



HAL
open science

Effets des champs électriques pulsés milli et nanosecondes sur cellules et tissus

Louise Chopinet-Mayeux

► **To cite this version:**

Louise Chopinet-Mayeux. Effets des champs électriques pulsés milli et nanosecondes sur cellules et tissus. Micro et nanotechnologies/Microélectronique. Université Paul Sabatier - Toulouse III, 2013. Français. NNT: . tel-00874040

HAL Id: tel-00874040

<https://theses.hal.science/tel-00874040v1>

Submitted on 1 Oct 2014

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

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



Université
de Toulouse

THÈSE

En vue de l'obtention du
DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ DE TOULOUSE

Délivré par :

Université Toulouse III Paul Sabatier (UT3 Paul Sabatier)

Discipline ou spécialité :

Biologie Structurale et Fonctionnelle

Présentée et soutenue par :

Louise CHOPINET

le : 24 Septembre 2013

Titre :

Effets des champs électriques pulsés milli et nanosecondes
sur cellules et tissus

Ecole doctorale :

Biologie, Santé, Biotechnologies (BSB)

Unité de recherche :

IPBS-CNRS, UMR 5089 - LAAS-CNRS, UPR 7008

Directeur(s) de Thèse :

Marie-Pierre ROLS - Etienne DAGUE

Rapporteurs :

Mr L. MIR, Directeur de recherche (Institut Gustave Roussy, Villejuif)

Mr V. SHAHIN, Group Leader (Faculté de Médecine, Munster)

Membre(s) du jury :

Mr B. DUCOMMUN, Professeur (UPS, Toulouse), Président du jury

Mr P. POULIGUEN, responsable scientifique (DGA/DS/MRIS), Examineur

Mr R. VEZINET, Ingénieur (CEA, Gramat), Examineur

Mme M.-P. ROLS, Directrice de recherche (IPBS, Toulouse), Co-directrice de thèse

Mr E. DAGUE, Chargé de recherche (LAAS, Toulouse), Co-directeur de thèse

A ma mère,

Pour avoir suivi tes traces malgré moi,
avoir accompli ce que tu as abandonné,
et commencer à comprendre.

Remerciements

Je remercie tout d'abord la direction générale de l'armement, et plus particulièrement Mr Pouliguen pour avoir sélectionné mon dossier et ce projet pour une bourse de thèse de 3 ans.

Merci à mes rapporteurs, Lluis Mir et Victor Shahin, d'avoir accepté de lire ce manuscrit et de participer à mon jury de soutenance et d'avoir amené une dimension supplémentaire à ces travaux lors de la soutenance.

Merci à Mr. Vezinet et A. Catrain pour leur implication au niveau électrique et leur patience.

Merci à Marie-Pierre qui m'a accueilli tout d'abord en stage de master 2 pour me former au travail de recherche, puis qui m'a proposé ce projet. Merci de m'avoir fait confiance, de m'avoir fait profiter des collaborations internationales et initié aux rouages diplomatiques.

Je te remercie Etienne d'avoir eu confiance en moi pour intégrer ton « équipe » sur une rencontre de 10 minutes dans la bibliothèque du LAAS. Merci aussi pour m'avoir initié à la pratique de l'AFM, avoir cru au projet jusqu'au bout, d'avoir attendu patiemment les résultats COMPLETS ;)

Je vous remercie tous deux d'avoir su accepter mon indépendance extrême et de m'avoir laissé évoluer en autonomie sur ce projet à deux têtes qui ne vous permettait pas d'être toujours au courant de ce qui se passait dans l'autre laboratoire (et l'autre tête).

Un merci particulier à Justin pour tous les dits et les non-dits, pour m'avoir crument montré ce qu'était la science en stage de M1, sans pour autant réussir à m'empêcher de revenir l'embêter dans son labo et quotidiennement avec mes questions de « pauvre petite biologiste » pendant les 4 années suivantes.

Je te remercie Luc pour ton accompagnement à mes débuts et m'avoir transmis tout ton savoir-faire (certaines phrases sont ancrées pour toujours). Pour ta bonne humeur quotidienne, tes astuces, tes blagues et ton soutien !

Bien sur un grand merci à tous les gens qui ont accompagné ce projet de près ou de loin :

- Far far away: Andrei Pakhomov for his hospitality in his laboratory in Norfolk for precisely 90 days and his introduction to P-Clamp (never again ;). Damijan Micklavcic for hosting me in his group 15 days in Ljubljana. Eventually Tina, *hvala* for sharing the project EP-nsEP which was bouncing but ultimately successful.
- De moins loin : merci à Sandor de m'avoir accueilli dans son labo pour 3 jours intenses, et merci à Charles pour les modifications sur Fovea et son implication dans le projet AFM. Merci Jean-Michel pour toutes les réponses, tous les échanges, toutes les

explications, toute l'aide inconditionnelle. Tu as été le soutien moral dissimulé tout au long de ces 3 années. Merci Christelle pour tes travaux et tes mails qui m'ont aidé à avancer.

