 pulses of 100 μ s duration, 10 Hz seems to be the optimum rate for the maximum uptake without reaching irreversible electroporation. However, their data show that for sufficiently low electric field value below irreversible electroporation threshold, 1 Hz and 10 Hz repetition rate are not distinguishable and they are more efficient than 1 kHz and 2.5 kHz. The general conclusion seems therefore to be in favor of a better efficiency of the low repetition rates.

Very few experiments *in vivo* have been carried out so far. In Sersa *et al.* (2010), electrochemotherapy on mice was tested at 1 Hz, 10 Hz, 100 Hz, 1 kHz and 5 kHz. Results show similar efficiency of tumor growth at all rates eventhough 1 Hz led to the highest number of complete regression (36.8%) and 1 kHz to the lowest (9.1 %). In Al-Sakere *et al.* (2007), antitumor effects of irreversible electroporation on immunocompetent mice do not appear related to the rate at which the electric pulses were delivered (1 Hz or 5 kHz). On immunodeficient mice however, 80 pulses appeared more efficient when applied at 0.3 Hz than at 3 Hz and 8 pulses more efficient at 0.03 Hz than at 0.3 Hz. This was correlated in Ivorra *et al.* (2009) by conductivity measurements using the same protocols.

3.3.2 Dependence to the repetition rate on permeabilisation by nanosecond pulses

Our experiments carried out on potato samples but with nsPEF show a similar tendency of greater effect of permeabilisation at very low repetition rates. At the most, it turned out that 0.01 Hz could induce permeabilisation on potato with only five pulses of 10 ns in duration. We might note here that the ratio between the duration of the excitation and the duration of the relaxation is thus in this case of 10^{10} . Naturally the similarities observed in the case on microsecond and nanosecond pulses do

not allow us to draw any conclusions on whether the mechanisms of permeabilisation are the same or not. However, if we admit that the optimal time during pulses is related to the ability of a cell to repair the induced damage, we can assume that the damages induced by the two different types of pulses could be of the same nature.

A similar study on the impact of repetition rate with pulses of different length has been recently performed on CHO cells (Pakhomova *et al.*, 2011). For all the tested pulse lengths, from $0.3\ \mu\text{s}$ to $9\ \mu\text{s}$, authors have shown a greater impact of very low repetition rate. They propose a 'electroporation-induced sensitization' due to possibly, a depletion of the energy of the cells after they reseal the damage from the first pulse, a modification of the cell physiology due to prolonged time intervals with high internal Ca^{2+} or a swelling of the cells resulting in a diameter increase and thus a lower permeabilisation threshold in terms of electric field magnitude. In the case of potato, cell swelling is unlikely since the cell wall prevents it. Moreover, an impact on the metabolism (for example due to rushes of Ca^{2+} ions) is important to consider when permeabilisation is assessed by cell death but it is quite unlikely to modify results when electroporation is assessed by measuring electrical properties of the tissue (which is the method that we have used on potato).

3.3.3 Hypothesis regarding the repetition rate dependency

The first hypothesis that we had in mind was that the optimal repetition rate was dependant on the tissue geometrical or mechanical properties. According to studies on vesicles, mechanical relaxation times of lipid bilayers are in the range of seconds or tens of seconds (Riske et Dimova, 2005) which could explain a better efficiency of the low repetition rates as they would enable cells to mechanically relax between each pulse. Moreover, in the case of tissues, we can suspect that contact between cells will play an important role in the global relaxation time especially since some molecules such as integrins might serve as electro-mechanical transducers at low frequencies (Hart, 2006, 2008, 2010). However, we believe that a mechanical resonance would appear sharper than what was observed in the experiments reported by us and others. In our experiments, for example, we observe a dependence with the repetition rate on the whole frequency ranges that we have tested which represent more than five decades in the case of the potato. This hypothesis has therefore been rejected.

The second hypothesis is that the optimal rate is related to the resealing speed of the membranes. Indeed, applying a pulse on a permeabilised cell is likely to be less efficient since conducting structures might prevent the establishment of the transmembrane potential. Among the possible pathway for repair, we believe that endocytosis might be a major one. One of the major argument for this, is that is has

been observed already that membrane resealing can be blocked at 4 °C (Teissie et Rols, 1994). Moreover, it has been shown that electric pulses can induce endocytosis (Glogauer *et al.*, 1993) or macropinocytosis (Rols *et al.*, 1995). More generally, it is known that membrane tension regulates endocytosis rate for both plant and cells (Apodaca, 2002). In Raucher et Sheetz (1999) authors show that endocytosis rate correlates inversely with membrane tension: increase of tension during mitosis happens together with a decrease of endocytosis rate. Complementarily, it was shown that when osmotically swollen cells are returned to isosmotic conditions, they rapidly recover, presumably as a consequence of some endocytosis triggered by a decreased membrane tension (Apodaca, 2002). Endocytosis is thus one possible pathway to repair damage in the membrane. It could be compatible with slow dynamics of repair of several 100 of seconds or even minutes. Moreover, since it is a continuous process starting immediately after the end of the pulse, it could explain the continuous dependence to the repetition rate.

In any case, in reversible conditions, there should be a cut-off frequency under which permeabilisation becomes less efficient, since effects of the first pulse would be completely reversed. This remains to be explored.

Chapitre 4

Expérimentation sur cellules en suspension

Ce chapitre aborde la perméabilisation de cellules en suspension. En premier lieu, ce chapitre expose l'utilité de la bléomycine comme marqueur de la perméabilisation induite par les impulsions nanosecondes. La sensibilité de détection qu'offre la bléomycine permet de détecter une perméabilisation même en l'absence de conditions électriques optimales. Dans des conditions électriques plus favorables, l'internalisation de bléomycine est ensuite utilisée pour explorer les paramètres électriques importants pour l'obtention d'une perméabilisation. Enfin, une amorce de transposition *in vivo* est proposée et met en évidence qu'il est possible d'obtenir une perméabilisation *in vivo* avec des impulsions de 10 ns.

Remarque préliminaire Au cours de ce chapitre, des calculs de différence de potentiel transmembranaire (ΔPTM) sont présentés. Les ΔPTM sont calculés d'après l'équation 1.7 et pour $\cos(\theta) = 1$. Le ΔPTM de repos est négligé. Le rayon de la cellule est pris égal à $7\ \mu\text{m}$, ce qui est le rayon moyen des cellules DC3F qui sont utilisées. La valeur calculée aux pôles n'est peut-être pas toujours atteinte, puisqu'en cas de perméabilisation, le ΔPTM chute. En revanche, sa valeur permet d'apprécier l'aire perméabilisée. Si le seuil de perméabilisation est de $\Delta\psi_{\text{seuil}}$, et que la valeur maximum de ΔPTM calculée à la cathode est de $\Delta\psi_{\text{max}}$, alors le pourcentage d'aire perméabilisée est donné par la formule 4.1 (formule valable pour un champ homogène unidirectionnel et pour une cellule sphérique).

$$A_{\text{permabilise}}(\%) = \left(1 - \frac{\Delta\psi_{\text{seuil}}}{\Delta\psi_{\text{max}}}\right).100 \quad (4.1)$$

4.1 Principe des expériences

La bléomycine est une substance cytotoxique dont l'action a été largement étudiée lors des travaux portant sur l'électrochimiothérapie (Tounekti *et al.*, 1993, 1995; Mir *et al.*, 1996). Elle présente l'intérêt majeur de permettre facilement la détection d'une perméabilisation réversible. En effet, une cellule perméabilisée de façon réversible survivra et se divisera normalement en l'absence de bléomycine dans le milieu d'électroporation, alors qu'elle mourra au plus tard à la première division cellulaire si de la bléomycine a pu pénétrer à l'intérieur de la cellule. L'intérêt majeur de l'utilisation de la bléomycine consiste dans le fait que la détection de sa pénétration ne repose sur la sensibilité d'aucun détecteur. Ainsi, la réponse à la question de la pénétration de la bléomycine est aisément quantifiable : du moment qu'une cellule apparaît comme sensible à la bléomycine, 500 molécules au moins ont pu pénétrer à l'intérieur. La limite de la sensibilité d'une telle expérience repose bien entendu sur la taille de la molécule ($\sim 1500Da$) et sur sa capacité à diffuser pendant la durée nécessairement limitée de l'état perméabilisé de la cellule.

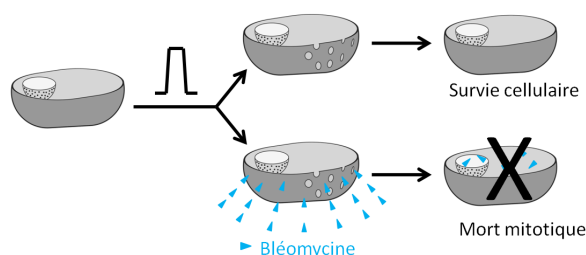


FIG. 4.1 : Principe de la détection de la perméabilisation au moyen de bléomycine.

Afin d'évaluer la survie de la cellule, nous procédons à des expériences d'efficacité de clonage. Les cellules, après exposition, sont déposées dans des boîtes de Pétri à une concentration permettant leur croissance clonale. Cinq jours après, les clones ayant réussi à pousser sont suffisamment gros pour être colorés et comptés. Cette technique présente un intérêt double. Le premier intérêt de l'efficacité de clonage est qu'elle permet de révéler la perte de viabilité, quel que soit le processus de mort cellulaire, qu'il soit immédiat (nécrose cellulaire), plus lent (apoptose) ou très lent (mort mitotique). Son second intérêt est qu'une telle méthode permet de réaliser une statistique puisque l'on considère plusieurs centaines de cellules à la fois tout en individualisant chaque cellule.

4.2 Travail à conductivité fixe

Cette section présente les résultats d'expériences conduites dans du SMEM (conductivité 1,5 S/m). Le taux de répétition est fixé à 10 Hz ¹.

4.2.1 Rôle de l'amplitude

Le premier paramètre dont nous avons évalué l'influence est l'amplitude de l'impulsion. La figure 4.2 présente le pourcentage de viabilité obtenu après l'application de 300 nanopulses d'amplitude variable délivrés avec un taux de répétition de 10 Hz. On observe une dépendance monotone de la viabilité avec l'amplitude des impulsions. 300 impulsions commencent à induire de la mortalité à partir de 3 kV/mm, et la viabilité chute en dessous de 40 % pour une amplitude de 5,6 kV/mm. Ainsi, dans cette fourchette d'amplitude, les impulsions induisent de la mortalité directe, mais uniquement à condition d'être appliquées en nombre important.

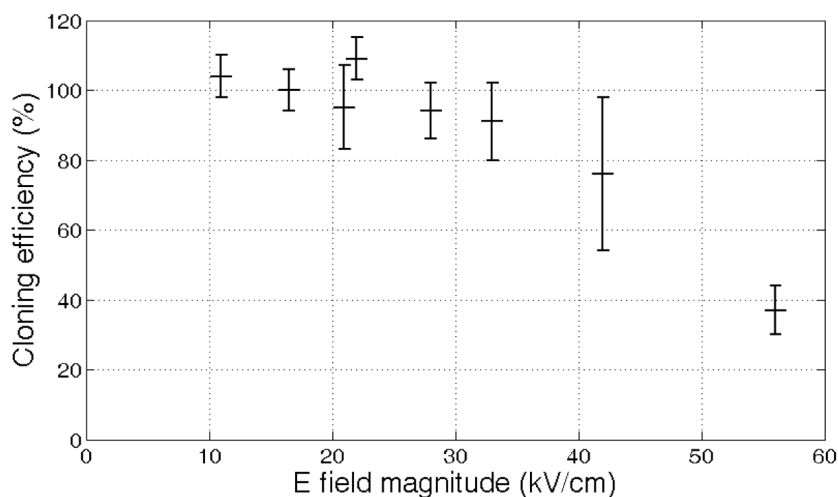


FIG. 4.2 : Viabilité quantifiée par expérience d'efficacité de clonage suite à l'application de 300 impulsions de 10 ns de différentes amplitudes. La fréquence de répétition est fixée à 10 Hz. Lors de l'application des impulsions, les cellules sont en suspension dans du S-MEM (Cuvettes STD, générateur A).

4.2.2 Rôle du nombre d'impulsions

Nous avons ensuite fixé l'amplitude des nanopulses à 4 kV/mm, et analysé l'influence du nombre d'impulsions. La première expérience a consisté à pulser les cellules

¹Rappel : pour des taux de répétition plus élevés, il apparaît dans ces gammes d'amplitude un échauffement global de la solution (voir section 2.4.2)

et à les replacer en milieu de culture immédiatement après, afin de les observer ensuite au microscope. La figure 4.3 présente les images réalisées environ 30 minutes après l'application des nanopulses. Ces photos montrent que pour un nombre important d'impulsions (300 ou 1000), les cellules sont fortement gonflées. Leur contour apparaît extrêmement lisse et la transparence des cellules est accrue, aspect caractéristique d'une cellule perméabilisée. En effet, l'influx d'eau consécutif à la perméabilisation induit une dilution du cytoplasme. Il apparaît cependant que pour 300 nanopulses délivrés, certaines cellules échappent en partie aux effets du champ et gonflent peu ou pas. A 1000 nanopulses, en revanche, toutes les cellules visibles sont entièrement gonflées, une partie des cellules étant déjà sous forme de débris cellulaires. Il apparaît par ailleurs sur les photos que les organelles intracellulaires sont également affectées par les nanopulses ; les noyaux apparaissent également comme gonflés ainsi que les vésicules intracellulaires. Enfin, sur les images obtenues après l'application de seulement trois nanopulses, on remarque que la membrane présente des ondulations qui ne sont pas présentes sur les témoins, ce qui suggère qu'un très faible nombre d'impulsions exerce déjà un effet sur les membranes.

Le rôle du nombre d'impulsions a été évalué de façon plus quantitative en utilisant le protocole d'efficacité de clonage en absence ou en présence de bléomycine (figure 4.4). En l'absence de bléomycine, un nombre important d'impulsions est nécessaire pour tuer les cellules par le seul effet du champ. La moitié de la population est tuée lorsque 500 nanopulses sont appliqués. L'ajout de bléomycine à une concentration de 30 nM permet de réduire le nombre d'impulsions nécessaires pour tuer l'ensemble des cellules. On peut noter en particulier qu'une centaine d'impulsions environ est suffisante pour tuer 50 % des cellules, alors qu'en l'absence de bléomycine, l'ensemble des cellules survivent. Cette expérience montre que des impulsions de 10 ns peuvent induire une perméabilisation réversible. Par ailleurs, lorsque la concentration extracellulaire de bléomycine passe à 3 μ M, le nombre d'impulsions nécessaires pour obtenir une mortalité est encore diminué. Les mêmes taux de mortalité qu'avec la concentration de 30 nM sont obtenus avec 25 fois moins d'impulsions. Par ailleurs, une seule impulsion devient suffisante pour tuer environ 20 % des cellules.

L'ensemble de ces résultats expérimentaux indique tout d'abord qu'un seul nanopulse de 10 ns et 4 kV/mm suffit à créer des défauts dans la structure de la membrane suffisamment importants pour permettre la pénétration de la bléomycine, une molécule de poids moléculaire 1,5 kDa. Nous ne disposons pas de données sur la taille de cette molécule. On peut cependant noter qu'une partie de la bléomycine est un disaccharide. Le sucrose, disaccharide courant, a des dimensions de l'ordre du nm (Nesin *et al.*, 2011). La bléomycine est donc de taille au moins supérieure au nm. A ce titre, il n'est donc pas adéquat de parler de nanopores pour décrire

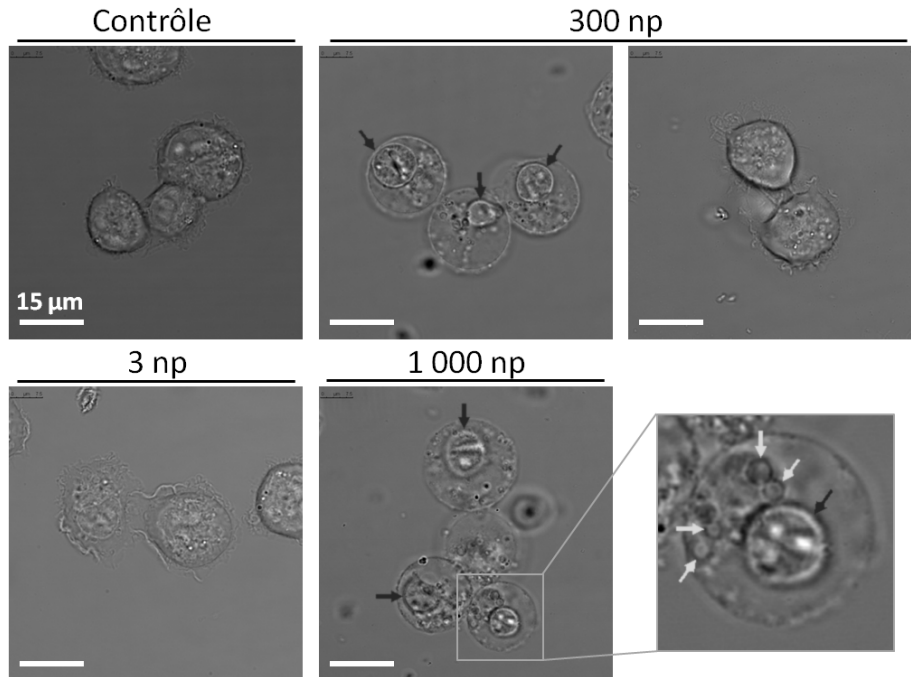


FIG. 4.3 : Visualisation de l'aspect des cellules 30 minutes environ après l'application d'un nombre variable d'impulsions. La fréquence de répétition est fixée à 10 Hz. Le champ appliqué est de 2,5 kV/mm. Lors de l'application des impulsions, les cellules sont suspendues dans du S-MEM. Les flèches noires indiquent les noyaux et les flèches blanches les organelles intracellulaires (Cuvettes STD, générateur A).

les défauts engendrés au niveau de la membrane par les nanopulses. Une partie des défauts au moins peut en effet permettre la diffusion à travers la membrane de molécules de taille plus importante que le nm, et ce même à la suite de l'application d'une unique impulsion de 10 ns et 4 MV/m. Les études sur la taille des molécules qui peuvent être internalisées après l'application d'impulsions plus longues (60 ns ou 600 ns) rapportent des tailles plus petites. Les méthodes utilisées dans ces études (en particulier le suivi du changement de volume des cellules ou l'internalisation d'iodure de propidium) nécessitent cependant l'internalisation de grandes quantités de molécules (Nesin *et al.*, 2011). La mort mitotique induite par la bléomycine, au contraire, ne nécessite l'internalisation que de 500 molécules, ce qui en fait une méthode bien plus sensible.

Avec ce type d'impulsion, il est possible de détecter la perméabilisation réversible après l'application d'une seule impulsion dans 20% des cellules lorsque la concentration de bléomycine est de $3\mu M$. Cette concentration correspond environ à $3 \cdot 10^6$

molécules de bléomycine dans le volume d'une cellule (cellule sphérique de rayon $7\mu\text{m}$), soit 6000 fois plus que le nombre nécessaire pour induire la mort mitotique (environ 500). Ainsi, il apparaît que dans ces conditions, la bléomycine ne diffuse qu'à travers une section efficace restreinte de la membrane et/ou pendant un temps court.

Il est important de souligner que lors des expériences à $3\mu\text{M}$, une minute après l'application des impulsions, les cellules sont diluées dans un milieu sans bléomycine. La perméabilisation observée ici est donc un effet direct des impulsions, par opposition à la perméabilisation au PI, qui a été le plus souvent rapportée au moins 10 minutes après l'application des nanopulses.

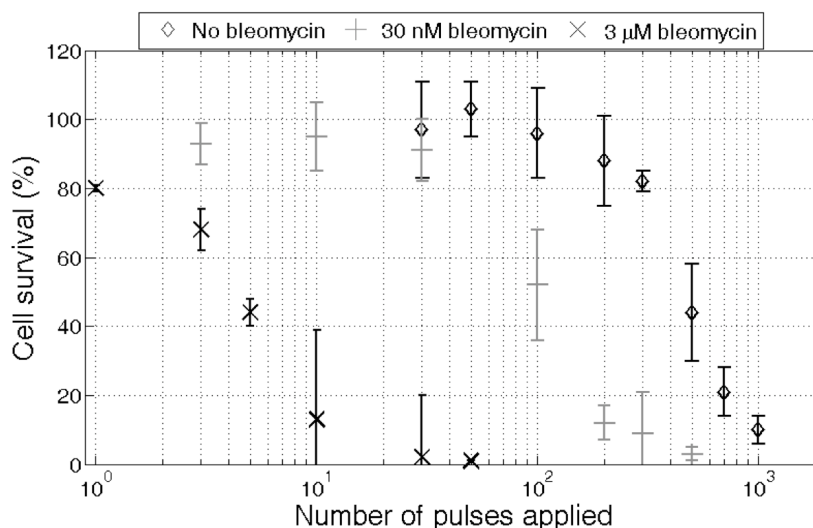


FIG. 4.4 : Viabilité quantifiée par expérience d'efficacité de clonage suite à l'application d'un nombre variable d'impulsions. La fréquence de répétition est fixée à 10 Hz. Le champ appliqué est de 4 kV/mm . Lors de l'application des impulsions, les cellules sont suspendues dans du S-MEM contenant éventuellement de la bléomycine. Les résultats sont normalisés par rapport aux témoins soumis à la bléomycine seule (Cuvettes STD, générateur A).

4.3 Travail à champ constant et conductivité variable

4.3.1 Rôle de la conductivité en perméabilisation classique

Il est globalement admis que la perméabilisation obtenue avec des impulsions de quelques microsecondes ou quelques millisecondes est initiée par l'augmentation de la différence de potentiel transmembranaire de la cellule, et le dépassement d'un seuil de rupture (voir chapitre 1). L'augmentation de la différence de potentiel

transmembranaire est induite par l'accumulation d'ions de chaque côté de la membrane. Ainsi, intrinsèquement, la perméabilisation d'une cellule est un effet des charges présentes dans les milieux extra et intra- cellulaire.

L'étude de l'impact de la conductivité extra-cellulaire sur la perméabilisation par des micropulses a pourtant montré une faible influence de celle-ci sur l'état final de perméabilisation. A très faible conductivité du milieu extracellulaire seulement, on observe une légère baisse d'efficacité de la perméabilisation (Ivorra *et al.*, 2010)(voir section 1.3.5.3).

Le tableau 4.1 indique les ordres de grandeur des constantes de temps de charge de la membrane en fonction de la conductivité extra-cellulaire. La constante de temps est calculée d'après l'équation 4.2 (voir le chapitre 1).

$$\tau = \frac{1}{2} \frac{r \varepsilon_m \varepsilon_0}{e} \frac{\sigma_i + 2\sigma_e}{\sigma_i \sigma_e} \quad (4.2)$$

avec r rayon de la cellule, σ_i σ_e conductivités intra et extra cellulaire, ε_m permittivité de la membrane, e épaisseur de la membrane, ε_0 permittivité du vide

TAB. 4.1 : *Constantes de temps de charge de la membrane cytoplasmique en fonction de la conductivité du milieu extracellulaire. Les valeurs utilisées pour le calcul sont données sous le tableau.*

conductivité extracellulaire	1,5 S/m	1 S/m	0,1 S/m	0,01 S/m
constante de temps de la membrane	60 ns	70 ns	350 ns	3 μ s

$$r = 7 \mu m, \sigma_i = 1.5 S/m, e = 5 nm, \varepsilon_m = 5$$

Il apparaît que pour une conductivité extra-cellulaire proche d'une valeur physiologique (c'est à dire 1,5 S/m), le temps de charge se situe autour de la centaine de nanosecondes. Pour une conductivité 15 fois plus faible (0,1 S/m), le temps de charge est toujours inférieur à la microseconde (350 ns). Ainsi, pour des impulsions longues (la centaine de microsecondes ou la milliseconde) la différence de potentiel transmembranaire atteint rapidement sa valeur d'équilibre, et la conductivité extracellulaire ne modifie pas l'initiation du phénomène de perméabilisation, puisque la même différence de potentiel transmembranaire est atteinte, et cela dans un temps court par rapport à la durée de l'impulsion. L'absence de dépendance à la conductivité extracellulaire suggère par ailleurs que la densité de charges circulant dans le milieu n'intervient pas dans le processus de stabilisation ou d'expansion des pores.

Afin de tester l'influence de la conductivité, les expériences qui suivent sont conduites soit comme les précédentes dans du S-MEM de conductivité physiologique (1,5 S/m), soit dans un milieu à base de sucrose, le STM, de conductivité beaucoup plus faible (0,1 S/m).

4.3.2 Résultats préliminaires liés aux impulsions microsecondes

Lors d'expériences préliminaires, il nous a semblé important de contrôler que la conductivité extra-cellulaire n'avait pas d'influence lors de l'exposition à des impulsions microsecondes dans nos conditions expérimentales et avec notre moyen de détection.

Paramètres électriques Le cliniporator étant réglé en tension, il est facile d'imposer une tension identique sur chacune des cuvettes contenant les cellules en S-MEM ou en STM. Pour une même tension et donc un même champ appliqué, les courants sont mesurés. En utilisant la géométrie de la cuvette d'exposition, il est alors possible d'évaluer le champ électrique et les densités de courant à partir des mesures de tension et courant. Les grandeurs électriques sont présentées sur la figure 4.5.

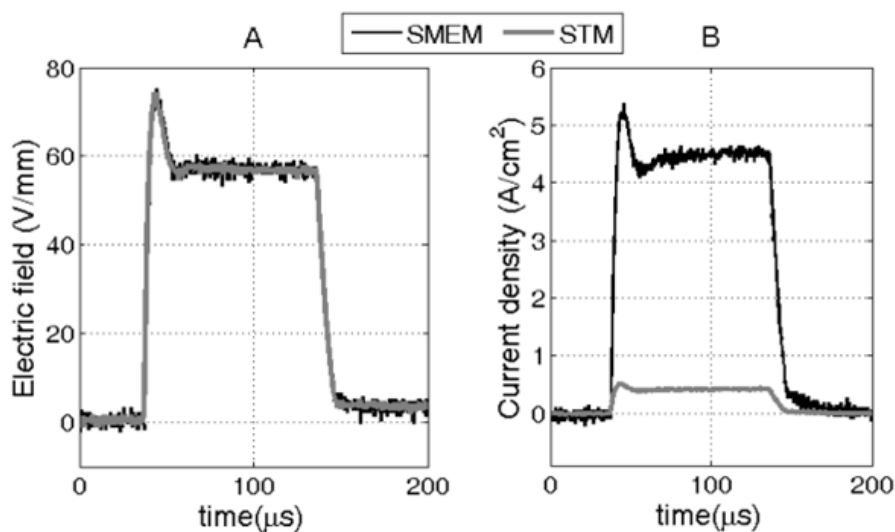


FIG. 4.5 : *Champ électrique et densités de courant lors de l'application d'une impulsion de $100\mu\text{s}$ sur une solution de S-MEM ou de STM. Une cuvette de distance inter-électrodes 1 mm contenant $100\mu\text{L}$ de solution a servi à faire les mesures.*

La figure 4.6 présente les ΔPTM théoriques calculés aux pôles d'une cellule de rayon $7\mu\text{m}$ pour les deux milieux à partir d'une impulsion réelle de $125\text{V}/\text{mm}$

délivrée par le cliniporator . Comme attendu, ils sont quasiment identiques dans les deux milieux.

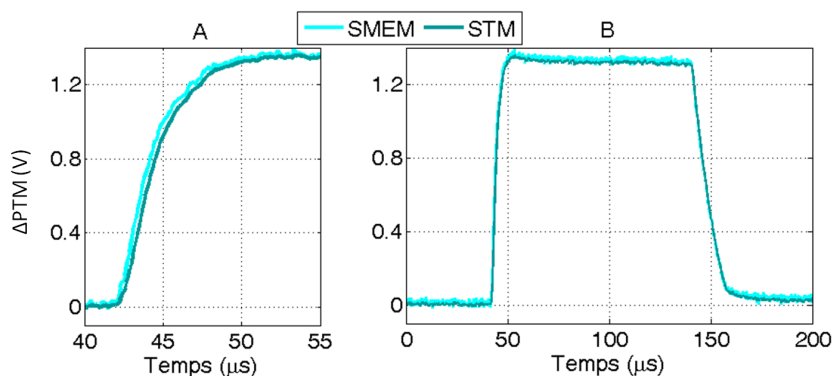


FIG. 4.6 : Différences de potentiel membranaires théoriques calculées pour les deux milieux à partir d'une impulsion de $125 V/mm$

Une seule impulsion, amplitude variable Une première expérience a consisté à exposer les cellules à une seule impulsion de $100 \mu s$ d'amplitude variable dans les deux milieux extra-cellulaires S-MEM et STM. L'expérience a été conduite à la fois en absence et en présence de $30 nM$ de bléomycine. Les résultats sont présentés sur la figure 4.7. Il apparaît qu'une seule impulsion de $100 \mu s$ n'induit aucune mortalité, même à $250 V/mm$, quel que soit le milieu extra-cellulaire. En présence de $30 nM$ de bléomycine en revanche, la mortalité augmente avec l'amplitude du champ jusqu'à atteindre environ 100% pour un champ de $250 V/mm$. Les paramètres électriques testés ici induisent donc une perméabilisation réversible. Quel que soit le milieu extra-cellulaire utilisé, les résultats obtenus sont très proches. Ainsi, la densité de courant ne semble pas affecter l'efficacité de la perméabilisation. L'utilisation de la bléomycine à $30 nM$ permet de détecter la perméabilisation par une impulsion de $100 \mu s$ pour un champ de $60 V/mm$. Le ΔPTM théorique associé aux pôles est dans ce cas de $630 mV$ pour une cellule de $7 \mu m$.

Amplitude fixe, nombre d'impulsions variable Une seconde expérience a été conduite afin de tester l'influence du milieu extra-cellulaire lors de l'application d'un nombre variable d'impulsions. La durée des impulsions est fixée à $100 \mu s$, l'amplitude du champ à $100 V/mm$, et le taux de répétition à $10 Hz$. A nouveau, les impulsions seules n'induisent aucune mortalité (figure 4.8). En revanche, en présence de bléomycine, la viabilité chute avec le nombre d'impulsions. Pour 20 impulsions, 80% des cellules sont tuées par la bléomycine. Ici encore, le milieu extra-cellulaire n'influence pas les résultats, ce qui confirme que dans la gamme testée, la densité de

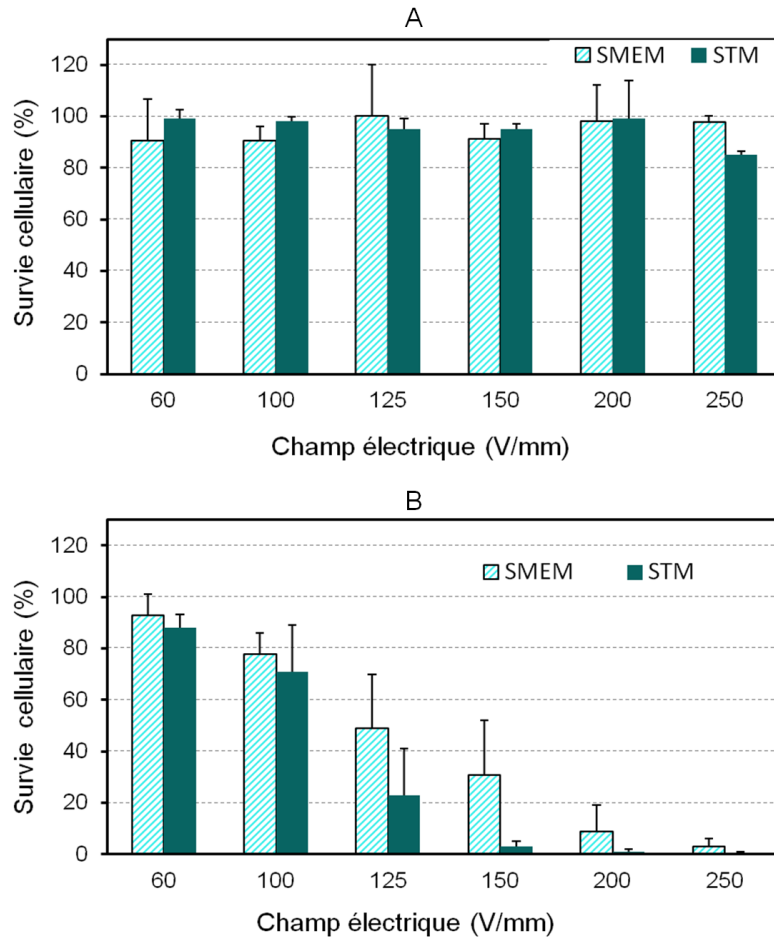


FIG. 4.7 : Viabilité en fonction de l'amplitude du champ. Les cellules sont soumises à une seule impulsion de $100\mu s$. Les deux milieux extra-cellulaires utilisés sont le S-MEM et le STM. Les milieux extra-cellulaires sont utilisés purs (A) ou avec 30 nM de bléomycine (B). La viabilité est normalisée par rapport au contrôle non soumis aux impulsions électriques mais éventuellement mis en contact avec la bléomycine. Les résultats sont la moyenne de 3 expériences \pm écart-type (Cuvettes STD).

courant n'influence pas l'efficacité de la perméabilisation. De plus, puisque cela reste vrai lors de l'application d'une salve d'impulsions, on peut en conclure de façon plus générale qu'il n'y a pas de différence d'effet en fonction du milieu extra-cellulaire ni pendant l'impulsion ni entre les impulsions (par exemple pendant la relaxation de la cellule).

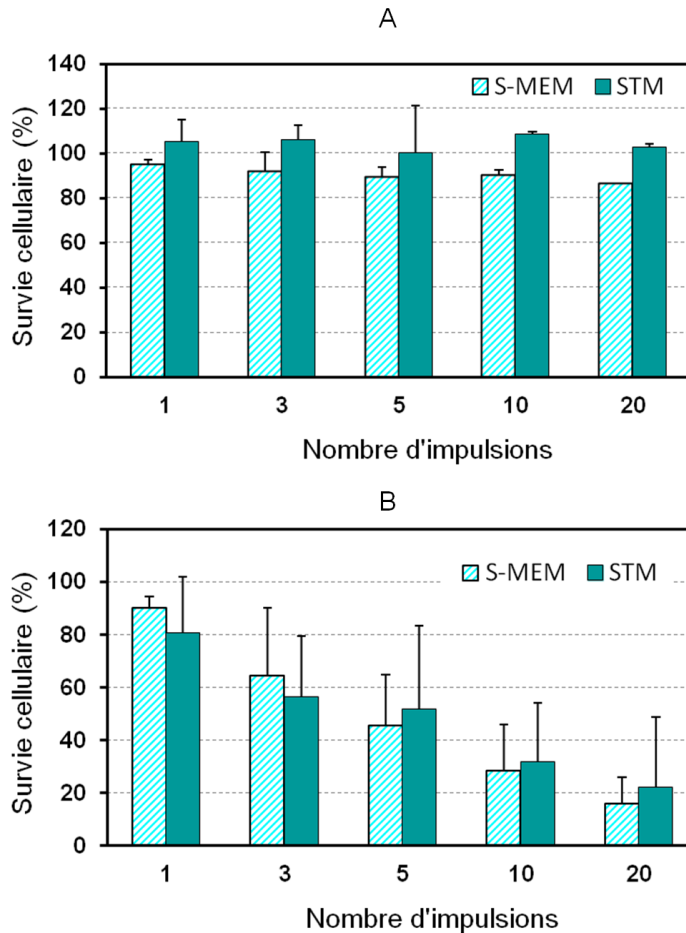


FIG. 4.8 : Viabilité en fonction du nombre d'impulsions. Les impulsions ont une amplitude de $100V/mm$, une durée de $100\mu s$ et sont appliquées avec un taux de répétition de $10Hz$. Les deux milieux extra-cellulaires utilisés sont le S-MEM et le STM. Les milieux extra-cellulaires sont utilisés purs (A) ou avec $30 nM$ de bleomycine (B). La viabilité est normalisée par rapport au contrôle non soumis aux impulsions électriques mais éventuellement mis en contact avec la bléomycine. Les résultats sont la moyenne de 3 expériences \pm écart-type (Cuvettes STD).

4.3.3 Impulsion de 10 ns à champ constant et conductivité variable

4.3.3.1 Procédure expérimentale

Nous avons vu dans le chapitre 2 qu'avec les générateurs d'impédance de sortie 50Ω , la tension appliquée est contrôlée par la charge de l'échantillon. Afin d'imposer rigoureusement la même tension et donc le même champ, deux cuvettes ont été

exposées simultanément en parallèle. Les deux cuvettes contiennent respectivement les cellules dans du S-MEM ou les cellules dans du STM. La mesure au D-dot (figure 4.9A) indique un champ appliqué de 3,3 kV/mm. Pour ce qui est du courant, il n'est pas possible de le mesurer dans chacune des cuvettes. Une mesure au B-dot permet cependant de mesurer le courant global. Les densités de courant sont donc calculées à partir de la mesure de champ et de l'impédance des cuvettes. Le résultat est présenté sur la figure 4.9B². Les densités de courant sont différentes dans les deux milieux. Ainsi, cette configuration permet bien de tester l'influence de la conductivité extracellulaire.

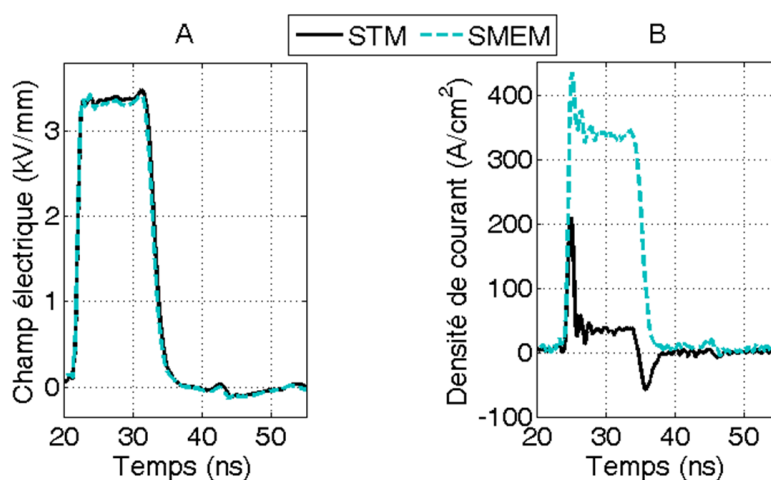


FIG. 4.9 : *Grandeurs électriques obtenues lors de l'exposition en parallèle de cuvettes contenant du S-MEM et du STM. A- Champ électrique et B-densités de courant (générateur A).*

4.3.3.2 Résultats biologiques

L'obtention d'effets biologiques dans ces conditions nécessite d'appliquer des nombres importants d'impulsions. Les résultats obtenus sont présentés sur la figure 4.10. En l'absence de bléomycine, 500 impulsions induisent la mort de 90% des cellules lorsqu'elles sont exposées dans du S-MEM. L'application de 3000 impulsions identiques n'induit qu'une faible mortalité si les cellules sont dans du STM (figure 4.10-A).

En présence de 30 nM de bléomycine, dans du S-MEM, 100 impulsions font chuter la viabilité à 60% et 300 impulsions à 10%. Dans du STM en revanche, aucune mor-

²En sommant les deux courants évalués grâce aux impédances et à la mesure de champ, on retrouve bien le courant global mesuré au B-dot.

talité n'est détectée même avec 500 impulsions (figure 4.10-B). La perméabilisation est donc plus élevée en milieu conducteur ($\sigma = 1,5 \text{ S/m}$) qu'en milieu non-conducteur ($\sigma = 0,1 \text{ S/m}$).

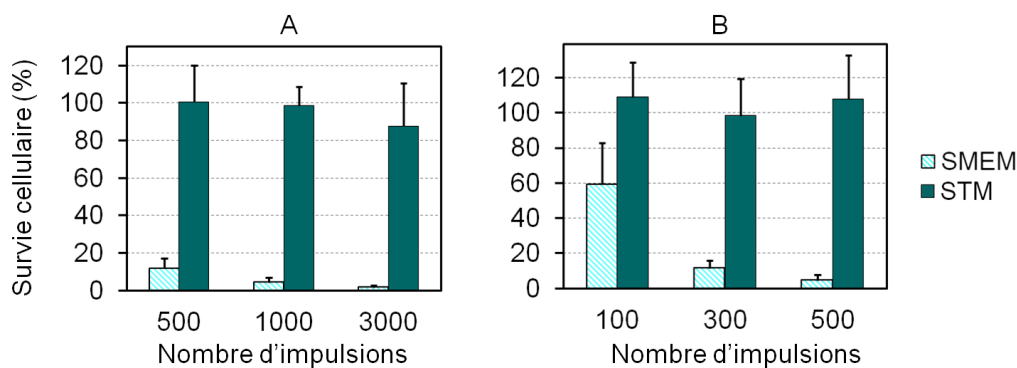


FIG. 4.10 : Viabilité en fonction du nombre d'impulsions lors de l'exposition de cuvettes en parallèle. Les impulsions ont une amplitude de $3,3 \text{ kV/mm}$, une durée de 10 ns et sont appliquées avec un taux de répétition de 10 Hz . Les deux milieux extra-cellulaires utilisés sont le S-MEM et le STM. Les milieux extra-cellulaires sont utilisés purs (A) ou avec 30 nM de bléomycine (B). La viabilité est normalisée par rapport au contrôle non soumis aux impulsions électriques mais éventuellement mis en contact avec la bléomycine. Les résultats sont la moyenne de 4 expériences \pm écart-type. (générateur A, cuvettes MBP).

4.3.3.3 Mise à l'écart de la viscosité

Les milieux S-MEM et STM diffèrent par leur conductivité mais également par leur viscosité. Afin d'évaluer le rôle de la viscosité du milieu, $0,1 \%$ ou $0,15 \%$ d'agar a été ajouté au S-MEM afin de le rendre visqueux. Il n'a pas été possible de mesurer la viscosité des différents milieux. En revanche, étant donné la difficulté de pipettage, il est certain que le S-MEM contenant $0,15 \%$ est plus visqueux que le STM. La figure 4.11 représente la viabilité pour des mêmes conditions d'impulsions (500 ns , $4,2 \text{ kV/mm}$ et 10 ns) dans du S-MEM contenant plus ou moins d'agar. On observe une légère intensification de la mortalité avec la viscosité du milieu. La faible différence n'est pas suffisante pour expliquer les différences entre le S-MEM et le STM. Les différences d'effet entre les deux milieux sont donc attribuables aux différences de propriétés électriques. Le rôle de la viscosité n'a pas été davantage investigué.

4.3.3.4 Rôle de la différence de potentiel transmembranaire

Lorsque les cellules sont exposées dans deux milieux distincts, en parallèle, le champ extérieur est le même dans les solutions de STM et de S-MEM (figure 4.9).

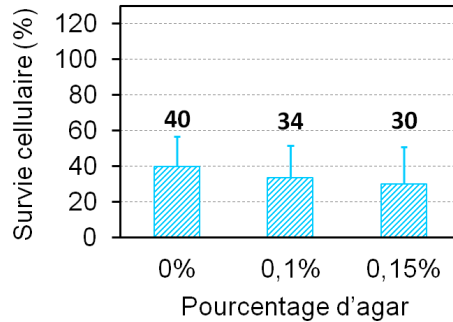
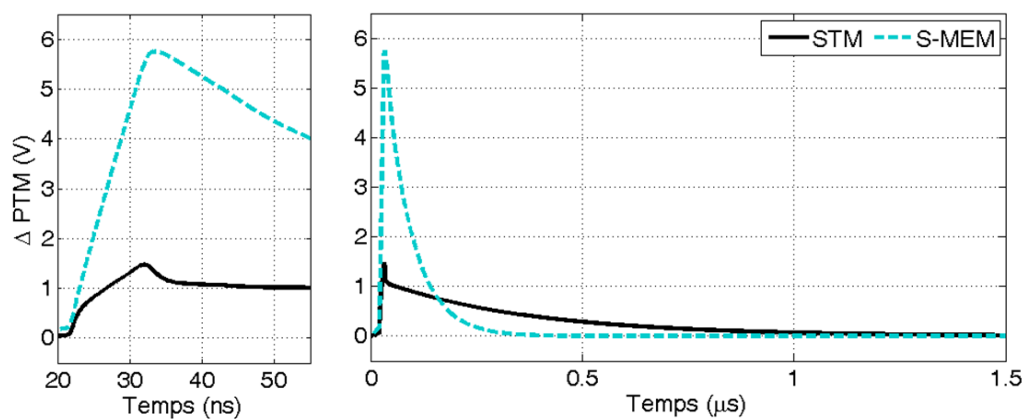


FIG. 4.11 : Viabilité en fonction du nombre d'impulsions. 500 impulsions d'amplitude de $4,2\text{ kV/mm}$ et de durée de 10 ns sont appliquées avec un taux de répétition de 10 Hz . Le milieu extra-cellulaire est du S-MEM. Les résultats sont la moyenne de 3 expériences \pm écart-type. (générateur A, cuvettes MBP)

En revanche, les valeurs de conductivité imposent des densités de charges très différentes dans les deux milieux. En outre, en fonction de la conductivité du milieu, le ΔPTM atteint sur les cellules est très différent. Les ΔPTM théoriques calculés sont présentés sur la figure 4.12. Dans les deux cas, le régime permanent n'est pas atteint. La différence de conductivité explique les différences des constantes de temps de charge et décharge. Le tableau de la figure 4.12 donne pour les deux milieux, la valeur maximum du ΔPTM théorique, les durées pendant lesquelles il est supérieur à certaines valeurs marquantes telles que 200 mV ou 1 V .

Il apparaît tout d'abord que la valeur maximale du ΔPTM est quatre fois plus élevée dans le S-MEM ($5,7\text{ V}$) que dans le STM ($1,5\text{ V}$). Dans les deux cas, ces valeurs sont bien supérieures aux valeurs habituellement considérées comme seuil pour la perméabilisation. De ce point de vue, l'absence de perméabilisation dans le STM est remarquable. En effet, dans le cas du STM, le ΔPTM dépasse le volt et reste supérieur à 200 mV pendant environ $2\text{ }\mu\text{s}$. Pour cette condition, aucune perméabilisation n'est détectée, même en accumulant 500 impulsions. Dans le cas du S-MEM, la relaxation du ΔPTM est beaucoup plus rapide, et il ne reste au dessus de 200 mV que pendant environ 300 ns . Pourtant, on détecte une perméabilisation (à condition de cumuler les impulsions). La perméabilisation peut être corrélée à une valeur élevée de ΔPTM maximum théorique ou encore à la persistance du ΔPTM au dessus d'une valeur pendant un temps minimal. On peut par exemple faire l'hypothèse que la perméabilisation nécessite de maintenir un ΔPTM supérieur à 1 V pendant un temps supérieur à 30 ns (120 ns semblant être une durée suffisante), ou bien encore un ΔPTM supérieur à 2 V pendant un temps minimal à déterminer (73 ns étant une durée suffisante). La suite des travaux a permis de raffiner ces conditions.

De plus, toutes les expériences qui suivent sont conduites dans des cuvettes STD, c'est à dire les mêmes cuvettes que celles utilisées pour les expériences en impulsions microsecondes.



	S-MEM	STM
ΔPTM_{max}	5,7 V	1,5 V
Durée $\Delta PTM > 200$ mV	220 ns	600 ns
Durée $\Delta PTM > 1$ V	120 ns	30 ns
Durée $\Delta PTM > 2$ V	73 ns	
Durée $\Delta PTM > 3$ V	47 ns	
Durée $\Delta PTM > 4$ V	26 ns	
Durée $\Delta PTM > 5$ V	11 ns	

FIG. 4.12 : ΔPTM théoriques calculés pour une cellule de $7 \mu m$ soumise à l'impulsion de la figure 4.9-A dans du S-MEM ou du STM.

4.3.3.5 Robustesse de l'expérience

Une expérience identique a été menée avec un autre générateur (générateur C, Europulse) délivrant également des impulsions de 10 ns de forme légèrement différente. Les cuvettes sont à nouveau exposées en parallèle. Il s'agit ici de cuvettes STD contenant 200 μL de cellules dans du S-MEM ou du STM. L'amplitude des impulsions appliquées est de l'ordre de 3,6 kV/mm (figure 4.13).

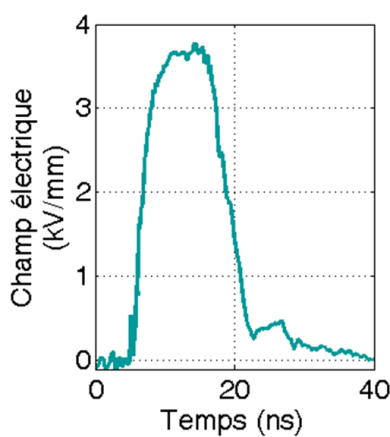


FIG. 4.13 : *Champ appliqué sur l'ensemble des deux cuvettes (STD) contenant respectivement 200 μL de S-MEM ou de STM, et exposées en parallèle (générateur C).*

La viabilité cellulaire en fonction du nombre d'impulsions est présentée sur la figure 4.14. On retrouve à nouveau le fait que les impulsions induisent une mortalité uniquement lorsque les cellules sont dans le milieu S-MEM. Dans cette expérience, la mortalité est moins importante que dans l'expérience précédente, bien que les niveaux de tensions soient identiques. En particulier, il apparaît que 500 impulsions suffisaient à tuer 90% des cellules alors qu'elles n'en tuent ici que 30%. Nous attribuons cet écart principalement au changement de cuvette. En effet, l'expérience présentée sur la figure 4.10 a été conduite dans des cuvettes MBP dans lesquelles on observe de façon systématique des effets plus prononcés que dans les cuvettes STD (voir annexe B).

La viabilité en fonction du nombre d'impulsions et du milieu extra-cellulaire en présence de 30 nM de bléomycine est présentée sur la figure 4.15. L'application de 100 ou 300 impulsions induit une mortalité en présence de la bléomycine lorsque les cellules sont dans du S-MEM. Dans ces conditions et en absence de bléomycine la viabilité est de 100 %, ce qui traduit donc une perméabilisation réversible. La viabilité des cellules exposées dans du STM reste en revanche de 100

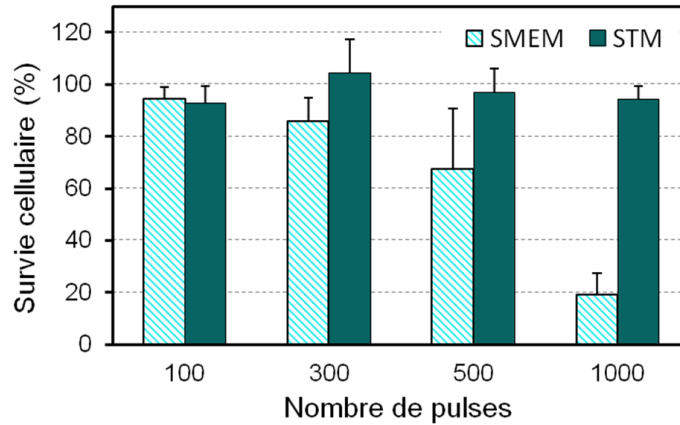


FIG. 4.14 : Viabilité en fonction du nombre d'impulsions et du milieu extracellulaire. Les impulsions ont une amplitude de $3,6 \text{ kV/mm}$, une durée de 10 ns et sont appliquées avec un taux de répétition de 10 Hz . Les résultats sont la moyenne de 3 expériences \pm écart-type. (générateur C, cuvettes STD contenant $200 \mu\text{L}$ de milieu).

% même lorsque 1000 impulsions sont délivrées, ce qui souligne qu'aucune perméabilisation ni réversible ni irréversible n'est obtenue dans ces conditions dans du STM.

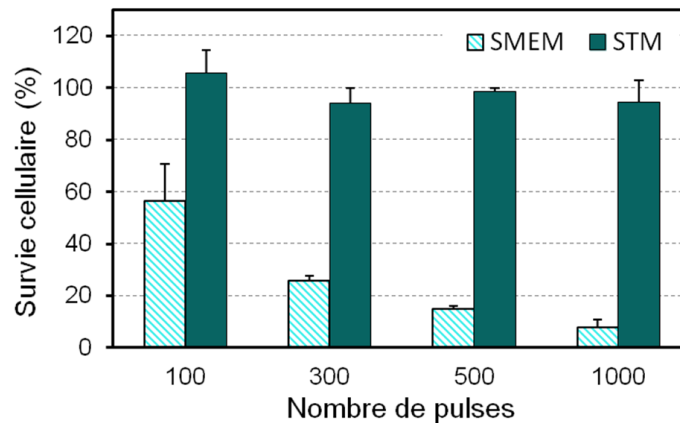


FIG. 4.15 : Viabilité en fonction du nombre d'impulsions et du milieu extracellulaire. Les milieux contiennent une concentration de bléomycine de 30 nM . La viabilité est normalisée au contrôle mis en présence de la bléomycine. Les impulsions ont une amplitude de $3,6 \text{ kV/mm}$, une durée de 10 ns et sont appliquées avec un taux de répétition de 10 Hz . Les résultats sont la moyenne de 3 expériences \pm écart-type. (générateur C, Cuvette STD contenant $200 \mu\text{L}$ de milieu).

Le calcul des ΔPTM théoriques sur les cellules exposées dans du STM ou du S-MEM est présenté sur la figure 4.16. Le calcul est effectué à partir de l'impulsion mesurée. Bien que la dynamique de l'impulsion soit très différente de celle délivrée par le générateur A, on retrouve les mêmes tendances que celles présentées dans la section 4.3.3.4 : le ΔPTM maximum atteint est bien plus élevé dans le S-MEM (6,6 V) que dans le STM (1,6 V), et la décroissance du ΔPTM est plus lente dans le STM. A nouveau, il est possible de corrélérer l'efficacité de la perméabilisation à une valeur plus élevée de ΔPTM maximum ou à une durée suffisamment longue au dessus d'une certaine valeur.

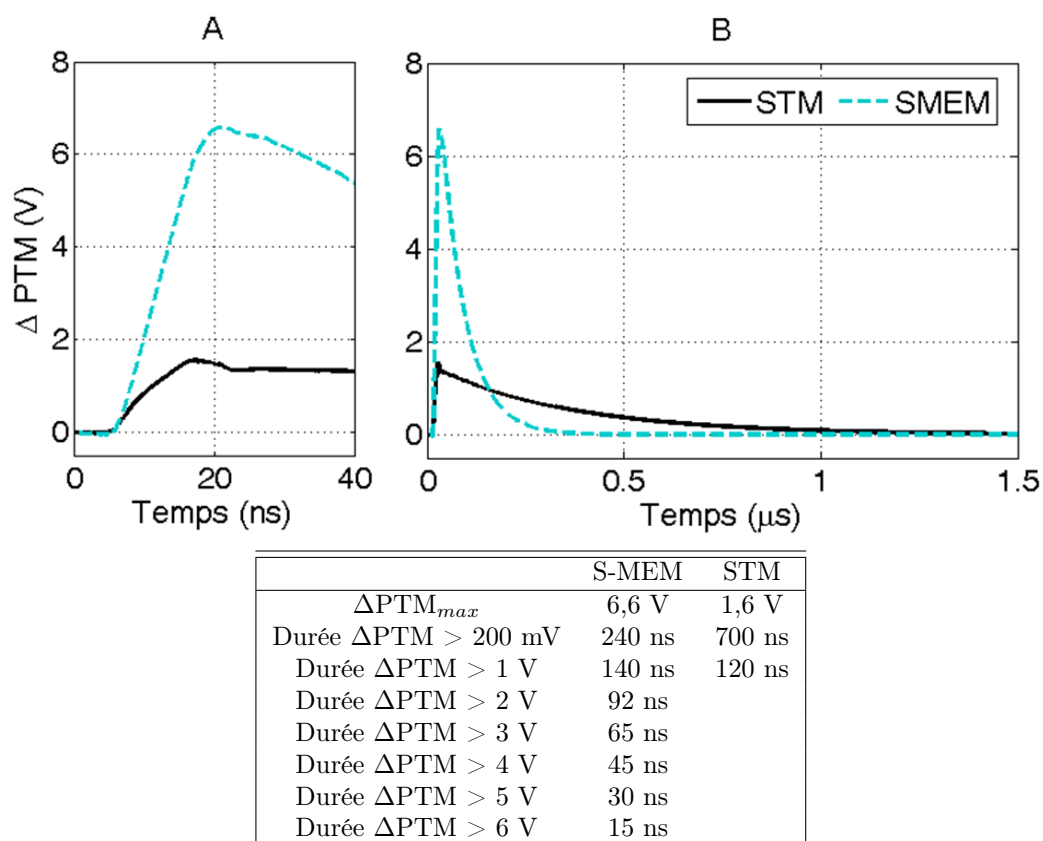


FIG. 4.16 : ΔPTM théoriques calculés pour une cellule de $7\mu m$ de rayon soumise à l'impulsion de la figure 4.13 dans du S-MEM ou du STM.

Le tableau 4.16 montre que le fait de dépasser 1 V pendant environ 120 ns ne suffit pas à induire une perméabilisation efficace. De plus, dans le cas du S-MEM, la durée pendant laquelle le ΔPTM est supérieur à 1 V est de 140 ns, soit très proche

des 120 ns dans le cas du STM. Ces valeurs sont calculées pour des cellules de $7 \mu\text{m}$ de rayon. Dans une population de cellules, il existe une variabilité biologique importante, notamment sur la valeur du rayon, ne serait-ce que parce que les cellules se divisent. Nous avons donc conduit la même analyse de ΔPTM pour des cellules de rayon 5 et $10 \mu\text{m}$. Les résultats sont présentés dans le tableau 4.2. Si l'on fait l'hypothèse que c'est le fait de maintenir 1V pendant 140ns qui permet d'expliquer la perméabilisation en S-MEM', alors une partie des cellules dans le STM, celles dont le rayon est proche de $10 \mu\text{m}$, devrait être perméabilisée. Or, les résultats biologiques dans les deux milieux sont très différents puisque par exemple 1000 impulsions n'induisent aucune mortalité dans le STM même en l'absence de bléomycine alors qu'elle induisent la mort de 80 % des cellules dans le S-MEM même en l'absence de bléomycine. Ainsi, il semble que la valeur de 1 V pendant une durée de l'ordre de 140 ns ne suffise pas à induire de la perméabilisation, même en cumulant un grand nombre d'impulsions.

D'après le tableau 4.16, la perméabilisation pourrait être obtenue par le dépassement de la valeur de 2 V pendant une durée à déterminer, inférieure à 92 ns. Dans ce cas, la perméabilisation obtenue reste faible puisqu'elle requiert l'application de plusieurs dizaines d'impulsions.

TAB. 4.2 : Propriétés des ΔPTM théoriques calculés pour des cellules de rayon 5, 7 ou $10 \mu\text{m}$ soumises à l'impulsion de la figure 4.13 dans du S-MEM ou du STM.

	S-MEM	STM
$5 \mu\text{m}$		
ΔPTM_{max}	6,3 V	1,5 V
Durée $\Delta\text{PTM} > 200 \text{ mV}$	170 ns	500 ns
Durée $\Delta\text{PTM} > 1 \text{ V}$	100 ns	90 ns
$7 \mu\text{m}$		
ΔPTM_{max}	6,6 V	1,6 V
Durée $\Delta\text{PTM} > 200 \text{ mV}$	240 ns	700 ns
Durée $\Delta\text{PTM} > 1 \text{ V}$	140 ns	120 ns
$10 \mu\text{m}$		
ΔPTM_{max}	6,9 V	1,6 V
Durée $\Delta\text{PTM} > 200 \text{ mV}$	340 ns	1000 ns
Durée $\Delta\text{PTM} > 1 \text{ V}$	190 ns	180 ns

4.3.3.6 Conclusion

Ces expériences mettent en évidence une nette influence de la conductivité extracellulaire. A champ égal et avec les impulsions de 10 ns, le milieu plus conducteur favorise la perméabilisation. Les expériences qui suivent ont pour but de discriminer les paramètres essentiels à l'induction de la perméabilisation.

4.4 Expériences discriminatoires

4.4.1 Nombre de charges constant

4.4.1.1 Procédure expérimentale

L'expérience présentée dans cette section consiste à exposer des cellules à une même densité de charges, mais avec des niveaux de champ très différents. Pour cela, deux cuvettes sont exposées en série. Elles contiennent respectivement 200 μL de cellules dans du S-MEM et 200 μL de cellules dans du STM. Les deux cuvettes sont donc traversées par la même densité de courant. Les champs imposés sur chacune des cuvettes (mesurés au D-dot) sont présentés sur la figure 4.17. Naturellement, les impédances globales des deux milieux étant très différentes, les tensions et donc les champs électriques sur chacune des cuvettes sont très différents. Dans le S-MEM, le champ maximum atteint est de 1,6 kV/mm, tandis que dans le STM, l'impulsion atteint 11 kV/mm.

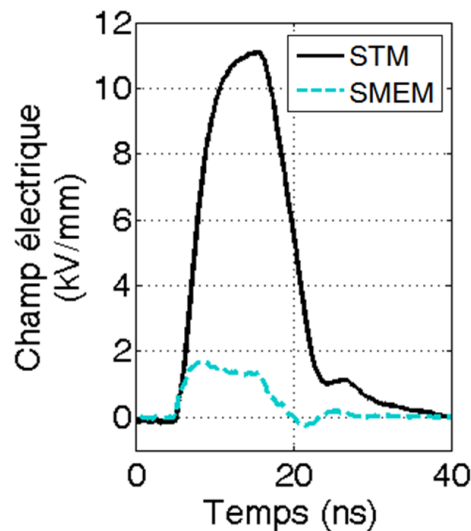


FIG. 4.17 : Champs appliqués sur chacune des cuvettes (STM) contenant 200 μL de S-MEM, respectivement STM, exposées en série (générateur C).

4.4.1.2 Résultats biologiques

Les résultats des tests d'efficacité de clonage en absence et en présence de 30 nM de bléomycine sont présentés sur les figures 4.18 et 4.19. Il apparaît que les cellules sont affectées de façon très différente dans chacun des milieux, bien qu'elles soient soumises à la même quantité de charges. Dans le cas du S-MEM, les cellules semblent

peu affectées par le champ à faible nombre d'impulsions (de 1 à 30). Aucune mortalité n'est détectée, même en présence de 30 nM de bléomycine. Dans le cas du STM, en l'absence de bléomycine, 3 impulsions n'ont pas d'effet mais 10 impulsions suffisent à tuer la moitié de la population. L'expérience avec bléomycine indique qu'une seule impulsion fait baisser la viabilité à 30% et 3 impulsions à 20%. Au delà de 3 impulsions, la viabilité stagne à environ 20%. Ces 20% correspondent à la fraction de volume qui dépasse légèrement des électrodes ³. Cette condition induit donc une perméabilisation réversible sur la quasi totalité des cellules exposées, avec une seule impulsion.

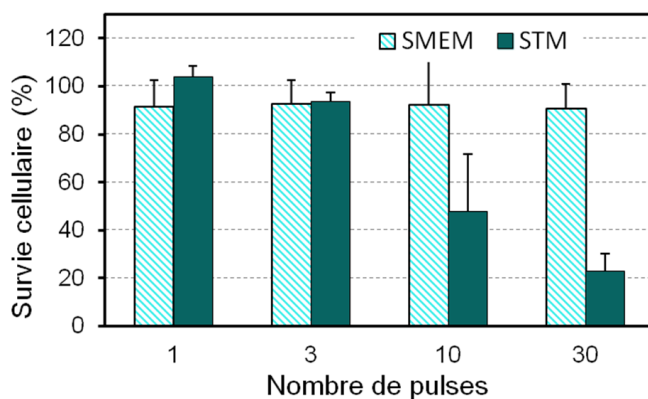


FIG. 4.18 : Viabilité en fonction du nombre d'impulsions. Les impulsions sont celles de la figure 4.17. Elles sont appliquées à 10 Hz. Les résultats sont la moyenne de 3 expériences \pm écart-type.

4.4.1.3 Caractéristiques du Δ PTM théoriques

Les Δ PTM théoriques calculés à partir des impulsions réelles sont présentés sur la figure 4.20. Les caractéristiques principales sont résumées dans le tableau en dessous. La valeur maximum du Δ PTM pour le S-MEM est de 2,5 V. A nouveau, cette valeur est largement supérieure aux valeurs de seuils admises en électroperméabilisation classique. Pourtant aucune perméabilisation n'est détectée en présence de 30 nM de bléomycine et ce même avec 30 impulsions. Le temps passé à une valeur supérieure à 1 V est de 70 ns, ce qui est insuffisant pour perméabiliser, même avec un nombre plus élevé d'impulsions compte tenu des conclusions intermédiaires précédentes. De plus, ce résultat permet de supposer que la membrane n'est pas perméabilisée à la

³Il est nécessaire de bien recouvrir les électrodes afin de ne pas avoir de claquage en surface au niveau du point triple électrodes/liquide/air. En conséquence, environ 20% des 200 μ L et donc 20% des cellules ne se trouvent pas localisées entre les électrodes et sont donc soumises à un champ moins intense que les autres.

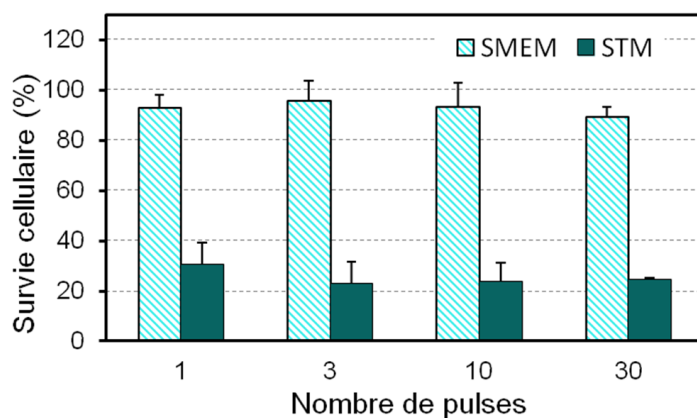


FIG. 4.19 : Viabilité en fonction du nombre de pulses en présence de 30 nM de bléomycine. Les impulsions sont celles de la figure 4.17. Elles sont appliquées à 10 Hz. Les résultats sont normalisés par rapport au contrôle mis en présence de la bléomycine. Les résultats sont la moyenne de 3 expériences \pm écart-type.

bléomycine par un Δ P_{TM} atteignant 2,5 V ou dépassant 2 V pendant 18 ns.

L'analyse du Δ P_{TM} théorique dans le cas du STM nous permet en outre de conclure que le Δ P_{TM} maximum théorique n'a pas besoin de dépasser 4 V pour obtenir une perméabilisation efficace avec une seule impulsion. En effet, la valeur de 4 V n'est maintenue que pendant 8 ns, la valeur maximum étant de 4,5 V.

4.4.1.4 Conclusion

Une théorie a récemment été proposée qui suggère que le niveau de perméabilisation dans le régime des impulsions nanosecondes est fixé par la densité de charges (Schoenbach *et al.*, 2009). Cette expérience permet de rejeter cette hypothèse et indique que le niveau de perméabilisation n'est pas imposé par la densité de courant.

4.4.2 Même Δ P_{TM} maximum

4.4.2.1 Procédure expérimentale

Cette expérience a pour but d'atteindre la même valeur de différence de potentiel transmembranaire sur la membrane, et ce dans les deux milieux de conductivité différente. Ainsi, quelle que soit la véritable valeur maximale réellement atteinte sur la membrane, elle sera atteinte sur la même surface. Les cuvettes contenant les cellules dans le S-MEM ou le STM sont exposées séparément. Le niveau de champ est ajusté le mieux possible sur chacune des cuvettes afin d'obtenir environ le même

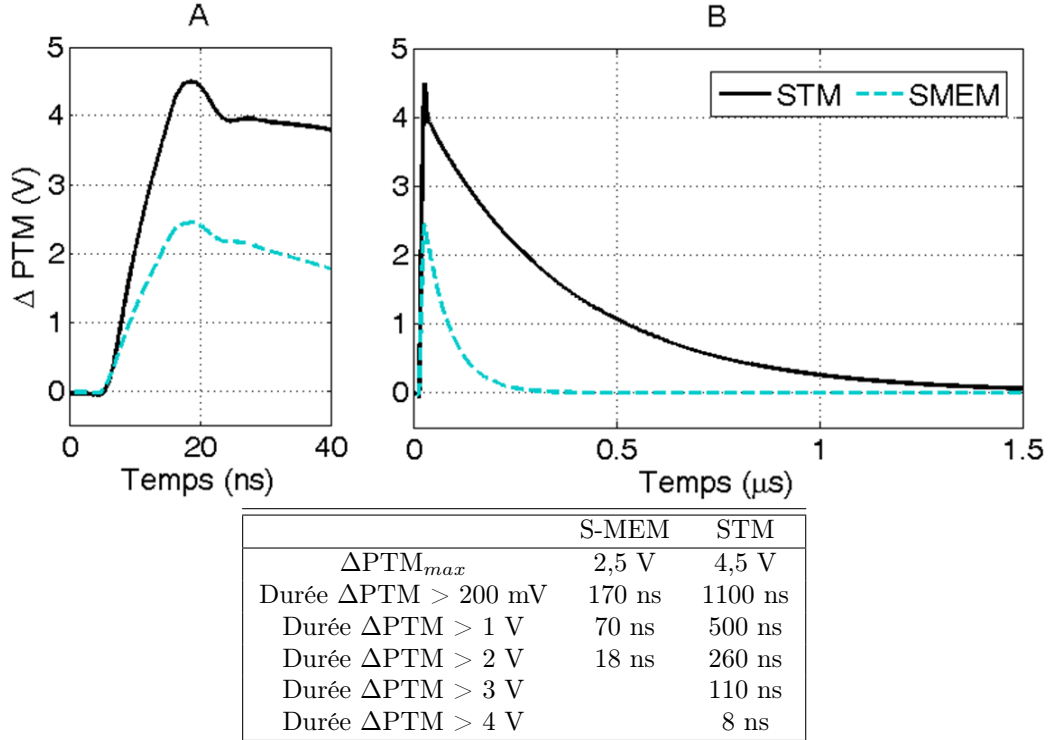


FIG. 4.20 : ΔPTM théoriques calculés pour une cellule de $7 \mu m$ soumise aux impulsions de la figure 4.17.

ΔPTM théorique maximum dans les deux cas. Les amplitudes des impulsions sont de 18 kV pour le STM et 3,8 kV pour le S-MEM (figure 4.21).

Les ΔPTM théoriques calculés pour une cellule de $7 \mu m$ de rayon sont présentés sur la figure 4.22. La valeur maximum théorique atteinte est de 6,9 V dans le cas du S-MEM et 7,5 V dans le cas du STM. Ces deux valeurs sont relativement proches, conformément au critère que nous nous sommes imposé. Le même calcul pour une cellule de $5 \mu m$ ou de $10 \mu m$ de rayon conduit également à des valeurs proches du ΔPTM maximum dans les deux milieux (voir tableau 4.3.) Ce calcul est donc robuste et ne correspond pas à un rayon cellulaire particulier. Le ΔPTM maximum calculé est donc quasi identique dans les deux milieux. Les pentes montantes des ΔPTM sont également très proches. Ainsi, si l'on note ψ_{seuil} le seuil de rupture, il est atteint sur une fraction d'aire identique sur les cellules dans les deux cas. Par contre, la relaxation du ΔPTM étant différente dans les deux milieux, le ΔPTM peut persister à des valeurs élevées pendant des durées plus longues en STM qu'en S-MEM.

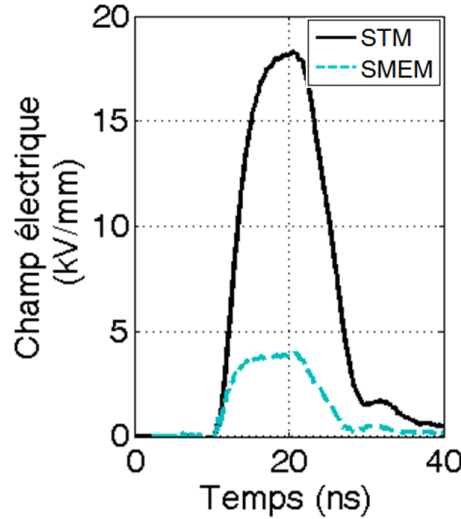


FIG. 4.21 : *Champs électriques appliqués en vue d'obtenir des ΔPTM maxima identiques dans les milieux STM et S-MEM (Cuvettes STD contenant 200 μ L de milieu, générateur C).*

TAB. 4.3 : *ΔPTM_{max} théoriques calculés pour des cellules de rayon 5, 7 ou 10 μ m soumises aux impulsions de la figure 4.21 dans du S-MEM ou du STM.*

	S-MEM	STM
5 μ m	6,5	7,3
7 μ m	6,9	7,4
10 μ m	7,2	7,5

4.4.2.2 Résultats biologiques

Les résultats des tests d'efficacité de clonage en absence et en présence de 30 nM de bléomycine sont présentés sur la figure 4.23. Ces résultats mettent à nouveau en évidence une très grande différence d'effets entre les deux milieux. Ces conditions sont particulièrement efficaces dans le cas du STM. En effet, une seule impulsion induit de la perméabilisation réversible sur la quasi-totalité des cellules exposées dans le STM, comme le met en évidence l'expérience avec 30 nM de bléomycine (figure 4.23-A) . Cette même impulsion n'induit pas de mort directe par perméabilisation irréversible. En revanche, les cellules dans le S-MEM ne sont pas suffisamment perméabilisées pour internaliser la bléomycine, même avec 30 impulsions. Il est nécessaire d'appliquer 300 impulsions (à 10 Hz) pour faire chuter la viabilité à 20% (ce qui correspond à la perte de viabilité de toutes les cellules exposées, 20% des cellules se trouvant dans l'excès de liquide au dessus des électrodes).

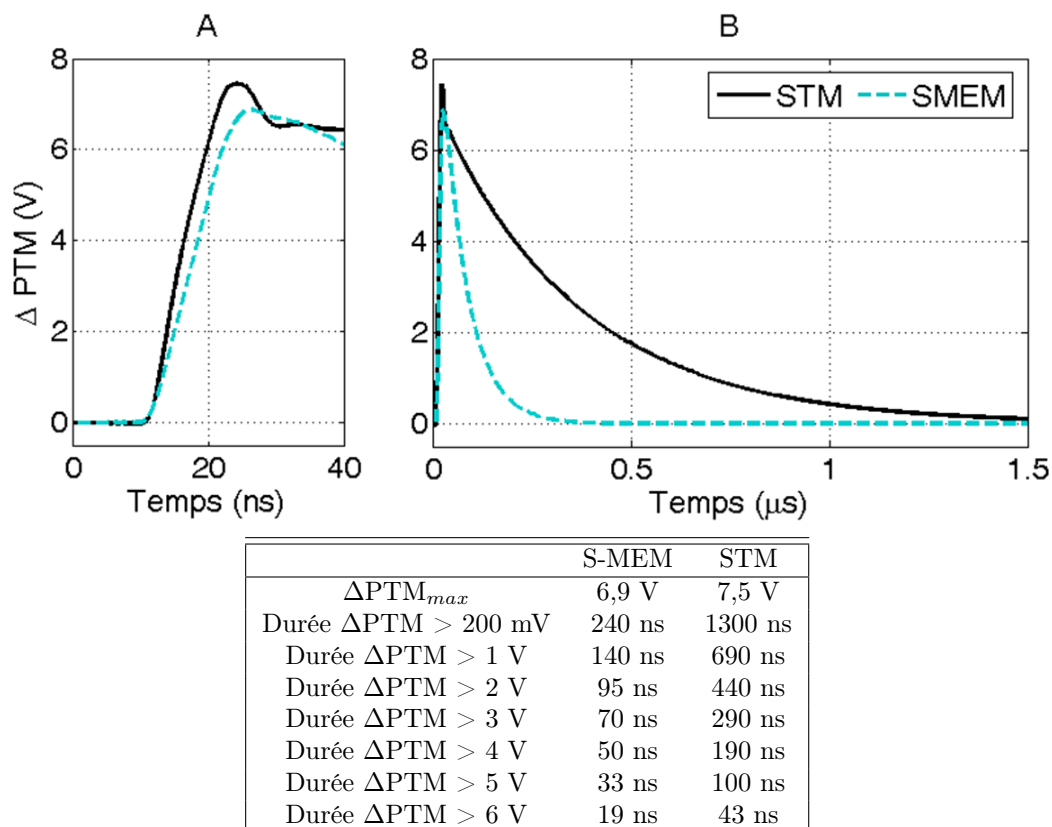


FIG. 4.22 : ΔPTM théoriques calculés pour une cellule de $7 \mu m$ soumise aux impulsions de la figure 4.21.

4.4.2.3 Conclusion

L'obtention d'un même ΔPTM maximum de forte valeur ne suffit pas à induire les mêmes effets biologiques. Ce n'est donc pas la valeur maximale du ΔPTM théorique qui fixe entièrement le niveau de perméabilisation.

4.4.3 Expériences à champ constant avec impulsions de 100 ns

L'expérience à champ constant et conductivité variable a été reproduite avec des impulsions de $3,8 \text{ kV/mm}$ et de durée 100 ns. Les résultats des expériences d'efficacité de clonage sans bléomycine et avec 30 nM de bléomycine sont présentées sur les figures 4.24 et 4.25. Contrairement à l'expérience similaire conduite avec des impulsions de 10 ns, la perméabilisation est plus efficace lorsque les cellules sont dans le STM. En particulier, en présence de 30 nM de bléomycine, une seule impulsion suffit à faire chuter la viabilité à 40% dans le STM alors qu'il en faut 10 dans le S-MEM.

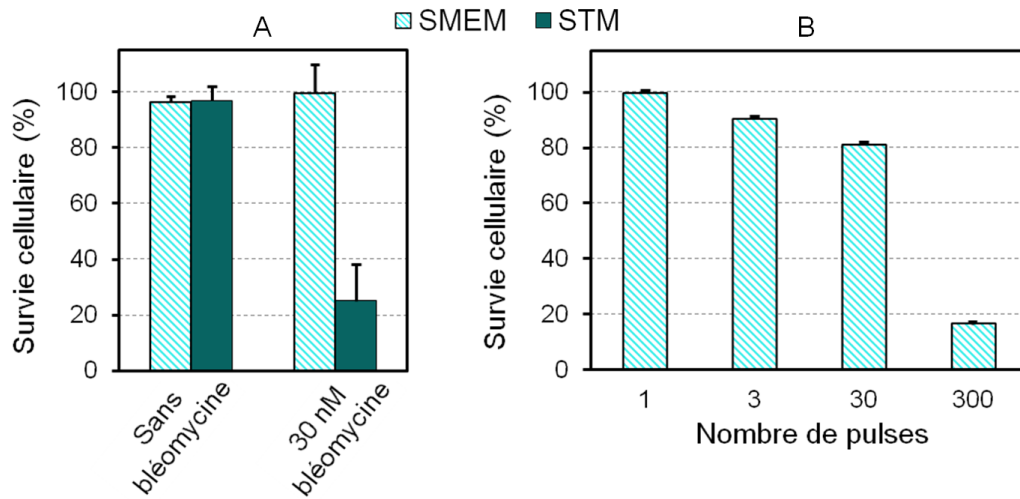


FIG. 4.23 : Les impulsions appliquées sont celles de la figure 4.21. A-Viabilité avec ou sans bléomycine après l'application d'une seule impulsion. B-viabilité en fonction du nombre d'impulsions (fréquence de répétition 10 Hz) en présence de 30nM de bléomycine dans le cas du S-MEM. Les résultats sont la moyenne de 3 expériences \pm écart-type.

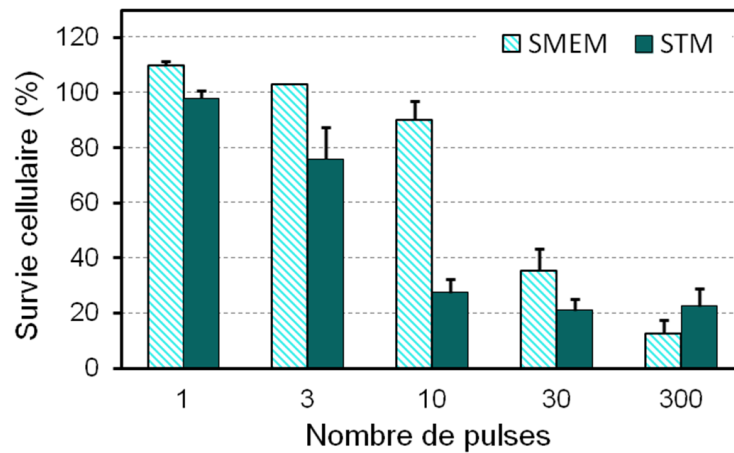


FIG. 4.24 : Viabilité en fonction du nombre d'impulsions et du milieu extracellulaire. Les impulsions ont une amplitude de 3,6 kV/mm , une durée de 100 ns et sont appliquées avec un taux de répétition de 10 Hz. (générateur C, Cuvette STD contenant 200 μ L de milieu). Les résultats sont la moyenne de 2 expériences \pm écart-type.

Les Δ P_{TM} théoriques sont représentés sur la figure 4.26. Les valeurs maximales

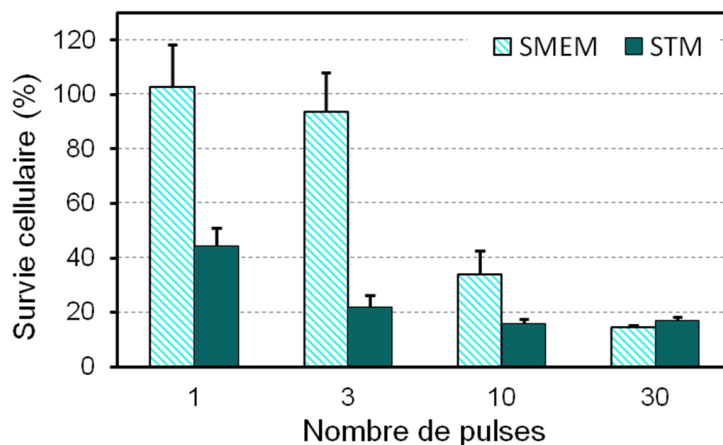
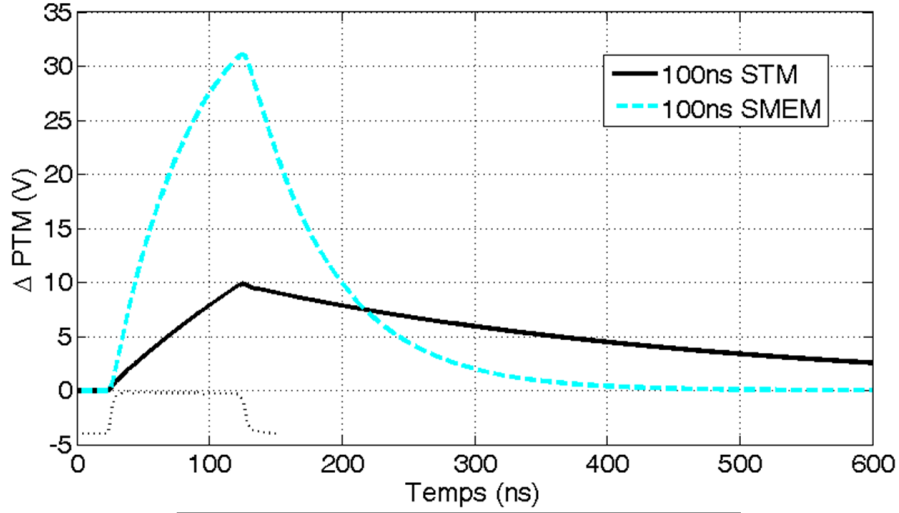


FIG. 4.25 : Viabilité en fonction du nombre d'impulsions et du milieu extracellulaire. Les milieux contiennent une concentration de bléomycine de 30 nM. Les impulsions ont une amplitude de 3,6 kV/mm, une durée de 100 ns et sont appliquées avec un taux de répétition de 10 Hz. (générateur C, Cuvette STD contenant 200 μ L de milieu). Les résultats sont la moyenne de 2 expériences \pm écart-type.

calculées sont extrêmement élevées : 31 V pour le S-MEM et 7,7 V pour le STM. Ainsi, il est probable que les valeurs de Δ PTM et les durées de maintien de ces valeurs susceptibles d'induire la perméabilisation soient largement dépassées dans ces expériences, en accord avec ce que les résultats biologiques rapportent. Le milieu permettant d'engendrer les valeurs les plus élevées de Δ PTM n'est pas nécessairement celui qui permet d'obtenir les effets biologiques les plus importants. En revanche, le milieu qui permet de maintenir le Δ PTM à des valeurs élevées pendant des durées plus importantes induit une perméabilisation plus efficace.

Si l'on se concentre sur l'effet d'une seule impulsion de 100 ns et 3,6 kV/mm dans le STM, nous voyons qu'elle n'induit pas de mortalité en l'absence de bléomycine, et 60% de mortalité avec 30 nM de bléomycine. Cet effet est très proche de celui obtenu avec une seule impulsion de 10 ns et 18 kV/mm (section 4.4.2). Dans le STM, une telle impulsion, en effet, n'induit pas de mortalité par le seul effet du champ, et induit 75% de mortalité en présence de 30 nM de bléomycine. Les paramètres du Δ PTM de ces deux cas sont regroupés dans le tableau 4.4 afin d'en permettre la comparaison. Les valeurs du tableau ne sont pas strictement les mêmes. L'écart en % pour chaque donnée est également présenté dans le tableau. Cet écart souligne la limite de ces calculs. En effet, il est certain que dès lors que l'on perméabilise, le Δ PTM est modifié par la perméabilisation. Or nous comparons ici deux conditions qui perméabilisent très efficacement à la bléomycine.



	S-MEM	STM
ΔPTM_{max}	31 V	10 V
Durée $\Delta PTM > 200$ mV	420 ns	1500 ns
Durée $\Delta PTM > 1$ V	310 ns	900 ns
Durée $\Delta PTM > 2$ V	270 ns	640 ns
Durée $\Delta PTM > 3$ V	245 ns	490 ns
Durée $\Delta PTM > 4$ V	230 ns	380 ns
Durée $\Delta PTM > 5$ V	200 ns	290 ns

FIG. 4.26 : ΔPTM théoriques calculés pour une cellule de $7\mu m$ soumise à une impulsion de 100 ns et $3,8 kV/mm$ dans du STM ou du S-MEM. L'impulsion est représentée schématiquement en pointillé noir.

TAB. 4.4 : Comparaisons des grandeurs caractéristiques des ΔPTM théoriques obtenus sur une cellule de $7\mu m$ de rayon soumise à une impulsion de 10 ns et $18 kV/mm$ ou une impulsion de 100 ns et $3,6 kV/mm$.

	10 ns, 18 kV/mm	100 ns, 3,6 kV/mm	écart
ΔPTM_{max}	7,5 V	10 V	33%
Durée $\Delta PTM > 200$ mV	1300 ns	1500 ns	15%
Durée $\Delta PTM > 1$ V	690 ns	900 ns	30%
Durée $\Delta PTM > 2$ V	440 ns	640 ns	45%
Durée $\Delta PTM > 3$ V	290 ns	490 ns	70%
Durée $\Delta PTM > 4$ V	190 ns	380 ns	100%
Durée $\Delta PTM > 5$ V	100 ns	290 ns	190%

4.5 Remarque sur le rôle d'un rebond secondaire

Dans cette section, l'importance du rebond secondaire peut varier d'une expérience à l'autre. Avec le générateur C, il percute l'échantillon environ 100 ns après la fin de

l'impulsion principale. Dans le cas de l'exposition en série et de l'exposition d'une seule cuvette contenant du STM, le rebond secondaire est positif et inférieur à 10% de l'impulsion principale. Dans le cas des expériences en parallèle ou de l'exposition d'une seule cuvette contenant du SMEM, le rebond secondaire est négatif et son amplitude est 50% de l'impulsion principale. L'interprétation des résultats nécessite de conserver ceci à l'esprit. On peut cependant souligner que :

- Dans les expériences en série, les deux cuvettes sont soumises au rebond secondaire et elles sont toujours soumises à la même densité de charges.
- Dans les expériences en parallèle, les deux cuvettes sont soumises au rebond secondaire et elles sont toujours soumises rigoureusement au même champ.
- Dans le cas de l'expérience visant à atteindre la même différence de potentiel transmembranaire, le rebond secondaire, qui atteint l'échantillon environ 100 ns après l'impulsion principale, ne change pas le fait que l'impulsion principale génère théoriquement la même différence de potentiel transmembranaire sur les cellules.

4.6 Remarque sur l'effet de la température

Une expérience supplémentaire a été conduite pour vérifier que l'internalisation de bléomycine ne se faisait pas par endocytose. Pour cela, nous avons comparé l'internalisation de bléomycine à température ambiante et à 4°C. L'expérience est conduite dans du STM, et une seule impulsion de 10 ns et 9 kV/mm est appliquée. Les cellules sont resuspendues, soit dans du STM à température ambiante, soit dans du STM à 4°C. Pendant l'expérience, la condition 4°C est en permanence maintenue sur glace. Enfin, après l'impulsion, les cellules sont maintenues dans les cuvettes pendant 10 minutes, soit à température ambiante, soit dans la glace.

Dans les deux conditions, il apparaît que la viabilité chute un peu en dessous de 20%. Ainsi, l'ensemble des cellules exposées (c'est à dire les 80% qui ne sont pas en dessus des électrodes) internalisent au moins 500 molécules de bléomycine. Il n'est pas possible de dégager précisément ici un effet de la température, puisque nous sommes dans une condition 'saturante' d'un point de vue de la mortalité. Cependant, dans la mesure où il est avéré que l'endocytose est bloquée à 4°C, cette expérience indique que la bléomycine n'est pas internalisée par endocytose ou alors en très faible quantité.

4.7 Discussion des expériences *in vitro*

Il ressort tout d'abord de ces expériences que les impulsions de 10 ns permettent de perméabiliser efficacement les cellules à des molécules telles que la bléomycine. Dans des conditions sous optimales, il est nécessaire d'appliquer un nombre

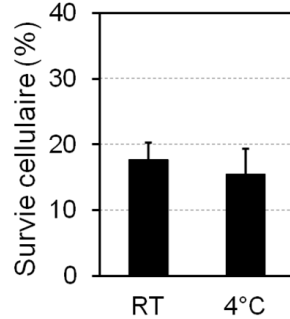


FIG. 4.27 : Viabilité à température ambiante et à 4°C, après application d'une seule impulsion de 10 ns et 9 kV dans du STM en présence de 30 nM de bléomycine. Les résultats sont normalisés aux contrôles avec bléomycine. Les résultats sont la moyenne \pm écart type de 2 expériences en duplicate. (générateur C, 200 μ L dans cuvettes STD)

important d'impulsions, ou alors de travailler avec des concentrations extra-cellulaires élevées de bléomycine (3 μ M). Lorsque les conditions sont suffisamment intenses, en revanche, une seule impulsion de 10 ns suffit à faire entrer les 500 molécules de bléomycine nécessaires pour induire la mort mitotique des cellules, et cela même lorsque la concentration extra-cellulaire de bléomycine n'est que de 30 nM.

Les expériences conduites avec deux cuvettes en parallèle mettent par ailleurs en évidence qu'un même champ n'induit pas les mêmes niveaux de perméabilisation en fonction du milieu extra-cellulaire. Ainsi, la perméabilisation peut varier à durée et amplitude de l'impulsion figées. De plus, dans le cas des impulsions de 10 ns et 3,8 kV/mm, la perméabilisation est plus efficace dans un milieu conducteur que dans un milieu non conducteur. Au contraire, si les impulsions ont une durée de 100 ns et toujours la même amplitude, la perméabilisation est plus efficace dans le milieu non conducteur. A même champ appliqué, la perméabilisation n'est donc pas croissante avec la densité de charges.

Par ailleurs, les expériences conduites en imposant la même densité de charges dans les deux milieux (expériences en série) mettent en évidence une perméabilisation plus marquée dans le milieu soumis au plus fort champ et confirme que la perméabilisation n'est pas uniquement imposée par la densité de charges mises en déplacement sous l'effet du champ.

Afin d'interpréter l'ensemble des résultats, il est nécessaire de considérer le Δ P_{TM}. Les valeurs données pour les Δ P_{TM} ne sont pas absolues. Les paramètres pour le calcul ne sont pas suffisamment bien renseignés. En particulier, nous ne connaissons pas précisément les différentes permittivités, ni les conductivités du milieu intra-cellulaire et de la membrane. De plus, le Δ P_{TM} de repos a été négligé.

Cependant, les valeurs proposées dans les tables précédentes peuvent être considérées en relatif, et comparées entre elles. En particulier, il est possible de comparer les valeurs que l'on obtient avec les impulsions de 100 μ s et les impulsions de 10 ou 100 ns.

Il apparaît tout d'abord, au vu des Δ PTM théoriques calculés, qu'il est nécessaire de dépasser les valeurs habituelles de seuil de perméabilisation. Au cours des expériences conduites avec une seule impulsions de 100 μ s, la perméabilisation réversible détectée au moyen de 30 nM de bléomycine nécessite un champ supérieur à 60 V/mm ce qui correspond à un Δ PTM théorique max de 630 mV. Avec les impulsions de 10 ns, ces valeurs peuvent être largement dépassées et ne pas induire de perméabilisation même avec un nombre élevé d'impulsions. C'est le cas lorsque les cellules sont dans du STM et soumises à des impulsions de 10 ns et 3,8 kV/mm (section 4.3.3.5). Dans cette configuration, même 1000 impulsions ne font pas chuter la viabilité en présence de 30 nM de bléomycine, c'est à dire que ces impulsions ne provoquent même pas de perméabilisation réversible. De plus, il apparaît que même lorsque le Δ PTM maximum théorique atteint des valeurs très élevées, de l'ordre de 6 V (sections 4.3.3.5 et 4.4.2), la détection de la perméabilisation peut nécessiter plusieurs dizaines d'impulsions. De manière générale, les conditions optimales de perméabilisation correspondent à des Δ PTM maxima élevés et des dynamiques lentes, c'est à dire des valeurs de plusieurs volts pendant des durées de quelques dizaines à quelques centaines de nanosecondes.

Il est difficile de spéculer sur les valeurs réellement atteintes par la différence de potentiel transmembranaire. L'utilisation de sondes fluorescentes est une approche possible pour répondre à cette question. L'utilisation de la sonde Annine-6 (Flickinger *et al.*, 2010) sur des cellules végétales a permis de montrer que 500 ns après l'application d'une impulsion électrique de l'ordre de 10 à 100 kV/mm et 1 μ s, la différence de potentiel transmembranaire sature à une valeur de l'ordre de 300 mV. Cette valeur est bien inférieure aux valeurs de plusieurs volts théoriques que nous calculons ici. Cependant, la mesure étant effectuée au bout de 500 ns, il n'est pas exclu que la différence de potentiel transmembranaire prenne des valeurs bien plus élevées pendant les premières nanosecondes de l'impulsion, puis s'effondre par suite de la perméabilisation qui induit un changement de conductivité de la membrane.

La possibilité de maintenir des tensions de l'ordre de quelques volts sur la membrane pendant quelques nanosecondes, voire quelques dizaines de nanosecondes, semble par ailleurs en accord avec les valeurs avancées par la dynamique moléculaire (voir chapitre 7). En outre, 5 V sur une membrane de 5 nm correspondent à un champ de l'ordre du GV/m, valeur qu'il est possible d'atteindre sur des matériaux diélectriques et particulièrement sur les couches minces utilisées dans les condensateurs

(Perny *et al.*, 1972; Schneuwly *et al.*, 1998; Gowrisanker *et al.*, 2009). Des couches d'oxyde de titane de $0,3 \mu\text{m}$ peuvent par exemple tenir en continu des tensions allant jusqu'à 1 kV , (Perny *et al.*, 1972) ce qui équivaut à des champs de l'ordre de 3 GV/m .

Enfin, d'après les études sur la rupture des matériaux, les champs de claquage sont directement liés à la durée de la stimulation. C'est notamment ce que rapportent les critères de Kilpatrick (Pai et Zhang, 1995) en impulsionnel. Dans l'huile et en régime impulsionnel, le critère de Kilpatrick indique que le champ de claquage E dépend de la durée des impulsions à la puissance $-1/3$. Ainsi, en passant de $100 \mu\text{s}$ à 10 ns , il est possible de tenir des champs environ 20 fois plus intenses. Au vu des expériences conduites en micropulses, nous pouvons proposer un seuil de perméabilisation de 630 mV pour un ΔPTM maintenu pendant $100 \mu\text{s}$. Ceci correspond, si l'on considère une loi en puissance $-1/3$, à un seuil de $6,3 \text{ V}$ pour une durée de 100 ns et un seuil de $13,6 \text{ V}$ pour une durée de 10 ns . Le critère que nous avons extrait des expériences (perméabilisation pour un ΔPTM d'environ 3 V pendant environ 100 ns) semble s'accorder avec une loi de ce type.

Bien entendu, la membrane n'est pas une simple couche d'huile homogène. De plus, il n'est pas certain qu'un claquage, au sens de l'arrachage d'électrons, intervienne. Cependant, il est envisageable que la vitesse de formation de défauts dans la bicouche lipidique dépende de la valeur de la différence de potentiel transmembranaire. Ceci est en accord avec les études sur membranes artificielles (Abidor *et al.*, 1979). En outre, les simulations en dynamique moléculaire indiquent bien que le temps d'initiation nécessaire pour que l'eau commence à s'infiltrer dans la membrane est fonction du ΔPTM appliqué (Tarek, 2005; Levine et Vernier, 2010).

4.8 Transposition *in vivo*

4.8.1 Principe des expériences

Les expériences qui suivent ont pour but de valider que la bléomycine peut être vectorisée au moyen de nanopulses *in vivo*. Les expériences sont conduites dans un tissu tumoral dans lequel la division rapide des cellules permet d'attester du succès de la vectorisation. En effet, des cellules n'ayant pas incorporé de bléomycine continueront à se diviser, ce qui se traduira pour l'expérimentateur par une augmentation du volume tumoral. Au contraire, si de la bléomycine rentre dans les cellules, les cellules en se divisant mourront et le volume tumoral diminuera. Avant d'être envisagées comme un test de traitement anticancéreux, ces expériences peuvent donc être considérées comme une technique de détection de la perméabilisation *in vivo*. Les expériences sont conduites de la façon suivante (figure 4.28) :

- Les souris sont inoculées en sous-cutané avec environ 10^6 cellules de fibrosarcome murin de souris (lignée LPB).
- Lorsque le volume tumoral atteint environ 40 mm^3 , les souris sont anesthésiées et $100 \mu\text{g}$ de bléomycine leur sont injectés par voie rétro-orbitale. Quatre minutes après l'injection de bléomycine, des nanopulses sont appliqués localement sur la tumeur.
- Le suivi du volume tumoral s'effectue pendant environ quatre semaines après le traitement.

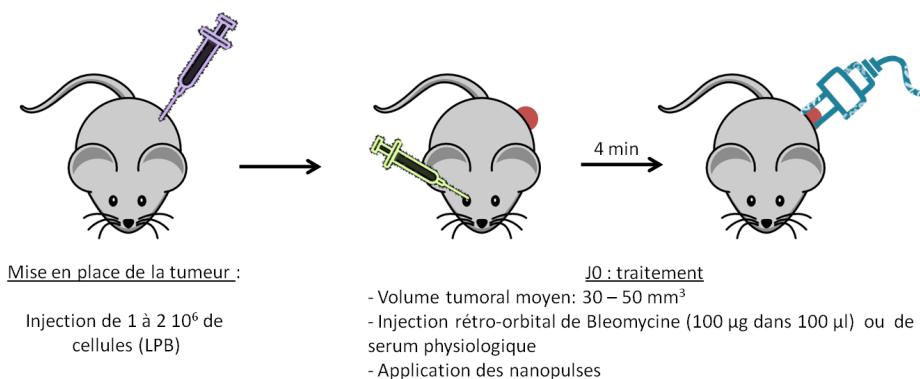


FIG. 4.28 : Principe des expériences de détection de perméabilisation *in vivo*.

4.8.2 De la nécessité de contrôler en permanence le champ

Contrairement aux expériences conduites sur des cellules en suspension avec des charges fixes et connues, les expériences *in vivo* se prêtent mal à une prédétermination du champ appliqué. La position de la tumeur dans les électrodes et la

conductivité du tissu tumoral peuvent varier d'une souris à l'autre et ainsi modifier l'impulsion appliquée. La nécessité de mesurer de façon systématique le champ est donc indiscutable. Au cours des expériences, nous nous sommes par ailleurs rendu compte que des claquages intempestifs avaient parfois lieu dans les câbles (au niveau des connecteurs), et que certaines impulsions étaient donc avortées. Ces claquages ne sont ni visibles ni audibles : on n'observe pas d'étincelle ni n'entend de son suspect. Seule la mesure des impulsions au niveau des électrodes peut donc garantir que l'ensemble des impulsions est bien délivré. La figure 4.29 est une photo du dispositif d'application des impulsions électriques. Un exemple de mesure est donné figure 4.30 Les quelques résultats présentés dans les sections suivantes proviennent d'expériences au cours desquelles aucun claquage n'a été signalé.

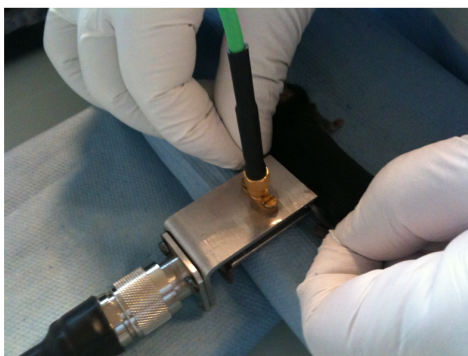


FIG. 4.29 : *Photo du dispositif expérimental pendant le traitement de tumeur.*

4.8.3 Quelques résultats

Les expériences présentées ont toutes été conduites avec le générateur A, le seul disponible au moment où les expériences se sont déroulées. L'amplitude de la tension de sortie a toujours été réglée à 7 kV, le maximum garantissant la tenue des câbles et connecteurs (le maximum du générateur est de 8 kV).

4.8.3.1 Influence du nombre d'impulsions

Au cours de la première expérience, toutes les conditions de traitement sont la combinaison de bléomycine et d'impulsions de 10 ns et 2 kV/mm. Un nombre croissant d'impulsions a été testé, en adaptant la fréquence de répétition pour conserver une durée de traitement constant. Les conditions sont les suivantes :

- 3000 impulsions délivrées à 10 Hz
- 300 impulsions délivrées à 1 Hz

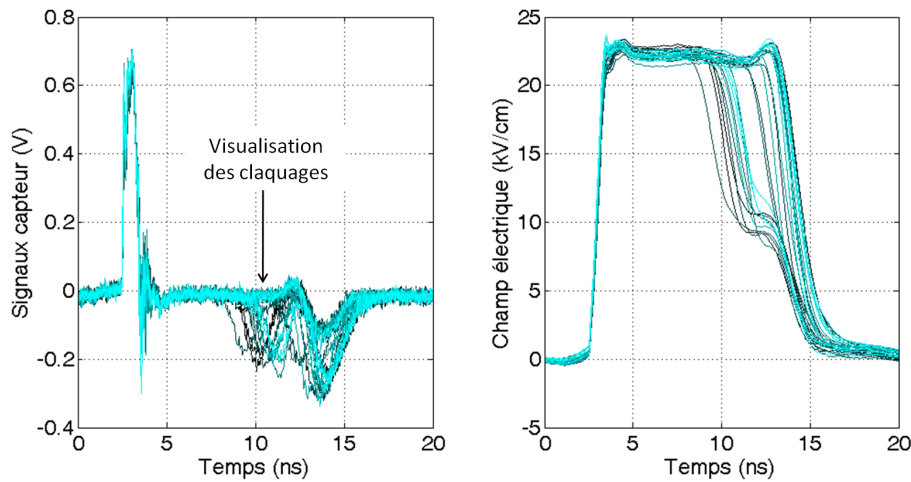


FIG. 4.30 : Mesures au D-dot lors des expériences sur souris. Au cours de cette expérience 30 nanopulses ont été délivrées avec un taux de répétition de 0,1 Hz. (A) Signaux acquis (B) Impulsions reconstituées.

- 30 impulsions délivrées à 0,1 Hz

Le suivi de la croissance tumorale sur 28 jours met en évidence un retard de croissance dans les trois conditions de traitement, alors que le groupe traité avec la bléomycine seule a une vitesse de croissance très proche de celle du contrôle absolu. L'effet du traitement est d'autant plus marqué que le nombre d'impulsions est important. En particulier, le groupe traité avec 3000 impulsions a un volume tumoral final inférieur de 25% à celui du groupe contrôle 28 jours après le traitement. Le groupe traité avec seulement 30 impulsions présente déjà un volume tumoral 50% en dessous de celui du contrôle. Cependant, aucune régression complète n'a été observée.

4.8.3.2 Action de la bléomycine

Comme suite à ces résultats, une expérience a été menée afin de comparer les effets des impulsions seules aux effets des impulsions combinées à la bléomycine. Les deux paramètres électriques conservés pour cette expérience sont :

- 3000 impulsions à 10 Hz
- 30 impulsions à 0,1 Hz

L'amplitude du champ mesurée pendant les expériences est de 2,5 kV/mm.

Dans cette expérience, les groupes traités avec la bléomycine seule ou les impulsions seules ont des croissances très proches et légèrement ralenties par rapport

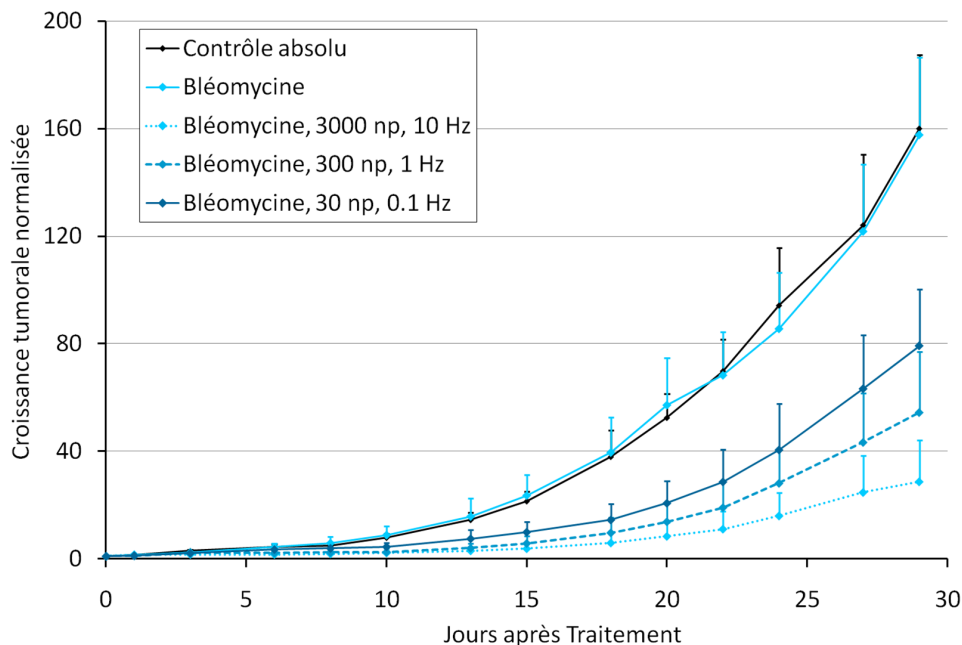


FIG. 4.31 : Croissance tumorale pendant les 28 jours suivant le traitement (normalisée par la mesure à J_0). Le groupe contrôle absolu n'a reçu aucun traitement. Le groupe bléomycine n'a reçu que l'injection de $100 \mu\text{g}$ de bléomycine en intra-orbitale. Les autres groupes ont reçu des impulsions de 10 ns et $2,5 \text{ kV/mm}$ (3000 délivrées à 10 Hz ou 30 impulsions à $0,1 \text{ Hz}$) après une injection rétro-orbitale de $100 \mu\text{g}$ de bléomycine. Les groupes sont constitués de 8 souris. Les résultats sont les moyennes \pm l'erreur standard.

au groupe contrôle. L'action de 3000 impulsions appliquées à 10 Hz est comparable à l'action de 30 impulsions appliquées à $0,1 \text{ Hz}$. Il est possible ainsi que les impulsions seules aient déjà un léger effet sur la croissance tumorale. L'action combinée des impulsions et de la bléomycine, en revanche, se démarque des autres traitements. A 24 jours, on retrouve que le groupe traité avec 3000 impulsions à 10 Hz et la bléomycine a un volume tumoral de l'ordre de 25% de celui des contrôles. De même, le groupe traité avec 30 impulsions à $0,1 \text{ Hz}$ et la bléomycine a un volume tumoral d'environ 50% du groupe contrôle.

Cette expérience préliminaire met en évidence qu'une action combinée de bléomycine et impulsions nanosecondes induit un effet supérieur à celui des impulsions seules. Ainsi, il est probable que le retard de croissance soit lié à une action perméabilisante des impulsions électriques.

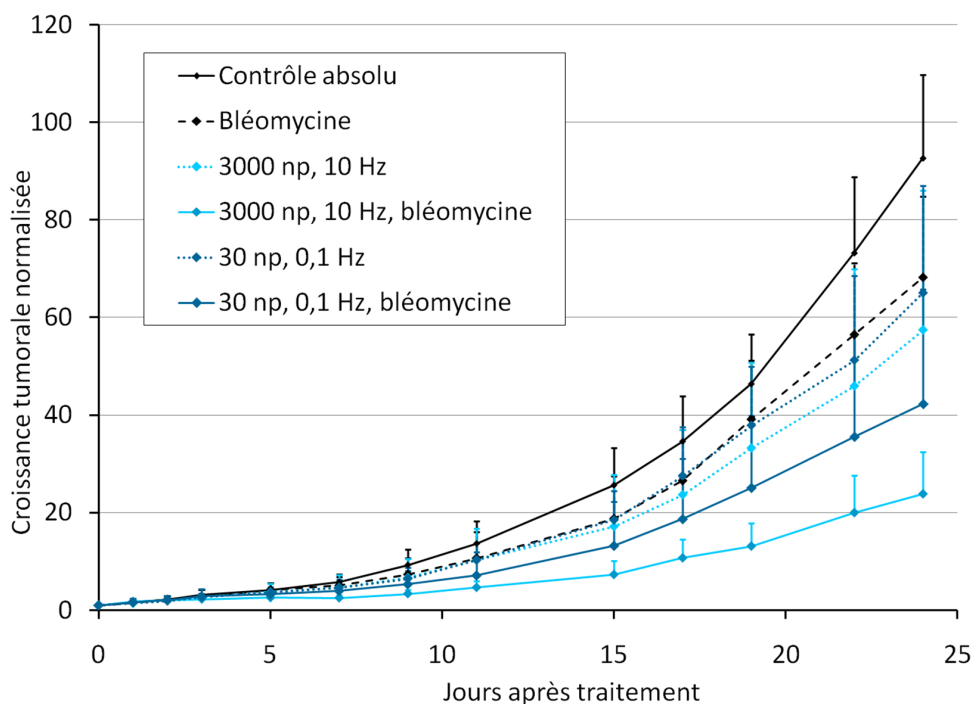


FIG. 4.32 : Croissance tumorale pendant les 24 jours suivant le traitement. Le groupe contrôle absolu n'a reçu aucun traitement. Le groupe bléomycine n'a reçu que l'injection de $100\mu\text{g}$ de bléomycine en intraorbitale. Les autres groupes ont reçu des impulsions de 10 ns et $2,5\text{ kV/mm}$ (3000 délivrées à 10 Hz ou 30 impulsions à 0,1 Hz) seules ou combinées à une injection rétroorbitale de $100\mu\text{g}$ de bléomycine. Les groupes sont constitués de 8 souris. Les résultats sont les moyennes \pm l'erreur standard.

4.8.4 Bilan sur les expériences *in vivo*

Les expériences conduites *in vivo* ont donné des résultats assez peu satisfaisants en termes de réduction du volume tumoral. Même si l'on observe systématiquement des retards de croissance, aucune véritable régression n'a suivi les traitements. Il est à noter cependant que 30 impulsions de 10 ns et 2 kV/mm suffisent à induire un effet.

Les champs utilisés au cours de ces expériences sont faibles en comparaison des amplitudes utilisées *in vitro*. Ceci est probablement la raison principale pour laquelle l'effet est si faible bien que la bléomycine soit injectée en quantité importante. Il sera donc intéressant de reprendre ces expériences lorsqu'il sera possible de délivrer des impulsions de plus forte amplitude.

Chapitre 5

Développement d'un microscope CARS

Une partie des travaux de cette thèse a été consacrée au développement d'un microscope CARS (Cohérent Anti-Stokes Raman Scattering) plein champ dédié à l'observation des effets des impulsions nanosecondes sur les cellules biologiques. Ce chapitre rappelle quelques bases de théorie de spectroscopie moléculaire. Le principe de la diffusion Raman anti-Stokes cohérente est exposé et son intérêt dans le cadre de l'étude des impulsions nanosecondes est expliqué. Ce chapitre inclut également quelques outils optiques nécessaires à la compréhension des travaux. Enfin, les expériences de validation du montage optique sur billes de polystyrène et sur cellules, ainsi que les expériences préliminaires conduites avec des impulsions nanosecondes, sont présentées.

Notations

Un rayonnement lumineux monochromatique est caractérisé par sa fréquence ν exprimée en Hz. Sa longueur d'onde dans le vide notée λ est définie par l'équation 5.1 où c désigne la vitesse de propagation dans le vide. Elle s'exprime en mètre ou sous-multiple du mètre.

$$\lambda = \frac{c}{\nu} \quad (5.1)$$

Enfin, on définit ω , le nombre d'onde dans le vide par l'équation 5.2. Le nombre d'onde a pour dimension l'inverse d'une longueur. On l'exprime en cm^{-1} selon la convention très souvent adoptée en spectroscopie moléculaire (Herzberg et Huber, 1950).

$$\omega = \frac{1}{\lambda} = \frac{\nu}{c} \quad (5.2)$$

L'usage veut que l'on appelle abusivement le nombre d'onde : 'fréquence'. Nous utiliserons donc le terme fréquence pour désigner la fréquence ν et le nombre d'onde ω . Les symboles seront respectés et les unités précisées entre crochets lors des premières occurrences.

5.1 Principes optiques

5.1.1 Niveaux énergétiques

Un système atomique, ou moléculaire, ne peut exister que dans certains états d'énergie quantifiés. L'ensemble de ces états constitue le **diagramme de niveaux d'énergie** de la molécule. Chaque niveau est fixé par la somme de trois termes :

L'énergie électronique E_e liée aux énergies potentielles et cinétiques des électrons dans le référentiel des noyaux.

L'énergie de vibration E_v liée aux mouvements d'oscillation des noyaux autour de leur position d'équilibre.

L'énergie de rotation E_r liée aux mouvements de rotation globale de la molécule.

De manière générale, la différence d'énergie ΔE_e entre deux niveaux électroniques consécutifs est bien plus grande que la différence d'énergie ΔE_v entre deux niveaux vibrationnels consécutifs, elle-même bien plus grande que la différence ΔE_r entre deux niveaux rotationnels consécutifs (équation 5.3). La figure 5.1 est une représentation schématique des différents niveaux et de quelques transitions les reliant. Le passage d'un niveau à l'autre (transition) peut se faire dans le sens des énergies croissantes par absorption d'un ou plusieurs photons ou dans le sens des énergies décroissantes par émission de photons. Les mécanismes d'absorption et d'émission à un photon ainsi que les transitions énergétiques associées sont représentés sur la figure 5.2. Pour une transition entre des niveaux E' et E'' , la fréquence ν [Hz] du photon émis ou absorbé est donnée par l'équation 5.3, où h est la constante de Planck.

$$\Delta E_e \gg \Delta E_v \gg \Delta E_r \quad (5.3)$$

$$\nu = \frac{|E' - E''|}{h} \quad (5.4)$$

Il est possible d'obtenir expérimentalement des spectres moléculaires d'émission ou d'absorption. En fonction des bandes énergétiques sondées, on distingue trois types de spectres.

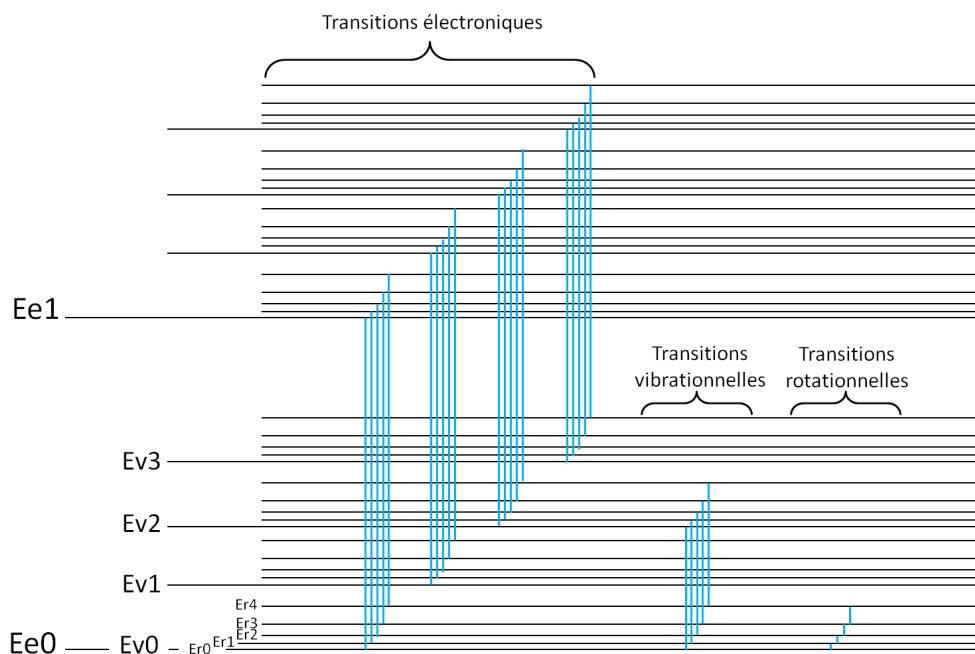


FIG. 5.1 : Répartition des bandes énergétiques. Quelques transitions entre niveaux d'énergie sont représentées en bleu.

Spectre de rotation Ce spectre est obtenu lorsque la molécule reste dans le même niveau électronique et le même niveau vibrationnel. Seule l'énergie de rotation est modifiée. Il s'observe dans les domaines des micro-ondes ou de l'infra-rouge lointain (domaine du Téraherz).

Spectre de vibration rotation Ce spectre correspond à des transitions entre deux niveaux vibrationnels d'un même niveau électronique. Il s'observe dans l'infra-rouge moyen ou proche.

Spectre électronique Il est obtenu lorsque la molécule passe d'un niveau électronique à un autre et donne ainsi lieu à un système de bandes. Il s'observe dans l'infra-rouge très proche, le visible ou l'ultra-violet.

L'ensemble de ces trois spectres constitue un spectre moléculaire, qui est caractérisé par la position spectrale des raies (ou bandes) en abscisse et par leur intensité en ordonnée. C'est une signature de la molécule. Un spectre moléculaire contient de plus des informations sur l'environnement de la molécule. Il est modifié en fonction de la température, de la pression, du taux d'hydratation de l'environnement. Ce sont le plus souvent les intensités relatives et les largeurs des composantes spectrales qui seront modifiées. Sonder les bandes énergétiques permet

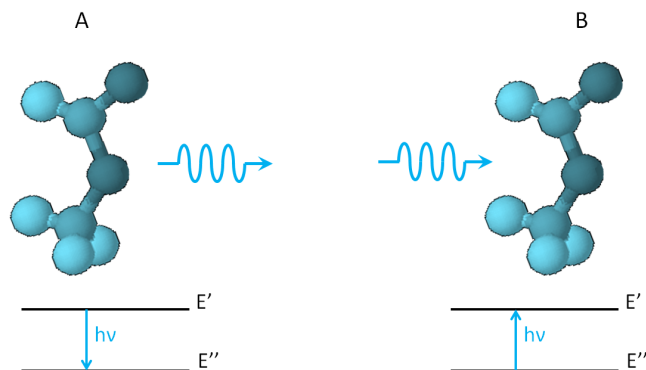


FIG. 5.2 : *Transitions énergétiques associées à l'absorption ou à l'émission d'un photon.*

donc de renseigner sur l'organisation moléculaire locale d'une espèce chimique et sur son environnement. Dans le cadre des interactions entre champ électrique et cellules vivantes, la connaissance des bandes énergétiques modifiées par le champ électrique apportera une information sur les modifications induites par le champ électrique sur les cellules au niveau moléculaire.

La spectroscopie infra-rouge permet donc de sonder les vibrations et rotations à l'échelle moléculaire. En pratique, la microscopie infrarouge a été peu développée, d'une part parce que les grandes longueurs d'ondes mises en jeu limitent fortement la résolution spatiale, et d'autre part à cause de l'importante absorption de l'eau à ces longueurs d'ondes. Le Raman spontané et le Raman cohérent que nous présentons dans les paragraphes suivants présentent ainsi des alternatives séduisantes pour l'étude des vibrations moléculaires. Les bandes sondées en Raman ne sont pas tout à fait les mêmes qu'en infra-rouge,¹ et elles sont moins nombreuses, car le Raman est un processus plus sélectif. En pratique, la plus grande sélectivité du Raman en fait une méthode de détection plus adéquate à l'exploration de milieux complexes contenant un grand nombre de macromolécules.

5.1.2 Diffusion Rayleigh et Raman spontanée

Lorsqu'un faisceau monochromatique de fréquence $\omega [cm^{-1}]$ interagit avec une espèce moléculaire, une partie des photons peut-être absorbée et conduire à une transition énergétique (section 5.1.1). Les autres photons interagissant avec la molécule sont diffusés du fait d'une interaction avec les électrons. Ils sont ré-émis instantanément dans toutes les directions (angle solide de 4π stéradians), car la

¹Ceci est dû aux différences de règles de sélection quantique entre l'absorption infra-rouge et le Raman.

diffusion est un processus incohérent. La majorité des photons diffusés a une fréquence égale à celle du rayonnement incident. On parle de diffusion Rayleigh.

L'existence d'une fréquence de vibration Ω [cm^{-1}] de la molécule est responsable d'un décalage en fréquence de certains photons diffusés (figure 5.3-A). Ce décalage correspond à un transfert d'énergie entre les photons et la molécule. Si le photon diffusé a pour fréquence $\omega - \Omega$, il y a disparition d'un photon d'énergie $h\omega$ et création d'un photon d'énergie $h(\omega - \Omega)$. La molécule gagne la différence d'énergie, et passe dans un état vibrationnel excité. On appelle le photon ré-émis photon **Stokes**. Sa fréquence est notée ω_s [cm^{-1}] et vérifie l'équation 5.5. Si le photon diffusé a pour fréquence $\omega + \Omega$, il y a disparition d'un photon d'énergie $h\omega$ et création d'un photon d'énergie $h(\omega + \Omega)$. La molécule perd la différence d'énergie et passe de l'état vibrationnel excité à l'état non-excité. On appelle le photon ré-émis photon **anti-Stokes**. Sa fréquence est notée ω_{as} [cm^{-1}] et vérifie l'équation 5.6.

Les diagrammes énergétiques associés aux transitions Stokes et anti-Stokes sont représentés sur la figure 5.3-B et le spectre schématique sur la figure 5.3-C. Les photons Stokes et anti-Stokes ré-émis sont rigoureusement symétriques par rapport au faisceau incident. L'analyse de ce spectre constitue la spectroscopie Raman. Elle permet d'étudier les bandes vibrationnelles d'une molécule. L'intensité des différentes bandes est proportionnelle à l'intensité lumineuse incidente I_0 .

$$\omega_s = \omega - \Omega \quad (5.5)$$

$$\omega_{as} = \omega + \Omega \quad (5.6)$$

La transition anti-Stokes fait intervenir une molécule dont l'état initial est un niveau vibrationnel excité. En l'absence d'excitation, la répartition des populations sur les différents niveaux énergétiques est régie par l'équilibre thermodynamique du milieu et suit la loi de Boltzmann. A température ambiante, les états excités, de plus haute énergie, sont moins peuplés que les états inférieurs. Il en résulte que les transitions Stokes sont plus fréquentes que les transitions anti-Stokes. De manière générale, les deux processus sont rares. Le signal est typiquement 10^{10} fois plus faible qu'un signal de fluorescence. L'obtention d'images d'objets biologiques en Raman spontané nécessite donc des puissances lasers extrêmement élevées (car le signal est proportionnel à l'intensité lumineuse incidente I_0). L'utilisation d'un processus non-linéaire actif de pompage (voir section 5.1.3) permet de réduire considérablement les puissances mises en jeu. C'est le principe de la diffusion Raman cohérente.

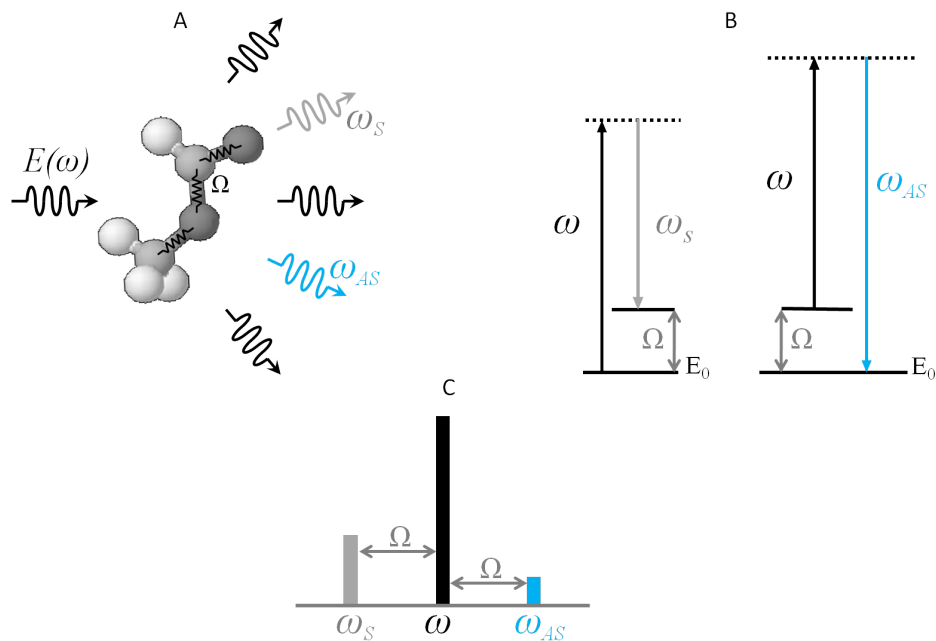


FIG. 5.3 : A - Illustration schématique de la diffusion Raman spontanée B - Diagrammes énergétiques associés C - Spectre schématique associé

5.1.3 Diffusion Raman anti-Stokes Cohérente

La diffusion Raman anti-Stokes Cohérente (ou CARS : Coherent anti-Stokes Raman Scattering) consiste à stimuler les transitions anti-Stokes. L'excitation est réalisée grâce à deux faisceaux dit Pompe et Stokes de fréquence respective $\omega_p [cm^{-1}]$ et $\omega_s [cm^{-1}]$. La différence des fréquences des deux faisceaux d'excitation est accordée de façon à correspondre à la fréquence de vibration d'intérêt Ω , la résonance Raman. Dans une configuration dite 'non-dégénérée', un troisième faisceau dit sonde de fréquence ω_{sonde} permet alors de générer un signal anti-Stokes **cohérent** à la fréquence $\omega_{sonde} + \Omega$. En pratique on peut se passer d'un troisième faisceau et exploiter à nouveau le faisceau pompe (configuration dégénérée). Dans ce cas, le signal anti-Stokes résonant est créé à la fréquence ω_{as} donnée par l'équation 5.8. Ce processus et le diagramme énergétique associé sont schématisés sur la figure 5.4. Le processus CARS faisant intervenir quatre photons, on parle de mélange à quatre ondes. C'est un processus dit résonant car on force l'ensemble des molécules à osciller en phase à leur fréquence de vibration Ω . En pratique, le signal créé par le processus CARS est environ 10^9 à 10^{11} fois plus intense que le signal Raman spontané (Tolles *et al.*, 1977; Levenson et Kano, 1988).

$$\omega_p - \omega_s = \Omega \quad (5.7)$$

$$\omega_{as} = \omega_p + \Omega = 2\omega_p - \omega_s \quad (5.8)$$

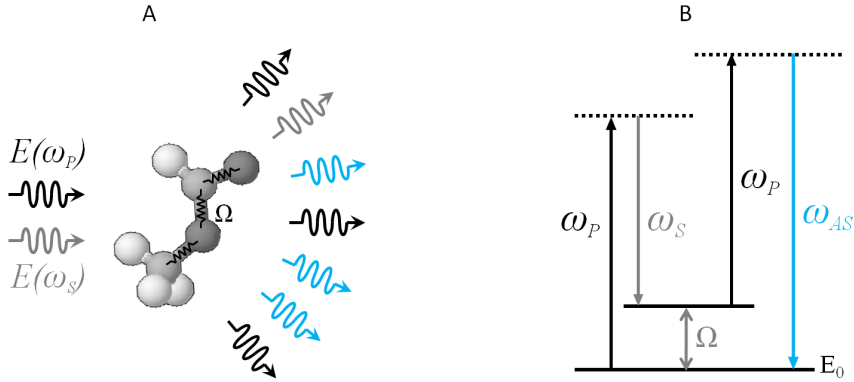


FIG. 5.4 : A - Illustration schématique de la diffusion Raman cohérente B - Diagramme énergétique associé

Il est important de noter que le processus de mélange à quatre ondes n'est pas intrinsèquement lié à la présence d'une résonance vibrationnelle. Il peut se produire même en l'absence de résonance, par interaction des photons avec le nuage électronique de la molécule. La présence d'une résonance rotationnelle ou vibrationnelle va seulement exalter le processus, et conduire à une bien plus grande intensité de signal (voir section 5.1.4).

5.1.4 Expressions théoriques des signaux

Nous ne rappellerons ici que les expressions nécessaires à l'interprétation et la compréhension des spectres. Des démonstrations détaillées peuvent être trouvées dans des ouvrages généraux ou des articles de revue (Tolles *et al.*, 1977; Druet et Taran, 1981).

La présence de charges liées dans un matériau est à l'origine d'une polarisation P_i induite sous l'effet d'un champ électrique. De manière générale, la polarisation induite peut s'exprimer par un développement en puissance des champs électriques (équation 5.9) :

$$\mathcal{P}_i = \varepsilon_0 [\chi_{ij}^{(1)} \mathcal{E}_j + \chi_{ijk}^{(2)} \mathcal{E}_j \mathcal{E}_k + \chi_{ijkl}^{(3)} \mathcal{E}_j \mathcal{E}_k \mathcal{E}_l] \quad (5.9)$$

où \mathcal{P} et \mathcal{E} sont des vecteurs, $\mathcal{X}^{(m)}$ est un tenseur d'ordre m représentant la susceptibilité linéaire ($m = 1$) ou non-linéaire ($m \neq 1$) du matériau considéré, et où le champ électrique \mathcal{E}_i est défini par la notation complexe habituelle :

$$\mathcal{E}_i(r, t) = E_i e^{-i(\omega_i t - \vec{k}_i \cdot \vec{r})} \quad (5.10)$$

Le processus CARS, qui appartient à la famille des processus de mélange à quatre ondes, fait intervenir un terme de susceptibilité d'ordre 3. La polarisation associée, induite à la fréquence anti-Stokes, est donnée par l'équation 5.11.

$$\mathcal{P}^3(\omega_{AS}) = \varepsilon_0 \mathcal{X}^{(3)}(\omega_{AS}, \omega_P, \omega_P, -\omega_S) \mathcal{E}_P^2 \mathcal{E}_S^* \quad (5.11)$$

Le champ électrique anti-Stokes \mathcal{E}_{AS} s'obtient en résolvant l'équation d'onde issue des équations de Maxwell dans les matériaux (équation 5.12). On obtient alors pour l'amplitude du champ la relation 5.13 qui régit l'amplification de l'onde créée à la fréquence ω_{as} . La direction \vec{Z} est la direction de l'axe optique.

$$\Delta \mathcal{E} - \frac{1}{c^2} \frac{\partial^2 \mathcal{E}}{\partial t^2} = \frac{1}{\varepsilon_0 c^2} \mathcal{P} \quad (5.12)$$

$$\frac{\partial \mathcal{E}_{AS}}{\partial Z} \propto \mathcal{X}^{(3)} \mathcal{E}_P^2 \mathcal{E}_S^* e^{i(\vec{\Delta k} \cdot \vec{Z})} \quad (5.13)$$

Le vecteur $\vec{\Delta k}$ est la somme des vecteurs d'onde des champs des quatre ondes impliquées dans le processus CARS (équation 5.14)

$$\vec{\Delta k} = \vec{k}_{AS} - (2\vec{k}_P - \vec{k}_S) \quad (5.14)$$

Si l'on pose $\mathcal{E}_{AS}(0) = 0$ on obtient alors à une distance D sur l'axe optique :

$$\mathcal{E}_{AS}(D) \propto \mathcal{X}^{(3)} \mathcal{E}_P^2 \mathcal{E}_S^* \left(\frac{e^{\vec{\Delta k} \cdot \vec{D}} - 1}{i \vec{\Delta k} \cdot \vec{D}} \right) \quad (5.15)$$

La distance D représente la distance d'interaction du processus CARS. L'intensité du signal CARS peut alors être écrite comme :

$$|I_{AS}(D)| \propto |\mathcal{E}_{AS}(D)|^2 \propto |\mathcal{X}^{(3)}|^2 I_P^2 I_S D^2 \left(\frac{\sin(\vec{\Delta k} \cdot \vec{D} / 2)}{\vec{\Delta k} \cdot \vec{D}} \right)^2 \quad (5.16)$$

On peut noter que l'intensité du signal CARS est proportionnelle au carré de l'intensité du faisceau Pompe et à l'intensité du faisceau Stokes.

5.1.5 Géométries d'illumination.

D'après l'expression 5.16, l'optimisation de l'intensité du signal nécessite de remplir la condition 5.17. C'est la condition d'accord de phase.

$$\vec{\Delta k} \cdot D \ll \pi \quad (5.17)$$

Les configurations optiques CARS macroscopiques sont conçues pour minimiser le désaccord de vecteurs d'onde $|\vec{\Delta k}|$ et maximiser la longueur d'interaction D . Lorsque l'indice du milieu est indépendant de la longueur d'onde, les deux géométries planaires qui permettent d'annuler $|\vec{\Delta k}|$ sont celles de la figure 5.5. En pratique, la dispersion chromatique des milieux est faible et $|\vec{\Delta k}| = \vec{0}$ pour des inclinaisons de vecteurs d'onde de quelques degrés seulement par rapport aux configurations de la figure 5.5.

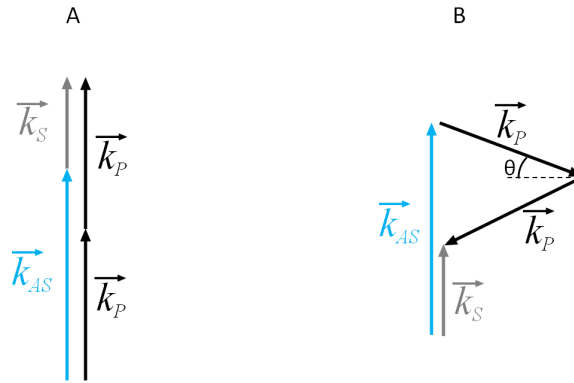


FIG. 5.5 : Géométries de faisceaux garantissant l'accord de vecteurs d'onde dans un milieu non dispersif.

La microscopie CARS conventionnelle utilise le balayage confocal. Les lasers sont fortement focalisés au moyen d'objectifs à grande ouverture numérique ($ON \sim 1,4$). Cette forte focalisation permet d'utiliser des géométries colinéaires d'excitation (Zumbusch *et al.*, 1999) qui ne respectent pas nécessairement l'accord des vecteurs d'onde mais qui respectent malgré tout l'accord de phase (Cheng et Xie, 2004; Volkmer, 2005). L'avantage des configurations colinéaires réside essentiellement dans la simplicité des alignements optiques, mais également dans l'amélioration des résolutions spatiales axiale et latérale. Les trois configurations principales utilisées sont présentées sur la figure 5.6. En configuration 'Forward' (F-CARS), l'accord de vecteur d'onde est vérifié et donc l'accord de phase également, quelle que soit la distance d'interaction. Le signal est donc intense mais contient un large fond non-résonant très gênant dans les milieux liquides. En configuration 'Epi' (E-CARS) ou en contra-propagatif, (C-CARS) en revanche, la contribution du fond non-résonant

est largement diminuée car le signal est constructif sur des distances beaucoup plus courtes.

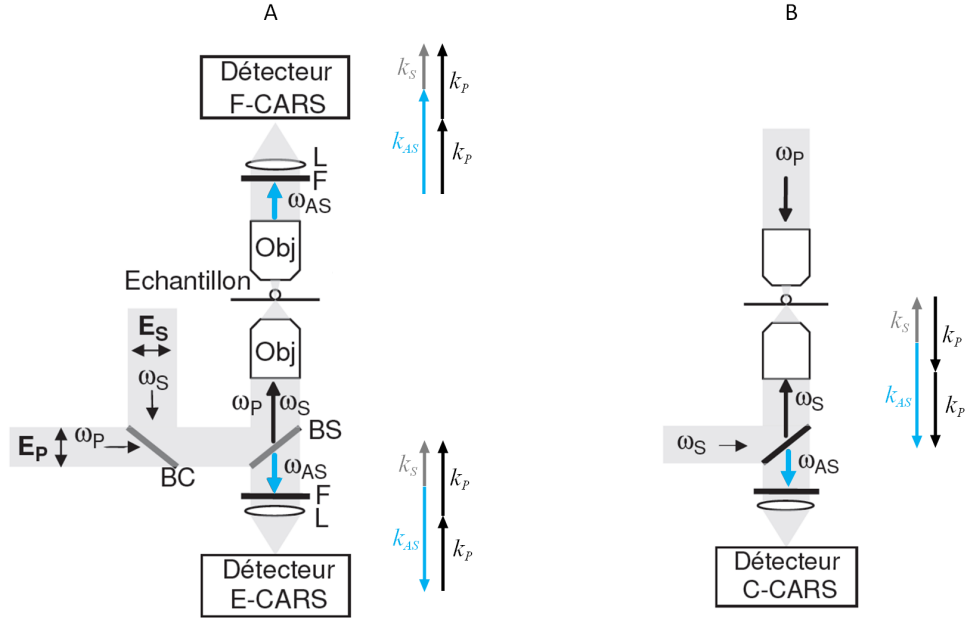


FIG. 5.6 : Représentation schématique des différentes géométries d'illumination en configuration colinéaire. A- Les faisceaux Pompe et Stokes sont co-propagatifs et la détection se fait vers l'avant (configuration Forward : F-CARS) ou vers l'arrière (configuration Epi : E-CARS). B- C-CARS : Les faisceaux d'excitation sont contra-propagatifs. La détection se fait dans la direction du faisceau Pompe.

5.1.6 Résonant et non-résonant.

D'après l'équation 5.16, l'intensité du signal CARS est proportionnelle au carré de la susceptibilité d'ordre 3 $\chi^3(\omega_{AS}, \omega_P, \omega_P, -\omega_S)$ que nous noterons désormais χ^3 . Il est possible de décomposer χ^3 en deux termes représentant respectivement les contributions résonante χ^{3r} et non-résonante χ^{3nr} du milieu (équation 5.18).

$$\chi^3 = \chi^{3r} + \chi^{3nr} \quad (5.18)$$

La contribution résonante correspond à la signature Raman des molécules. C'est ce terme qui fournit le contraste dans la microscopie CARS. C'est un terme complexe décrit par l'équation 5.19, où A_R est un coefficient lié à la densité de liaisons résonantes dans le milieu considéré et à leur section efficace, c'est à dire leur probabilité de générer un photon anti-Stokes. Γ_R est un facteur d'amortissement qui représente la largeur spectrale de la raie Raman.

$$\chi^{3r} = \chi^{3r'} + j\chi^{3r''} = \frac{A_R}{\Omega - (\omega_p - \omega_s) + j\Gamma_R} \quad (5.19)$$

Les parties réelle $\chi^{3r'}$ et imaginaire $\chi^{3r''}$ sont données par les équations 5.20 et 5.21. Lorsque la différence des fréquences lasers d'excitation $\omega_p - \omega_s$ est rigoureusement égale à la fréquence de vibration Ω de la liaison considérée, la partie réelle s'annule et la partie imaginaire est exaltée (figure 5.7).

$$\chi^{3r'} = -\frac{A_R(\omega_p - \omega_p)}{(\Omega - [\omega_p - \omega_s])^2 + \Gamma_R^2} \quad (5.20)$$

$$\chi^{3r''} = \frac{A_R\Gamma_R}{(\Omega - [\omega_p - \omega_s])^2 + \Gamma_R^2} \quad (5.21)$$

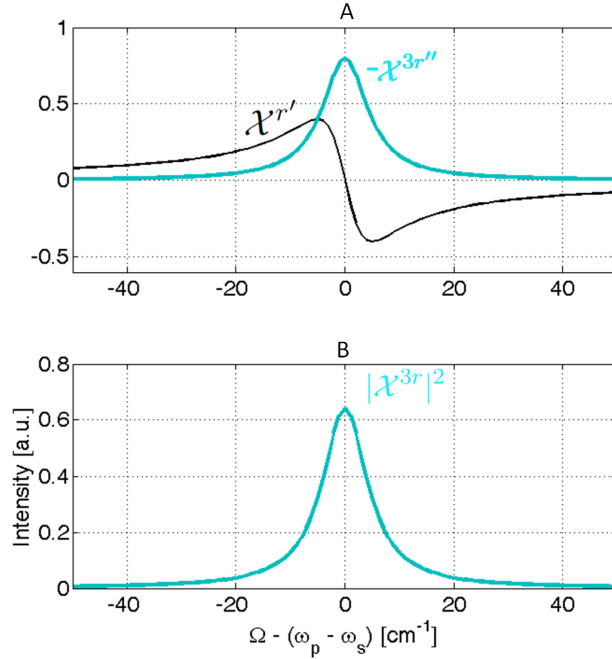


FIG. 5.7 : Susceptibilité CARS résonante pour une bande isolée tracée en fonction de l'écart en fréquence $\Omega - [\omega_p - \omega_s]$ Tracé avec $\Gamma_R = 5 \text{ cm}^{-1}$ et $A_R = 4$. A - Parties réelle $\chi^{3r'}$ et imaginaire $\chi^{3r''}$. B - Module au carré.

Le terme non-résonant χ^{3nr} est toujours présent même en l'absence de résonance. Il peut provenir d'une transition à un photon (figure 5.8-A) ou à deux photons (figure 5.8-B). Dans le cas d'une transition électronique à deux photons, la proximité d'un niveau électronique excité peut aussi produire une résonance à la fréquence $2\omega_p$ qui intensifie le signal dû à χ^{3nr} .

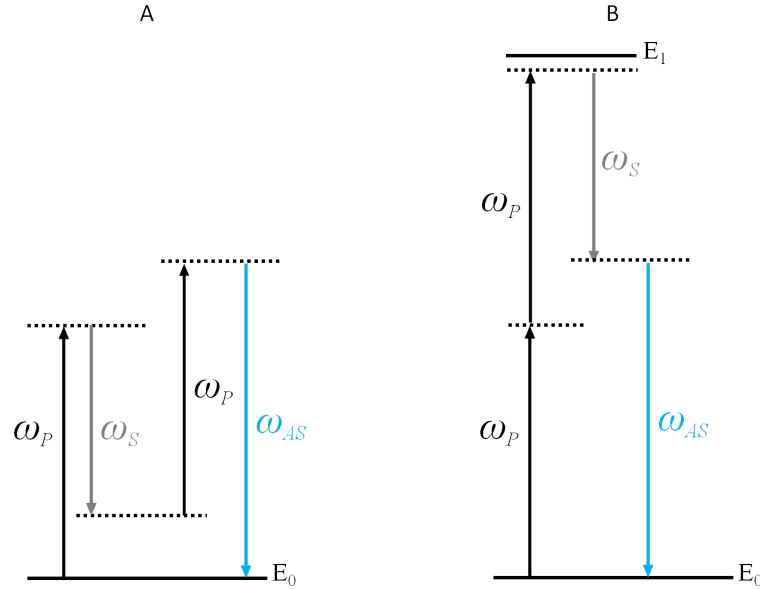


FIG. 5.8 : *A - Diagramme énergétique d'un processus CARS non-résonant. B - Contribution non-résonante d'un état électronique.*

Le terme \mathcal{X}^{3nr} est un terme réel quasi indépendant de la fréquence à condition d'être suffisamment loin des bandes électroniques excitées (afin de ne pas produire de résonance électronique). C'est ce terme qui limite en pratique la sensibilité de la CARS. La figure 5.9 représente le module au carré de \mathcal{X}^3 en absence et en présence d'un fond résonant. Le fond non résonant est responsable d'une distorsion du spectre typique du CARS (les raies sont le plus souvent asymétriques). L'intensité résultante présente un maximum à une fréquence inférieure à la fréquence de la résonance vibrationnelle sondée. Le pic résonant est de plus suivi par un creux plus ou moins important en fonction de l'amplitude du fond non-résonant. Lorsque le fond non-résonant est très important, il peut noyer complètement le signal Raman résonant (Vartiainen *et al.*, 2006). En imagerie des objets biologiques, l'eau est le principal élément susceptible de produire un fond non-résonant important du fait du grand nombre de molécules entourant l'objet. Il est nécessaire de s'en affranchir pour obtenir un bon contraste dans l'image.

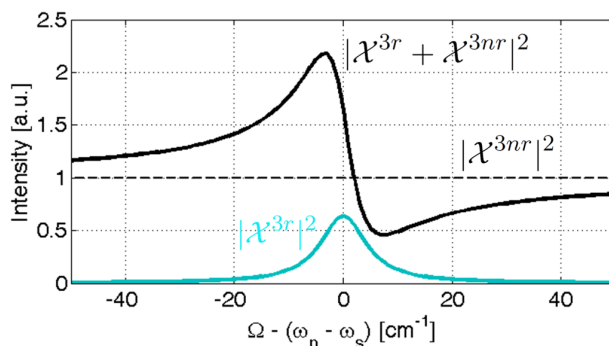


FIG. 5.9 : Profils d'une bande CARS en absence et en présence de fond non-résonant. Tracé avec $\Gamma_R = 5 \text{ cm}^{-1}$, $A_R = 4$ et $\chi^{3nr} = 1$

5.2 Le CARS pour l'étude des effets des nanopulses sur le vivant

5.2.1 Intérêt potentiel

L'information spectrale portée par un signal CARS est l'intérêt premier de ce processus dans le cadre de l'étude des effets des impulsions nanosecondes sur le vivant. Il est possible avec un tel outil de sonder les modifications moléculaires engendrées pendant et après l'application d'une impulsion électrique microseconde ou nanoseconde. D'autres outils ont déjà été utilisés dans ce même but. Une étude sur multicouche artificielle en résonance de spin électronique indique que les chaînes hydrocarbonées des phospholipides ne sont pas affectées par l'application d'un champ électrique intense de l'ordre de 10^5 V/m (Stulen, 1981). L'utilisation de la résonance magnétique nucléaire (RMN) dans les mêmes conditions indique que le champ peut produire une réorientation des têtes lipidiques (Stulen, 1981). Une autre étude en RMN, sur cellules CHO après application d'impulsions perméabilisantes, pointe une modification du spectre, également attribuée à une réorientation des têtes lipidiques (Lopez *et al.*, 1988). Actuellement, aucune expérience n'a permis cependant d'observer le comportement de l'eau interfaciale au cours du processus d'électroporation. L'implication de l'eau a pourtant de nombreuses fois été suggérée (Teissie, 2007), entre autres dans les récents articles de dynamique moléculaire (Tieleman, 2004; Tarek, 2005; Levine et Vernier, 2010). De ce point de vue, la spectroscopie CARS apparaît comme un outil à fort potentiel (voir section 5.2.3), car tout effet sur les molécules d'eau peut altérer notablement l'amplitude de certaines raies du spectre, changeant ainsi la signature initiale.

Le processus CARS est par ailleurs intéressant, car il permet intrinsèquement

d'obtenir une très grande dynamique temporelle. En effet, la durée typique du processus CARS est de l'ordre de la femtoseconde. Par opposition, en fluorescence classique, les durées moyennes de désexcitation sont de l'ordre de la nanoseconde. Dans notre configuration, les lasers d'excitation et le détecteur choisi limitent la résolution temporelle à la nanoseconde. Des évolutions du montage sont cependant envisageables s'il semble intéressant de résoudre les processus moléculaires mis en jeu à l'échelle de la femtoseconde.

Enfin, le processus CARS présente de nombreux avantages pratiques :

- L'absence de marqueurs exogènes (fluorescent, radioactif ...) permet d'étudier un échantillon biologique sans le modifier.
- Contrairement à la majorité des autres techniques d'optique non-linéaire, le CARS n'amène aucune population dans un état électronique excité, ce qui permet de s'affranchir des problèmes de photo-blanchiment.
- La possibilité d'utiliser des faisceaux d'excitation dans le proche infra-rouge (domaine dans lequel l'eau absorbe peu) permet de limiter l'absorption des lasers par l'échantillon biologique, dont la bande d'absorption est plutôt centrée sur le visible (en particulier dans le bleu pour les protéines). Ceci permet donc de minimiser l'échauffement de l'échantillon.

5.2.2 Les lipides

Les lipides constituent des molécules de choix en microscopie CARS, et en particulier les liaisons C-H. En effet, les vibrations associées aux liaisons C-H des queues lipidiques produisent des signaux très intenses et facilement détectables. Ceci est dû au grand nombre de liaisons C-H présentes dans chaque lipide, mais surtout à la très grande section efficace de cette liaison. La figure 5.10 présente un spectre typique de lipide. Les principales liaisons sont représentées. La bande associée à l'élongation des liaisons C-H est extrêmement large et intense. Elle est en réalité constituée de plusieurs bandes assez bien identifiées (Tu, 1982). En particulier, les élongations symétriques et asymétriques des liaisons C-H des groupes méthylène produisent deux bandes à 2850 cm^{-1} et 2890 cm^{-1} . Le rapport des intensités de ces deux modes de vibration est souvent exploité pour déterminer la conformation des chaînes carbonées et donc le 'packing' lipidique. Parmi les résonances les plus marquées, on trouve également l'élongation des doubles liaisons C=C à 1650 cm^{-1} dans la région appelée 'foot-print' des lipides, car elle permet de mieux différencier les lipides entre eux.

L'orientation des lipides peut être révélée par l'utilisation de lasers polarisés. La figure 5.11 présente un fantôme d'érythrocyte observé en CARS à 2845 cm^{-1} , les

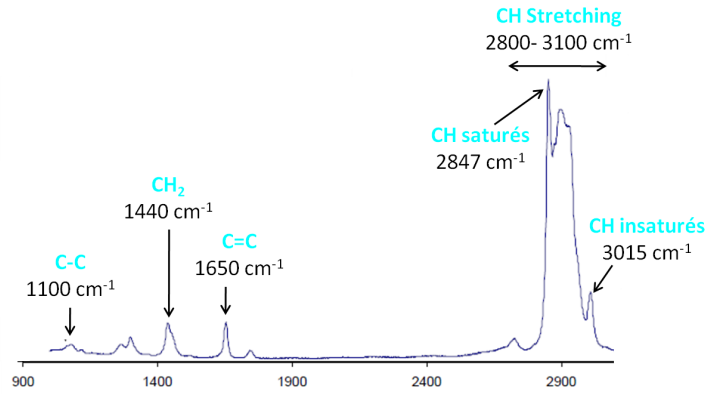


FIG. 5.10 : *Spectre Raman des lipides. Les principales vibrations sont indiquées.*

lasers Pompe et Stokes étant polarisés colinéairement. Il apparaît un contraste sur la membrane, lié à l'orientation des liaisons C-H. L'intensité du signal est augmentée lorsque la polarisation des lasers est alignée avec l'axe de la liaison C-H, car cet axe est aussi l'axe du dipôle excité (Tu, 1982).

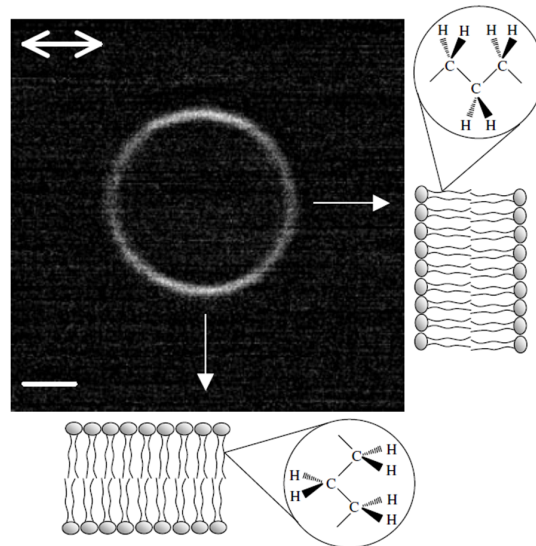


FIG. 5.11 : *Image Epi-CARS d'un fantôme d'érythrocyte à 2845 cm^{-1} . La double flèche indique la direction de la polarisation des faisceaux Pompe et Stokes. Extrait de Potma et Xie (2003)*

Parmi les autres liaisons d'intérêt, nous pouvons citer les liaisons autour du phos-

phate des phospholipides, et notamment les élongations symétriques et asymétriques de PO_2 , lesquelles se situent respectivement autour de 1100 cm^{-1} et 1200 cm^{-1} (Akutsu et Kyogoku, 1975; Mendelsohn *et al.*, 1975). Cette vibration est affectée par le taux d'hydratation. En effet, les molécules d'eau augmentent la mobilité des groupements glycérol et carbonyle au niveau des têtes des phospholipides, ce qui se traduit par un shift dans le mode asymétrique de PO_2 (Bush *et al.*, 1980; Fowler Bush *et al.*, 1980). Cette vibration peut donc renseigner sur l'état d'hydratation de la membrane. Elle présente donc un intérêt tout particulier dans notre application. La proximité d'autres vibrations, et en particulier des liaisons C-C des chaînes carbonées vers 1100 cm^{-1} , rend cependant la détection de cette bande délicate.

5.2.3 L'eau

La spectroscopie de l'eau liquide est à ce jour toujours en débat (Maréchal, 2011). Elle a été abordée essentiellement grâce à la spectroscopie infra-rouge (Badger et Bauer, 1937; Pimentel et McClellan, 1960) ou la spectroscopie Raman (Tu, 1982). La région principale d'intérêt de vibration se situe entre 3000 cm^{-1} et 3600 cm^{-1} (voir figure 5.12). Elle est attribuée aux élongations symétriques et asymétriques des liaisons O-H . Pour autant, cette large bande n'est pas constituée uniquement de deux pics, même si l'on parle souvent de deux bandes aux environs de 3200 cm^{-1} et 3400 cm^{-1} . La complexité du spectre Raman de l'eau provient du fait que les liaisons O-H sont à la fois intra-moléculaires et inter-moléculaires. Les couplages inter-moléculaires au travers des liaisons hydrogène modifient les fréquences de vibrations des oscillateurs O-H . Il est généralement admis que plus les liaisons hydrogène sont fortes, plus le spectre est décalé vers les basses fréquences de vibration (Du *et al.*, 1994; Scatena *et al.*, 2001; McGuire, 2006; Da Silva, 2008). Certains environnements produisent une intensification des vibrations Raman autour de 3200 cm^{-1} , associée à de forts couplages inter-moléculaires au travers des liaisons hydrogène. L'eau liquide dite 'bulk' présente un spectre large qui est maximal à 3400 cm^{-1} . Dans tous les cas, les bandes sont larges et constituées de plusieurs raies superposées qui correspondent aux modes de vibration de l'eau liquide démultipliés par l'influence de la liaison hydrogène.

De nombreuses études se sont penchées sur l'eau aux interfaces, et en particulier aux interfaces eau/silice, eau/lipides ou eau/air. Il est admis qu'au niveau d'une interface, l'eau dite 'interfaciale' est davantage ordonnée. La technique privilégiée jusqu'à présent pour l'étude de l'eau interfaciale est la spectroscopie par génération de fréquence somme. Ce processus non-linéaire du second ordre permet en effet de s'affranchir de la contribution de l'eau isotrope 'bulk'². On retrouve le plus souvent, comme dans le cas de la glace, une intensification des vibrations autour 3200 cm^{-1} par

²Les règles de sélection pour les processus non-linéaires de rang pair stipulent en effet que ces processus sont interdits dans les milieux isotropes.

rapport aux vibrations à 3400 cm^{-1} dans l'eau aux interfaces silice/eau ou lipide/eau (Sovago *et al.*, 2009). Cette tendance a parfois été attribuée à une intensification des liaisons hydrogène. Cependant, certaines études montrent au contraire une diminution des liaisons hydrogène sur d'autres types d'interface : interfaces $\text{CCl}_4/\text{H}_2\text{O}$ ou Hexane/ H_2O (Scatena *et al.*, 2001). En réalité, il convient de distinguer les liaisons hydrogène reliant deux molécules d'eau liquide de celles qui peuvent être induites entre un monomère d'eau à proximité d'une interface comme la silice ou un lipide (Scatena *et al.*, 2001). Il se trouve que la formation d'une liaison hydrogène entre une molécule d'eau et un lipide va réduire la liaison hydrogène qui la liait à une autre molécule d'eau, le résultat spectral étant alors de recentrer la bande O-H de vibration vers 3500 cm^{-1} .

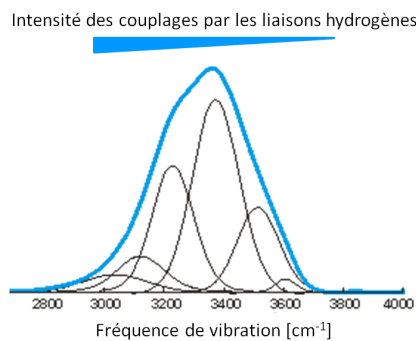


FIG. 5.12 : Spectre de l'eau liquide (ligne bleue). Les bandes tracées en noir sont un exemple de décomposition possible du spectre de l'eau en 6 bandes. Extrait de Da Silva (2008).

Une étude récente a permis de mettre en évidence l'eau interfaciale dans des vésicules multi-lamellaires (Cheng *et al.*, 2003) par microscopie CARS. L'utilisation de lasers polarisés a permis de mettre en évidence l'organisation de cette eau. Cette expérience est illustrée par la figure 5.13. L'image CARS à 3445 cm^{-1} en lumière polarisée montre que le signal est intense dans les régions où les liaisons O-H sont alignées avec la polarisation des lasers. Cette étude a par ailleurs mis en évidence que le spectre CARS de l'eau interfaciale (eau liée) présente des fréquences de résonance plutôt centrées à 3445 cm^{-1} , et presque pas de signal à 3200 cm^{-1} . Cette observation implique donc que les liaisons hydrogène de l'eau liée à ce type d'interface sont plutôt faibles entre deux molécules d'eau par rapport à celles de l'eau 'bulk'. C'est la seule étude à ma connaissance qui présente des données spectrales sur l'eau interfaciale dans un système multicouches lipide/eau.

Il est à noter qu'en présence d'un champ électrique intense, comme c'est le cas au niveau de la membrane des cellules, l'orientation des molécules d'eau (dipôle électrique) crée une anisotropie dans les couplages par liaisons hydrogène. Les liaisons hydrogène sont, à priori, en relatif, plus fortes dans la direction du champ électrique,

et plus relâchées dans la direction orthogonale (Alice, 2004).

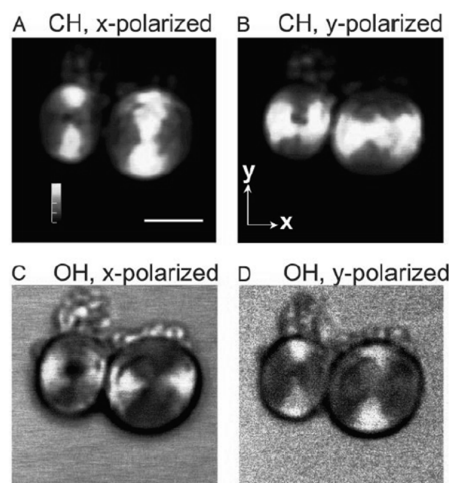


FIG. 5.13 : *Images CARS de vésicules multi-lamellaires de phosphatidylsérines. Les vibrations sondées sont 2845 cm^{-1} (images A et B) et 3445 cm^{-1} (images C et D). Les directions de polarisation pour les lasers Pompe et Stokes sont indiquées sur chaque image. Extrait de Cheng et al. (2003).*

5.2.4 Choix technologiques

L'objectif final consiste en l'observation, grâce au processus CARS, des modifications moléculaires induites par l'application d'impulsions électriques courtes et ultracourtes. Cet objectif a conduit aux choix technologiques ci-dessous.

Microscopie Nous avons choisi tout d'abord d'exploiter le processus CARS dans un microscope. En effet, la microscopie, par opposition à la simple analyse spectrale en cuve, conserve la spécificité spatiale de l'information. Pour toute modification moléculaire induite, il sera ainsi possible de corrélérer spatialement les changements observés à la répartition du champ électrique appliqué au niveau de la cellule.

Configuration plein champ La quasi totalité des microscopes CARS (commerciaux ou de laboratoire) fonctionnent à la manière d'un microscope confocal. Les faisceaux lasers sont fortement focalisés dans un très petit volume ($< 1\mu\text{m}^3$). L'acquisition d'une image sur une zone large se fait alors point par point, en balayant spatialement le volume de mesure par translation de l'échantillon. Certains groupes se sont penchés sur la possibilité de mettre en œuvre des configurations 'plein champ' qui permettent ainsi d'obtenir une image sur une zone large (quelques dizaines de

μm) en un seul tir laser (voir section 5.3). C'est cette approche que nous avons retenue, car elle permet l'acquisition d'une image en un tir laser et donc l'obtention d'une image de cellule pendant l'application d'une impulsion ultra-courte.

Lasers nanosecondes La majorité des montages CARS existant utilisent des lasers pico-secondes (parfois femto-secondes). Leurs hautes cadences de répétition, de l'ordre de la centaine de MHz, sont en effet avantageuses lorsqu'il est nécessaire de construire une image en balayant l'objet. Les hautes cadences permettent en effet dans ce cas d'accumuler suffisamment de signal dans un temps court pour que le temps de balayage de l'image reste raisonnable (quelques dizaines de secondes). A contrario, notre étude ne nécessite pas de hautes cadences dans la mesure où l'image doit être obtenue en un seul tir laser. Les cadences faibles deviennent préférables, puisqu'elles limitent l'énergie apportée par unité de temps tout en permettant d'utiliser une énergie importante pour chaque tir.

Les dommages potentiels qui peuvent être causés sur des cellules doivent être pris en compte dans le choix des lasers. Les dommages engendrés se classent en deux catégories : les dommages linéaires et les dommages non-linéaires (Fu *et al.*, 2006). Les dommages linéaires traduisent un échauffement. Ils sont proportionnels à la puissance moyenne des lasers d'excitation et peuvent être limités par l'utilisation d'une basse cadence des tirs lasers. Les seuils rapportés de dommage laser par échauffement dans une configuration fortement focalisée se situent autour de 10 mW (Fu *et al.*, 2006). Les dommages non linéaires en revanche traduisent des effets tels que l'absorption à plusieurs photons, l'ionisation, l'apparition de plasma etc ... (Voronin et Zheltikov, 2010). La dépendance vis à vis de la puissance laser moyenne est d'ordre supérieur à 1. De manière générale, ce type de dommage dépend fortement de la puissance crête. Afin de minimiser la puissance crête, il est donc judicieux d'utiliser des impulsions lasers suffisamment longues. Les lasers nanosecondes dont la durée est typiquement de l'ordre de 3 ns représentent de ce point de vue un choix bien adapté à la fois à la dynamique temporelle recherchée et à la réduction des dommages non-linéaires.

Enfin, les lasers doivent avoir une largeur spectrale adaptée à la largeur des bandes vibrationnelles que l'on souhaite sonder. Dans les liquides, les raies ont des largeurs typiquement comprises entre quelques cm^{-1} et 30 cm^{-1} . Dans les montages à balayage, les lasers picosecondes dont les largeurs spectrales se situent aux alentours du cm^{-1} sont souvent retenus, par opposition aux lasers femtosecondes dont les largeurs spectrales sont de plusieurs dizaines voire centaines de cm^{-1} . Nous avons ainsi choisi de travailler avec des lasers nanosecondes à colorant. Ces lasers peuvent travailler en bande fine ($\sim 0,01 \text{ cm}^{-1}$), ce qui est utile pour sonder les gaz mais aussi en bande large ($\sim 2 \text{ cm}^{-1}$), configuration plus adaptée au cas des lipides.

Le passage en bande large est effectué en ôtant le système de prisme expasseur de faisceau dans la cavité laser.

L'inconvénient de l'utilisation de ces lasers est qu'ils nécessitent un entretien important. De plus, leur énergie décroît à mesure que les colorants vieillissent, ce qui requiert de changer les colorants régulièrement (les molécules du colorant sont progressivement détruites).

Longueurs d'ondes Le choix des longueurs d'ondes est fortement sous contrainte. Tout d'abord, il est recommandé de manière générale, en imagerie d'objet biologique, d'utiliser des longueurs d'ondes d'excitation dans le proche infrarouge plutôt que dans le visible, afin de limiter le photo-damage lié à l'absorption (Zumbusch *et al.*, 1999). Par ailleurs, les longueurs d'ondes proche-infrarouge sont préférables aux longueurs d'ondes visibles car elles évitent d'exciter les transitions électroniques qui augmentent le fond non-résonant. En dehors de ces grandes règles générales, il est préférable de choisir des longueurs d'ondes pour lesquelles il existe des colorants laser performants. Enfin, le signal anti-Stokes doit si possible se situer dans l'optimum de sensibilité du détecteur, et être à une longueur d'onde pour laquelle il existe des filtres passe-bande performants.

Le choix finalement retenu a été le suivant: pour le laser Pompe, la longueur d'onde est fixée à $\lambda_P = 625,03 \text{ nm}$ ($\omega_P = 15\,999,3 \text{ cm}^{-1}$). Le colorant sélectionné est le DCM. Pour le laser Stokes, la longueur d'onde λ_S est balayée entre 750 nm et 798 nm ($\omega_S = 12\,578 - 16\,000 \text{ cm}^{-1}$). Le colorant utilisé est le LDS 765. La courbe de l'énergie en fonction de la longueur d'onde est tracée sur la figure 5.14. Cette dépendance énergétique du laser est à prendre en compte lors de la construction de spectres (section 5.5.2.3).

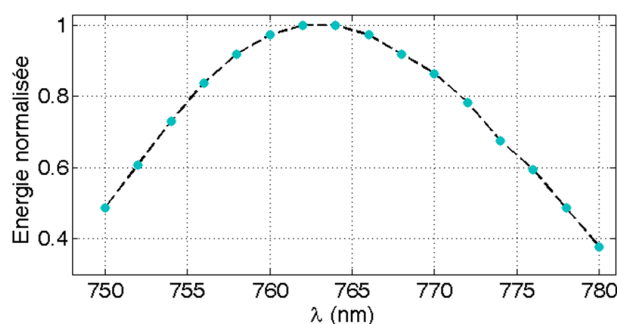


FIG. 5.14 : Courbe d'émission normalisée du colorant LDS 765. Les points expérimentaux sont indiqués par les marqueurs bleus.

L'ensemble des optiques (miroirs, lentilles, filtres) est choisi en accord avec ces

choix de longueurs d'onde. Dans cette configuration, les vibrations moléculaires d'intérêt majeur (listées dans le tableau 5.1) pourront être excitées à la résonance par nos lasers, hormis l'élongation anti-symétrique du groupement PO₂, qui nécessitera une modification du colorant du laser Stokes ainsi que de certains filtres.

TAB. 5.1 : *Calcul des longueurs d'ondes Stokes requises et des longueurs d'ondes anti-Stokes émises pour l'imagerie CARS des principales vibrations d'intérêt. La longueur d'onde du faisceau Pompe est fixée à 625 nm.*

Vibration	Vibration (cm ⁻¹)	$\lambda_{Stokes}(nm)$	$\lambda_{Anti-Stokes}(nm)$
C_H élong. sym (PS, cycle)	3054	772,4	524,8
C_H élong. sym. (lipides)	2847	760,3	530,6
C_H élong a-sym. (lipides)	2890	762,8	529,4
O_H	3200	781,3	520,8
O_H	3400	793,7	515,4
P_O ₂ élong. a-sym.	1200	675,7	581,4

5.3 Les configurations existantes

Différents groupes travaillent sur la possibilité d'obtenir des images CARS en microscopie plein champ. Deux stratégies très différentes ont été abordées. La première utilise une configuration optique dans laquelle l'accord de vecteurs d'ondes est vérifié (Heinrich *et al.*, 2006, 2008a,b). La surface imagée est typiquement de l'ordre de 50 μm de diamètre. La géométrie d'illumination est illustrée sur la figure 5.15. Les lasers sont des lasers nanosecondes, un Nd-YAG (1064 cm⁻¹) pour le faisceau Stokes (3 ns, 0,03 cm⁻¹) et un OPO accordable pour le faisceau Pompe (3 ns, 5 cm⁻¹). Les deux faisceaux sont amenés par des fibres optiques multi-modes afin de garantir une illumination homogène de l'échantillon grâce au brouillage de mode. Le faisceau Pompe est amené sur l'échantillon au moyen d'un condenseur 'dark-field', ce qui permet de générer au point focal des vecteurs d'onde en incidence rasante par rapport à l'axe du microscope (axe Oz). Le fond non-résonant est limité car il n'est créé que dans le volume dans lequel l'accord de vecteur d'onde est vérifié, soit environ 5 μm de profondeur sur l'axe Oz d'après les auteurs.

Ce dispositif a été employé pour fournir une image des gouttelettes d'huile ainsi que des liposomes dans des adipocytes (Heinrich *et al.*, 2008b). La bonne résolution spectrale (5 cm⁻¹) permet d'identifier les acides gras saturés des non-saturés en utilisant le ratio 3015 cm⁻¹/2850 cm⁻¹. Malgré le bon ratio signal à bruit du dispositif, l'obtention de données quantitatives nécessite la plupart du temps l'accumulation d'une centaine d'images.

La seconde approche utilise une stratégie différente, qui consiste au contraire à ne

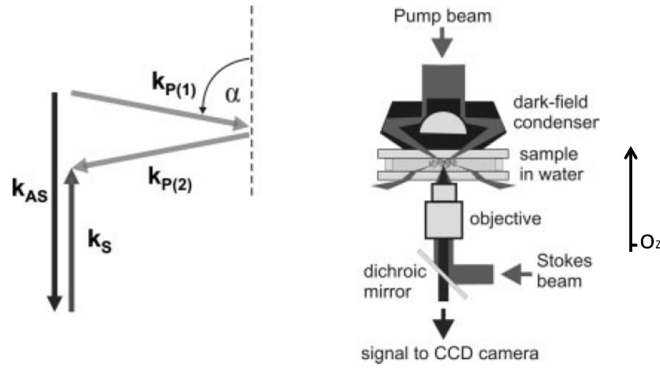


FIG. 5.15 : Géométrie d'illumination proposée dans Heinrich *et al.* (2006)

pas respecter volontairement l'accord de phase. Différentes configurations optiques ont été testées, dans lesquelles les faisceaux Pompe et Stokes sont quasi-colinéaires (l'ensemble des configurations est rassemblé dans Toytman *et al.* (2009)). Dans cette approche, la création de signal repose sur la diffusion et la réfraction des lumières lasers incidentes par les objets à imager. En l'absence de diffuseur, les faisceaux Stokes et Pompe traversent le milieu (air ou eau) sans générer de signal CARS. En présence d'un diffuseur de lumière, une partie des photons est déviée et l'accord de vecteur d'onde peut se faire. La réfraction par les objets joue également un rôle essentiel dans le processus de phase matching (Lei *et al.*, 2011). C'est donc uniquement au niveau des objets que le signal se crée et pas dans le milieu qui l'entoure. En particulier, lors de l'imagerie d'objets biologiques en milieu aqueux, il est possible de réduire efficacement le fond non-résonant provenant de l'eau. Cette approche a été implémentée avec des lasers picosecondes. Des images de billes de polystyrène de $3\mu\text{m}$ ont pu être obtenues avec un bon contraste dans l'air en un seul tir laser de 1 ps (Toytman *et al.*, 2009). De plus, le fond non-résonant de l'eau est efficacement supprimé (Toytman *et al.*, 2009; Lei *et al.*, 2011). Cette approche s'est par ailleurs révélée exploitable sur un tissu en coupe (Toytman *et al.*, 2009) et sur un embryon de *C. elegans* (Lei *et al.*, 2011).

Dans notre étude, nous souhaitons utiliser les images CARS pour explorer les effets des impulsions électriques sur des cellules vivantes. Il est donc indispensable de s'affranchir au maximum du fond non-résonant de l'eau. De ce point de vue, les deux approches apparaissent comme équivalentes, bien que la configuration phase-matchée soit plus complexe à implémenter. Nous avons exposé dans la section 5.2.3 l'intérêt que nous portons à l'eau, et en particulier à l'eau interfaciale. Afin de pouvoir sonder les vibrations de l'eau de la cellule, il est donc important de ne pas créer de signal dans l'eau 'bulk'. La seconde approche non phase-matchée apparaît

de ce point de vue plus avantageuse, puisqu'elle favorise la possibilité d'observer l'eau interfaciale d'une cellule.

5.4 Configuration optique

5.4.1 Première configuration

Nous avons repris dans un premier temps la géométrie d'illumination proposée dans Toytman *et al.* (2009) représentée sur la figure 5.16. L'ensemble du montage est construit sur la base d'un microscope inversé (Axiovert 200 inverted, Zeiss) Les deux faisceaux Pompe et Stokes sont focalisés sur l'objet au moyen de deux lentilles de grande focale. Les zones d'illumination ont des profils d'énergie gaussiens au niveau du foyer. Leurs surfaces évaluées à mi-hauteur sur la tâche d'énergie observée sur la caméra, sont de $6,6 \cdot 10^4 \mu\text{m}^2$ pour le Pompe et $6,8 \cdot 10^4 \mu\text{m}^2$ pour le Stokes. L'angle entre les deux faisceaux est d'environ 8° et l'accord de vecteur d'onde n'est donc pas respecté ($|\Delta\vec{k}| \neq 0$). De plus, les faisceaux sont fortement inclinés par rapport à la direction de collection (environ 70°), ce qui permet aux faisceaux d'échapper à l'objectif de collection (à condition de choisir une ouverture numérique *ad hoc*). En effet, les énergies importantes qui sont nécessaires dans cette configuration pour produire un signal intense peuvent détériorer les optiques lorsque les faisceaux sont trop focalisés à l'intérieur d'un objectif de microscope.

Le signal anti-Stokes est collecté au moyen d'objectifs standards (Zeiss, ref 420650 9901, 20x NA 0.8, ref 422472 9960, 50x NA 0.55). Le signal est collecté sur une caméra CCD intensifiée et refroidie (Roper, PIMAX 3, 1024×1024 pixels). Des filtres passe-bandes à fort taux de réjection (ref FF01-534/42, Semrock et ref FF01-750, Semrock) sont placés dans les emplacements habituels des filtres. Les filtres sont amovibles, ce qui permet, si nécessaire, de les ôter pour visualiser les faisceaux Pompe et Stokes et faire l'alignement initial.

5.4.2 Observation de billes de polystyrène

Sur la figure 5.17, on observe deux images de billes de polystyrène de $3 \mu\text{m}$ dans l'air. La première image (A) est obtenue avec une illumination en lumière blanche diffuse. La seconde (B) est une image CARS obtenue en excitant la vibration C_H du cycle aromatique ($\omega = 3054 \text{cm}^{-1}$). Cette image est le cumul de 25 tirs lasers. Les billes produisent un signal anti-Stokes important, tandis que les zones autour des billes sont très sombres. L'énergie de chaque impulsion laser est de $220 \mu\text{J}$ pour le Pompe et $340 \mu\text{J}$ pour le Stokes. Nous avons donc vérifié que cette configuration permet bien de générer un signal anti-Stokes sur les objets diffusant la lumière, en accord avec les publications précédemment citées (Toytman *et al.*, 2007, 2009).

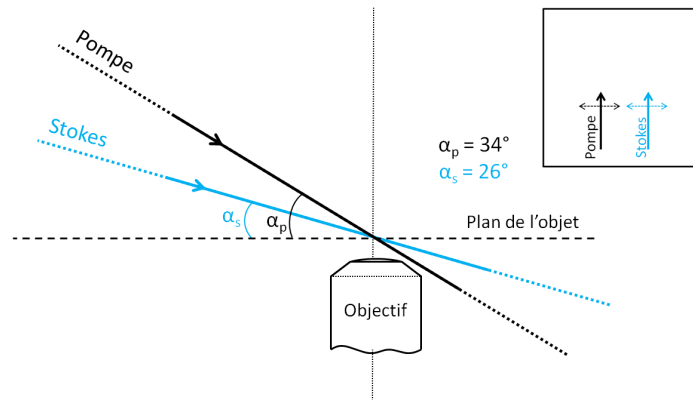


FIG. 5.16 : Schéma de principe de la configuration optique. L'encart représente la projection des faisceaux Pompe et Stokes dans le plan des images telles qu'elles apparaissent à la caméra. Les flèches pointillées schématisent les directions de polarisation.

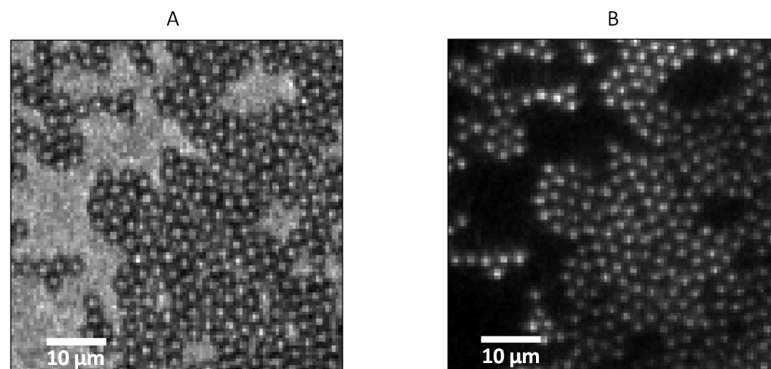


FIG. 5.17 : Images de billes de polystyrène de $3\ \mu\text{m}$ dans l'air (objectif $\times 20$). A- Image en lumière blanche et B-Image CARS obtenue en cumulant 25 tirs lasers ($\omega = 3054\text{cm}^{-1}$)

Dans la mesure où la création de signal anti-Stokes requiert la diffusion des lasers Stokes et Pompe, un objet qui ne diffuse pas la lumière de façon homogène ne pourra pas être imagé dans son ensemble. C'est ce qu'illustre la figure 5.18, sur laquelle sont présentées quatre images de billes de polystyrène de $15\ \mu\text{m}$ de diamètre, immergées dans l'eau et visualisées avec différents éclairages. L'image A est obtenue avec un éclairage en lumière blanche diffuse. Les images B et C sont obtenues en éclairant respectivement les billes avec les faisceaux lasers Pompe et Stokes. Il apparaît que sur un objet opaque de $15\ \mu\text{m}$, la diffusion de la lumière laser ne s'effectue pas du

tout de façon homogène. En conséquence, seule une calotte de la bille est visible. Par conséquent, le signal CARS n'est pas créé de façon homogène sur l'ensemble de la bille. En pratique, les images obtenues par la diffusion des faisceaux Stokes et Pompe sur l'objet nous permettent d'anticiper les zones susceptibles de créer du signal anti-Stokes. On peut cependant noter que bien que les billes soient immergées dans l'eau, l'image CARS apparaît avec un très bon contraste. Cette configuration permet donc bien de s'affranchir de la quasi-totalité du fond non-résonnant de l'eau comme nous le souhaitions.

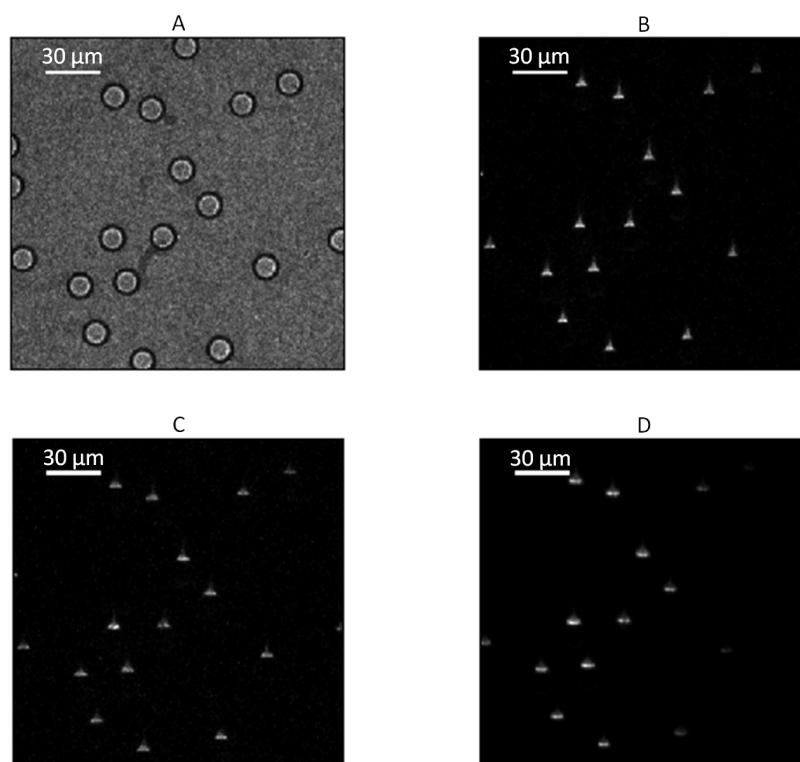


FIG. 5.18 : *Billes de polystyrène de $15\mu\text{m}$ observées avec un objectif $x20$, A- en lumière blanche, B- éclairées par le faisceau Pompe, C-éclairées par le faisceau Stokes, D-en CARS ($\omega = 3054\text{cm}^{-1}$).*

5.4.3 Limite de la configuration

Le problème majeur de cette configuration est qu'elle nécessite que l'objet réfracte ou diffuse les faisceaux incidents avec de grands angles. En effet, seuls les photons Stokes et Pompe dont la direction coïncide avec la direction de collection peuvent générer un signal anti-Stokes qui puisse être collecté par l'objectif du microscope.

Les objets transparents tels que les cellules diffusent peu la lumière. Lorsque le faisceau d'illumination est fortement incliné par rapport à la direction de collection, les cellules ne sont pas visibles, puisque la diffusion Rayleigh se fait peu. Afin d'obtenir un signal CARS sur cellules, la configuration optique du microscope a donc été modifiée ³. La modification a consisté à redresser les faisceaux Pompe et Stokes afin que leur directions soient presque colinéaires avec l'axe de la collection. Dans cette configuration, la diffusion aux petits angles qui a lieu sur les objets transparents tels que les cellules suffit à générer un signal anti-Stokes dans la direction de collection du signal, c'est à dire selon l'axe vertical.

5.5 Configuration finale

5.5.1 Description de la configuration

Dans cette configuration, le faisceau Pompe est colinéaire à l'axe du microscope (axe Oz). Il est focalisé sur l'objet au moyen d'une lentille de 750 mm de distance focale. Le faisceau Stokes est incliné par rapport à l'axe du microscope d'un angle α_S voisin de 7° . Le faisceau est focalisé au moyen d'une lentille de 500 mm de distance focale. Les deux faisceaux Pompe et Stokes sont filtrés spatialement au moyen de diaphragmes placés en amont des lentilles de focalisation, de diamètres respectifs 0,8 mm et 1,5 mm. Les deux faisceaux forment des tâches d'illumination dans le plan de l'objet (plan focal de l'objectif de collection) dont la répartition en énergie est gaussienne. Les surfaces d'illumination, évaluées à mi-hauteur en énergie, sont de $4,7 \cdot 10^4 \mu\text{m}^2$ pour le faisceau Pompe et de $4,3 \cdot 10^4 \mu\text{m}^2$ pour le faisceau Stokes. Il est donc possible d'observer plusieurs cellules dans le même champ d'observation.

L'angle α_S a été choisi à 7° afin d'optimiser le rapport signal à bruit. Lorsque cet angle est trop important (nous avons testé $\alpha_S = 20^\circ$), aucun signal n'est créé sur les objets. Au contraire, lorsque le faisceau Stokes est trop rapproché du faisceau Pompe ($\alpha_S = 4^\circ$), un intense fond non-résonnant est créé dans la lamelle de verre sous l'objet.

La collection n'est pas modifiée hormis par l'ajout d'un filtre passe-bande supplémentaire (ref FF01-534/42, Semrock) inséré entre l'échantillon à imager et l'objectif, afin d'atténuer l'énergie des lasers (d'un facteur 10^4) avant qu'ils n'atteignent l'objectif. L'ajout de ce filtre introduit des contraintes supplémentaires sur la distance de travail des objectifs de collection. A l'heure actuelle, seul l'objectif $\times 50$ (distance de travail : 9 mm) a pu être utilisé, car l'épaisseur des filtres disponibles commercialement est de 1 mm. Son ouverture numérique étant de 0,55, il présente une mauvaise résolution latérale et axiale. Quelques essais ont été faits

³L'analyse des propriétés de cette première configuration n'a donc pas été plus approfondie.

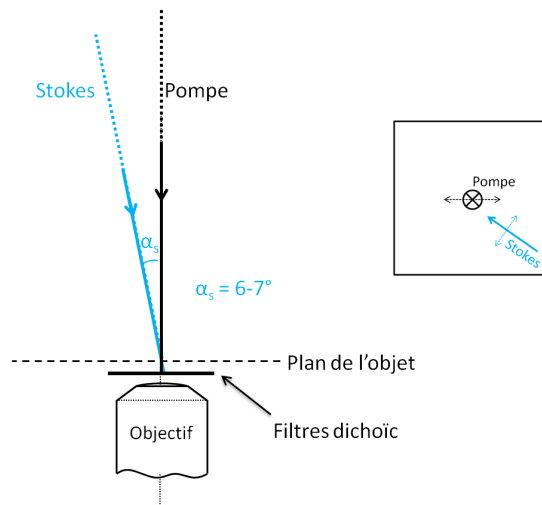


FIG. 5.19 : Schéma de principe de la configuration optique. L'encart représente la projection des faisceaux Pompe et Stokes dans le plan des images telles qu'elles apparaissent à la caméra. Les flèches pointillées schématisent les directions de polarisation.

avec d'autres objectifs, mais en modérant les énergies lasers au détriment du signal. Afin de contourner cette difficulté technique, nous avons fait usiner sur commande des filtres d'épaisseur $500\ \mu\text{m}$. Ils permettront par la suite de travailler avec une plus grande gamme d'objectifs.

Dans cette configuration, il est possible d'observer par diffusion Rayleigh les cellules lorsqu'elles sont illuminées par les lasers Pompe et Stokes (figure 5.20). Ainsi, la condition de diffusion requise pour générer un signal anti-Stokes est bien remplie. Il est à noter que l'observation des cellules par diffusion Rayleigh nécessite des énergies extrêmement faibles, c'est à dire typiquement de l'ordre du μJ . Grâce à la sensibilité du détecteur et à la porte temporelle de la caméra, une image de cellule en diffusion Rayleigh peut être obtenue en un seul tir laser (soit une durée typiquement de l'ordre de 3 ns). Cette possibilité supplémentaire du montage sera exploitée, en complément des images CARS, pour observer, grâce aux images Rayleigh, les éventuelles déformations mécaniques pendant l'application d'impulsions de 10 ns.

Le tableau 5.2 indique les énergies utilisées couramment dans cette configuration ainsi que les puissances, les densités d'énergie crête et les densités de puissance associées. Les énergies des lasers Pompe et Stokes sont ajustées au moyen de filtres neutres NG insérés sur le trajet des lasers. On peut remarquer que bien que les

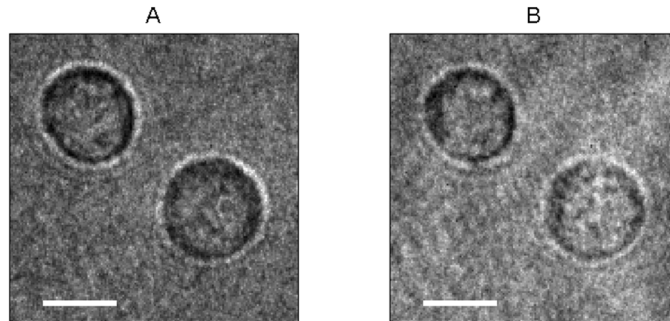


FIG. 5.20 : *Visualisation par diffusion Rayleigh de cellules. L'illumination est réalisée avec A- le laser Pompe ou B- le laser Stokes. Chaque image est obtenue en un seul tir laser.*

énergies soient élevées (de l'ordre du mJ pour le Pompe et de $300 \mu\text{J}$ pour le Stokes), les puissances moyennes restent relativement faibles, de l'ordre de la dizaine de mW, dans la mesure où la cadence des lasers est basse. De plus, il est important de souligner que la majeure partie de cette puissance n'est pratiquement pas absorbée par l'échantillon.

TAB. 5.2 : *Energies utilisées pour l'obtention d'images*

	Pompe (625 nm)	Stokes (770 nm)
Energie	1 mJ	0,3 mJ
Surface	$4,7 \cdot 10^4 \mu\text{m}^2$	$4,3 \cdot 10^4 \mu\text{m}^2$
Densité d'énergie	$2,1 \text{ J.cm}^2$	$0,7 \text{ J.cm}^2$
Durée du pulse	4 ns	3 ns
Puissance crête	$0,25 \text{ MJ.s}^{-1}$	$0,1 \text{ MJ.s}^{-1}$
Densité crête	$532 \text{ MJ.s}^{-1} \cdot \text{cm}^{-2}$	$230 \text{ MJ.s}^{-1} \cdot \text{cm}^{-2}$
Fréquence de répétition	10 Hz	10 Hz
Puissance moyenne	10 mW	3 mW
Densité moyenne	21 W.cm^{-2}	7 W.cm^{-2}

5.5.2 Validation sur billes de polystyrène

5.5.2.1 Images de billes

Cette nouvelle configuration permet également d'obtenir un signal anti-Stokes. La figure 5.21 présente deux images de billes de polystyrène de $3 \mu\text{m}$ dans l'air, observées

avec l'objectif $\times 20$. La première est une image obtenue en illuminant les billes en lumière blanche, et la seconde en CARS en accumulant 100 tirs lasers. La fréquence de vibration sondée est l'élongation symétrique des C-H du cycle aromatique, soit $\omega = 3050 \text{ cm}^{-1}$. A nouveau, on distingue bien les billes de polystyrène.

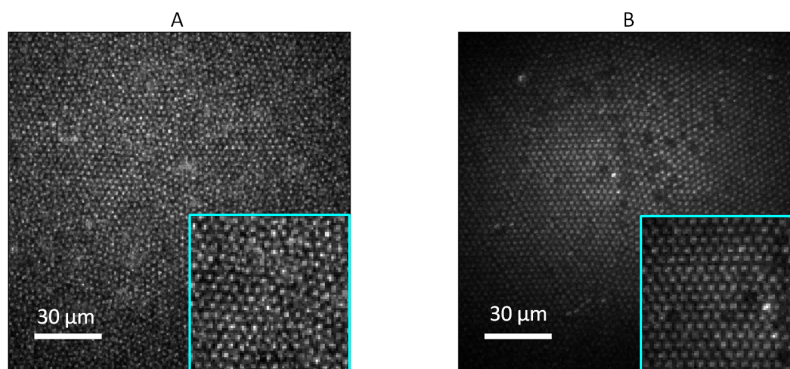


FIG. 5.21 : Images de billes de polystyrène de $3 \mu\text{m}$ dans l'air (objectif $\times 20$). A- Image en lumière blanche et B- Image CARS à 3054 cm^{-1} obtenue en accumulant 100 tirs lasers. Les énergies sont de $250 \mu\text{J}$ pour le Stokes et $115 \mu\text{J}$ pour le Pompe.

Comme dans la configuration précédente, le signal CARS sur billes de $15 \mu\text{m}$ n'est pas homogène sur l'ensemble de la bille. Il est particulièrement intense sur le fond de la bille, au niveau du contact avec la lame, là où la diffusion est efficace (voir figure 5.22).

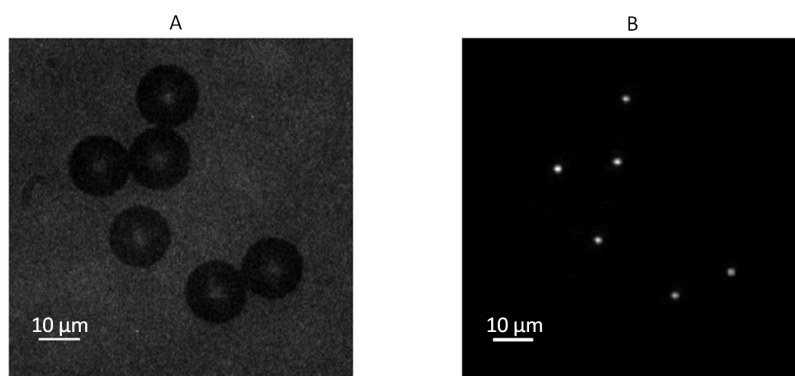


FIG. 5.22 : Images de billes de polystyrène de $15 \mu\text{m}$ immergées dans l'eau (objectif $\times 50$). A- Image en lumière blanche et B- Image CARS à 3054 cm^{-1} obtenue en accumulant 50 tirs lasers. Les énergies sont de $275 \mu\text{J}$ pour le Stokes et 1 mJ pour le Pompe.

Une image CARS acquise avec un seul tir laser est présentée sur la figure

5.23-A. Dans cet exemple, les billes sont à nouveau immergées dans l'eau. Le profil d'intensité de la ligne en pointillé est tracé sur la figure 5.23-B. Le rapport signal à bruit évalué d'après ce profil est de 140:1.

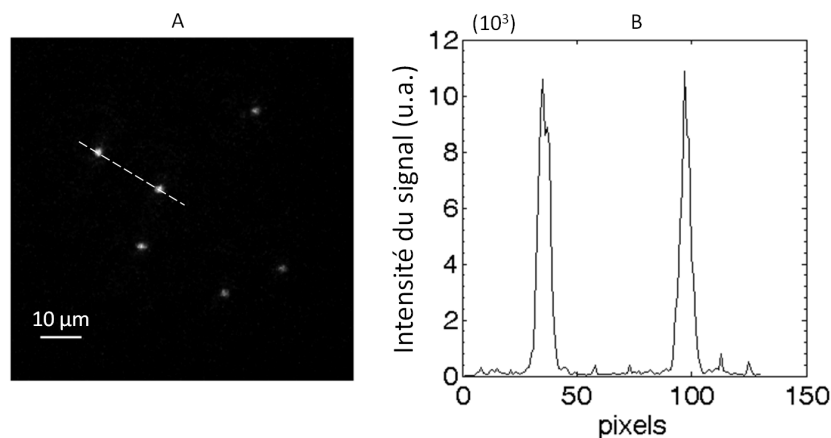


FIG. 5.23 : A- Image CARS à 3054 cm^{-1} obtenue en un seul tir laser sur billes de polystyrène de $15\text{ }\mu\text{m}$ immergées dans l'eau (objectif $\times 50$). Les énergies sont de $275\text{ }\mu\text{J}$ pour le Stokes et 1 mJ pour le Pompe. B- profil d'intensité le long de la ligne pointillée tracée sur l'image A (le niveau de signal du fond de l'image est 70 a.u.)

5.5.2.2 Dépendance énergétique

Des images de billes de diamètre $15\text{ }\mu\text{m}$ dans de l'eau ont été obtenues pour différentes énergies Pompe et Stokes. Chaque image est réalisée par le moyennage de 100 tirs. Les résultats sont présentés sur la figure 5.24. L'intensité est calculée en moyennant l'intensité sur l'ensemble des 1024×1024 pixels de la caméra. On retrouve le fait que l'intensité du signal créé est proportionnelle au carré de l'énergie du faisceau Pompe et proportionnelle à l'énergie du faisceau Stokes. La même analyse a été conduite en ne prenant que des pixels au niveau d'une bille ou que des pixels en dehors d'une bille. La même dépendance se retrouve, ce qui indique que la quasi totalité du signal collecté correspond à un signal CARS, résonant ou non-résonant.

Le profil d'intensité des faisceaux lasers étant gaussien, il en résulte une inhomogénéité de l'illumination. L'image de la figure 5.25-A est une image CARS sur laquelle on observe une quinzaine de billes. Il apparaît clairement que les billes au centre de l'image, et donc au centre des faisceaux lasers produisent un

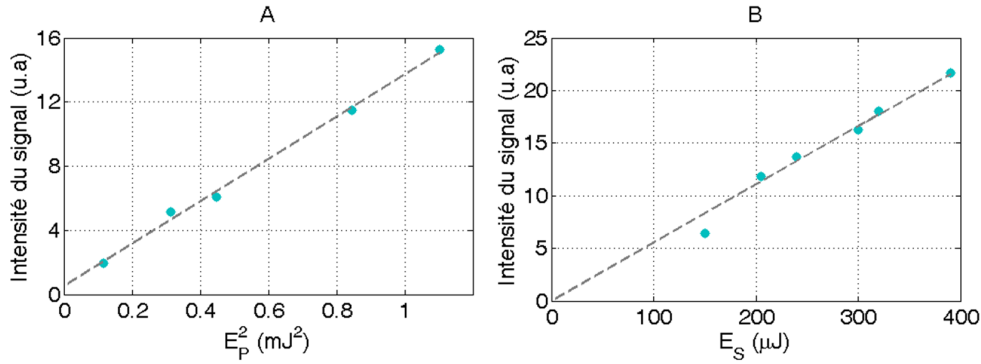


FIG. 5.24 : *Intensité du signal en fonction du carré de A- l'énergie du faisceau Pompe et B- l'énergie du faisceau Stokes. Les points bleus correspondent aux mesures et les lignes en pointillés à l'ajustement par une droite.*

signal plus intense. Pour quatre billes, l'intensité du signal mesurée a été tracée en fonction de $E_p^2 E_s$. Chaque point correspond à la moyenne de 100 tirs lasers. La valeur de l'intensité est obtenue en moyennant le signal sur une aire de 20×20 pixels centrée sur une bille. La dépendance du niveau de signal en fonction de $E_p^2 E_s$ est linéaire pour les quatre billes choisies, mais la pente est différente en fonction de la position de la bille. Il est à noter que l'inhomogénéité d'illumination n'est pas une véritable contrainte dans notre application, puisque l'information recherchée est la différence de signal que l'on obtient à différentes fréquences de vibration, avec et sans impulsion électrique. La fluctuation tir à tir en revanche est plus contraignante. Pour les plus hautes énergies d'illumination ($E_p^2 E_s = 0.046 mJ^3$), les signaux obtenus pour 100 images individuelles (un seul tir laser) sont représentés sur la figure 5.25-B. La moyenne des 100 tirs est indiquée par un tiret horizontal. La dispersion des points met en évidence une grande fluctuation de tir à tir. Les écarts-types du signal obtenu sur chacune des quatre billes considérées dans la figure 5.25 sont présentés dans le tableau 5.3. L'écart-type est de l'ordre de 28%.

TAB. 5.3 : *Niveaux de signal et écarts-types sur 4 billes.*

	Signal (u.a.)	Ecart-type (u.a.)	Ecart-type (%)
Bille 1	6000	1750	29%
Bille 2	4860	1330	27%
Bille 3	4800	1370	28%
Bille 4	2900	810	28%

L'intensité des lasers varie de tir à tir, ce qui explique en partie la fluctuation

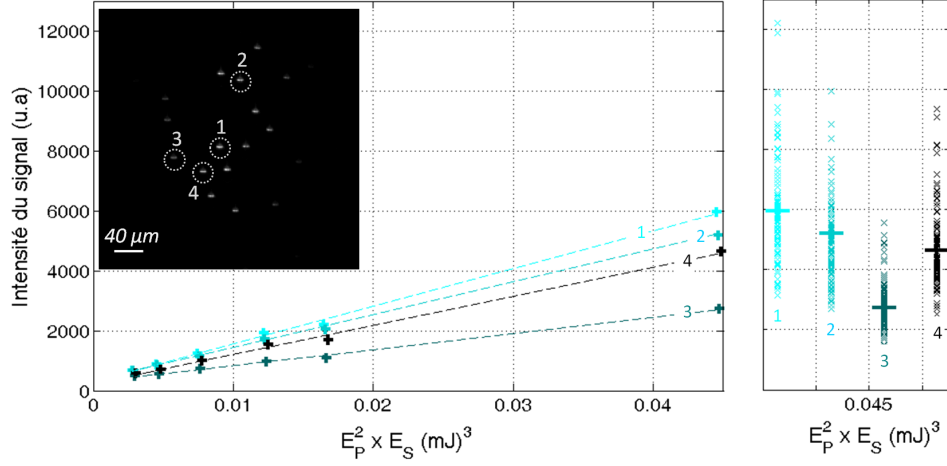


FIG. 5.25 : *A- Dispersion de l'intensité du signal en fonction de la position de l'objet dans le champ d'illumination. L'intensité du signal sur les quatre billes indiquées dans la figure est tracée en fonction de $E_p^2 E_s$. Les mesures (+) sont les moyennes obtenues sur 100 images. B- Dispersion tir à tir de l'intensité du signal pour des énergies laser fixées. Chaque point de mesure (x) correspond à une image en un seul tir laser. La moyenne sur 100 tirs pour chaque objet est indiquée par un symbole (+).*

du signal CARS. Il est possible d'avoir une image de l'énergie des impulsions lasers en plaçant une photo-diode dans les boîtes des lasers. Pour chaque laser, la photo-diode capte une réflexion parasite et ne coupe donc pas le faisceau principal, ce qui permet d'avoir les énergies des faisceaux en même temps que l'on fait l'acquisition des images CARS. Les mesures des photodiodes donnent une fluctuation tir à tir de 6% pour le faisceau Pompe et de 7% pour le faisceau Stokes. De par la dépendance énergétique, ces fluctuations sont amplifiées au cube sur le signal CARS. Le tracé du signal CARS en fonction de $E_p^2 E_s$ pour des images mono-coup ne permet cependant pas de retrouver une dépendance linéaire. La fluctuation tir à tir du signal est en effet aussi due aux fluctuations spatiales des lasers, phénomène connu des lasers nanosecondes. Cette fluctuation nécessitera donc de multiplier les acquisitions mono-tirs pour ainsi établir une évolution quantitative des variations de signal avec les impulsions électriques.

5.5.2.3 Information spectrale

La spécificité du signal CARS, et en particulier la contribution du fond non-résonant, nécessite d'effectuer une analyse spectrale. La figure 5.26 représente un spectre acquis sur des billes de polystyrène. Chaque point du spectre est obtenu à partir

d'une accumulation de 50 tirs lasers. La valeur de l'intensité correspond à la moyenne du signal mesuré sur 20×20 pixels centrés sur la bille considérée.

Dans le spectre, le pic intense à 3054 cm^{-1} est caractéristique des vibrations C-H du cycle aromatique (Lin-Vien *et al.*, 1991). Ce pic est suivi d'un creux typique des spectres CARS et de l'interaction complexe entre le signal résonant et le fond non-résonant (voir section 5.1.6). Les pics observés à 2850 cm^{-1} et 2904 cm^{-1} correspondent par ailleurs probablement aux stretchings symétriques et asymétriques des liaisons C-H des groupements méthylène CH_2 . Ils sont en effet proches des vibrations des groupements CH_2 des lipides à 2847 cm^{-1} et 2882 cm^{-1} . La structure fine du cycle benzénique et en particulier les vibrations à $3035, 3051$ et 3061 cm^{-1} (Lin-Vien *et al.*, 1991; Chimento *et al.*, 2009) ne sont pas résolues, et des pics secondaires à 2996 et 3020 cm^{-1} se superposent au pic principal à 3054 cm^{-1} .

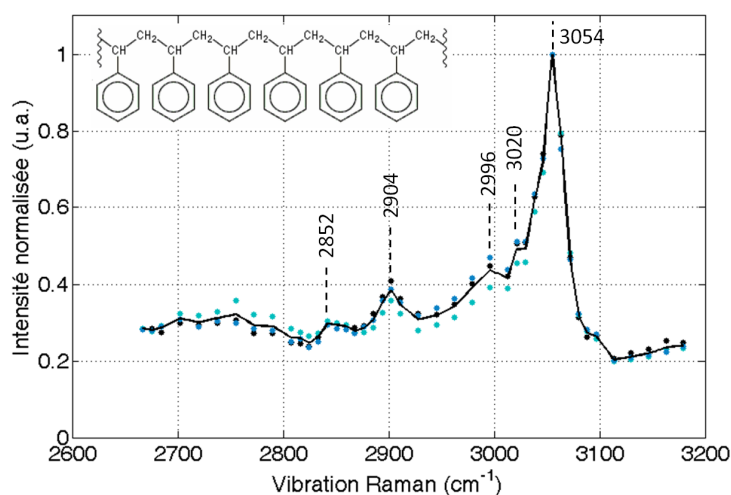


FIG. 5.26 : Spectre CARS obtenu sur des billes de polystyrène de $15 \mu\text{m}$ immergées dans l'eau. Chaque point de mesure (*) est une moyenne de 50 images. La ligne indique le spectre moyen. Les énergies Pompe et Stokes sont respectivement 1 mJ et $280 \mu\text{J}$.

Dans le but d'observer le signal des vibrations de l'eau (c'est à dire les élongations O-H), un spectre a été acquis sur une plus large gamme de fréquences en utilisant toujours comme objet de référence les billes de polystyrène. Les fréquences de vibrations sont balayées de 2700 cm^{-1} à 3500 cm^{-1} . Le spectre est présenté sur la figure 5.27. Afin de faire ressortir les bandes de vibrations de l'eau, les énergies lasers ont été augmentées. Il en résulte une déformation des bandes du polystyrène et notamment une saturation de la bande du cycle aromatique. En plus des bandes associées aux vibrations du polystyrène, il apparaît sur le

spectre deux bandes supplémentaires attribuables à l'eau. Ces bandes, centrées à 3245 cm^{-1} et 3420 cm^{-1} , sont larges et correspondent respectivement aux couplages inter-moléculaires forts et faibles entre deux molécules d'eau. Il est donc possible d'aller sonder les vibrations des molécules d'eau avec notre dispositif CARS.

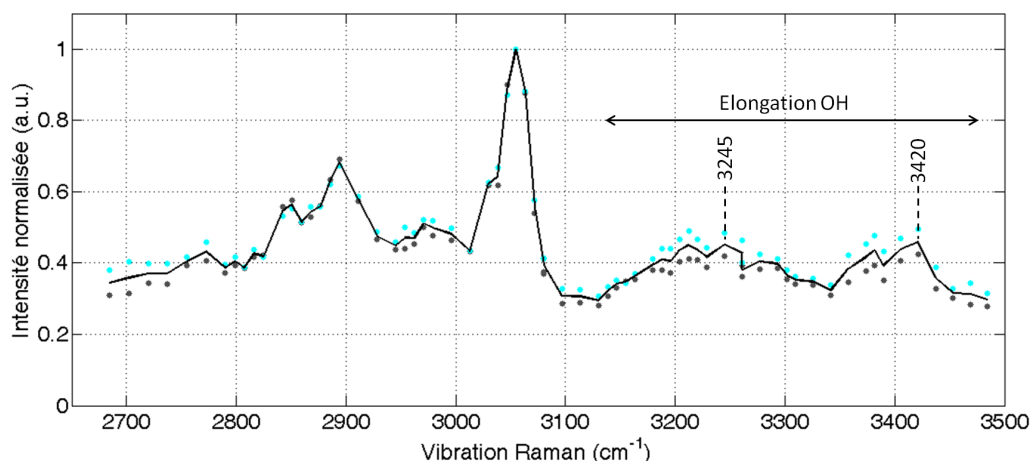


FIG. 5.27 : Spectre CARS obtenu sur des billes de polystyrène de $15\text{ }\mu\text{m}$ immergées dans l'eau. Chaque point de mesure (●) est une moyenne de 50 images. La ligne indique le spectre moyen. Les énergies Pompe et Stokes sont respectivement $1,2\text{ mJ}$ et $390\text{ }\mu\text{J}$.

Nous avons voulu vérifier la robustesse et surtout la spécificité des spectres. Pour cela, deux spectres ont été construits, en moyennant les spectres sur une zone de 20×20 pixels autour d'une bille ou dans une zone sans billes, c'est à dire ne contenant que de l'eau. Les deux zones choisies pour construire ces spectres de référence sont indiquées par des carrés sur l'image en lumière blanche (figure 5.28-C). Les spectres sont tracés sur les figures 5.28-A et 5.28-B. Pour l'ensemble de la zone considérée, le coefficient de corrélation entre chaque pixel et le spectre du polystyrène est calculé. La représentation de la valeur du coefficient de corrélation est la figure 5.28-C. Afin de faire ressortir visuellement les valeurs élevées du coefficient de corrélation, les valeurs ont pour seuil 0,4. La même procédure est appliquée pour le spectre en dehors des billes (dit spectre de l'eau) et le résultat est présenté sur la figure 5.28-E.

Il apparaît que le coefficient de corrélation avec le spectre du polystyrène n'est élevé que sur les zones qui correspondent au centre des billes, là où un signal intense est généré. De plus, les trois billes présentent bien la même signature spectrale. L'observation du spectre obtenu en dehors des billes présente une large bande qui s'étend de 3200 cm^{-1} à 3500 cm^{-1} , caractéristique de la signature des vibrations

O-H de l'eau. Ainsi, le signal résiduel dans cette zone est constitué en partie d'un signal anti-Stokes de l'eau. Son niveau est extrêmement faible puisque la configuration optique défavorise volontairement la création de signal dans le milieu environnant les objets mais il est néanmoins résonant dans la bande de O-H. Les deux autres bandes moins intenses n'ont pas été attribuées. Ce signal résiduel de l'eau pourra être exploité pour observer l'orientation de l'eau liquide soumise à des impulsions nanosecondes.

5.6 Imagerie CARS des cellules

5.6.1 Aspect des images

Des images CARS obtenues sur des cellules avec l'objectif $\times 50$ sont présentées sur la figure 5.29. La vibration sondée est l'élongation symétrique des liaisons C-H, soit $\omega = 2847 \text{ cm}^{-1}$. L'image A est acquise en lumière blanche, l'image B en CARS en cumulant 50 tirs lasers, et l'image C en CARS avec un seul tir laser. Les énergies utilisées sont de 1 mJ pour le Pompe et de $420 \mu\text{J}$ pour le Stokes, énergies qui à priori n'endommagent pas les cellules (voir section 5.7). Sur ces images, on voit particulièrement ressortir le fond des cellules en contact avec la lame de verre, là où la diffusion est importante. La mauvaise résolution intrinsèque de l'objectif ne permet pas d'obtenir une bonne cartographie de la cellule.

Les profils d'intensité obtenus sur les lignes pointillées des images B et C sont tracés sur les images D et E. Les ratios signal à bruit évalués d'après ces profils sont respectivement de 100:1 et 30:1. Ce dernier rapport montre la très bonne détectivité du dispositif même en tir unique.

5.6.2 Vers une meilleure résolution spatiale

Les images de la figure 5.30 sont des images de cellules obtenues avec l'objectif $\times 63$. L'image A est une image en lumière blanche et l'image B en CARS ($\omega = 2847 \text{ cm}^{-1}$) en cumulant 100 tirs lasers. Les énergies sont maintenues à un niveau relativement bas afin de ne pas endommager l'objectif, soit $230 \mu\text{J}$ pour le Pompe et $150 \mu\text{J}$ pour le Stokes. L'utilisation de cet objectif à plus grande ouverture numérique permet de gagner en résolution latérale et surtout en résolution axiale. En conséquence, le signal CARS n'est pas intégré sur une grande profondeur, et on distingue donc bien un anneau, caractéristique de la membrane.

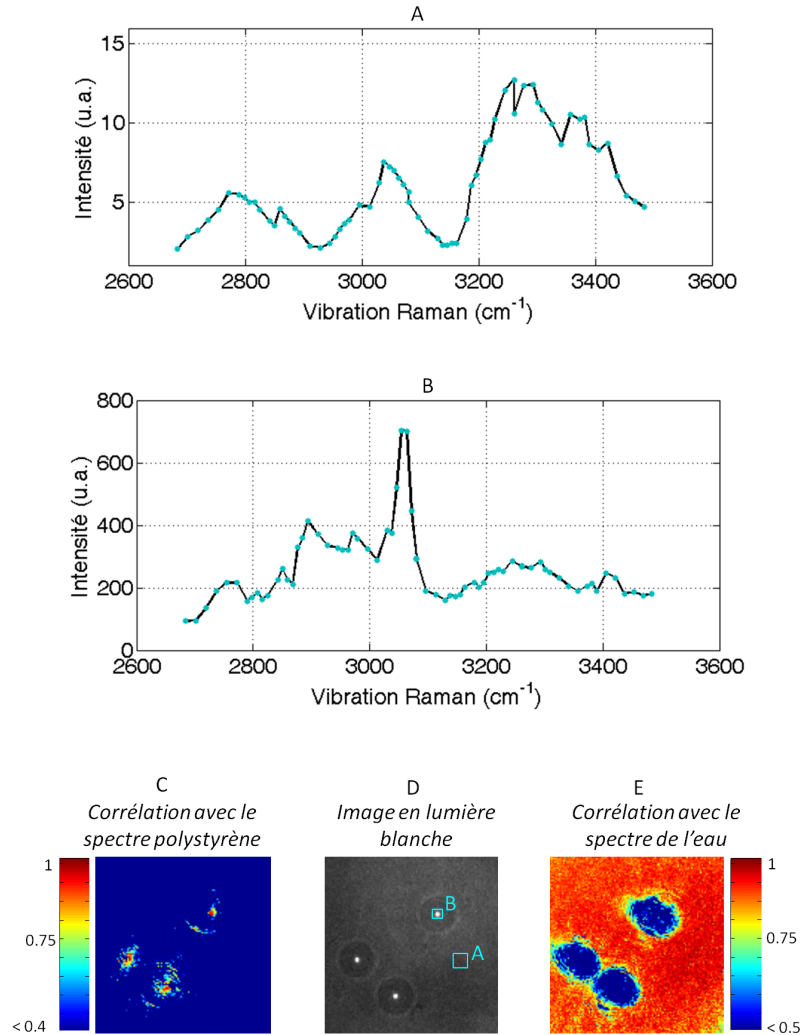


FIG. 5.28 : *Robustesse et spécificité des spectres.* Les spectres de l'eau (encart A) et du polystyrène (encart B) sont obtenus en moyennant les spectres sur les zones marquées A et B sur l'image en lumière blanche. Les images C et E donnent la valeur du coefficient de corrélation de chaque pixel avec, respectivement, les spectres du polystyrène et de l'eau.

5.7 Effet des impulsions lasers sur les cellules

Les longueurs d'ondes d'excitation ont été choisies dans le rouge et proche infra-rouge afin de limiter au maximum l'absorption de photons et donc l'échauffement de l'échantillon sous test. De plus, les puissances moyennes incidentes sont au max-

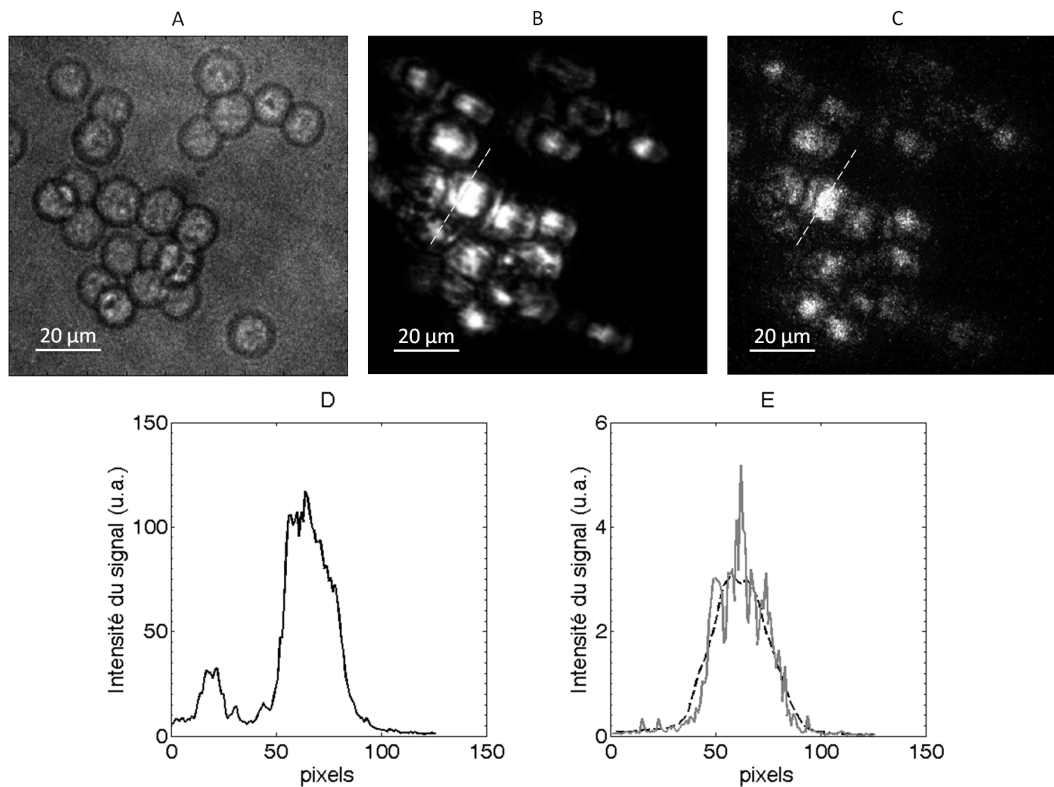


FIG. 5.29 : *Images de cellules vivantes. A- Image en lumière blanche. B- Image CARS (2847 cm^{-1}) obtenue en cumulant 50 tirs lasers. C- Image CARS (2847 cm^{-1}) obtenue en un seul tir laser. Les énergies sont fixées à 1 mJ pour le Pompe et $420\text{ }\mu\text{J}$ pour le Stokes. D- profil d'intensité tracé d'après l'image obtenue en 50 tirs. E- profil d'intensité tracé d'après l'image obtenue en un seul tir (trait continu) et moyenne glissante sur 20 pixels (ligne pointillée).*

imum de l'ordre de 30 mW, et elles sont appliquées pendant au maximum quelques dizaines de secondes. Ceci est typiquement de l'ordre des puissances utilisées dans les montages de type confocal dans lesquels les illuminations durent plusieurs minutes. Dans notre application, la durée d'illumination est beaucoup plus courte. L'obtention d'une centaine d'images n'impose qu'une illumination de 20 s (elle est imposée par la cadence de la caméra de 5 Hz). Il est donc peu probable qu'un échauffement ait lieu. Au cours d'expériences préliminaires, des cellules ont été exposées à de très grands nombres d'impulsions lasers : environ un millier. Les énergies Stokes et Pompe ont été fixées à $550\text{ }\mu\text{J}$ et 1 mJ respectivement, soit typiquement les énergies utilisées en condition de signal. Aucun changement morphologique des cellules n'a été observé, ce qui suggère qu'il n'y a pas d'échauffement important.

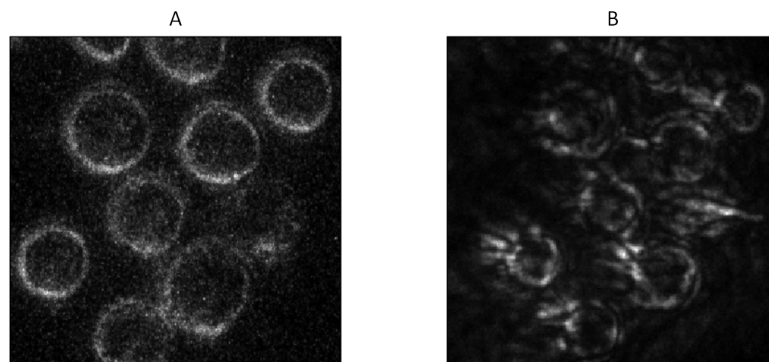


FIG. 5.30 : Observation de cellules (objectif $\times 63$, $ON = 0,8$) A- en lumière blanche, B- en CARS ($\omega = 2845 \text{ cm}^{-1}$). L'image CARS est l'accumulation de 100 tirs lasers.

5.7.1 Intégrité des membranes

L'intégrité des membranes après l'illumination laser a été testée grâce à un test bleu Trypan. Les intensités des lasers ont été fixées à $530 \mu\text{J}$ pour le Stokes et $1,2 \text{ mJ}$ pour le Pompe. Ces intensités sont volontairement supérieures aux intensités nécessaires à l'obtention d'images mono-coup. Les cellules sont exposées pendant 5 minutes à un seul laser ou aux deux en même temps, ce qui correspond à environ 3000 impulsions ou paires d'impulsions lasers. Un contrôle positif a été ajouté dans le cadre de cette expérience. Il consiste à exposer les cellules à 8 impulsions électriques de $100 \mu\text{s}$ et 125 V/mm . Les cellules sont exposées dans une cuvette d'électroporation et le comptage des cellules positives est effectué 5 minutes après. Les résultats du test sont présentés sur la figure 5.31. Le contrôle positif valide le test, puisque environ 35% des cellules sont positives au bleu trypan. Immédiatement après l'exposition aux impulsions lasers, en revanche, environ 1% seulement des cellules sont positives au bleu-trypan. Ce test n'indique donc pas de dommage important sur les membranes des cellules dû aux impulsions lasers.

5.7.2 Stabilité du signal sur cellules vivantes

Afin de tester la stabilité du signal au cours du temps, des séquences de 300 images ont été réalisées (à la fréquence de 5 Hz). Le signal est quantifié en moyennant l'intensité sur une tranche de cellule. Pour une séquence, la valeur du signal est représentée en fonction du numéro de l'impulsion sur la figure 5.32. On observe que le signal fluctue. L'écart-type du signal par rapport à la valeur moyenne est de 25 %, ce qui correspond aux fluctuations des lasers (voir section 5.5.2.2).

Il est possible de moyennner plusieurs séquences indépendantes, acquises sur dif-

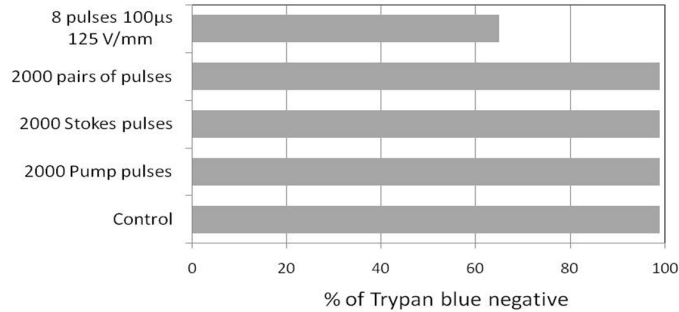


FIG. 5.31 : Test bleu Trypan après l'application d'impulsions lasers. Les énergies utilisées sont 1,2 mJ pour le Pompe et 530 µJ pour le Stokes.

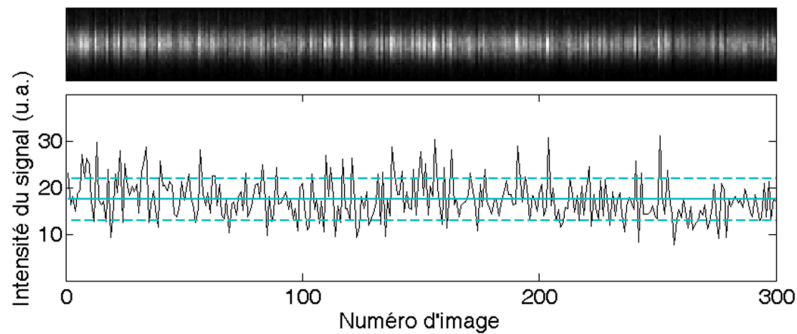


FIG. 5.32 : Evolution de la quantité de signal obtenu sur des cellules en suspension au cours du temps. L'intensité est la moyenne sur la tranche d'une cellule. Les énergies Pompe et Stokes sont fixées respectivement à 1 mJ et 550 µJ.

férentes cellules pendant différentes expériences, à condition de normaliser par la valeur moyenne du signal. Le signal de la figure 5.32 est présenté normalisé sur la figure 5.33-A. En sommant huit séquences indépendantes normalisées, on obtient le signal présenté sur la figure 5.33-B. L'écart type est fortement réduit et n'est plus que de 12%. De plus, la décroissance de l'écart type en fonction du nombre de séquences accumulées suit la loi de Poisson, ce qui est caractéristique d'un phénomène aléatoire. Ainsi, on n'observe pas de modification particulière au cours du temps. Le dispositif peut donc être utilisé en fonctionnement continu sur des cellules vivantes.

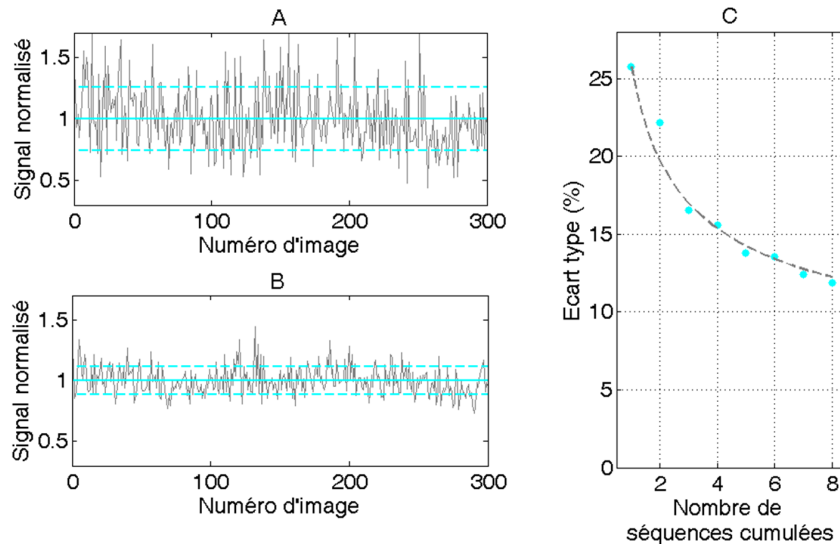


FIG. 5.33 : *A - Evolution au cours du temps du signal normalisé déterminé sur une tranche de cellule. La normalisation est obtenue en divisant par la valeur moyenne du signal. B - Moyenne de huit séquences normalisées. C - Valeur de l'écart type en pourcentage en fonction du nombre de séquences normalisées. La ligne pointillée correspond à l'ajustement des points par la loi de Poisson.*

5.8 Aspects pratiques du montage

5.8.1 Dispositif d'exposition aux nanosecondes

Le développement d'un micro-système dédié à l'exposition de cellules à des nanopulses sous microscope fait l'objet d'une ANR (ANR Nanopulsebiochip-08-PNANO-024). En attendant que ce dispositif soit fonctionnel et adapté sur le microscope, un premier dispositif d'exposition a été aménagé. Ceci nous a permis de vérifier les problèmes de compatibilité électromagnétique au sein du montage, et également de mettre au point la synchronisation entre les lasers et les impulsions nanosecondes.

L'impulsion nanoseconde est amenée par un câble coaxial de type SMA, tandis que les électrodes pour l'application des impulsions électriques sont constituées de deux lames de scalpel en acier inoxydable. La transition entre le câble coaxial et les électrodes est réalisée au moyen de ruban adhésif en cuivre (figure 5.34). L'écartement entre les deux électrodes est ajusté en faisant glisser les lames de scalpel jusqu'à ce que la distance inter-électrodes soit d'environ $500 \mu\text{m}$. La parallélisme et la distance inter-électrodes exacte sont analysés sous microscope. Une sonde (ref :

Barth Electronics, INC, model: 2440 – 6 GHz, 10:1) est positionnée sur les électrodes et permet d'une part de contrôler que les impulsions sont bien déclenchées, et d'autre part de déterminer leur amplitude.

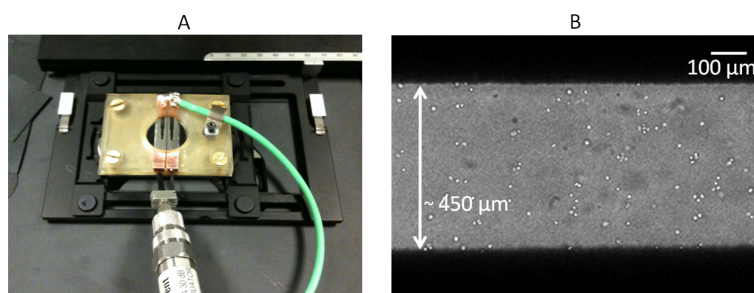


FIG. 5.34 : *A-Dispositif d'exposition aux impulsions nanosecondes. B- Visualisation des cellules entre les deux électrodes sous microscope (lumière blanche, objectif $\times 10$)*

5.8.2 Synchronisation temporelle

L'ensemble de la synchronisation est présentée de façon schématique sur la figure 5.35.

La synchronisation des deux lasers n'a pas été décrite en détail, mais elle ne présente pas de difficulté particulière. Pour chaque laser YAG (laser qui pompe le laser à colorant), le délai entre le déclenchement du flash (qui pompe le barreau de YAG)) et du Q-switch (cellule de Pockels qui déclenche le mode laser) est ajusté pour optimiser l'énergie du laser YAG.

Le laser Stokes est asservi sur le laser Pompe. Son déclenchement se fait au temps $T_1 = T_0 + \Delta t_{laser}$. Le délai Δt_{laser} est ajusté afin d'assurer que les deux lasers soient synchrones au niveau de l'échantillon. En pratique, une photo-diode est placée juste au dessus de l'objectif de collection et permet de détecter l'arrivée de l'impulsion Pompe ou de l'impulsion Stokes alternativement. Les signaux de la photo-diode sont envoyés sur un oscilloscope, et le délai est ajusté jusqu'à superposer les deux traces des impulsions.

L'impulsion électrique est également déclenchée par le générateur de délai. Pour synchroniser l'impulsion électrique de 10 ns avec les faisceaux lasers, la même procédure est utilisée en remplaçant la photo-diode par une sonde de tension (sonde visible sur la figure 5.34). Le déclenchement des impulsions électriques est par ailleurs contrôlé par une porte générée avec un générateur basse fréquence (GBF) supplémentaire, ce qui permet lors de l'acquisition d'une séquence d'images CARS de ne

déclencher les nanopulses que pendant certains tirs lasers.

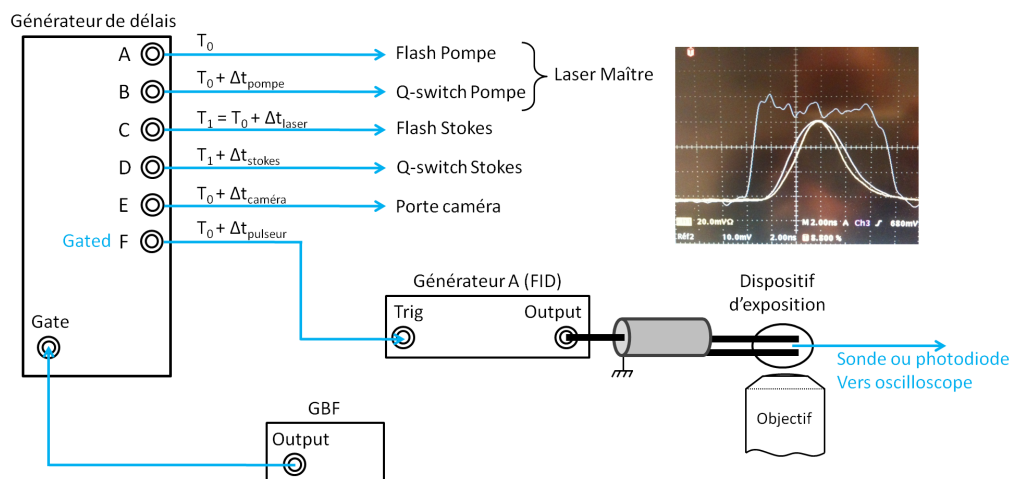


FIG. 5.35 : Schéma de principe de la synchronisation temporelle entre appareils. L'encart est une photographie de l'oscilloscope sur laquelle on visualise les deux impulsions lasers et le nanopulse électrique.

5.8.3 Bruit de la caméra

Le bruit électronique de la caméra doit être soustrait avant toute analyse des images, afin de permettre l'extraction d'information et d'assurer la qualité de l'information spectrale. L'analyse du bruit de la caméra a donc été effectuée afin de vérifier sa stabilité. De plus, nous avons contrôlé qu'en présence d'impulsions électriques ce bruit n'était pas modifié du fait de problèmes de compatibilité électromagnétique.

Des séquences d'images de bruit ont été acquises, en l'absence d'excitation laser ou de tout autre éclairage. Pour chaque image, il est possible de calculer l'histogramme des valeurs du bruit sur les 1024×1024 pixels. La figure 5.36 présente les histogrammes de 50 images acquises dans une même séquence. Il apparaît que l'histogramme de la première image est déplacé vers des valeurs de bruit 20 fois plus élevées que les valeurs du bruit dans les 49 images suivantes. Ceci se retrouve de façon systématique dans toute les acquisitions. De plus, le bruit de la première image est très fluctuant d'une séquence à l'autre, alors que celui des images suivantes est bien plus stable. Ainsi, lors de l'acquisition de séquences d'images CARS, il est nécessaire d'éliminer la première. La moyenne du bruit des 49 images suivantes est tracée sur la figure 5.37. On observe une augmentation progressive du bruit sur les 20 premières images, qui doit traduire la régulation de la caméra. Les variations d'amplitude de ce bruit sont cependant limitées à 10 coups sur la caméra.

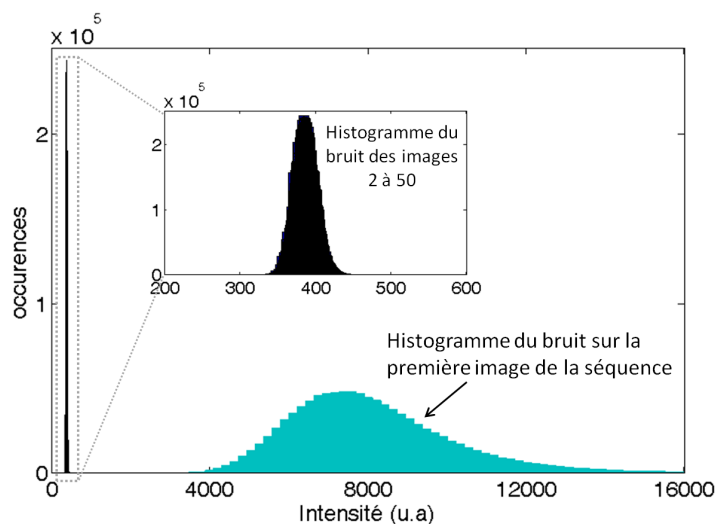


FIG. 5.36 : *Superposition de 50 histogrammes de bruit acquis au cours d'une séquence. L'encart correspond au zoom sur les histogrammes des images 2 à 50*

Le bruit a ensuite été testé pendant l'application d'impulsions électriques de 10 ns, 5 kV/mm sur des électrodes espacées de 400 μm (dispositif d'exposition présenté dans la section 5.8.1). Une séquence de 50 images a été analysée, la première étant toujours exclue. La moyenne du bruit sur chaque image est présentée sur la figure 5.37, superposée à la courbe obtenue en l'absence d'impulsions électriques. Il n'apparaît pas de changement du bruit moyen en présence des impulsions électromagnétiques.

5.9 Résultats préliminaires en diffusion Rayleigh

Des premiers tests ont été effectués afin d'observer en diffusion Rayleigh (donc avec uniquement le laser Pompe) le comportement des cellules pendant l'application des impulsions électriques de 10 ns. Les images sont acquises toutes les 300 ms. Deux séries de 100 images sont collectées, la première en n'appliquant que l'impulsion laser Pompe, puis la seconde en appliquant des impulsions électriques de 10 ns et 12 kV/mm (2900 V sur des électrodes espacées de 240 μm). La figure 5.38 présente la tranche d'une cellule en fonction de l'impulsion laser. Les parties A et B de la figure correspondent respectivement aux images acquises sans et avec impulsions électriques. Aucun changement de morphologie n'est observé, la même analyse ayant été conduite sur 10 cellules.

Le suivi de la morphologie des cellules sur plusieurs minutes après l'application des impulsions montre un net gonflement des cellules, ce qui indique que les impul-

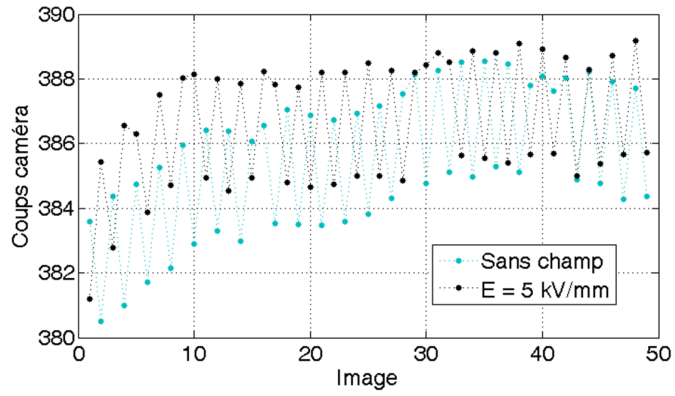


FIG. 5.37 : Moyennes du bruit caméra sur les 1024×1024 pixels en fonction du numéro de l'image lors de l'acquisition de deux séquences de 50 images avec et sans impulsions électriques (la première image est exclue)

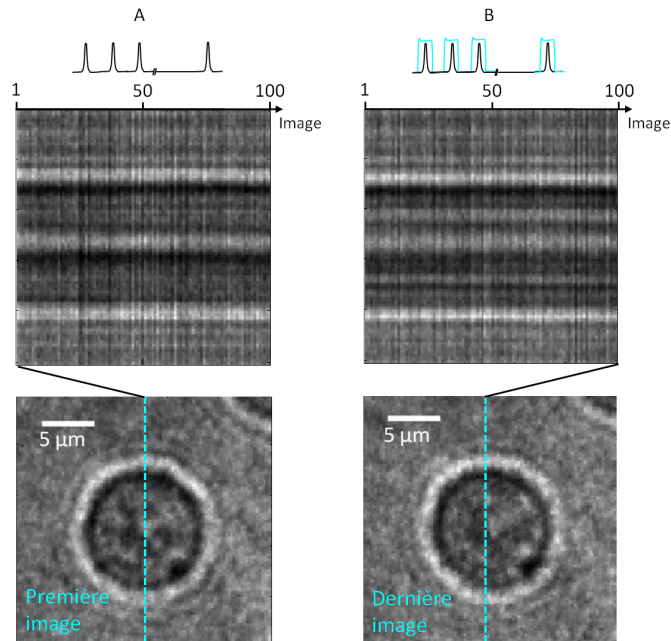


FIG. 5.38 : Observation d'une cellule par diffusion Rayleigh du faisceau Pompe, A- sans application d'impulsions électriques, B- lors de l'application d'impulsions électriques de 10 ns et 12 kV/mm.

sions ont tout de même affecté (en l'occurrence perméabilisé) les cellules. Le changement morphologique d'une cellule, 15 minutes après l'application de 100 impulsions

de 10 ns et 12 kV/mm, est visible sur la figure 5.39.

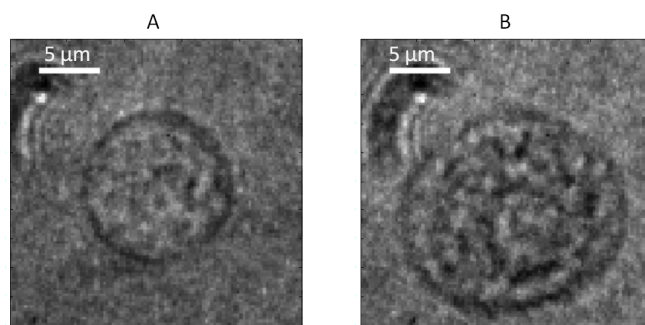


FIG. 5.39 : *A-Observation en lumière blanche d'une cellule avant application d'impulsions électriques. B-Observation en lumière blanche de la même cellule 15 minutes après l'application de 100 impulsions de 10 ns et 12 kV/mm.*

5.10 Conclusions

La configuration actuelle du montage s'est révélée adaptée à l'imagerie d'objets biologiques en CARS plein champ. Actuellement, il est déjà possible de synchroniser les impulsions lasers avec des impulsions électriques de 10 ns. Certains freins techniques ont cependant limité le montage. La possibilité d'utiliser aujourd'hui des objectifs de plus grande ouverture numérique (grâce à l'usinage des filtres) devrait permettre d'améliorer la résolution latérale et axiale et donc la qualité des images. En outre, l'amélioration de la résolution spatiale permettra d'obtenir des informations spectrales plus précises sur les échantillons sondés.

Le montage pourra par ailleurs être amélioré rapidement grâce à :

- l'exploitation de la polarisation des lasers.
- l'automatisation du balayage en fréquence dans le but de permettre l'acquisition de spectre sur cellules en quelques minutes. La bonne connaissance du spectre initial de nos échantillons est en effet un pré-requis indispensable à l'observation de modifications pendant l'application d'impulsions nanosecondes.

L'exploitation du montage pour l'observation des effets des impulsions électriques nanosecondes au niveau moléculaire reste donc toujours à faire. Une belle perspective pour 'l'après rédaction' ...

Chapitre 6

Conclusion générale

Le but initial poursuivi par les premiers expérimentateurs lorsqu'ils ont soumis des cellules à des impulsions de quelques nanosecondes, était d'atteindre des cibles intra-cellulaires sans affecter la membrane. Les effets intra-cellulaires de telles impulsions sont cependant pour le moment peu représentés dans la littérature, et la perméabilisation de la membrane cytoplasmique demeure un des effets les plus étudiés. Les impulsions nanosecondes, en effet, perméabilisent la membrane externe des cellules. J'en suis fort aise, puisque l'étude de la perméabilisation a occupé mes trois années de thèse.

L'ensemble des expériences menées avec des impulsions ultra-courtes a nécessité un travail préliminaire de mise au point des protocoles d'exposition. Une partie des travaux a donc été consacrée à la caractérisation des générateurs, des impédances des objets biologiques. L'étude des propriétés électriques passives des milieux biologiques a notamment permis de vérifier que, même soumis aux valeurs élevées de champs que nous utilisons, les milieux gardaient un comportement linéaire. En outre, une partie des travaux a également été consacrée à la mise en œuvre de moyens de mesure spécifiques aux impulsions nanosecondes. L'implantation de capteurs de champ 'D-dot' dans les systèmes d'exposition, au plus près des échantillons biologiques sous test, a permis de conduire l'ensemble des expériences en contrôlant de façon systématique que les impulsions étaient bien délivrées. Enfin un capteur B-dot, utilisé comme capteur de courant, a permis de contrôler les valeurs de courant.

Les travaux de cette thèse ont par ailleurs contribué à la mise en évidence de similarités entre la perméabilisation obtenue avec des impulsions longues, de quelques microsecondes voire millisecondes (perméabilisation 'classique'), et celle obtenue avec des impulsions courtes de 10 nanosecondes. Différents modèles ont pour cela été exploités.

Le premier modèle exploité pour comparer l'action d'impulsions de $100\ \mu\text{s}$ et l'action d'impulsions de $10\ \text{ns}$ a été un tissu végétal (la pomme de terre). La détection de la perméabilisation sur un échantillon peut être réalisée de façon sensible grâce à la mesure de ses propriétés électriques passives, c'est à dire de son impédance. Cette méthode a permis de mettre en évidence que des impulsions de $10\ \text{ns}$ pouvaient perméabiliser un tissu végétal. En outre, l'efficacité des très basses fréquences de répétition ($< 0,1\ \text{Hz}$) a été mise en évidence à la fois pour les impulsions de $10\ \text{ns}$ et pour les impulsions de $100\ \mu\text{s}$. La transposition partielle de ces résultats *in vivo* sur le foie de souris avec des impulsions de $100\ \mu\text{s}$ suggère également que les basses fréquences sont plus efficaces sur ce tissu animal. Des phénomènes systémiques, et notamment la modification du flux sanguin, qui se répercutent sur les propriétés électriques du foie, limitent cependant la pertinence des mesures électriques dans ce cas.

Ces travaux sur la meilleure efficacité des très basses fréquences de répétition sur la perméabilisation des tissus sont en accord avec la majorité des expériences conduites *in vitro*. Une des théories récemment proposée suggère une action 'sensibilisante' des impulsions électriques liée soit à une action des premières impulsions sur le métabolisme (épuisement en ATP ou perturbation à cause de pics de calcium intra-cellulaire) soit à un gonflement des cellules qui abaisserait la valeur du champ nécessaire pour perméabiliser les cellules (Pakhomova *et al.*, 2011). L'obtention de résultats très proches sur un tissu végétal permet d'écarter au moins une de ces suggestions. Le changement de volume en effet est proscrit dans la pomme de terre à cause de la paroi végétale qui fixe le volume maximal de la cellule. Une alternative que nous proposons est que l'efficacité des très basses fréquences est liée à la réparation des dommages : plus la membrane est réparée, plus il est possible d'établir une différence de potentiel transmembranaire de façon efficace. Cette hypothèse s'accorde avec les dynamiques très lentes de réparation qui ont été jusqu'à présent observées.

L'utilisation de la bléomycine, marqueur sensible de la perméabilisation réversible, a par ailleurs permis de démontrer que les impulsions de $10\ \text{ns}$ perméabilisent de façon réversible des cellules en suspension à des molécules de tailles moyennes. Ce résultat est d'autant plus marquant que la perméabilisation réversible à la bléomycine peut avoir lieu après l'application d'une seule impulsion de $10\ \text{ns}$ à condition que l'amplitude de l'impulsion et que la conductivité du milieu extracellulaire soient bien choisies. La perméabilisation de la membrane à la bléomycine remet en cause les théories actuelles qui stipulent que les impulsions nanosecondes n'induisent que des 'nanopores' d'un diamètre de l'ordre du nanomètre. En effet, la libre diffusion d'une molécule telle que la bléomycine n'est pas envisageable au travers de 'pores' de cette taille. Par ailleurs, la pénétration de la bléomycine

peut avoir lieu à 4°C, et ne passe donc pas par l'endocytose. Ceci abonde dans le sens que la 'nano-perméabilisation' est un phénomène passif au même titre que la perméabilisation classique.

Par ailleurs, l'utilisation combinée d'impulsions de 10 ns et de bléomycine a pu être transférée partiellement *in vivo*. Cette transposition des protocoles d'électrochimiothérapie s'est avéré induire chez l'animal, des retards de croissance tumorale. Ainsi, la transposition de l'*in vitro* à l'*in vivo* a pu être menée à bien. Le succès de ces expériences reste très relatif d'un point de vue thérapeutique, puisqu'aucune véritable régression tumorale n'a été observée. La possibilité d'augmenter les niveaux de champ grâce à l'utilisation de générateurs délivrant des tensions plus élevées permettront rapidement, je l'espère, de dépasser les résultats préliminaires obtenus dans le cadre de cette thèse, et d'atteindre des efficacités thérapeutiques intéressantes.

L'utilisation de la bléomycine comme marqueur de la perméabilisation a par ailleurs permis d'étudier la corrélation entre les différents paramètres électriques et l'efficacité de la perméabilisation. En particulier, il a été mis en évidence que la conductivité du milieu extracellulaire influence l'efficacité de la perméabilisation.

Concernant les mécanismes de l'électroperméabilisation des cellules, il est possible de lister l'ensemble des hypothèses qui ont été envisagées au cours de ce travail de thèse :

Hypothèse 1 *Comme avec les micropulses, l'amplitude du champ et la durée de l'impulsion sont les paramètres essentiels qui définissent le niveau de perméabilisation.* Cette hypothèse a été rejetée suite à l'utilisation de milieux de différentes conductivités. L'exposition de cuvettes en parallèle garantit que les champs imposés dans deux milieux de conductivités différentes sont rigoureusement identiques. Pourtant les résultats biologiques sont différents dans chacun des milieux.

Hypothèse 2 *La densité de courant est le paramètre qui fixe le niveau de perméabilisation.* Ceci sous-entend qu'à niveau de champ variable, une même densité de charges induit des effets identiques. Cette hypothèse a été formulée dans Schoenbach *et al.* (2009). Les auteurs stipulent qu'au delà de la rupture de la membrane, la densité de courant stabilise les défauts. Cette hypothèse a cependant été invalidée en exposant des cellules à des densités de charges identiques avec des niveaux de champ différents, par l'exposition de cuvettes en série.

Hypothèse 3 *A même niveau de champ appliqué, plus la densité de charges est importante, plus la perméabilisation est efficace.* Ceci est la tendance qui a été observée

avec des impulsions de 10 ns et 3,6 kV/mm. Avec ce type d'impulsions, la perméabilisation est plus efficace dans un milieu conducteur (S-MEM) que dans un milieu non conducteur (STM). Cependant, la tendance inverse est observée avec les impulsions de 100 ns et 3,6 kV/mm. Ainsi, selon la durée de l'impulsion, l'efficacité de la perméabilisation peut être une fonction croissance ou décroissante de la conductivité extra-cellulaire. Cette hypothèse a donc également été rejetée.

Hypothèse 4 *Le niveau de perméabilisation est fixé par la valeur maximale du ΔPTM théorique.* La formulation de cette hypothèse est motivée par l'idée que plus le ΔPTM maximum théorique calculé est élevé, plus le seuil de rupture est dépassé sur une surface plus importante de la membrane. En effet, un facteur 4 sur le ΔPTM maximum peut faire passer d'une perméabilisation très ponctuelle aux pôles à 85% de la surface perméabilisée (car $\text{Arccos}(1/4) = 75^\circ \simeq 0.85 * 90^\circ$.) Des expériences ont été mises en place pour tester cette hypothèse. Ainsi, des conditions conduisant théoriquement à la même valeur de différence de potentiel transmembranaire ont été comparées. La comparaison indique qu'une même différence de potentiel transmembranaire maximum théorique peut être associé à des résultats biologiques très différents en termes de perméabilisation. Dans les deux conditions testées, les conditions associées à une dynamique lente de décharge de la différence de potentiel transmembranaire se sont avérées être les plus efficaces.

Hypothèse 5 *Il est nécessaire de dépasser des valeurs critiques du ΔPTM pendant des durées suffisantes.* Cette hypothèse impliquerait de dépasser les valeurs habituelles de seuil, et d'atteindre plusieurs volts sur la membrane pour qu'elle se perméabilise, dans la mesure où la différence de potentiel transmembranaire n'est maintenu que pendant des temps courts, de quelques dizaines ou centaines de nanosecondes.

Les résultats des différentes expériences conduites dans cette thèse convergent vers cette dernière hypothèse. Ceci est en accord avec des travaux antérieurs, qui indiquent que le seuil de perméabilisation varie en fonction de la durée des impulsions. De plus, une telle dépendance est dans la logique des théories sur la tenue des matériaux aux champs électriques. La notion de seuil de perméabilisation est ainsi directement liée à la double notion d'amplitude de la différence de potentiel et de durée minimale pendant laquelle cette différence de potentiel est maintenue. L'hypothèse formulée implique aussi qu'il est possible de dépasser des différences de potentiels transmembranaires de plusieurs volts sans perméabiliser, à condition qu'ils soient maintenus pendant un temps suffisamment court. La validation de cette hypothèse requerra des mesures de différences de potentiel transmembranaire, par exemple au moyen de sondes fluorescentes. La maîtrise croissante de ces sondes fluorescentes devrait permettre de réaliser ces expériences.

Nos expériences mettent donc l'accent sur la différence majeure entre les impulsions de durée supérieures et inférieures au temps de charge de la membrane. Le passage aux impulsions de quelques nanosecondes implique que le régime permanent de la différence de potentiel transmembranaire n'est pas atteint et que tout élément susceptible d'affecter la constante de charge ou de décharge de cette différence de potentiel va à présent jouer un rôle important. C'est le cas de la conductivité extra-cellulaire.

Enfin, une partie de ces trois ans à été consacrée au développement d'un nouveau microscope CARS, plein champ. Ce microscope a été développé sous fortes contraintes puisqu'il se veut être dédié à l'observation de modifications moléculaires dans des cellules soumises à des impulsions électriques de 10 ns. A ce stade, le fonctionnement du microscope a été validé, y compris sa synchronisation avec les générateurs d'impulsions électriques. L'outil tel qu'il est mis en place actuellement permet d'une part d'obtenir des images en diffusion Rayleigh en 3 ns, ce qui pourra être exploité pour évaluer une éventuelle déformation mécanique pendant l'application d'impulsions de quelques nanosecondes sur des cellules ou des vésicules. Par ailleurs, le niveau de signal CARS obtenu sur les cellules en un seul tir des lasers est suffisamment important pour pouvoir être exploité. L'exploration des effets des impulsions électriques sur les cellules au niveau chimique peut être envisagée dans un futur proche, ce qui ouvre encore d'autres perspectives au travail de cette thèse.

Chapitre 7

Matériels et Méthodes

7.1 Culture cellulaire

7.1.1 Lignées cellulaires

Deux types cellulaires ont été utilisés dans les expériences rapportées ici : des DC-3F (fibroblastes de poumon de hamster chinois) et des LPB (fibrosarcome murin de souris). Ces deux lignées cellulaires sont maintenues en culture dans du Milieu Essentiel Minimum (MEM) (Invitrogen) complété par 10 % de sérum de veau fœtal (Invitrogen), 500 U/ml de pénicilline et 500 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de streptomycine (Invitrogen). Ceci définit le milieu complet. Les cultures cellulaires sont maintenues en atmosphère humide régulée à 5 % de CO_2 et à 37 °C. Le passage des cellules est réalisé tous les deux ou trois jours. Pour cela, les cellules sont décollées avec de la Trypsine (Invitrogen) ou du TrypLE Express (Invitrogen), diluées, et remises en culture.

7.1.2 Milieux d'exposition

Les différents milieux utilisés pour l'application d'impulsions électriques (microseconde ou nanosecondes) sont les suivants :

- S-MEM ("Minimum Essential Medium Spinner Modification") (Invitrogen). Conductivité de 1,5 S/m.
- S-MEM complété avec 0,1% ou 0,15% d'agar(Eurobio). Conductivité de 1,5 S/m.
- STM (Sucrose, Tris, Magnésium) : Sucrose 0.25 M, MgCl_2 1 mM, Tris 10 mM. Conductivité 0,1 S/m.

7.2 Générateurs

7.2.1 Générateur d'impulsions microsecondes

Cliniporator

Générateur développé par IGEA (Carpi, Italie). C'est un générateur contrôlé en tension. Sa tension de sortie n'est donc pas fonction de la charge connectée. Il permet de délivrer deux types d'impulsions différentes : des impulsions perméabilisantes dites 'courtes' et des impulsions à action électrophorétique dites 'longues'. Les paramètres de réglage pour ces deux types d'impulsions sont donnés ci-dessous. En pratique, l'alimentation du générateur peut limiter l'amplitude, le nombre de pulses ou la fréquence de répétition. La fréquence de répétition minimale pour les impulsions courtes est de 1 Hz (tableau 7.2.1). L'application d'impulsions à des fréquences plus lentes est possible en appliquant manuellement une impulsion à la fois avec la bonne cadence (les expériences du chapitre 3 sont concernées). Ce générateur inclut un système de contrôle et d'acquisition des données. Ainsi, tous les paramètres d'exposition peuvent être sauvegardés. Les courbes de tension et de courant peuvent par ailleurs être contrôlées en temps réel.

Caractéristiques des impulsions 'courtes'

Tension de sortie	60 V à 100 V
Durée des impulsions	10 μ s
Fréquence de répétition	> 1 Hz
Commande	interne
Nombre d'impulsions	1 à 20
Courant max	12 A

Caractéristiques des impulsions 'longues'

Tension de sortie	12 V à 200 V
Durée des impulsions	1 ms à 1 s
Pause entre impulsions	1 ms à 3 s
Commande	interne
Nombre d'impulsions	1 à 20
Pause après impulsions courtes	1 ms à 4200 ms

7.2.2 Générateur d'impulsions nanosecondes

7.2.2.1 Générateur A

Référence : FPG 10-1SM10

Générateur commercial acquis auprès de la compagnie FID (Burbach, Germany) d'impédance de sortie 50Ω . Il a été mis à la disposition du laboratoire par le Dr P.Lévêque du laboratoire Xlim (Limoges, France) dans le cadre de collaborations (ANR Nanopulsebiochip-08-PNANO-024 et ANR IntCell-10-BLAN-916)

Caractéristiques sur charge adaptée (50Ω)	
Tension de sortie	de 3,8 kV à 8 kV
Durée des impulsions	10 ns
Fréquence de répétition min	aucune
Fréquence de répétition max	non testée mais > 1 kHz
Commande	Externe
Nombre d'impulsions	Illimité

La sortie du générateur s'effectue sur un connecteur coaxial haute tension. Un adaptateur (Barth) permet de connecter des câbles N standards. L'exposition des cuvettes d'électroporation se fait entre deux plaques de cuivre soudées sur un connecteur N (figure 7.1). D'autres connecteurs permettent d'exposer des cuvettes en parallèle ou en série (figure 7.2). Lorsque les cuvettes sont exposées en série, une plaque de cuivre est éventuellement rajoutée entre les deux cuvettes (visible sur la figure 7.2-B) afin de pouvoir mesurer le champ dans une cuvette au moyen du D-dot.

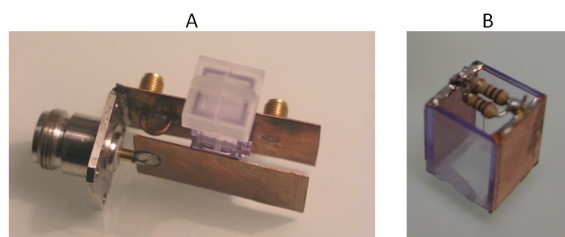


FIG. 7.1 : A- Dispositif d'exposition pour une seule cuvette. B- Bouchon 50Ω permettant des mesures de référence dans le dispositif

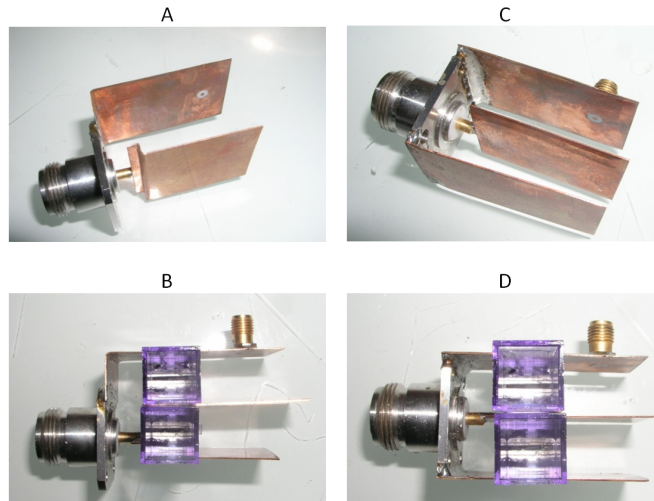


FIG. 7.2 : *A et B - Dispositif pour exposition en série. C et D - Dispositif pour exposition en parallèle.*

7.2.2.2 Générateur B

Référence : FID Technology FPG 10-30MS

Générateur commercial de la compagnie FID et prêté par le Pr. Christophe Laux et la Dr Deanna Lacoste du laboratoire EM2C (Ecole Centrale de Paris, Châtenay-Malabry, France). Le générateur est alimenté avec une alimentation continue (Delta Electronika ES 0.300-0.45). La sortie s'effectue sur quatre câbles coaxiaux. Chaque sortie est adaptée $100\ \Omega$. Les câbles ont été connectés comme indiqué sur la figure 7.3-B. Dans cette configuration, l'impédance globale de sortie est de $100\ \Omega$.

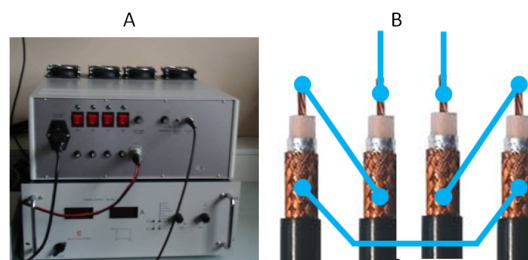


FIG. 7.3 : *A- Pulseur. B-Connexion des câbles en sortie.*

7.2.2.3 Générateur C

Référence : EP4003-306582A

Ce générateur a été conçu et développé par la compagnie Europulse (Cressensac, France). Il a été mis à notre disposition par le CEA grâce à l'intervention particulière de messieurs René Vezinet (Ingénieur CEA/CEG) et Bruno Cassany (Ingénieur CEA/DAM/CESTA). C'est un générateur à ligne qui fonctionne avec des éclateurs à air. Son impédance de sortie est 50Ω .

Caractéristiques sur charge adaptée (50Ω)

Tension de sortie	10 kV (6 bar) à 20 kV (16 bar)
Durée des impulsions	10, 20, 40, 80 ou 100 ns
Fréquence de répétition	< 100 Hz (réglage continu)
Commande	interne (si $f_{rep} > 1Hz$) ou externe (signal TTL)
Nombre d'impulsions	1 à 9999

La sortie s'effectue sur un câble coaxial 50Ω . L'extrémité du câble de sortie est présentée sur la figure 7.4-A. Pour l'exposition de cuvette d'électroporation, un dispositif a été adapté. Il est représenté sur la figure 7.4-B.

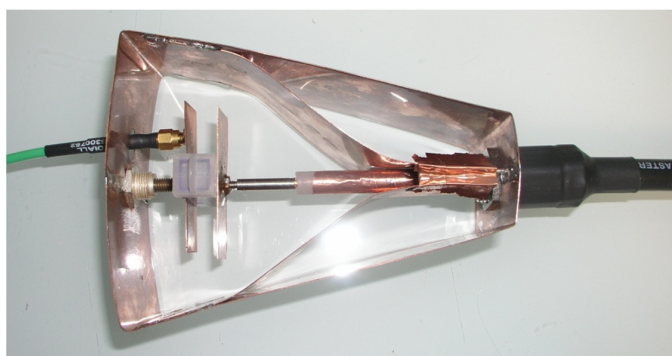
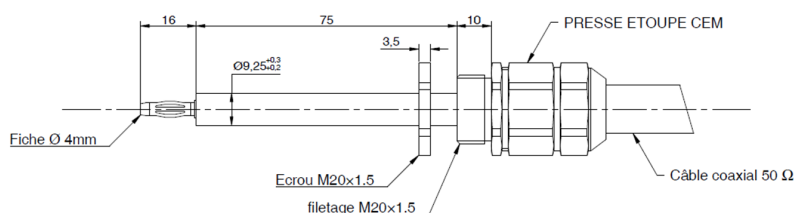


FIG. 7.4 : A- Extrémité du câble de sortie. B-Dispositif d'exposition pour cuvette d'électroporation, monté en bout de câble.

Pour une impulsion de 10 ns et 11 kV crête de moyenne, la reproductibilité pulse à pulse a été évaluée. Les données sont regroupées sur la figure 7.5. Il apparaît que la durée de l'impulsion fluctue très peu (écart type de environ 0.2%). Le niveau de l'impulsion en revanche, fluctue d'avantage et présente un écart type de l'ordre de 5%.

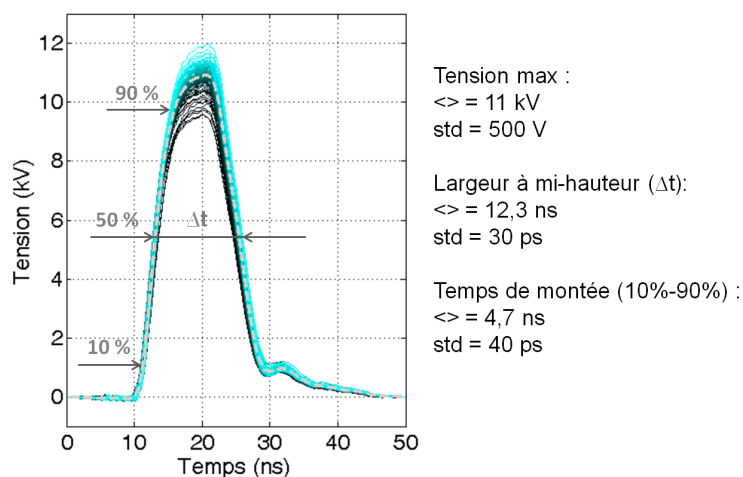


FIG. 7.5 : Superposition de 100 impulsions (générateur C). Les valeurs moyennes et écarts types des grandeurs caractéristiques des impulsions sont indiquées sur la figure.

7.3 Evaluation du champ dans les cuvettes

Le champ dans les cuvettes est évalué à l'aide du capteur D-dot, décrit dans le chapitre 2. En toute rigueur, il permet de mesurer le champ entre les deux électrodes de cuivre situées de part et d'autre de la cuvette et distante de $D = 1,2$ cm (voir figure 7.6). Pour évaluer le champ dans la cuvette, nous appliquons donc un facteur correctif de D/d avec $d = 1$ mm la distance inter-électrode de la cuvette.

7.4 Mesures d'impédance

Les expériences de quantification de la perméabilisation de pomme de terre et de foie de souris ont été faites avec un impédancemètre développé et mis à notre disposition par Anton Guimerà Brunet et Rosa Villale du 'Centre Nacional de Microelectronica' (CNM, Barcelona, Spain). La mesure est effectuée en petit signal de 100 Hz à 400 kHz. Les mesures sur les échantillons de pomme de terre ont été effectuées en 4-points avec les électrodes de la figure 7.7-A. Les mesures sur foie de souris ont

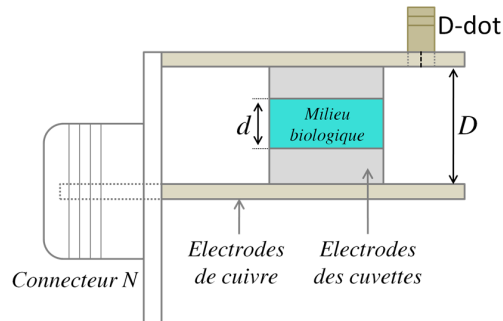


FIG. 7.6 : *Dispositif pour la mesure de champ.*

été effectuées entre les deux électrodes planes servant à l'application des impulsions perméabilisantes (figure 7.7-B).

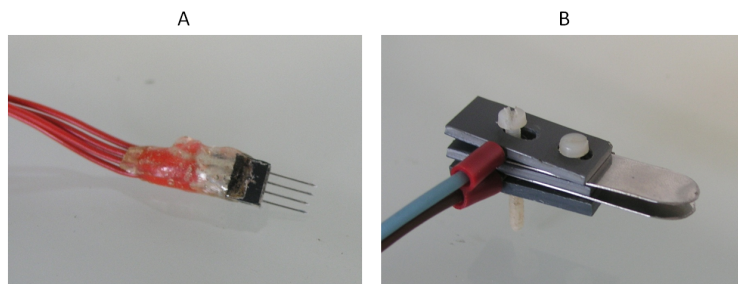


FIG. 7.7 : *A- Électrodes utilisées pour la mesure d'impédance 4-points sur échantillons de pomme de terre B- Électrodes pour la mesure d'impédance de foie de souris.*

De façon ponctuelle, des mesures d'impédance sur large bande ont été effectuées afin de caractériser les échantillons (voir chapitre 2). Ces mesures ont été faites à l'aide d'un pont d'impédance (Agilent/HP 4194) et d'un analyseur de réseau (Agilent E5070B)

7.5 Expériences sur pomme de terre.

7.5.1 Préparation des échantillons de pomme de terre

Des pommes de terre standard ont été achetées au supermarché local. Des tranches d'une épaisseur homogène de 5 mm ont été découpées (avec une mandoline), puis de petits cylindres de diamètres différents ont été estampillés dans la partie périphérique de la tranche de pomme de terre. Une première mesure d'impédance est effectuée. Immédiatement après, l'échantillon est placé entre deux électrodes planes en acier inoxydable séparées par une distance de 5 mm. Dès la fin de la dernière impulsion,

l'échantillon de pomme de terre est retiré des électrodes. L'impédance est à nouveau mesurée $7s \pm 2s$ et $80 s$ après la dernière impulsion.

7.5.2 Coloration à l'Iodure de Propidium

Des échantillons pré-découpés sont mis à tremper pendant 24 h dans une solution de PBS contenant 0,1 mM d'iodure de propidium. Les échantillons sont ensuite traités par les impulsions électriques. Une minute après, de fines lamelles (moins d'un mm) sont découpées manuellement avec une lame de rasoir et déposées sur une lame de microscope. Les observations sont faites à l'aide d'un microscope inversé (Zeiss, Axiovert S 100), à un grossissement $\times 10$. L'acquisition des images est faite avec une caméra CCD (Zeiss, AxioCam HRc)

7.6 Procédure chirurgicale pour les expériences sur foie de souris

Les expériences ont été conduites avec des souris nude suisses provenant de l'animalerie de l'Institut Gustave Roussy. Les souris sont âgées de 8 et 10 jours. Leur foie peut ainsi être entièrement placé entre deux électrodes planes en acier inoxydable espacées de 2 mm. Les souris sont d'abord anesthésiées avec une dose de 10 μl par g de poids corporel avec un mélange composé de xylazine 12,5 mg/kg (Bayer PHAMA, Puteaux, France) et de kétamine 125 mg/kg (Parke Davis, Courbevoie, France). Le mélange est injecté par voie intrapéritonéale. Une incision est réalisée dans la partie supérieure médiane de l'abdomen (ou épigastrique) de l'animal anesthésié, puis le foie est sorti doucement et placé entre les électrodes. Les électrodes et la souris sont maintenues de façon à limiter au maximum les mouvements pendant la mesure de l'impédance du foie. Une première mesure d'impédance entre les deux électrodes est réalisée avant le traitement. L'impédancemètre est ensuite débranché, et les impulsions sont appliquées en utilisant les mêmes électrodes. Immédiatement après la dernière impulsion, les électrodes sont manuellement reconnectées à l'impédancemètre et l'impédance est à nouveau mesurée. La tension et le courant pendant les impulsions sont systématiquement enregistrées.

7.7 Protocole d'efficacité de clonage

7.7.1 Bléomycine

La bléomycine est achetée sous forme lyophilisée. Elle est ensuite dissoute en milieu d'électroporation (SMEM ou STM) et stockée à -20°C . Concentration de stockage : 300 μM .

7.7.2 Expériences sans bléomycine ou à 30 nM de bléomycine

Chaque expérience est réalisée à partir d'une flasque de cellules (DC-3F) passée à J-1 ou J-2. Les cellules sont comptées et remises en suspension à $5 \cdot 10^6$ cellules/mL dans le milieu d'électroporation pur ou dans du milieu contenant 30 nM de bléomycine. Le volume adéquat de suspension cellulaire est déposé dans les cuvettes d'électroporation et les impulsions appliquées. Après 10 minutes à température ambiante, les cellules sont diluées plusieurs fois dans du milieu complet jusqu'à atteindre 150 cellules par mL. Pour chaque condition ou chaque témoin, trois puits de plaques 6-puits ($\phi = 3,5\text{cm}$) sont remplies avec 2 mL de la solution à 150 cellules/mL. Ainsi 300 cellules sontensemencées par puits. Après 5 jours de culture en atmosphère humide régulée à 5 % de CO_2 et à 37°C , les cellules sont fixées et colorées avec une solution de fixation. Enfin, les colonies formées sont comptées.

Composition de la solution de fixation Ethanol 100% 50 mL, Formaldéhyde 37% 25 mL, H_2O 175 mL, Crystal violet 0,5g

7.7.3 Expériences à $3\ \mu\text{M}$ de bléomycine

Afin de ne pas induire une mortalité importante due à la présence de la bléomycine à forte concentration, il est nécessaire de réduire au maximum la durée du passage des cellules dans la solution de bléomycine à $3\ \mu\text{M}$. Pour cela, les cellules sont initialement resuspendues dans du milieu sans bléomycine. Chaque condition (c'est à dire chaque cuvette) est traitée séparément selon le protocole suivant :

- $t=0$ s : Ajout de la bléomycine pour être à $3\ \mu\text{M}$.
- $t = 30$ s : Application des impulsions électriques
- $t = 1$ minutes 30 s : Dilution dans du milieu complet

7.8 Plasmide pour transfert de gène

Les plasmides utilisés contiennent le gène de la luciférase, enzyme catalysant l'oxydation de la luciférine. La mesure de l'activité de la luciférase a comme avantage de ne pas être sujette à du bruit de fond, contrairement à l'utilisation de la GFP dont le signal peut être partiellement masqué par l'auto-fluorescence des cellules. Les plasmides **pCMVLuc** contiennent le promoteur du cytomégalovirus provenant du plasmide pcDNA3 (Invitrogen) inséré en amont de la séquence codant pour la luciférase de luciole du plasmide pGL2-Basic Vector (Promega) (voir figure 7.8).

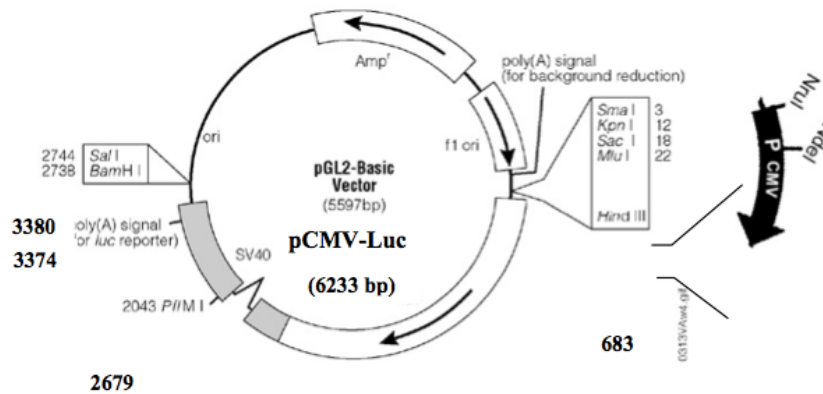


FIG. 7.8 : Carte du plasmide pCMVLuc codant pour la luciférase.

7.9 Expérience de perméabilisation *in vivo*

7.9.1 Animaux

Toutes les expériences sur animaux ont été réalisées d'après les recommandations pour l'expérimentation animale du comité national d'éthique.

Les souris utilisées sont des souris femelles C57Bl/6 (Janvier ou Harlan) âgées de deux mois environ.

7.9.2 Anesthésie

Les souris sont anesthésiées par une injection intra-péritonéale de 10 μ l/g d'un mélange anesthésiant de kétamine (Ketalar, 100 mg/kg; Panpharma, Fougères, France) et de xylazine (Rompun, 40 mg/kg; Bayer, Puteaux, France) en solution dans du sérum physiologique (NaCl 0,9%).

7.9.3 Modèles de tumeurs murines

Les souris sont inoculées avec 10^6 cellules LPB dans le flanc gauche. Le traitement est appliqué lorsque les tumeurs ont atteint un diamètre moyen de 3 à 5 mm. Les mesures des tumeurs sont ensuite effectuées régulièrement en mesurant les deux diamètres perpendiculaires les plus grands (notés a et b). Le volume total est ensuite calculé à l'aide de la formule suivante : $V = a \cdot b^2 \cdot \pi / 6$.

7.9.4 Traitement par impulsions ultra-courtes

Dix ou cent microgrammes de bléomycine (Roger Bellon, Neuilly, France) sont injectés par voie rétro-orbitale dans les souris anesthésiées comme mentionné plus haut.

Quatre minutes après l'injection, les impulsions sont appliquées. Une très légère couche de gel conducteur est utilisée pour éviter les claquages dans l'air entourant la tumeur. Il est important de ne pas mettre trop de gel afin de ne pas présenter une impédance faible, ce qui réduirait l'amplitude des impulsions.

Les électrodes sont en acier inoxydable. L'espace inter-électrodes est fixé à 4 mm. Une partie des expériences a été conduite avec des électrodes montées sur un connecteur de type N. Ce système s'est révélé limitant en terme de niveau de tension. En effet, pour des tensions de l'ordre de 6 kV, des claquages survenaient dans le connecteur. Pour s'affranchir des claquages, les électrodes ont été dans un deuxième temps directement soudées sur un câble N dénudé.

Toutes les impulsions délivrées sont mesurées grâce à un D-dot inséré dans l'électrode de masse. L'amplitude des impulsions est systématiquement calculée par traitement des signaux du D-dot.

7.9.5 Suivi de croissance tumorale

Dans la semaine qui suit le traitement, les tumeurs sont mesurées tous les jours, puis tous les 2 ou 3 jours. Le résultat est ensuite exprimé en croissance tumorale, représentant le rapport du volume tumoral au jour J sur le volume tumoral initial à J0.

Bibliographie

- Abidor, I., Arakelyan, V., Chernomordik, L., Chizmadzhev, Y., Pastushenko, V., and Tarasovich, M. (1979). Electric breakdown of bilayer lipid membranes: I. the main experimental facts and their qualitative discussion. *Journal of Electroanalytical Chemistry and Interfacial Electrochemistry*, 104:37–52.
- Akutsu, H. and Kyogoku, Y. (1975). Infrared and raman spectra of phosphatidylethanolamine and related compounds. *Chemistry and Physics of Lipids*, 14(2):113–122. PMID: 236097.
- Al-Sakere, B., André, F., Bernat, C., Connault, E., Opolon, P., Davalos, R. V., Rubinsky, B., and Mir, L. M. (2007). Tumor ablation with irreversible electroporation. *PloS One*, 2(11):e1135. PMID: 17989772.
- Alberts, Bray, D., Hopkin, K., and Collectif (2005). *L'essentiel de la biologie cellulaire*. Flammarion Médecine-Sciences, 2e édition edition.
- Alice, V. (2004). Reorientational relaxation and rotational translational coupling in water clusters in a d.c. external electric field. *Journal of Molecular Liquids*, 110(1-3):155–168.
- Alvarez, O. and Latorre, R. (1978). Voltage-dependent capacitance in lipid bilayers made from monolayers. *Biophysical Journal*, 21(1):1–17. PMID: 620076.
- André, F. M., Gehl, J., Sersa, G., Prémat, V., Hojman, P., Eriksen, J., Golzio, M., Cemazar, M., Pavselj, N., Rols, M., Miklavcic, D., Neumann, E., Teissié, J., and Mir, L. M. (2008). Efficiency of high- and low-voltage pulse combinations for gene electrotransfer in muscle, liver, tumor, and skin. *Human Gene Therapy*, 19(11):1261–1271. PMID: 19866490.
- Apodaca, G. (2002). Modulation of membrane traffic by mechanical stimuli. *American Journal of Physiology. Renal Physiology*, 282(2):F179–190. PMID: 11788431.
- Badger, R. M. and Bauer, S. H. (1937). Spectroscopic studies of the hydrogen bond. II. the shift of the O[Single Bond]H vibrational frequency in the formation of the hydrogen bond. *The Journal of Chemical Physics*, 5:839.
- Bazile, D., Mir, L. M., and Paoletti, C. (1989). Voltage-dependent introduction of a d[alpha]octothymidylate into electroporabilized cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 159(2):633–639. PMID: 2930534.

- Beebe, S. J., Fox, P. M., Rec, L. J., Willis, E. L. K., and Schoenbach, K. H. (2003). Nanosecond, high-intensity pulsed electric fields induce apoptosis in human cells. *The FASEB Journal: Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 17(11):1493–1495. PMID: 12824299.
- Belehradek, J., Orłowski, S., Ramirez, L. H., Pron, G., Poddevin, B., and Mir, L. M. (1994). Electropermeabilization of cells in tissues assessed by the qualitative and quantitative electroloading of bleomycin. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, 1190(1):155–163.
- Benz, R. and Zimmermann, U. (1980). Pulse-length dependence of the electrical breakdown in lipid bilayer membranes. *Biochimica Et Biophysica Acta*, 597(3):637–642. PMID: 7378404.
- Benz, R. and Zimmermann, U. (1981). The resealing process of lipid bilayers after reversible electrical breakdown. *Biochimica Et Biophysica Acta*, 640(1):169–178. PMID: 7213683.
- Bowman, A. M., Nesin, O. M., Pakhomova, O. N., and Pakhomov, A. G. (2010). Analysis of plasma membrane integrity by fluorescent detection of $\text{tl}(+)$ uptake. *The Journal of Membrane Biology*, 236(1):15–26. PMID: 20623351.
- Breton, M. and Mir, L. M. (2011). Microsecond and nanosecond electric pulses in cancer treatments. *Bioelectromagnetics*. PMID: 21812011.
- Burkhart, S. (1985). Coaxial E-Field probe for High-Power microwave measurement (Short papers). *Microwave Theory and Techniques, IEEE Transactions on*, 33(3):262–265.
- Bush, S. F., Adams, R. G., and Levin, I. W. (1980). Structural reorganizations in lipid bilayer systems: effect of hydration and sterol addition on raman spectra of dipalmitoylphosphatidylcholine multilayers. *Biochemistry*, 19(19):4429–4436. PMID: 6893277.
- Casabianca-Pignède, M., Mir, L. M., Le Peck, J., and Jacquemin-Sablon, A. (1991). Stability of antiricin antibodies introduced into chinese hamster cells by electropermeabilization. *Journal of Cell Pharmacology*, 2:54–60.
- Chen, N., Schoenbach, K. H., Kolb, J. F., James Swanson, R., Garner, A. L., Yang, J., Joshi, R. P., and Beebe, S. J. (2004). Leukemic cell intracellular responses to nanosecond electric fields. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 317(2):421–427. PMID: 15063775.
- Chen, X., James Swanson, R., Kolb, J. F., Nuccitelli, R., and Schoenbach, K. H. (2009). Histopathology of normal skin and melanomas after nanosecond pulsed electric field treatment. *Melanoma Research*. PMID: 19730404.
- Cheng, J., Pautot, S., Weitz, D. A., and Xie, X. S. (2003). Ordering of water molecules between phospholipid bilayers visualized by coherent anti-Stokes raman scattering microscopy. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 100(17):9826–9830.
- Cheng, J. and Xie, X. S. (2004). Coherent Anti-Stokes raman scattering microscopy instrumentation, theory, and applications. *The Journal of Physical Chemistry B*, 108(3):827–840.

- Chenguo, Y., Xiaoqian, H., Chengxiang, L., and Caixin, S. (2009). Window effect of pulsed electric field on biological cells. *Dielectrics and Electrical Insulation, IEEE Transactions on*, 16(5):1259–1266.
- Chimento, P. F., Jurna, M., Bouwmans, H. S. P., Garbacik, E. T., Hartsuiker, L., Otto, C., Herek, J. L., and Offerhaus, H. L. (2009). High-resolution narrowband CARS spectroscopy in the spectral fingerprint region. *Journal of Raman Spectroscopy*, 40(9):1229–1233.
- Craviso, G., Chatterjee, P., Maalouf, G., Cerjanic, A., Yoon, J., Chatterjee, I., and Vernier, P. (2009). Nanosecond electric pulse-induced increase in intracellular calcium in adrenal chromaffin cells triggers calcium-dependent catecholamine release. *IEEE Transactions on Dielectrics and Electrical Insulation*, 16(5):1294–1301.
- Da Silva, C. (2008). *Etudes structurales et vibrationnelle des liaisons hydrogène en solution aqueuse supercritique*. PhD thesis, University Joseph Fourier, Grenoble, France, Grenoble, France.
- Davalos, R. V., Mir, I. L. M., and Rubinsky, B. (2005). Tissue ablation with irreversible electroporation. *Annals of Biomedical Engineering*, 33(2):223–231. PMID: 15771276.
- DeBruin, K. A. and Krassowska, W. (1999). Modeling electroporation in a single cell. i. effects of field strength and rest potential. *Biophysical Journal*, 77(3):1213–1224. PMID: 10465736 PMCID: 1300413.
- Delemotte, L., Dehez, F., Treptow, W., and Tarek, M. (2008). Modeling membranes under a transmembrane potential. *The Journal of Physical Chemistry. B*, 112(18):5547–5550. PMID: 18412411.
- Derjaguin, B. V. and Prokhorov, A. V. (1981). On the theory of the rupture of black films. *Journal of Colloid and Interface Science*, 81(1):108–115.
- Desprat, N., Supatto, W., Pouille, P., Beaurepaire, E., and Farge, E. (2008). Tissue deformation modulates twist expression to determine anterior midgut differentiation in drosophila embryos. *Developmental Cell*, 15(3):470–477. PMID: 18804441.
- Druet, S. and Taran, J. (1981). CARS spectroscopy. *Progress in quantum Electronics*, 7:1–72.
- Du, Q., Freysz, E., and Shen, Y. R. (1994). Surface vibrational spectroscopic studies of hydrogen bonding and hydrophobicity. *Science*, 264:826–828.
- Eing, C., Bonnet, S., Pacher, M., Puchta, H., and Frey, W. (2009). Effects of nanosecond pulsed electric field exposure on arabidopsis thaliana. *IEEE Transactions on Dielectrics and Electrical Insulation*, 16(5):1322–1328.
- Elliott, J. I., Sardini, A., Cooper, J. C., Alexander, D. R., Davanture, S., Chimini, G., and Higgins, C. F. (2006). Phosphatidylserine exposure in b lymphocytes: a role for lipid packing. *Blood*, 108(5):1611–1617. PMID: 16684961.

- Ferreira, E., Potier, E., Logeart-Avramoglou, D., Salomskaite-Davalgiene, S., Mir, L. M., and Petite, H. (2008). Optimization of a gene electrotransfer method for mesenchymal stem cell transfection. *Gene Therapy*, 15(7):537–544. PMID: 18256695.
- Flickinger, B., Berghöfer, T., Hohenberger, P., Eing, C., and Frey, W. (2010). Transmembrane potential measurements on plant cells using the voltage-sensitive dye ANNINE-6. *Protoplasma*, 247(1-2):3–12. PMID: 20309592.
- Fowler Bush, S., Levin, H., and Levin, I. W. (1980). Cholesterol-lipid interactions: An infrared and raman spectroscopic study of the carbonyl stretching mode region of 1,2-dipalmitoyl phosphatidylcholine bilayers. *Chemistry and Physics of Lipids*, 27(2):101–111.
- Frey, W., White, J. A., Price, R. O., Blackmore, P. F., Joshi, R. P., Nuccitelli, R., Beebe, S. J., Schoenbach, K. H., and Kolb, J. F. (2006). Plasma membrane voltage changes during nanosecond pulsed electric field exposure. *Biophysical Journal*, 90(10):3608–3615. PMID: 16513782.
- Fricke, H. (1924). A mathematical treatment of the electric conductivity and capacity of disperse systems i. the electric conductivity of a suspension of homogeneous spheroids. *Physical Review*, 24(5):575.
- Fromm, J. and Lautner, S. (2007). Electrical signals and their physiological significance in plants. *Plant, Cell & Environment*, 30(3):249–257. PMID: 17263772.
- Fu, Y., Wang, H., Shi, R., and Cheng, J. (2006). Characterization of photodamage in coherent anti-Stokes raman scattering microscopy. *Optics Express*, 14(9):3942–3951.
- Gabriel, B. and Teissié, J. (1997). Direct observation in the millisecond time range of fluorescent molecule asymmetrical interaction with the electropermeabilized cell membrane. *Biophysical Journal*, 73(5):2630–2637. PMID: 9370457.
- Gabriel, B. and Teissié, J. (1999). Time courses of mammalian cell electropermeabilization observed by millisecond imaging of membrane property changes during the pulse. *Biophysical Journal*, 76(4):2158–2165. PMID: 10096909.
- Gabriel, C., Gabriel, S., and Corthout, E. (1996a). The dielectric properties of biological tissues: I. literature survey. *Physics in Medicine and Biology*, 41(11):2231–2249. PMID: 8938024.
- Gabriel, S., Lau, R. W., and Gabriel, C. (1996b). The dielectric properties of biological tissues: II. measurements in the frequency range 10 hz to 20 GHz. *Physics in Medicine and Biology*, 41(11):2251–2269. PMID: 8938025.
- Gabriel, S., Lau, R. W., and Gabriel, C. (1996c). The dielectric properties of biological tissues: III. parametric models for the dielectric spectrum of tissues. *Physics in Medicine and Biology*, 41(11):2271–2293. PMID: 8938026.
- Gajda, G. and Stuchly, S. (1983). Numerical analysis of Open-Ended coaxial lines. *Microwave Theory and Techniques, IEEE Transactions on*, 31(5):380–384.

- Galindo, F. G., Dejmek, P., Lundgren, K., Rasmusson, A. G., Vicente, A., and Moritz, T. (2009). Metabolomic evaluation of pulsed electric field-induced stress on potato tissue. *Planta*, 230(3):469–479. PMID: 19495789.
- Galindo, F. G., Vernier, P. T., Dejmek, P., Vicente, A., and Gundersen, M. A. (2008). Pulsed electric field reduces the permeability of potato cell wall. *Bioelectromagnetics*, 29(4):296–301. PMID: 18163439.
- Garner, A. L., Chen, G., Chen, N., Sridhara, V., Kolb, J. F., Swanson, R. J., Beebe, S. J., Joshi, R. P., and Schoenbach, K. H. (2007). Ultrashort electric pulse induced changes in cellular dielectric properties. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 362(1):139–144. PMID: 17706595.
- Garon, E. B., Sawcer, D., Vernier, P. T., Tang, T., Sun, Y., Marcu, L., Gundersen, M. A., and Koeffler, H. P. (2007). In vitro and in vivo evaluation and a case report of intense nanosecond pulsed electric field as a local therapy for human malignancies. *International Journal of Cancer. Journal International Du Cancer*, 121(3):675–682. PMID: 17417774.
- Gimbrone, M A, J., Nagel, T., and Topper, J. N. (1997). Biomechanical activation: an emerging paradigm in endothelial adhesion biology. *The Journal of Clinical Investigation*, 99(8):1809–1813. PMID: 9109423.
- Glaser, R. W., Leikin, S. L., Chernomordik, L. V., Pastushenko, V. F., and Sokirko, A. I. (1988). Reversible electrical breakdown of lipid bilayers: formation and evolution of pores. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, 940(2):275–287.
- Glogauer, M., Lee, W., and McCulloch, C. A. (1993). Induced endocytosis in human fibroblasts by electrical fields. *Experimental Cell Research*, 208(1):232–240. PMID: 8359218.
- Goldspink, G. (1999). Changes in muscle mass and phenotype and the expression of autocrine and systemic growth factors by muscle in response to stretch and overload. *Journal of Anatomy*, 194(Pt 3):323–334. PMID: 10386770 PMCID: 1467932.
- Golzio, M., Teissié, J., and Rols, M. (2002). Direct visualization at the single-cell level of electrically mediated gene delivery. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 99(3):1292–1297. PMID: 11818537 PMCID: 122183.
- Gothelf, A., Mir, L. M., and Gehl, J. (2003). Electrochemotherapy results of cancer treatment using enhanced delivery of bleomycin by electroporation. *Cancer Treatment Reviews*, 29(5):371–387. PMID: 12972356.
- Gowrisanker, S., Quevedo-Lopez, M., Alshareef, H., and Gnade, B. (2009). Time dependent breakdown characteristics of parylene dielectric in metal insulator metal capacitors. *Organic Electronics*, 10(5):1024–1027.
- Gowrishankar, T. R., Esser, A. T., Vasilkoski, Z., Smith, K. C., and Weaver, J. C. (2006). Microdosimetry for conventional and supra-electroporation in cells with organelles. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 341(4):1266–1276.

- Grimnes, S. and Martinsen, r. G. (2008). *Bioimpedance and bioelectricity basics*. Academic Press.
- Gross, D., Loew, L. M., and Webb, W. W. (1986). Optical imaging of cell membrane potential changes induced by applied electric fields. *Biophysical Journal*, 50(2):339–348. PMID: 3741986.
- Gross, E., Bedlack, R S, J., and Loew, L. M. (1994). Dual-wavelength ratiometric fluorescence measurement of the membrane dipole potential. *Biophysical Journal*, 67(1):208–216. PMID: 7918989.
- Haest, C. W., Kamp, D., and Deuticke, B. (1997). Transbilayer reorientation of phospholipid probes in the human erythrocyte membrane. lessons from studies on electroporated and resealed cells. *Biochimica Et Biophysica Acta*, 1325(1):17–33. PMID: 9106480.
- Hart, F. X. (2006). Integrins may serve as mechanical transducers for low-frequency electric fields. *Bioelectromagnetics*, 27(6):505–508. PMID: 16715526.
- Hart, F. X. (2008). The mechanical transduction of physiological strength electric fields. *Bioelectromagnetics*, 29(6):447–455. PMID: 18381594.
- Hart, F. X. (2010). Cytoskeletal forces produced by extremely low-frequency electric fields acting on extracellular glycoproteins. *Bioelectromagnetics*, 31(1):77–84. PMID: 19593781.
- Heinrich, C., Hofer, A., Bernet, S., and Ritsch-Marte, M. (2008a). Coherent anti-Stokes raman scattering microscopy with dynamic speckle illumination. *New Journal of Physics*, 10(2):023029.
- Heinrich, C., Hofer, A., Ritsch, A., Ciardi, C., Bernet, S., and Ritsch-Marte, M. (2008b). Selective imaging of saturated and unsaturated lipids by wide-field CARS-microscopy. *Optics Express*, 16(4):2699–2708.
- Heinrich, C., Meusburger, C., Bernet, S., and Ritsch-Marte, M. (2006). CARS microscopy in a wide-field geometry with nanosecond pulses. *Journal of Raman Spectroscopy*, 37(6):675–679.
- Herzberg, G. and Huber, K. (1950). *Molecular spectra and molecular structure. I. Spectra of diatomic molecules*. Van Nostrand Reinhold.
- Hibino, M., Itoh, H., and Kinoshita Jr, K. (1993). Time courses of cell electroporation as revealed by submicrosecond imaging of transmembrane potential. *Biophysical Journal*, 64(6):1789–1800.
- Hibino, M., Shigemori, M., Itoh, H., Nagayama, K., and Kinoshita Jr, K. (1991). Membrane conductance of an electroporated cell analyzed by submicrosecond imaging of transmembrane potential. *Biophysical Journal*, 59(1):209–220.
- Honig, B. H., Hubbell, W. L., and Flewelling, R. F. (1986). Electrostatic interactions in membranes and proteins. *Annual Review of Biophysics and Biophysical Chemistry*, 15:163–193. PMID: 2424473.

- Israelachvili, J. N. (1992). *Intermolecular and Surface Forces, Second Edition: With Applications to Colloidal and Biological Systems*. Academic Press, 2 edition.
- Ivorra, A. (2010). Tissue electroporation as a bioelectric phenomenon: Basic concepts. In Rubinsky, B., editor, *Irreversible Electroporation*, pages 23–61. Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg.
- Ivorra, A., Al-Sakere, B., Rubinsky, B., and Mir, L. M. (2009). In vivo electrical conductivity measurements during and after tumor electroporation: conductivity changes reflect the treatment outcome. *Physics in Medicine and Biology*, 54(19):5949–5963. PMID: 19759406.
- Ivorra, A., Genescà, M., Sola, A., Palacios, L., Villa, R., Hotter, G., and Aguiló, J. (2005). Bioimpedance dispersion width as a parameter to monitor living tissues. *Physiological Measurement*, 26(2):S165–S173.
- Ivorra, A. and Rubinsky, B. (2007). In vivo electrical impedance measurements during and after electroporation of rat liver. *Bioelectrochemistry (Amsterdam, Netherlands)*, 70(2):287–295. PMID: 17140860.
- Ivorra, A., Villemejane, J., and Mir, L. M. (2010). Electrical modeling of the influence of medium conductivity on electroporation. *Physical Chemistry Chemical Physics*, 12(34):10055.
- Janmey, P. and Kinnunen, P. (2006). Biophysical properties of lipids and dynamic membranes. *Trends in Cell Biology*, 16(10):538–546.
- Jeyamkondan, S., Jayas, D. S., and Holley, R. A. (1999). Pulsed electric field processing of foods: a review. *Journal of Food Protection*, 62(9):1088–1096. PMID: 10492486.
- Kinosita, K., Ashikawa, I., Saita, N., Yoshimura, H., Itoh, H., Nagayama, K., and Ikegami, A. (1988). Electroporation of cell membrane visualized under a pulsed-laser fluorescence microscope. *Biophysical Journal*, 53(6):1015–1019. PMID: 3395657 PMID: 1330281.
- Kotnik, T., Miklavcic, D., and Slivnik, T. (1998). Time course of transmembrane voltage induced by Time-Varying electric fields—a method for theoretical analysis and its application.
- Krassowska, W. and Filev, P. D. (2007). Modeling electroporation in a single cell. *Biophysical Journal*, 92(2):404–417. PMID: 17056739.
- Landau, L. D., Pitaevskii, L. P., and Lifshitz, E. (1984). *Electrodynamics of Continuous Media, Second Edition: Volume 8*. Butterworth-Heinemann, 2 edition.
- Lei, M., Winterhalder, M., Selm, R., and Zumbusch, A. (2011). Video-rate wide-field coherent anti-Stokes raman scattering microscopy with collinear nonphase-matching illumination. *Journal of Biomedical Optics*, 16(2):021102. PMID: 21361665.
- Lentz, B. R. (1994). Polymer-induced membrane fusion: potential mechanism and relation to cell fusion events. *Chemistry and Physics of Lipids*, 73(1-2):91–106.

- Leontiadou, H., Mark, A. E., and Marrink, S. J. (2004). Molecular dynamics simulations of hydrophilic pores in lipid bilayers. *Biophysical Journal*, 86(4):2156–2164. PMID: 15041656 PMCID: 1304067.
- Levenson, M. D. and Kano, S. (1988). *Introduction to nonlinear laser spectroscopy*. Academic Press.
- Leventis, P. A. and Grinstein, S. (2010). The distribution and function of phosphatidylserine in cellular membranes. *Annual Review of Biophysics*, 39:407–427. PMID: 20192774.
- Levine, Z. A. and Vernier, P. T. (2010). Life cycle of an electropore: field-dependent and field-independent steps in pore creation and annihilation. *The Journal of Membrane Biology*, 236(1):27–36. PMID: 20623350.
- Lin-Vien, D., Colthup, N. B., Fateley, W. G., and Grasselli, J. G. (1991). *The Handbook of Infrared and Raman Characteristic Frequencies of Organic Molecules*. Academic Press, 1st edition.
- Lojewska, Z., Farkas, D. L., Ehrenberg, B., and Loew, L. M. (1989). Analysis of the effect of medium and membrane conductance on the amplitude and kinetics of membrane potentials induced by externally applied electric fields. *Biophysical Journal*, 56(1):121–128. PMID: 2752081 PMCID: 1280457.
- Lopez, A., Rols, M. P., and Teissie, J. (1988). ³¹P NMR analysis of membrane phospholipid organization in viable, reversibly electroporated chinese hamster ovary cells. *Biochemistry*, 27(4):1222–1228. PMID: 3365382.
- Maréchal, Y. (2011). The molecular structure of liquid water delivered by absorption spectroscopy in the whole IR region completed with thermodynamics data. *Journal of Molecular Structure*, (0).
- Martin, R., Quintana, J. J., Ramos, A., and de la Nuez, I. (2008). Modeling electrochemical double layer capacitor, from classical to fractional impedance. In *MELECON 2008 - The 14th IEEE Mediterranean Electrotechnical Conference*, pages 61–66, Ajaccio, France.
- Marty, M. (2006). Electrochemotherapy - an easy, highly effective and safe treatment of cutaneous and subcutaneous metastases: Results of ESOPE (European standard operating procedures of electrochemotherapy) study. *EJC Supplement*, 4:3–13.
- McGuire, J. A. (2006). Ultrafast vibrational dynamics at water interfaces. *Science*, 313:1945–1948.
- McLaughlin, S. (1989). The electrostatic properties of membranes. *Annual Review of Biophysics and Biophysical Chemistry*, 18:113–136. PMID: 2660821.
- Mendelsohn, R., Sunder, S., and Bernstein, H. (1975). Structural studies of biological membranes and related model systems by raman spectroscopy. sphingomyelin and 1,2-dilauroyl phosphatidylethanolamine. *Biochimica Et Biophysica Acta*, 413(3):329–340. PMID: 1238123.

- Mir, L. M. (2009). Nucleic acids electrotransfer-based gene therapy (electrogenetherapy): past, current, and future. *Molecular Biotechnology*, 43(2):167–176. PMID: 19562526.
- Mir, L. M., Banoun, H., and Paoletti, C. (1988). Introduction of definite amounts of non-permeant molecules into living cells after electroporation: Direct access to the cytosol. *Experimental Cell Research*, 175(1):15–25.
- Mir, L. M., Tounekti, O., and Orlowski, S. (1996). Bleomycin revival of an old drug. *General Pharmacology*, 27(5):745–748. PMID: 8842674.
- Müller, K. J., Sukhorukov, V. L., and Zimmermann, U. (2001). Reversible electroporation of mammalian cells by high-intensity, ultra-short pulses of submicrosecond duration. *The Journal of Membrane Biology*, 184(2):161–170. PMID: 11719852.
- Murray, D., Arbuzova, A., Honig, B., McLaughlin, S., and Sidney A. Simon, T. J. M. (2002). The role of electrostatic and nonpolar interactions in the association of peripheral proteins with membranes. In *Peptide-Lipid Interactions*, volume Volume 52, pages 277–298, IN1–IN3, 299–307. Academic Press.
- Murray, D., Ben-Tal, N., Honig, B., and McLaughlin, S. (1997). Electrostatic interaction of myristoylated proteins with membranes: simple physics, complicated biology. *Structure*, 5(8):985–989.
- Needham, D. and Hochmuth, R. M. (1989). Electro-mechanical permeabilization of lipid vesicles. role of membrane tension and compressibility. *Biophysical Journal*, 55(5):1001–1009. PMID: 2720075 PMCID: 1330536.
- Nesin, O. M., Pakhomova, O. N., Xiao, S., and Pakhomov, A. G. (2011). Manipulation of cell volume and membrane pore comparison following single cell permeabilization with 60- and 600-ns electric pulses. *Biochimica Et Biophysica Acta*, 1808(3):792–801. PMID: 21182825.
- Neu, J. C. and Krassowska, W. (1999). Asymptotic model of electroporation. *Physical Review E*, 59(3):3471.
- Neumann, E. (1992). Membrane electroporation and direct gene transfer. *Bioelectrochemistry and Bioenergetics*, 28(1-2):247–267.
- Neumann, E. and Rosenheck, K. (1972). Permeability changes induced by electric impulses in vesicular membranes. *The Journal of Membrane Biology*, 10(3):279–290. PMID: 4667921.
- Neumann, E., Schaefer-Ridder, M., Wang, Y., and Hofschneider, P. H. (1982). Gene transfer into mouse lymphoma cells by electroporation in high electric fields. *The EMBO Journal*, 1(7):841–845. PMID: 6329708.
- Nuccitelli, R., Chen, X., Pakhomov, A. G., Baldwin, W. H., Sheikh, S., Pomietter, J. L., Ren, W., Osgood, C., Swanson, R. J., Kolb, J. F., Beebe, S. J., and Schoenbach, K. H. (2009). A new pulsed electric field therapy for melanoma disrupts the tumor’s blood supply and causes complete remission without recurrence. *International Journal of Cancer. Journal International Du Cancer*, 125(2):438–445. PMID: 19408306.

- Nuccitelli, R., Pliquett, U., Chen, X., Ford, W., James Swanson, R., Beebe, S. J., Kolb, J. F., and Schoenbach, K. H. (2006). Nanosecond pulsed electric fields cause melanomas to self-destruct. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 343(2):351–360.
- Nuccitelli, R., Tran, K., Sheikh, S., Athos, B., Kreis, M., and Nuccitelli, P. (2010). Optimized nanosecond pulsed electric field therapy can cause murine malignant melanomas to self-destruct with a single treatment. *International Journal of Cancer. Journal International Du Cancer*, 127(7):1727–1736. PMID: 20473857.
- Orlowski, S., Belehradek, J. J., Paoletti, C., and Mir, L. M. (1988). Transient electroporation of cells in culture. increase of the cytotoxicity of anticancer drugs. *Biochemical Pharmacology*, 37(24):4727–4733. PMID: 2462423.
- Pai, S. T. and Zhang, Q. (1995). *Introduction to high power pulse technology*. World Scientific.
- Pakhomov, A. G., Bowman, A. M., Ibey, B. L., Andre, F. M., Pakhomova, O. N., and Schoenbach, K. H. (2009). Lipid nanopores can form a stable, ion channel-like conduction pathway in cell membrane. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 385(2):181–186.
- Pakhomov, A. G., Miklavcic, D., and Markov, M. S. (2010). *Advanced Electroporation Techniques in Biology and Medicine*. CRC Press.
- Pakhomov, A. G., Phinney, A., Ashmore, J., Walker, K., Kolb, J. F., Kono, S., Schoenbach, K., and Murphy, M. (2004). Characterization of the cytotoxic effect of high-intensity, 10-ns duration electrical pulses. *Plasma Science, IEEE Transactions on*, 32(4):1579–1586.
- Pakhomov, A. G., Shevin, R., White, J. A., Kolb, J. F., Pakhomova, O. N., Joshi, R. P., and Schoenbach, K. H. (2007). Membrane permeabilization and cell damage by ultrashort electric field shocks. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 465(1):109–118. PMID: 17555703.
- Pakhomova, O. N., Gregory, B. W., Khorokhorina, V. A., Bowman, A. M., Xiao, S., and Pakhomov, A. G. (2011). Electroporation-induced electrosensitization. *PloS One*, 6(2):e17100. PMID: 21347394.
- Perny, G., Lavielle, L., Laville Saint Martin, B., and Sarroca, M. (1972). Propriétés diélectriques de couches minces quasi amorphes d’oxydes métalliques pulvérisés. *Thin Solid Films*, 10(2):173–183.
- Piejak, R., Godyak, V., and Alexandrovich, B. (2001). Validation of current density measurements with a b-dot probe.
- Pimentel, G. C. and McClellan, A. L. (1960). *The hydrogen bond*. W.H. Freeman.
- Poddevin, B., Orlowski, S., Belehradek, J. J., and Mir, L. M. (1991). Very high cytotoxicity of bleomycin introduced into the cytosol of cells in culture. *Biochemical Pharmacology*, 42 Suppl:S67–75. PMID: 1722669.

- Potma, E. O. and Xie, X. S. (2003). Detection of single lipid bilayers with coherent anti stokes raman scattering (CARS) microscopy. *Journal of Raman Spectroscopy*, 34(9):642–650.
- Pucihar, G., Kotnik, T., Kanduser, M., and Miklavcic, D. (2001). The influence of medium conductivity on electropermeabilization and survival of cells in vitro. *Bioelectrochemistry (Amsterdam, Netherlands)*, 54(2):107–115. PMID: 11694390.
- Pucihar, G., Mir, L. M., and Miklavcic, D. (2002). The effect of pulse repetition frequency on the uptake into electropermeabilized cells in vitro with possible applications in electrochemotherapy. *Bioelectrochemistry*, 57(2):167–172.
- Rauch, C. and Farge, E. (2000). Endocytosis switch controlled by transmembrane osmotic pressure and phospholipid number asymmetry. *Biophysical Journal*, 78(6):3036–3047. PMID: 10827982.
- Raucher, D. and Sheetz, M. P. (1999). Membrane expansion increases endocytosis rate during mitosis. *The Journal of Cell Biology*, 144(3):497–506. PMID: 9971744.
- Reed Edgel, W. (1980). Prodyn application note 895. primer on electromagnetic field measurements.
- Riske, K. A. and Dimova, R. (2005). Electro-deformation and poration of giant vesicles viewed with high temporal resolution. *Biophysical Journal*, 88(2):1143–1155. PMID: 15596488.
- Rols, M. and Teissié, J. (1998). Electropermeabilization of mammalian cells to macromolecules: Control by pulse duration. *Biophysical Journal*, 75(3):1415–1423.
- Rols, M. P., Delteil, C., Golzio, M., and Teissié, J. (1998). Control by ATP and ADP of voltage-induced mammalian-cell-membrane permeabilization, gene transfer and resulting expression. *European Journal of Biochemistry / FEBS*, 254(2):382–388. PMID: 9660195.
- Rols, M. P., Femenia, P., and Teissie, J. (1995). Long-lived macropinocytosis takes place in electropermeabilized mammalian cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 208(1):26–35. PMID: 7887937.
- Rols, M. P. and Teissié, J. (1990). Electropermeabilization of mammalian cells. quantitative analysis of the phenomenon. *Biophysical Journal*, 58(5):1089–1098. PMID: 2291935.
- Rostand, E. (1959). *Cyrano de Bergerac*. Bantam Classics, 1st bantam edition, 1st printing edition.
- Salimi, E., Bridges, G. E., and Thomson, D. J. (2010). The effect of dielectric relaxation in nanosecond pulse electroporation of biological cells. In *2010 14th International Symposium on Antenna Technology and Applied Electromagnetics & the American Electromagnetics Conference*, pages 1–4, Ottawa, ON, Canada.

- Saulis, G., Rodaite-Riseviciene, R., and Snitka, V. (2007). Increase of the roughness of the stainless-steel anode surface due to the exposure to high-voltage electric pulses as revealed by atomic force microscopy. *Bioelectrochemistry (Amsterdam, Netherlands)*, 70(2):519–523. PMID: 17289442.
- Scatena, L. F., Brown, M. G., and Richmond, G. L. (2001). Water at hydrophobic surfaces: Weak hydrogen bonding and strong orientation effects. *Science*, 292(5518):908–912.
- Schneuwly, A., Gröning, P., Schlapbach, L., Brüesch, P., Carlen, M., and Gallay, R. (1998). Temperature-dependent dielectric breakdown strength of oil impregnated polypropylene foils. *Materials Science and Engineering: B*, 54(3):182–188.
- Schoenbach, K., Joshi, R., Beebe, S., and Baum, C. (2009). A scaling law for membrane permeabilization with nanopulses. *IEEE Transactions on Dielectrics and Electrical Insulation*, 16(5):1224–1235.
- Schoenbach, K. H., Beebe, S. J., and Buescher, E. S. (2001). Intracellular effect of ultrashort electrical pulses. *Bioelectromagnetics*, 22(6):440–448.
- Schultheiss, C., Bluhm, H., Mayer, H., Kern, M., Michelberger, T., and Witte, G. (2002). Processing of sugar beets with pulsed-electric fields. *IEEE Transactions on Plasma Science*, 30:1547–1551.
- Sersa, G., Kranjc, S., Scancar, J., Krzan, M., and Cemazar, M. (2010). Electrochemotherapy of mouse sarcoma tumors using electric pulse trains with repetition frequencies of 1 Hz and 5 kHz. *The Journal of Membrane Biology*, 236(1):155–162. PMID: 20607223.
- Shechter, E. (2004). *Biochimie et biophysique des membranes - Aspect structuraux et fonctionnels, 2ème édition*. Dunod.
- Shirakashi, R., Sukhorukov, V. L., Tanasawa, I., and Zimmermann, U. (2004). Measurement of the permeability and resealing time constant of the electroporated mammalian cell membranes. *International Journal of Heat and Mass Transfer*, 47(21):4517–4524.
- Silve, A., Vezinet, R., and Mir, L. M. (2010). Implementation of a broad band, high level electric field sensor in biological exposure device. pages 711–714.
- Simons, K. and Vaz, W. L. C. (2004). Model systems, lipid rafts, and cell membranes. *Annual Review of Biophysics and Biomolecular Structure*, 33:269–295. PMID: 15139814.
- Smith, K. C., Neu, J. C., and Krassowska, W. (2004). Model of creation and evolution of stable electropores for DNA delivery. *Biophysical Journal*, 86(5):2813–2826. PMID: 15111399 PMID: 1304151.
- Sovago, M., Kramer Campen, R., Bakker, H. J., and Bonn, M. (2009). Hydrogen bonding strength of interfacial water determined with surface sum-frequency generation. *Chemical Physics Letters*, 470(1-3):7–12.
- Stampfli, R. (1958). Reversible electrical breakdown of the excitable membrane of a ranvie node. *Ann. Acad. Brasil. Cien.*, (30):57–63.

- Stulen, G. (1981). Electric field effects on lipid membrane structure. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, 640(3):621–627.
- Sukhorukov, V. L., Imes, D., Woellhaf, M. W., Andronic, J., Kiesel, M., Shirakashi, R., Zimmermann, U., and Zimmermann, H. (2009). Pore size of swelling-activated channels for organic osmolytes in jurkat lymphocytes, probed by differential polymer exclusion. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, 1788(9):1841–1850.
- Sukhorukov, V. L., Mussauer, H., and Zimmermann, U. (1998). The effect of electrical deformation forces on the electroporation of erythrocyte membranes in low- and high-conductivity media. *The Journal of Membrane Biology*, 163(3):235–245. PMID: 9625780.
- Tarek, M. (2005). Membrane electroporation: a molecular dynamics simulation. *Biophysical Journal*, 88(6):4045–4053. PMID: 15764667.
- Teissie, J. (2007). Biophysical effects of electric fields on membrane water interfaces: a mini review. *European Biophysics Journal*, 36(8):967–972.
- Teissie, J. and Rols, M. P. (1994). Manipulation of cell cytoskeleton affects the lifetime of cell membrane electroporation. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 720:98–110. PMID: 8010657.
- Teissie, J. and Tsong, T. Y. (1981). Electric field induced transient pores in phospholipid bilayer vesicles. *Biochemistry*, 20(6):1548–1554. PMID: 6261800.
- Tieleman, D. P. (2004). The molecular basis of electroporation. *BMC Biochemistry*, 5:10. PMID: 15260890.
- Tolles, W. M., Nibler, J. W., McDonald, J. R., and Harvey, A. B. (1977). A review of the theory and application of coherent Anti-Stokes raman spectroscopy (CARS). *Applied Spectroscopy*, 31(4):253–271.
- Tounekti, O., Belehradec, J. J., and Mir, L. M. (1995). Relationships between DNA fragmentation, chromatin condensation, and changes in flow cytometry profiles detected during apoptosis. *Experimental Cell Research*, 217(2):506–516. PMID: 7535239.
- Tounekti, O., Pron, G., Belehradec, J. J., and Mir, L. M. (1993). Bleomycin, an apoptosis-mimetic drug that induces two types of cell death depending on the number of molecules internalized. *Cancer Research*, 53(22):5462–5469. PMID: 7693342.
- Towhidi, L., Kotnik, T., Pucihar, G., Firoozabadi, S. M. P., Mozdarani, H., and Miklavcic, D. (2008). Variability of the minimal transmembrane voltage resulting in detectable membrane electroporation. *Electromagnetic Biology and Medicine*, 27(4):372–385. PMID: 19037786.
- Toytman, I., Cohn, K., Smith, T., Simanovskii, D., and Palanker, D. (2007). Wide-field coherent anti-Stokes raman scattering microscopy with non-phase-matching illumination. *Optics Letters*, 32(13):1941–1943.

- Toytman, I., Simanovskii, D., and Palanker, D. (2009). On illumination schemes for wide-field CARS microscopy. *Optics Express*, 17(9):7339–7347.
- Tu, A. (1982). *Raman spectroscopy in biology : principles and applications*. Wiley, New York.
- Ulmer, H. M., Heinz, V., Gänzle, M. G., Knorr, D., and Vogel, R. F. (2002). Effects of pulsed electric fields on inactivation and metabolic activity of *Lactobacillus plantarum* in model beer. *Journal of Applied Microbiology*, 93(2):326–335. PMID: 12147082.
- Vartiainen, E. M., Rinia, H. A., Muller, M., and Bonn, M. (2006). Direct extraction of raman line-shapes from congested CARS spectra. *Optics Express*, 14(8):3622–3630.
- Vernier, P., Thu, M., Marcu, L., Craft, C., and Gundersen, M. (2004a). Nanosecond electroperturbation; mammalian cell sensitivity and bacterial spore resistance. *IEEE Transactions on Plasma Science*, 32(4):1620–1625.
- Vernier, P. T., Levine, Z. A., Wu, Y., Joubert, V., Ziegler, M. J., Mir, L. M., and Tieleman, D. P. (2009). Electroporating fields target oxidatively damaged areas in the cell membrane. *PloS One*, 4(11):e7966. PMID: 19956595.
- Vernier, P. T., Sun, Y., Chen, M., Gundersen, M. A., and Craviso, G. L. (2008). Nanosecond electric pulse-induced calcium entry into chromaffin cells. *Bioelectrochemistry (Amsterdam, Netherlands)*, 73(1):1–4. PMID: 18407807.
- Vernier, P. T., Sun, Y., and Gundersen, M. A. (2006). Nanoelectropulse-driven membrane perturbation and small molecule permeabilization. *BMC Cell Biology*, 7:37. PMID: 17052354.
- Vernier, P. T., Sun, Y., Marcu, L., Craft, C. M., and Gundersen, M. A. (2004b). Nanoelectropulse-induced phosphatidylserine translocation. *Biophysical Journal*, 86(6):4040–4048. PMID: 15189899.
- Vernier, P. T., Sun, Y., Marcu, L., Craft, C. M., and Gundersen, M. A. (2004c). Nanosecond pulsed electric fields perturb membrane phospholipids in t lymphoblasts. *FEBS Letters*, 572(1-3):103–108. PMID: 15304332.
- Vernier, P. T., Sun, Y., Marcu, L., Salemi, S., Craft, C. M., and Gundersen, M. A. (2003). Calcium bursts induced by nanosecond electric pulses. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 310(2):286–295. PMID: 14521908.
- Volkmer, A. (2005). Vibrational imaging and microspectroscopies based on coherent anti-Stokes raman scattering microscopy. *Journal of Physics D: Applied Physics*, 38(5):R59–R81.
- Voronin, A. A. and Zheltikov, A. M. (2010). Ionization penalty in nonlinear optical bioimaging. *Physical Review E*, 81(5):051918.
- Weaver, J. C. (1995). Electroporation theory. concepts and mechanisms. *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)*, 55:3–28. PMID: 8528421.

- Wegner, L. H., Flickinger, B., Eing, C., Berghöfer, T., Hohenberger, P., Frey, W., and Nick, P. (2011). A patch clamp study on the electro-permeabilization of higher plant cells: Supra-physiological voltages induce a high-conductance, k^+ selective state of the plasma membrane. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, 1808(6):1728–1736.
- Whitehead, J., Vignjevic, D., Fütterer, C., Beaurepaire, E., Robine, S., and Farge, E. (2008). Mechanical factors activate beta-catenin-dependent oncogene expression in APC mouse colon. *HFSP Journal*, 2(5):286–294. PMID: 19404440.
- Wong, T. K. and Neumann, E. (1982). Electric field mediated gene transfer. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 107(2):584–587. PMID: 7126230.
- Wozniak, M. A. and Chen, C. S. (2009). Mechanotransduction in development: a growing role for contractility. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, 10(1):34–43. PMID: 19197330.
- Zhang, J., Blackmore, P. F., Hargrave, B. Y., Xiao, S., Beebe, S. J., and Schoenbach, K. H. (2008). Nanosecond pulse electric field (nanopulse): a novel non-ligand agonist for platelet activation. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 471(2):240–248. PMID: 18177729.
- Zumbusch, A., Holtom, G. R., and Xie, X. S. (1999). Three dimensional vibrational imaging by coherent Anti-Stokes raman scattering. *Physical Review Letters*, 82(20):4142.
- Annexe A

Annexe A

Impact de l'usure des cuvettes sur le transfert de gène

Au cours d'expériences sur le transfert de gènes, il nous est apparu que la fluctuation du niveau d'expression de la luciférase après un électrotransfert classique était corrélée à l'usure des cuvettes. En effet, plus les cuvettes étaient usées, plus les niveaux de base de luciférase chutaient. Afin de vérifier cette observation, nous avons utilisé volontairement des cuvettes avant de procéder à un électrotransfert classique. L'usure de ces cuvettes a été contrôlée, en parallèle, de façon indirecte, par mesure d'impédance.

A.1 Contrôle de l'usure des cuvettes par mesure d'impédance

A basse fréquence, l'impédance d'une interface électrode/électrolyte est imposée non pas par la solution elle-même mais par la couche d'ions qui se crée en regard de l'électrode (Couche de Nerst). Il en résulte un comportement en basse fréquence globalement capacitif, modulé par un coefficient de Cole-cole α (sans unité) compris entre 0 et 1. L'impédance basse-fréquence peut donc être écrite comme indiquée dans l'équation A.1.

$$Z_{BF} = \frac{1}{j.C.\omega}{}^\alpha \quad (\text{A.1})$$

Le coefficient de Cole-cole, toutes choses étant conservées par ailleurs, reflète l'état de surface des électrodes. Plus le coefficient de Cole-cole sera proche de 1, plus la surface sera lisse. Inversement, une électrode présentant beaucoup d'irrégularités aura un coefficient de Cole-cole proche de 0. Dans la représentation

de Nyquist inversée¹, une augmentation du coefficient de Cole-cole se traduit par une augmentation de la pente de l'impédance. Le cas $\alpha = 1$, le pur condensateur, correspond à une pente infinie (droite verticale) et le cas $\alpha = 0$, la résistance pure, à une pente nulle (droite horizontale). De façon plus générale, le coefficient de Cole-cole peut être déduit de la pente p de l'impédance grâce à la relation A.2.

$$\alpha = \frac{2}{\pi} \arctan(p) \quad (\text{A.2})$$

Afin de tester l'usure engendrée par nos propres expériences, les cuvettes ont été exposées à un nombre important d'impulsions électriques microsecondes ou nanosecondes. L'usure des cuvettes est réalisée en remplissant les cuvettes avec 60 μl de PBS et en appliquant des impulsions. Les trois groupes de cuvettes considérés sont :

- des cuvettes neuves (cuvette STD 1 mm)
- des cuvettes usées par l'application de 6×20 micropulses de 100 μs à 1 Hz et 125 V/mm ce qui correspond à l'usure des cuvettes après 20 à 30 expériences classiques d'électrotransfert. Le calcul des charges injectées donne environ 2250 C/m².
- des cuvettes usées par l'application de 3000 impulsions nanosecondes de 4 kV/mm (générateur A) appliquées à 10 Hz. Le calcul des charges injectées donne environ 180 C/m².

La figure A.1 présente les impédances moyennes mesurées dans ces cuvettes remplies avec 100 μL de PBS. Le PBS sert ici de simple électrolyte afin de mesurer le comportement capacitif basse fréquence. Il apparaît sur la figure que les cuvettes préalablement exposées à des impulsions électriques ont un coefficient de Cole-cole plus petit. Les valeurs moyennes et écarts type sur 3 cuvettes par groupes sont :

- Cuvettes neuves : $\alpha = 0,91 \pm 0,01$
- Cuvettes usées par micropulses $\alpha = 0,87 \pm 0,01$
- Cuvettes usées par nanopulses $\alpha = 0,89 \pm 0,01$

¹Représentation de Nyquist inversée : opposé de la partie imaginaire en fonction de la partie réelle

Ainsi, les deux types d'impulsions engendrent une usure. Dans ces conditions précises, l'usure est plus importante avec les micropulses qu'avec les nanopulses, c'est à dire dans la condition qui correspond à la plus grande quantité de coulombs injectée.

Si l'on considère que la variation du coefficient de Cole-cole est attribuable uniquement aux changements d'état de surface, alors les présents résultats indiquent que nos conditions expérimentales augmente la rugosité des électrodes. Ce résultat est peu surprenant car l'attaque électrochimique des électrodes aluminium a déjà été rapportée et mesurée au microscope à force atomique Saulis *et al.* (2007). Les impulsions longues (100 μ s) et courtes (10 ns) induisent toutes les deux de l'usure. Il est par ailleurs connu que les réactions électrochimiques sur l'aluminium sont responsables d'un dépôt d'alumine, matériau isolant qui peut également modifier le coefficient de Cole-cole de la capacité électrochimique. La modification du coefficient de Cole-cole dans nos conditions peut-être une combinaison des deux phénomènes.

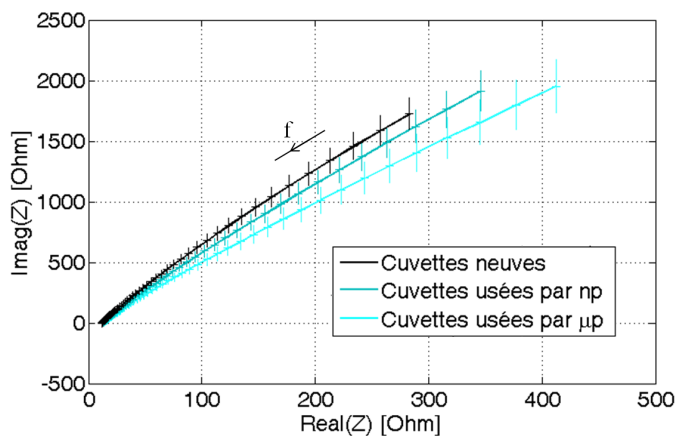


FIG. A.1 : Impédances de cuvettes d'électroporation neuves et usées dans le diagramme de Nyquist. Chaque condition a été testée sur trois cuvettes. Les moyennes et les écart types des trois mesures sont représentées sur le graphique. Le sens des fréquences est indiqué par la flèche. Les impédances sont représentées de 100 Hz à 1 MHz.

A.2 Impact de l'usure sur l'électrotransfert

Les cuvettes décrites ci dessus ont été utilisées pour une expérience d'électrotransfert de plasmide. Les conditions de l'électrotransfert sont les suivantes:

- Milieu SMEM
- 17.10^6 cellules/mL
- 60 μL de solution par cuvette
- 2 μg de plasmide pcMV-Luc par cuvette
- 4 micropulses de 100 μs , 125 V/mm et une impulsion électrophorétique de 20 V/mm et 5 ms.

La transfection est évaluée 24 h après l'électrotransfert, par quantification de la luciférase et quantification des protéines totales par échantillon. Les résultats sont rapportés dans le tableau A.1. Par ailleurs, le courant délivré par le cliniporator pendant la première impulsion de 100 μs est relevé (tableau A.1).

TAB. A.1 : *Impact de l'usure des cuvettes*

	Cuvettes neuves	Cuvettes usées par nanopulses	Cuvettes usées par micropulses
Cole-cole	$0,91 \pm 0.01$	$0,89 \pm 0.01$	$0,87 \pm 0.01$
Courant (A)	$5,1 \pm 0.1$	$5,0 \pm 0.2$	$4,7 \pm 0.1$
Luciférase (pg/mL)	$4,92 \pm 0.15$	$3,86 \pm 0,36$	$2,89 \pm 0.60$
Protéines totales ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	2087 ± 38	2189 ± 34	2120 ± 50

Il apparaît que l'usure des cuvettes n'affecte pas la quantité de protéines totales dans les échantillons, ce qui suggère que la viabilité n'est pas affectée. En revanche, la quantité de luciférase produite est fortement modifiée. Plus les cuvettes sont usées et moins la transfection apparaît efficace. Cette expérience souligne le fait que l'usure des cuvettes influence l'efficacité de la transfection. Les raisons exactes de l'influence de l'état de surface n'ont pas été investiguées. Cependant, on observe une diminution du courant traversant l'échantillon lorsque les cuvettes sont usées. Il est possible que la capacité électrochimique due à la rugosité des électrodes, ou un dépôt d'alumine, encaissent une partie du champ appliqué ce qui a pour résultat un champ moins élevé au niveau des cellules.

Annexe B

Influence du type de cuvette sur les résultats biologiques

Nous avons abordé dans le chapitre 2 les différences de propriétés électriques entre les cuvettes MBP (Molecular BioProduct, Dutcher, Issy les moulineaux, France) et STD (Cell Projects, Dutcher, Issy les moulineaux, France). En terme de résultats biologiques, nous avons observé des différences d'effets en fonction du type de cuvettes utilisées. De manière générale, il apparaît que les effets des impulsions nanosecondes sont plus marqués dans les cuvettes MBP. Cette annexe présente un exemple d'expérience conduite dans les deux types de cuvettes.

L'expérience consiste à déterminer l'impact d'impulsions de 10 ns sur la viabilité cellulaire (voir chapitre 4). Elle est conduite avec le générateur C. Deux cuvettes (distance inter-électrodes 1 mm) contenant des cellules dans du STM ou du S-MEM sont exposées simultanément en série. L'expérience a été conduite soit avec des cuvettes MBP remplies avec 150 μL de milieu, soit avec des cuvettes STD remplies avec 200 μL . Les volumes des milieux ont été choisis afin de recouvrir les électrodes et ainsi d'éviter les phénomènes de claquage. Les tensions appliquées évaluées au D-dot sont présentées sur la figure B.1. Il apparaît que dans ces conditions, les amplitudes de tension sont légèrement plus intenses dans les cuvettes STD.

Les résultats des expériences d'efficacité pour un nombre variable d'impulsions sont présentés sur les figures B.2 et B.3. Les cellules exposées dans le S-MEM ne sont pas affectées par les impulsions dans ces conditions ce qui ne permet pas de comparer les deux types de cuvettes entre elles. En revanche, les cellules exposées dans le STM sont affectées. Dans les cuvettes STD, 10 impulsions sont nécessaires pour induire environ 50% de mortalité alors que dans les cuvettes MBP une seule impulsion suffit à tuer 40% des cellules. Les effets sont donc plus marqués dans les cuvettes MBP bien que le niveau de tension soit a priori plus faible de 20%.

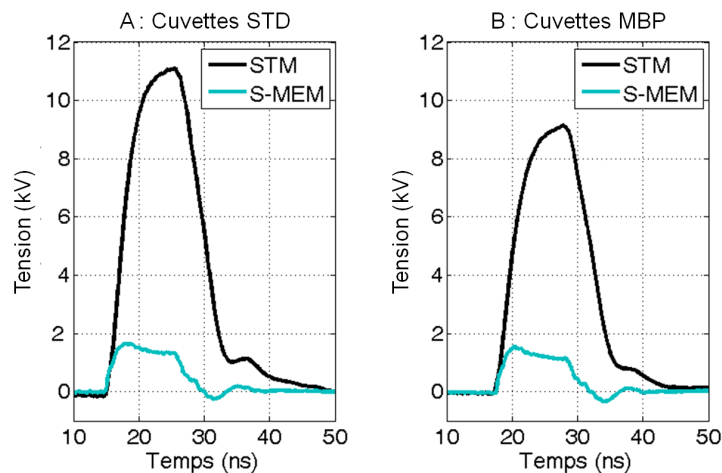


FIG. B.1 : Mesures au capteur de champ sur des cuvettes contenant du STM ou du S-MEM, exposées en série. A- Cuvettes STD remplies avec $200\ \mu\text{L}$ B- Cuvettes MBP remplies avec $150\ \mu\text{L}$.

Nous n'avons pas cherché précisément la différence entre les deux types de cuvettes. Il semblerait cependant que la distance inter-électrodes soit légèrement inférieure dans les cuvettes MBP. Ainsi, la valeur que nous établissons pour le champ électrique dans les cuvettes MBP est peut-être sous évaluée. Les irrégularités d'état de surface (présentées dans la section 2.4.4) peuvent également un rôle.

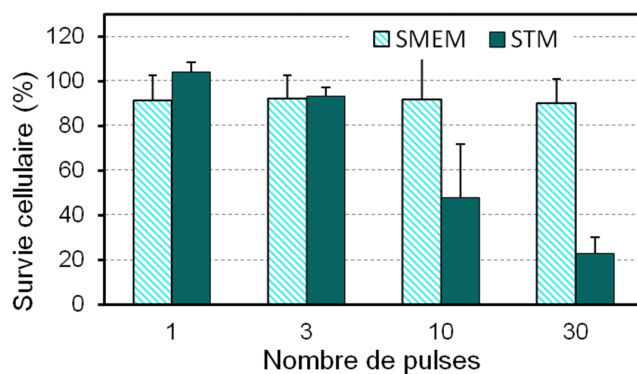


FIG. B.2 : Viabilité en fonction du nombre d'impulsions dans des cuvettes STD. Les impulsions sont celles de la figure B.1-A. Elles sont appliquées à 10 Hz. Les résultats sont la moyenne de 3 expériences \pm écart-type.

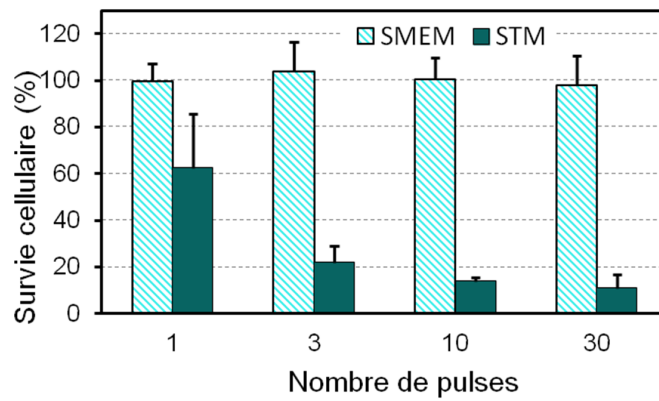


FIG. B.3 : Viabilité en fonction du nombre d'impulsions dans des cuvettes MPB. Les impulsions sont celles de la figure B.1-B. Elles sont appliquées à 10 Hz. Les résultats sont la moyenne de 3 expériences \pm écart-type.

Annexe C

Implementation of a broad band, high level electric field sensor in biological exposure device

Article publié dans les proceedings de IEEE International Power Modulator and High Voltage Conference (2010 IPMHVC), Atlanta, Georgia, USA, May 23-27, 2010.

Cet article détaille le fonctionnement et les caractéristiques d'un capteur de champ de type D-dot implanté dans un dispositif d'exposition.

Implementation of a Broad Band, High Level Electric Field Sensor in Biological Exposure Device

Aude Silve, Lluís M. Mir
CNRS, UMR 8023, Institut Gustave Roussy
Villejuif, France
aude.silve@ens-cachan.fr

René Vézinet
CEA, Centre de Gramat
Gramat, France

Abstract— A great interest has recently emerged concerning the interactions between nanosecond electric pulses and biological cells. The duration of the pulses currently used ranges from a few nanoseconds to a few hundreds of nanoseconds, but sub-nanosecond pulses effects are starting to be explored. In this paper we propose an electric field sensor well adapted to fast and intense signals. We believe that it can be very convenient to record signals especially during *in vivo* experiments.

Keywords: *Nanosecond pulsed electric fields (nsPEF), electric field sensor, open-ended coaxial cable sensor.*

I. INTRODUCTION

Nanosecond pulsed electric field (nsPEF or nanopulse) is the word currently used to define electric pulses with a duration ranging from one nanosecond to a few hundreds of nanoseconds and a field amplitude of a few to a few tens of kilovolts per centimeter. Recent studies have investigated their effects on biological cells and tissues [1,2]. It appears that they could have many potential applications as they have been shown to affect not only the cell membrane but also intracellular organelles. Depending on the duration, amplitude or shape of the pulses, we can expect very different biological effects. To perform serious investigations in this domain, a perfect knowledge of the applied field is necessary especially as up to now, there are very few clues regarding the important electrical parameters that provoke biological effects on cells and tissues.

II. PROBLEMATIC

When applying nanosecond pulsed electric field (nsPEF) on biological samples, propagation phenomena have to be taken into account. Most of the time the biological samples are placed at the end of a transmission line (for example a coaxial cable) and thus constitute the electrical load. Naturally, in such a configuration, the load can never perfectly match the generator's output impedance. As a consequence, the biological sample under test will impose the nsPEF voltage to which it is exposed. In some cases, a perfect knowledge of the electrical properties of biological load is achievable. For example, a cuvette filled with medium can be characterized experimentally or by finite elements simulation. For a given generated pulse it is thus possible to foresee the resulting

voltage that will be applied. On the contrary, during *in vivo* experiments [3], it is very difficult to properly estimate the biological load as it can be very different from one sample to another.

Direct measurements of voltage or field are thus compulsory. However metrology can be difficult. The first reason is that the voltages involved are often extremely high: a few kilovolts is a typical value which of course bans many commercial probes. Moreover, nsPEF have a very broad spectrum. A typical ten nanosecond duration pulse with a rising time of one nanosecond has significant spectrum content up to almost one gigahertz which again bans most high voltage probes which have narrow bandwidth.

The exposure device used in our experiments is made of two plate stainless steel electrodes terminating a coaxial cable. The two electrodes are separated by a distance of 7mm (Fig. 1). In such a configuration, the electric field is essentially perpendicular to the electrodes except on the edges. We propose here a sensor that can easily be incorporated in this device which is already currently used to treat biological cells and tissues.

III. FIELD SENSOR

A. Description

The sensor we have implemented is an open-ended coaxial cable. This kind of sensor has often been used in complex permittivity measurements [4,5]. Burkart [6] proposed to use it as a field sensor in cavities or waveguides. It allows to measure the field normal to the open-ended coaxial cable and it is thus well adapted to our exposition device in which the field is in only one direction.

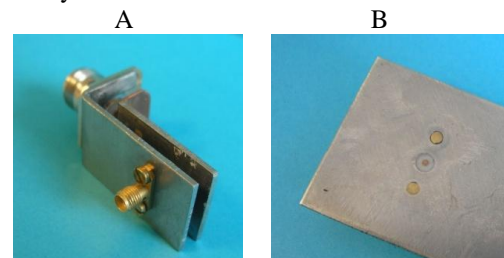


Fig. 1: A- Exposure device made of two plate stainless steel electrodes fixed on a N-connector. The SMA connector that constitutes the open-ended coaxial field sensor is inserted in the electrode connected to the ground. B- Detail of the open-ended coaxial mounted flush in the electrode.

Figure 1 shows a picture of the device with the sensor. A SMA connector (Radial R124 464 273) was inserted in one of the electrodes and cut flush. The diameter of the central conductor is 1.27 mm and the diameter of the dielectric (Teflon PTFE) 4.06 mm. The dimensions are quite small compared to the global size of the electrode which ensures that the sensor will not disturb the field to which the biological samples are submitted.

B. Field sensor principle

If the open-ended coaxial cable is placed in air (defined by its permittivity ϵ_0), the normal component of the electric field induces a charge $Q(t)$ [Coulomb, C] on the central conductor of the coax (1), given by Maxwell-Gauss's equation [6]. The constant K [m²] is called the effective area. It depends on the actual dimensions of the coaxial cable as well as on its depth of insertion.

$$Q(t) = KD_n(t) = \epsilon_0 KE_n(t) \quad (1)$$

If we consider a sinusoidal electric field with an amplitude E_{max} [V.m⁻¹] and an angular frequency ω [rad.s⁻¹] the current flow in the coaxial cable is thus given by (2)

$$I(t) = \frac{dQ(t)}{dt} = \epsilon_0 K j \omega E_{max} e^{j\omega t} \quad (2)$$

If the coaxial cable is then coupled to a matched resistor R_0 [Ω], the voltage on the resistor will be given by (3). The voltage is thus the derivate of the normal electric field.

$$V(t) = \epsilon_0 R_0 K j \omega E_{max} e^{j\omega t} \quad (3)$$

This analysis which is based on quasistatic approximation is suitable as long as the diameter of the cable is a small fraction of the wavelength of interest. In our case, the diameter of the cable is less than one centimeter (which would, in free space, be the wavelength at 30 GHz) which theoretically enables to measure frequencies up to a few Gigahertz.

C. Calibration

Calibration is needed in order to determine the constant K mentioned above. We have done it using a network analyzer (Agilent E5070B). The entry of the device through which the voltage creating the field is injected will be considered as port 1 (Fig. 2). The output of the coaxial cable used as sensor will be considered as port 2. Fig. 2 shows the S_{12} parameters obtained either with the device in open circuit, or with a home-made 50 Ω calibration cap between the two electrodes. These measurements do not directly give the relation between the field and the sensor's voltage: they give the relation between the voltage injected and the voltage measured. However, for our device, it is reasonable to consider that the electric field is directly given by the voltage on the electrodes divided by the distance between the electrodes. Up to about 1GHz, the voltage on the electrode can be considered equal to the voltage injected in the case of the 50 Ω cap (as the reflection coefficient is below -20dB) and twice the voltage injected in the case of an open-circuit (the reflection coefficient is 0.05dB up to 300 MHz and less than -5dB up to

1GHz). In both measurements, it stands out that the sensor behaves as a differentiator. The value of the constant K extracted from the measurements is approximately $K=5 \cdot 10^{-6}$. Above 1GHz, the transfer function is slightly distorted. This is due to a limitation of the global device and not to the sensor as can be seen when looking at the reflection coefficient of the device (data not shown).

We can also note that the global attenuation is very important and of course depends on the frequency: it goes from about -90dB to -40dB for frequencies between 10 MHz to 1 GHz.

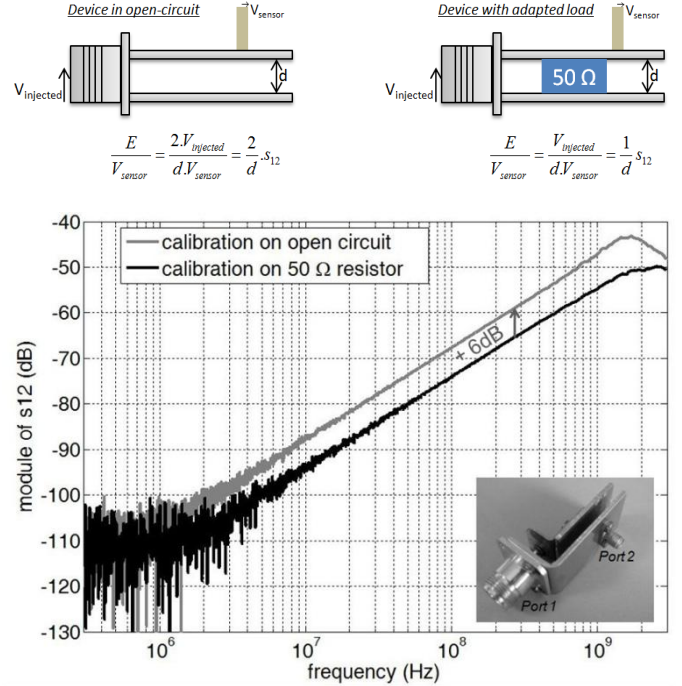


Fig. 2: Calibration of the field sensor with a network analyzer. The device was either left in open-circuit or adapted with a 50 Ω calibration cap.

D. Validation by simulation

In order to evaluate the actual limits of our sensor we have implemented the geometry in a three dimensional Comsol Multiphysics® simulation. The simulation includes the two electrodes, the sensor and a biological sample placed next to the sensor (described with a constant conductivity of $\sigma=0.04$ S/m and a constant permittivity of $\epsilon_r=1$). The central conductor of the field sensor is connected to the ground through a 50 Ω load (Fig. 3). Simulations were done using the quasistatic equations which is a reasonable approximation up to at least a few GHz considering the small dimensions of the whole device.

Figure 3A shows the distribution of the electric potential between the two electrodes. It appears immediately that neither the sensor, nor the biological sample is disturbing the distribution of the field which is homogeneous between the electrodes. This implies that the field detected by the sensor will be the one in the sample.

The calibration of the sensor can also be done thanks to the simulation. To do that, we have imposed a sinusoidal voltage on the upper electrode and extracted the resulting voltage on

the 50 Ω load terminating the sensor. The ratio of the resulting voltage on the load over the imposed voltage on the electrode has been calculated for different frequencies and superimposed on the measurements made with the network analyzer (figure 3B). The simulation brings out very effectively the derivative behavior of the sensor. Moreover, the global gain agrees with the measurements. However, above 10 GHz, the sensor's behavior changes. The cut-off frequency (at -3dB) can be estimated at 10 GHz, which is the typical cut-off frequency of coaxial connectors like the one used in these experiments.

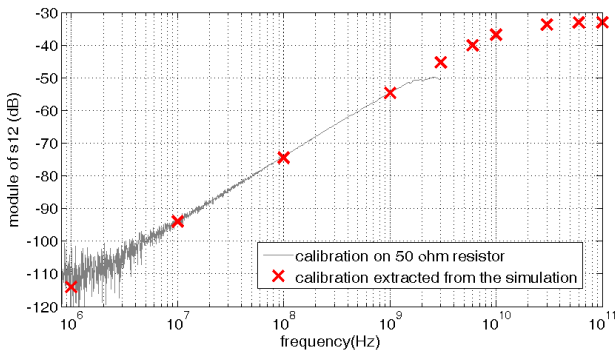
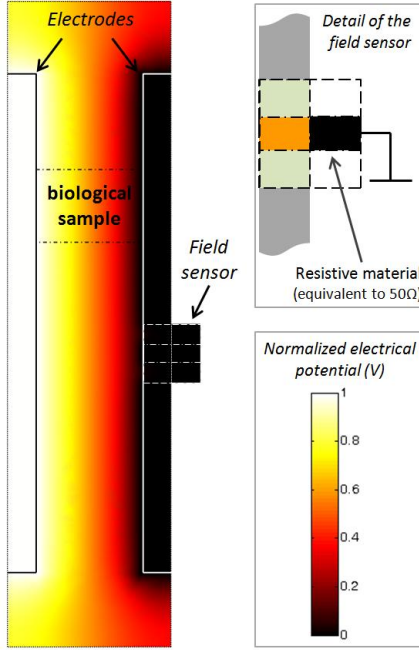


Fig. 3:A- Electrical potential distribution obtained by comsol multiphysics® simulation of the whole device. B- Numerical calibration of the sensor. S_{12} is defined as the ratio between the voltage on the 50 Ω load terminating the field sensor and the voltage between the two electrodes. Numerical data are superimposed on the measurements detailed in section III.C

Thanks to the simulation, it is also possible to evaluate the impact of the position of the sample regarding the sensor. It appears that even when the sample is tangent to the field sensor, the distribution of the field is kept unchanged and the voltage on the sensor stays the same, at least for an homogeneous sample.

IV. VALIDATION IN THE TIME DOMAIN

Measurements of nsPEF were performed with the field sensor. The exposure device was connected with a standard coaxial cable to a 10 ns pulse generator (FID GmbH, Model FPG 10-ISM10, Burbach, Germany) with an output impedance of 50 Ω . A tap-off allowing to extract 1/100 of the signal (Barth Electronics, INC, Model: 245-NM FFP) was inserted on the cable and allowed to record the voltages transiting on the line (Fig. 4). Figure 6A presents the voltages recorded using the extractor or the field sensor when the device is in an open-circuit. The voltage from the extractor clearly displays both the generated pulse and the almost complete reflection. By summing the incident voltage with the reflected one we can estimate the electric field by dividing the resulting voltage by the distance between the two electrodes (Fig. 5B). The electric field can also be evaluated by integrating the voltage from the sensor. The integration was done by simple summation (withdrawal on the noise post-summation is then necessary) but similar results can be obtain by integration by Fourier transform (except for the average value). Even though both computations are slightly different, we can notice that we have an extremely good precision on the rising and falling edges which corresponds to the highest frequencies (those that are less attenuated by the sensor).

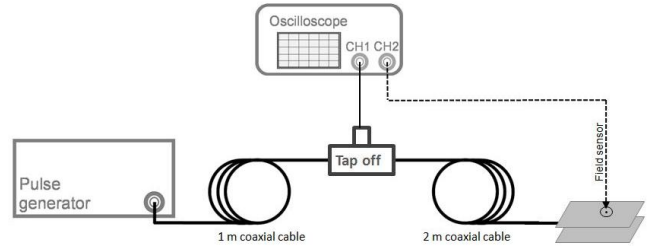


Fig. 4: Experimental setup. The device to apply nsPEF on biological samples is connected to the generator (output impedance $Z_c=50\Omega$) with a standard coaxial cable. A tap-off allowing to extract 1/100 of the signal is inserted on the cable and allows to record the voltages transiting on the line.

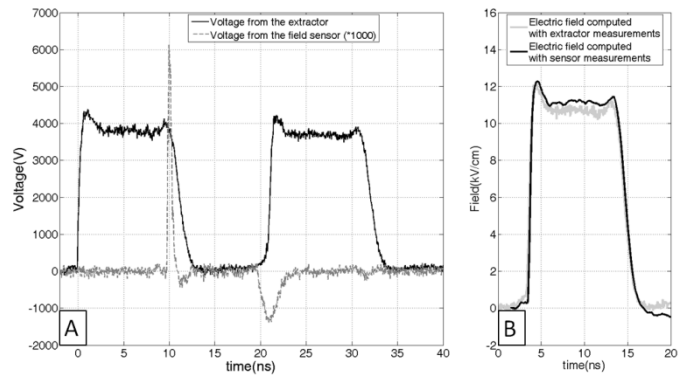


Fig. 5 : A- Measured voltages on the extractor and on the field sensor when the two electrodes are left in an open-circuit. B- Electric field between the electrodes, obtained by post-processing of the voltage from the field sensor or of the voltage from the extractor.

V. FIELD MEASUREMENTS WHEN EXPOSING BIOLOGICAL SAMPLES

The field sensor was finally tested in a typical configuration of *in vivo* experiments. Signals were acquired for different position of the mouse's leg between the electrodes. Some tests were also made with different quantities of conductive gel (conductivity $\sigma=3$ S/m). Figure 7 shows some of the reconstructed electric fields. The measurements highlight the variations in the level of the field as well as in the steepness of the rising edges.

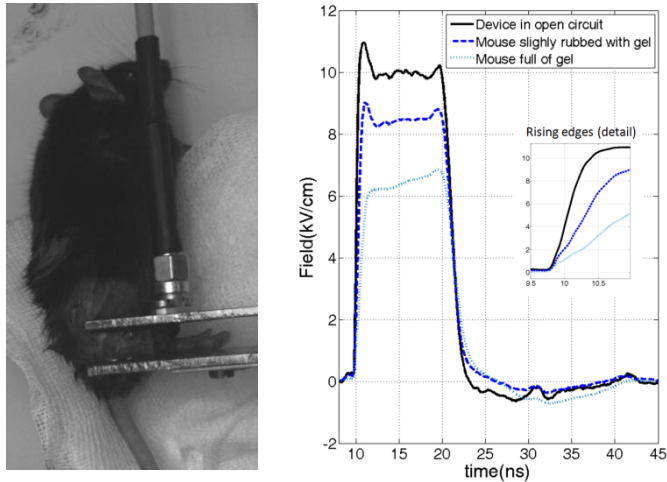


Fig. 7: A-Experimental set-up during *in-vivo* experiments. B-Electric fields computed from the sensor's measurements (three different configurations were tested: open-circuit, a mouse with almost no gel and a mouse with a lot of gel.)

VI. BENEFIT OF THE SENSOR IN OUR APPLICATION

When aiming at the measurement of ultra short electric field pulses with a duration T , we need to have a good precision above the frequency $1/\pi T$ which is the frequency domain that is coding for the actual shape of the pulse (Fig. 6A). For that purpose, this type of sensor is very well adapted as it will enhance the contribution of high frequencies and thus allow to measure with a good precision the fast rising edges. Moreover, in the case of pulses, the voltage obtained before integration is a direct image of the rising and falling edges (Fig. 6B).

The pulses, delivered in our biological applications are extremely intense and the high voltages applied can prevent the use of many probes. On that point of view, the important attenuation of the sensor is not a limit: on the contrary it guarantees that the voltage levels coming from the sensor will be compatible with oscilloscopes entries.

VII. CONCLUSION

We have proposed in this paper a simple and cheap solution to measure the electric field during experiments dealing with the exposure of biological samples to nsPEF. This sensor can be

very easily adapted to many exposure devices and for any kind of setup, whatever the characteristic impedance. Thanks to its characteristics, it allows to measure extremely intense voltages and gives signals that do not need to be attenuated (or need very little attenuation) before being recorded on an oscilloscope. Moreover, it does not disturb the distribution of the field as opposed to some voltage probe.

Finally, it guarantees a real measurement of the field very close to the biological sample so that any distortion can be seen, whether it is caused by the biological load or by imperfections in the exposure device. We believe it will be a great support in the investigation of more biological effects.

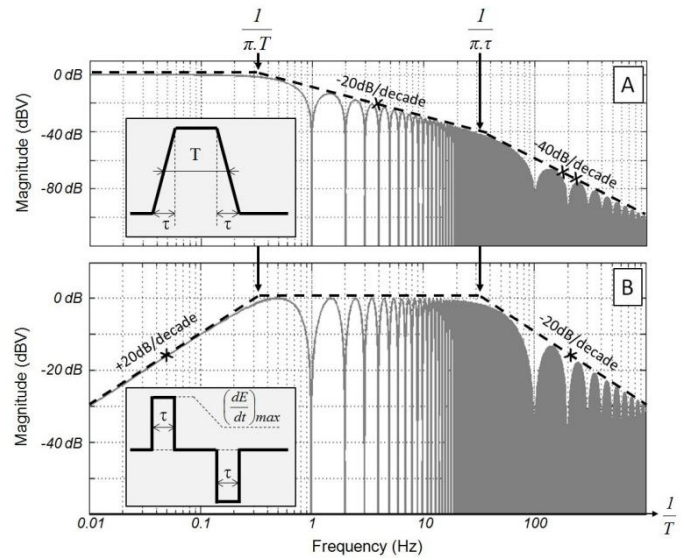


Fig. 6: A- Normalized spectrum of a pulse with a duration of T and rising and falling edges of τ (for the figure, τ was chosen equal to one hundredth of T). B- Normalized spectrum of the sensor's signal as it detects the pulse described in A.

REFERENCES

- [1] PT.Vernier, MJ.Ziegler, R.Dimova, "Calcium binding and head group dipole angle in phosphatidylserine-phosphatidylcholine bilayers." *Langmuir*. 2009 Jan 20 ; 25(2) : 1020-7.
- [2] PT. Vernier, Y. Sun, M-T. Chen, M A. Gundersen , GL. Craviso "Nanosecond electric pulse-induced calcium entry into chromaffin cells." *Bioelectrochemistry* 73 (2008) 1-4
- [3] R. Nuccitelli et al, "A new pulsed electric field therapy for melanoma disrupts the tumor's blood supply and causes complete remission without recurrence". *Int. J. Cancer*, 125(2) :438--45.
- [4] G. B. Gajda and S S. Stuchly. "Numerical analysis of open-ended coaxial lines," *IEEE Trans. MTT-31*, pp. 380-384, May 1983.
- [5] M. A. Stuchly and S. S. Stuchly, " Coaxial fine reflection methods for measuring dielectric properties of biological substances at radio and microwave frequencies—A Review; *IEEE Trans. Instrum, Meas.*, vol. IM-29, no. 3, pp. 176-183, Sept. 1980.
- [6] S.E. Burkhart, "Coaxial E-Field Probe for High-Power Microwave Measurement" *IEEE Trans. On Microwave Theory and Techniques*, vol. MTT-33, No. 3, pp. 262-265, 1985

Annexe D

Permeabilisation obtained by microsecond and nanosecond electric pulses : experimental proofs of the relevance of current density.

Article publié dans les proceedings de 18th IEEE International Pulsed Power Conference, Chicago, Illinois, USA, 19th-23rd June, 2011.

Cet article présente le début des études sur l'influence de la densité de courant sur la perméabilisation. Le fonctionnement du capteur de courant de type B-dot y est détaillé ainsi que la méthodologie pour évaluer le courant dans deux cuvettes exposées simultanément en parallèle.

CONTROL OF CURRENT INTENSITY: EXPERIMENTAL PROOFS OF THE RELEVANCE OF CURRENT DENSITY IN BIOLOGICAL CELLS PERMEABILISATION CAUSED BY NANOSECOND ELECTRIC PULSES*.

A. Silve^{1,2,3+}, I. Leray^{1,2,3}, R. Vezinet⁴, L.M. Mir^{1,2,3}

¹Université Paris-Sud, Laboratoire de Vectorologie et Thérapeutiques Anticancéreuses, UMR 8203, Orsay, F-91405

²CNRS, Orsay, Laboratoire de Vectorologie et Thérapeutiques Anticancéreuses, UMR 8203, F-91405

³Institut Gustave Roussy, Laboratoire de Vectorologie et Thérapeutiques Anticancéreuses, UMR 8203, Villejuif F-94805

⁴CEA, DAM, GRAMAT, F-46500, Gramat, France

Abstract

Electropermeabilisation of cells can be obtained by electric pulses of very different durations. In this paper we compare the efficiency of pulses of 100 μ s and 10 ns duration eventually in the presence of bleomycin, a cytotoxic drug in order to detect reversible permeabilisation of cells. Biological effects are evaluated using cloning efficiency tests. The impact of the external conductivity is studied for the two types of pulses. Experiments reveal that current density plays a critical role when 10 ns pulses are applied which is very different from the results achieved with more traditional pulses of 100 μ s duration.

I. INTRODUCTION

Electric pulses can induce reversible or irreversible defects in a cell membrane thus allowing direct access of external molecules to the cell inside [1]. The name given to such an effect is electropermeabilisation or electroporation. This technique is nowadays routinely used in research laboratories and in the clinic e.g. to treat cancerous tissues. In the traditional electropermeabilisation, pulse parameters can be chosen over a wide range of values and still lead to successful permeabilisation of cells. However, a consensus more or less came out and the most common protocol is to use electric pulses of 100 μ s duration (which are referred to as micropulses) with a field magnitude close to 120 V/mm. More recently, different groups have shown that much shorter and more intense pulses could also lead to permeabilisation [2]. Typical electrical parameters mentioned in the literature are a few tens of nanoseconds for the duration and at least 2 kV/mm for the electric field magnitude.

Two very different types of pulses thus lead to a similar (but not strictly identical) biological effect. This naturally raises the question of whether the mechanisms leading to permeabilisation are the same when it is

achieved using microsecond pulses or nanosecond pulses. In an attempt to investigate this question, we have performed experiments to highlight the importance of current density during exposure to pulses of two different durations: 100 μ s or 10 ns.

According to the papers reporting influence of extracellular conductivity during the application of microsecond pulses, very little effect has been observed. In particular, similar permeabilisation is obtained when extracellular conductivity is set around 0.1 S/m and 1 S/m [3]. Below 0.01 S/m, experiments and models show that slightly higher field magnitude is required to achieve the same effect. Under highly controlled electrical conditions, we explored the effect of extracellular medium conductivity on permeabilisation obtained by nanosecond pulses. We report in this paper that extracellular medium conductivity is a major parameter in the permeabilisation induced by 10 ns pulses.

II. EXPERIMENTAL CONDITIONS

A. Cell culture

Chinese hamster lung cell line - DC-3F- was grown in MEM - Minimum Essential Medium (GIBCO Laboratories, Cergy-Pontoise, France) with addition of 10% fetal bovine serum (GIBCO Laboratories) and supplemented by antibiotics. The cells were maintained in a humidified atmosphere at 37°C and 5% CO₂. Lyophilized bleomycine was dissolved in medium for electroporation and stored at -20°C (300 μ M concentration).

B. Exposure of cells to electric pulses

After trypsinization of exponentially growing cells and inactivation of trypsin by complete medium, cells were centrifuged for 10 minutes at 1000 rpm and resuspended in the appropriate medium at a density of 5 x 10⁶ cells/mL. The mixture was then immediately deposited in a standard electroporation cuvette (MBP

*Research conducted in the scope of the EBAM European Associated Laboratory (LEA). Work supported by CNRS, University Paris-Sud, Institut Gustave Roussy, and ANR (grant Nanopulsebiochip-08-PNANO-024 and IntCell-10-BLAN-96). The authors thank CEA-DAM, and Philippe Levêque from XLIM, UMR CNRS 6172 (Limoges, France).

+ email: aude.silve@ens-cachan.fr. The authors thank the DGA for the DGA/MRIS grant allocated to Aude Silve.

1mm, Dutcher, Issy les Moulineaux, France) with a 1mm gap between the two electrodes. Electric pulses were immediately applied. Two different mediums were used: either S-MEM (S-MEM, Minimum Essential Medium, GIBCO Laboratories) or STM (250 mM sucrose, 10 mM Tris HCl pH 7.0, 1 mM MgCl₂). Their conductivities are approximately 1.5 S/m and 0.1 S/m. Both mediums are iso-osmotic. The volume of solution used during experiments was 60 μ L.

C. Cloning efficacy tests

After delivery of the electric pulses, cells were kept for 10 min at room temperature and then diluted in complete medium and seeded in triplicate in complete culture medium (250 cells per cell culture dish, 60 mm in diameter) for cloning efficacy test. After 5 days in a humidified atmosphere at 37°C and 5% CO₂, colonies were fixed with 5% formaldehyde, stained with crystal violet and counted.

D. Pulse generators

Pulses of 100 μ s duration (micropulses) were delivered by an electroporation power supply (Cliniporator™, Igea, Carpi, Italy) able to apply high-voltage square-wave pulses with repetition rates ranging from 1Hz to 7 kHz. Pulse duration can be adjusted between 10 μ s and 1 ms but was kept constant at 100 μ s for all our experiments. Rising and falling edges are typically 5 μ s.

Pulses of 10 ns were delivered by a commercial generator purchased from FID (FID GmbH, Model FPG 10-ISM10, Burbach, Germany) with an output impedance of 50 Ohms (50 Ω). It generates trapezoidal monopolar pulses of 10 ns half width. The amplitude goes from 3 kV to 8 kV. The rising edge lasts between 0.4 and 0.6 ns. The falling edge lasts between 1 and 1.5 ns.

E. Voltage and current measurements

During experiments with micropulses, voltage and current waveforms were recorded with an oscilloscope (LeCroy WaveMaster 808Zi), a current probe (based on the current transducer HTP100 by ConTec) and a voltage probe (LeCroy PP007-WR). During experiments with nanosecond pulses dedicated D-dot and B-dot sensors were inserted in the electrodes (details are given in Appendix A) and allowed to measure the electric field and current waveforms.

III. CURRENT DENSITY RELEVANCE ON PERMEABILIZATION

A. Experiments principle

Bleomycin is a non permeant molecule which possesses a very high intrinsic cytotoxicity [4][5]. When cells are in a solution of 30 nM bleomycin, in the absence of electric pulses, they are not affected by the drug since bleomycin

cannot reach the cell inside (typically, at least 95 % of cells survive in a 30 nM bleomycin solution – data not shown). Too intense electric pulses or too many of them can kill the cells alone by inducing permeant defects in the cell membrane (irreversible electroporation). When pulses alone do not kill the cells, cell death obtained by the combined use of bleomycin and pulses reveals that reversible permeabilisation of the plasma membrane has been achieved (Figure 1). Indeed, if during the transient electroporated state approximately 500 molecules of bleomycin can reach the cell inside, the first cell division will induce a mitotic death.

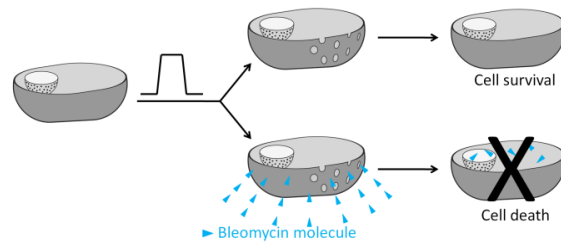


Figure 1. Method to detect reversible permeabilisation using bleomycine.

B. Exposure to Microsecond Pulses

Preliminary experiments were performed in order to make sure that with our experimental conditions and with our detection method extra-cellular conductivity did not affect the permeabilisation obtained with microsecond pulses as it is reported in the literature. The pulse duration was fixed at 100 μ s. The external medium was either S-MEM or STM which have conductivities of approximately 1.5 S/m and 0.1 S/m respectively. Voltage and current measurements were performed. The electric field and the current density in the medium were then easily computed since the distance between the electrode is 1 mm and the surface area 0.6 cm² (those experiments were performed with a sample volume of 60 μ L). In the case of a 60 V/mm pulse, the electric field and current density waveforms are displayed on Figure 2 for both S-MEM and STM media.

Due to the difference of conductivity, identical waveforms of the electric field lead to different levels of current density: 4.6 A/cm² and 0.42 A/cm² for S-MEM and STM respectively.

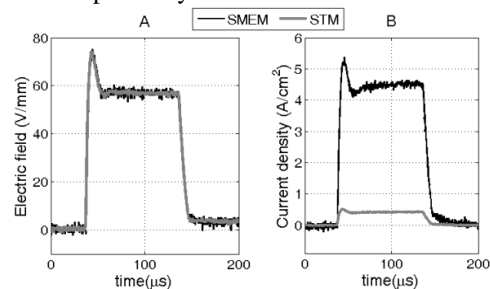


Figure 2. (A) Typical electric fields and (B) associated current densities during the exposure of cells to micropulse.

In the first experiment, DC3F cells were exposed to one single micropulse of 100 μ s with an electric field magnitude varying between 60 V/mm and 250 V/mm. Figure 3 displays the cell survival percentage obtained from the cloning efficiency tests as a function of the pulse magnitude. When cells are submitted to the pulse alone (Figure 3-A), cell survival is 100 % in all tested conditions. On the contrary, when the external medium contains 30 nM of bleomycin, the cell survival rate decreases with the electric field magnitude (Figure 3-B). Such electrical parameters thus induce reversible permeabilisation. In those conditions, viability is independent on the external medium.

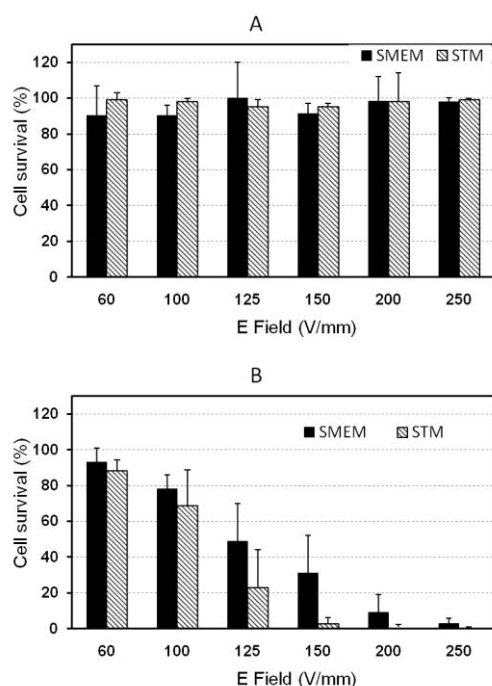


Figure 3. Cell survival as a function of pulse magnitude. Cloning efficiency tests were performed after exposure to one single micropulse (100 μ s) in different extra-cellular media (S-MEM or STM). Results are represented as mean values + SD (standard deviation) of three to five experiments. (A) Cells were exposed in medium alone. (B) Cells were exposed in medium containing 30 nM bleomycin. Cell survival is normalized on the control submitted to the drug alone.

A second experiment was performed using a fixed pulse magnitude (100 V/mm) and a number of pulses varying between 1 and 20. Results are presented on Figure 4. As in the previous experiments, we notice that regardless of the extracellular medium, pulses alone do not affect the cells while in the presence of bleomycin there is an increasing percentage of dead cells reaching almost 100 % when 20 pulses are applied. According to all experiments, the reversible electroporation level is identical in both media which is

coherent with previous work showing that when extracellular conductivity is above 0.01 S/m, it does not affect electropermeabilisation efficiency. This is true whether permeabilisation is obtained with one single pulse or with a series of pulses. Conductivity is thus neither affecting the effect of the pulse themselves nor the relaxation of cells between pulses.

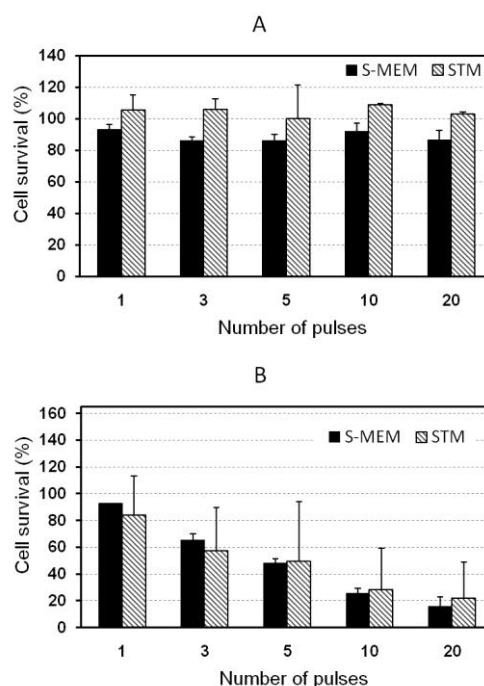


Figure 4. Cell survival as a function of the number of pulses. Cloning efficiency tests were performed after exposure in different extra-cellular media (S-MEM or STM) to several micropulse (100 μ s) applied at 10 Hz, with a field magnitude of 100 V/mm. Results are represented as mean values + SD of two experiments. (A) Cells were exposed in medium alone. (B) Cells were exposed in medium containing 30 nM bleomycin. Cell survival is normalized to the control submitted to the drug alone.

C. Exposure to Nanosecond Pulses

The effect of the extracellular conductivity on the permeabilisation by nanosecond pulses was then challenged. The generator used to perform experiments has a 50 Ω characteristic impedance. The biological samples that we consider in these experiments are electroporation cuvette containing biological medium and cells. When connected to the generator alone, each biological sample, depending on the medium, would thus impose a different voltage since each one has a different impedance and since impedance matching is not satisfied. In order to impose the exact same electric field in the two different media, two cuvettes containing cells in STM and S-MEM respectively were exposed in parallel. This ensures identical electric field in the two different media

and enables to evaluate the impact of the current density which is thus the only fluctuating electrical parameter. In this condition it is not possible however to measure the current in each cuvette. Only the global current can be measured. Current density in each of the cuvette can nevertheless be evaluated (Appendix A). Results from the computation are presented on Figure 5. According to the measurements, the electric field is equal to 3.3 kV/mm. The current densities computed during the pulse are approximately 340 A/cm² in the case of S-MEM and 34 A/cm² in the case of STM.

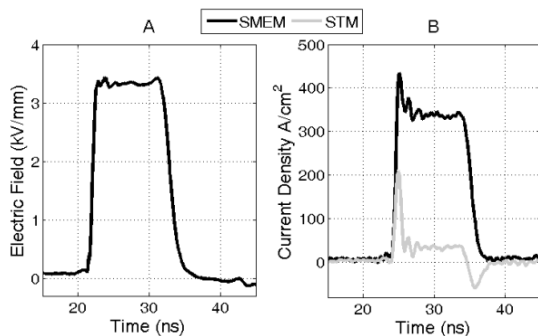


Figure 5. (A) Typical electric field and (B) associated current densities during the exposure of cells to nanopulse.

Experiments with 10 ns duration pulses had to be performed with a high number of pulses in order to achieve cell death. Figure 6 presents the results of the cloning efficiency experiments, both without and with 30 nM bleomycin. In both cases, we observe that cell killing is much more efficient in the S-MEM solution. Both reversible and irreversible electroporation happen in the S-MEM solution while not in the STM solution. Since the electric field is strictly identical in both cases, we believe that the huge difference in current density is responsible for such a difference.

IV. DISCUSSION

This paper explores the effect of extracellular conductivity on electroporation obtained either by micropulse or nanopulse. Cloning efficiency test was used to assess permeabilisation. The addition of 30 nM bleomycin in the pulsing medium allowed also to detect reversible permeabilisation. Results obtained with micropulses are in good agreement with the literature. Indeed, changing the conductivity from 0.1 S/m to 1.5 S/m does not change cell viability after pulse application. However, external conductivity and thus current density appears to play a major role when permeabilisation is caused by nanosecond pulses. Although current density had been suggested as a very important factor in [6], we believe this is the first experimental evidence of the importance of current density. In the near future, experiments will be performed

to evaluate what are the mechanisms involved. In particular, it will be important to figure out the differences observed when permeabilisation is obtained with micropulses or with nanopulses.

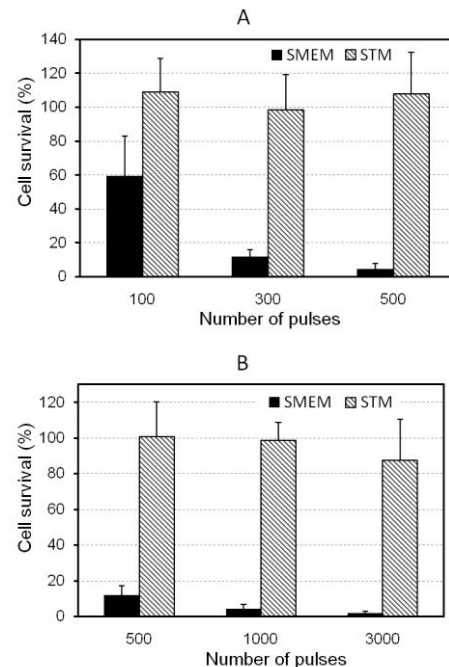


Figure 6. Cell survival as a function of the number of nanopulses. Cloning efficiency tests were performed after exposure to several nanopulse (10 ns) applied at 10 Hz, with a field magnitude of 3.3 kV/mm in different extra-cellular media (S-MEM or STM). Results are represented as mean values + SD of three to five experiments. (A) Cells were exposed in medium alone. (B) Cells were exposed in medium containing 30 nM bleomycin. Cell survival is normalized on the control submitted to the drug alone.

V. REFERENCES

- [1] M.-P. Rols and J. Teissié, "Electroporation of Mammalian Cells to Macromolecules: Control by Pulse Duration," *Biophysical Journal*, vol. 75, no. 3, pp. 1415-1423, Sep. 1998.
- [2] A. G. Pakhomov, A. M. Bowman, B. L. Ibey, F. M. Andre, O. N. Pakhomova, and K. H. Schoenbach, "Lipid nanopores can form a stable, ion channel-like conduction pathway in cell membrane," *Biochemical and Biophysical Research Communications*, vol. 385, no. 2, pp. 181-186, Jul. 2009.
- [3] A. Ivorra, J. Villemejane, and L. M. Mir, "Electrical modeling of the influence of medium conductivity on electroporation," *Physical Chemistry Chemical Physics*, vol. 12, no. 34, p. 10055, 2010.
- [4] L. M. Mir, H. Banoun, and C. Paoletti,

“Introduction of definite amounts of nonpermeant molecules into living cells after electroporation: Direct access to the cytosol,” *Experimental Cell Research*, vol. 175, no. 1, pp. 15-25, Mar. 1988.

[5] L. M. Mir, O. Tounekti, and S. Orlowski, “Bleomycin: revival of an old drug,” *General Pharmacology*, vol. 27, no. 5, pp. 745-748, Jul. 1996.

[6] K. Schoenbach, R. Joshi, S. Beebe, and C. Baum, “A scaling law for membrane permeabilization with nanopulses,” *IEEE Transactions on Dielectrics and Electrical Insulation*, vol. 16, no. 5, pp. 1224-1235, 2009.

[7] A. Silve, R. Vezinet, and L. M. Mir, “Implementation of a broad band, high level electric field sensor in biological exposure device,” presented at the IEEE International Power modulator and high voltage conference, Atlanta, GA, 2010.

APPENDIX A

A. Current and Electric Field Sensors for 10 ns pulses

To apply nanosecond pulses, the electroporation cuvette were placed between two copper electrodes connected to a coaxial cable thanks to a N-connector (Figure 7). The current circulating through the sample was measured using a B-dot sensor inserted on the ground electrode. The size of the loop that consists the B-dot is approximately 3 mm in diameter. Notations of the different electrical quantities are presented on Figure 8.

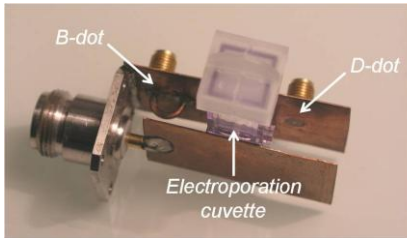


Figure 7. Exposure setup for the application of nanosecond pulse on electroporation cuvette. Two sensors are inserted on the ground electrode.

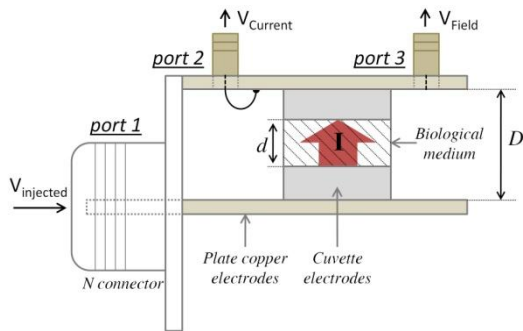


Figure 8. Notations.

Calibration of the B-dot sensor was performed using a network analyzer (Agilent E5070B). The input of the

device through which the injected voltage ($V_{injected}$) allows to impose a current is considered as port 1 (Figure 8). The output of the coaxial cable used as current sensor ($V_{current}$) is considered as port 2. If instead of a cuvette a 50Ω cap is placed between the two electrodes (impedance matching condition) the relation between the current circulating in the device and the sensor's voltage is given by (1). Measurement of S_{12} with a 50Ω cap is displayed on Figure 9. S_{12} is a straight line with a constant slope of +20 dB/decade. The sensor thus behaves as a differentiator. When the device is short-circuited, the current is doubled if the injected voltage is kept constant. This is experimentally observed by the fact that S_{12} measured on a short circuit is up-shifted of 6 dB relatively to S_{12} on the 50Ω cap (Figure 9).

$$\frac{I}{V_{current}} = \frac{V_{injected}}{50 \cdot V_{current}} = \frac{S_{12}}{50} \quad (1)$$

The electric field was measured using a D-dot sensor integrated in the ground electrode. Calibration of the D-dot can be done using a similar protocol. The output of the coaxial cable used as a field sensor (V_{Field}) is considered as port 3 (Figure 8). When the 50Ω cap is placed in the device, the relation between the electric field and the sensor voltage V_{Field} is given by (2). Measurements of S_{13} both with a 50Ω cap and on an open circuit are displayed on Figure 9 (details of the calibration procedure can be found in [7]).

$$\frac{E}{V_{field}} = \frac{V_{injected}}{D \cdot V_{field}} = \frac{S_{13}}{D} \quad (2)$$

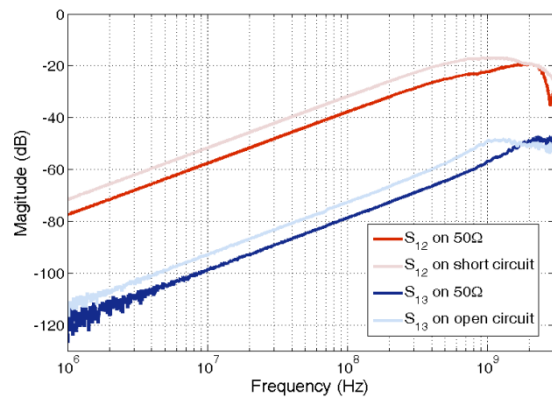


Figure 9. Calibration of the B-dot sensor with a network analyzer. The device was either short-circuited or adapted with a 50Ω calibration cap.

Measurements were then performed using the FID pulse generator and the 50Ω cap. Signals from the sensors are presented on Figure 10. The voltage applied as well as the current circulating through the cap can be computed by integrating signals from the D-dot and B-dot sensors.

The attenuation coefficients are deduced from the calibration curves. One can notice that signals from both sensors have a very good signal to noise ratio which allows a clean reconstitution of the voltage and current. Moreover, the computation of the ratio voltage over current gives a value of 52Ω which is close to the 50Ω expected value. Such sensors can thus be trusted to evaluate the current in electroporation cuvette.

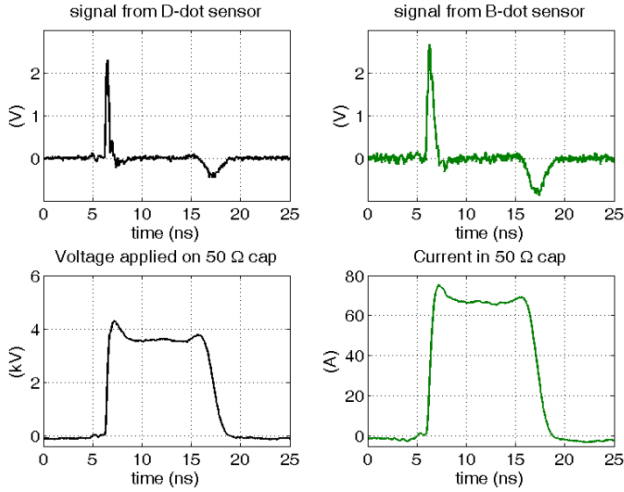


Figure 10. Measurements on the 50Ω calibration cap. Signals directly issued from the D-dot and B-dot sensors are presented as well as the computation of the voltage applied and the current.

B. Determination of current in experimental conditions

During experiments presented in section III.C, two cuvettes containing different solutions (cells in STM or

cells in S-MEM) are exposed in parallel. The electric field applied is thus the same in both cuvettes and can be measured thanks to the D-dot sensor. The current circulating in each cuvette can however not be directly measured since the B-dot sensor would give the sum of the currents in the two cuvettes. Current in each cuvette can nevertheless be evaluated in two steps:

First step: each cuvette (containing either STM or S-MEM) is exposed alone. Signals from the both sensors are used to electrically characterize the cuvettes: the transfer functions TF_{medium} linking the current $I(\omega)$ to the electric field $E(\omega)$ in the frequency domain are computed using (3). TF_{medium} is fixed by the electrical properties and the geometry of the medium. It is expressed in $\Omega^{-1} \cdot m$.

$$TF_{medium} = \frac{I(\omega)}{E(\omega)} \quad (3)$$

where medium is SMEM or STM

Second step: the electric field measured during the experiment in parallel $E_{//}(\omega)$ and the medium transfer function are then used to compute each of the current according to (4). Current density can then be easily deduced using the electrode surface area. The results from this final computation are those presented in section III.C.

$$I_{medium}(\omega) = TF_{medium}(\omega) \cdot E_{//}(\omega) \quad (4)$$

where medium is SMEM or STM

Résumé :

La manipulation des membranes des cellules en suspension ou dans des tissus au moyen d'impulsions électriques constitue un sujet de recherche majeur au cœur du bio-électromagnétisme. A ce jour les impulsions de quelques microsecondes voire millisecondes ont été principalement étudiées. Elles n'affectent que la membrane plasmique des cellules. Les impulsions nanosecondes de fort niveau de champ (de l'ordre de quelques MV/m) ouvrent la voie vers la manipulation des organelles intra-cellulaires. En outre, elles constituent un nouvel outil pour l'étude des mécanismes de la perméabilisation.

Les travaux de cette thèse ont été principalement consacrés aux effets des impulsions de 10 ns sur la membrane plasmique. Des protocoles expérimentaux permettant d'appliquer de façon reproductible et contrôlée les impulsions sur des objets vivants ont été définis. Des moyens de mesure (D-dot et B-dot) adaptés aux hautes tensions et hautes fréquences ont été développés et mis en œuvre, permettant un contrôle en temps réel des impulsions délivrées.

Différentes approches ont permis de mettre en évidence la perméabilisation des cellules par des impulsions de 10 ns. Ces techniques regroupent notamment le suivi de bio-impédance dans les tissus et l'internalisation de molécules cytotoxiques non perméantes dans des cellules en suspension et *in vivo* sur des tumeurs. Les expériences conduites ont permis de mettre en évidence la plus grande efficacité des basses fréquences de répétition dans la perméabilisation d'un tissu végétal (la pomme de terre). De plus l'influence de la conductivité du milieu extracellulaire sur le niveau de perméabilisation a été investiguée. Ces expériences ont permis de mettre en évidence l'importance de la dynamique d'établissement et de relaxation de la différence de potentiel transmembranaire dans l'efficacité de la perméabilisation.

Enfin un microscope CARS (Coherent Anti-stokes Raman Scattering) plein-champ a été développé. Sa conception a été pensée en vue de l'étude des effets des impulsions ultra-courtes sur le vivant à l'échelle moléculaire. A ce jour il permet d'obtenir des images de cellules en CARS en 3 ns.

Mots-clefs :

Electroporation, nanopulses, bio-impédance, bléomycine, microscopie CARS.

UMR 8203 Vectorologie et thérapeutiques anticancéreuses
CNRS – Institut Gustave Roussy - Université Paris-XI

PÔLE : PHARMACOTECHNIE ET PHYSICO-CHIMIE PHARMACEUTIQUE

UNIVERSITÉ PARIS-SUD 11
UFR «FACULTÉ DE PHARMACIE DE CHATENAY-MALABRY »
5, rue Jean Baptiste Clément
92296 CHÂTENAY-MALABRY Cedex