- De près : Merci à Audrey pour m'avoir aidé à faire les expériences nano au pied levé. Merci à Julie, Houda à l'IPBS et Charline au LAAS pour l'entretien des cellules lors de mes nombreuses allées et venues entre les deux laboratoires. Et merci à tous les membres de l'équipe de l'IPBS pour leur soutien manifesté de quelque manière que ce soit ($\mu\mu$ pour les blagues, Babeth pour tous les coups de main en microscopie, Sandrine pour les cellules, Flavien pour les questions, Olivier pour les discussions humaines, Caro pour les transfections, Laetitia pour les commandes, Mathilde pour apprécier mon travail, Chloé pour les montages électriques et tous les autres). Merci à Sandra ma stagiaire pour s'être débrouillée vite seule et avoir scrupuleusement rempli ton cahier de labo. Merci à toutes les personnes que j'oublie de l'IPBS et du LAAS avec qui j'ai pu interagir au cours de ces trois années.
- De très près : Cécile merci pour... trop de choses : de m'avoir lancé sur le QI, d'avoir réfléchi avec moi sur des thématiques loin loin de ta formation, de m'avoir entendu marmonner et pester et refuser les cafés, d'être toujours plus énervée que moi, merci pour les dialogues de sourds en analysant les données, les quelques cigarettes, le soutien en live pendant 2 ans intenses.

Et évidemment merci aux personnes extérieures à ce projet :

Merci mes amis de m'avoir écouté râler pendant 3 ou 8 ans (je vous assure que ce n'est pas fini, vous n'allez pas être dépaysés malgré mon nouveau diplôme), d'avoir accepté mes changements d'avis et soutenu. Un merci particulier à Nicko pour son soutien en mathématique et en informatique ! Et Emilie, la gotarde super banane de la première heure, tout ça, c'est de (grâce) ta faute (à toi) :) Aurélie et Emilie, soutien moral toujours la !

Merci à ma famille de me laisser faire ce que je veux, et d'avoir finalement compris (ou peut-être pas...) tout ce que représentait cette thèse même si c'est un travail obscur et contraignant.

Pour terminer un merci illuminé à Damien qui m'a permis de terminer cette thèse dans le bonheur que peut procurer une vie de couple de thésard en dernière année... !

Table des matières

Liste des communications et publications	7
Liste des abréviations	9
Préambule	11
Introduction générale	13
I. Le transfert de gène pour la thérapie génique.....	13
A. Les barrières au transfert de gène	15
1. La barrière cellulaire	16
2. La barrière membranaire	17
3. La barrière nucléaire.....	20
B. Comment franchir ces barrières ?	22
1. Les vecteurs viraux.....	22
2. Les vecteurs chimiques :	22
3. Les vecteurs physiques.....	23
II. L'électropéabilisation	24
A. Une rapide explication	24
B. L'électrotransfert de gène	27
C. Méthodes de détection et de mesure	29
D. Modèles d'études	31
III. Le projet	32
Chapitre 1 : Validation d'un modèle ex vivo pour de l'électrotransfert de gène et son optimisation: le sphéroïde multicellulaire	35
I. Introduction	35
A. Les différences d'efficacité <i>in vivo/in vitro</i> de l'électrotransfert de gène.....	35

B.	Le modèle sphéroïde	36
C.	Thérapie génique et sphéroïde	38
D.	Problématiques.....	39
II.	Validation du modèle.....	39
A.	“First explanations for differences in electrotransfection efficiency <i>in vitro</i> and <i>in vivo</i> using spheroid model”, article publié dans le journal International Journal of Pharmaceutics en 2012.....	40
B.	Perméabilité irréversible et viabilité	51
C.	Conclusion : Le sphéroïde - un modèle pour l'étude de l'électrotransfection	54
III.	Optimisation de l'électrotransfection sur sphéroïdes.....	55
A.	Application d'impulsions électriques bipolaires.....	55
1.	Interaction ADN/membrane	55
2.	Transfection et aspect morphologique	56
3.	Perméabilité irréversible et viabilité	57
4.	Conclusion.....	58
B.	Effet de la diminution du nombre d'impulsions	59
1.	Transfection.....	59
2.	Perméabilité irréversible et viabilité	60
3.	Conclusion.....	60
IV.	Discussion et perspectives	61
 Chapitre 2 : Etude des effets de l'électroperméabilisation par AFM.....		65
I.	Introduction	65
A.	Les effets membranaires de l'électroperméabilisation : tour d'horizon	65
B.	La microscopie à force atomique	67
1.	Fonctionnement.....	68
2.	« Atomic Force Microscopy and pharmacology; from microbiology to cancerology », chapitre de livre à paraître aux éditions Nova	88

C.	Problématique	107
II.	Application de l'AFM à l'étude de l'électroperméabilisation : mesure des effets sur l'élasticité membranaire	107
A.	« Destabilization induced by électropermeabilization analyzed by Atomic Force Microscopy », article accepté dans le journal Biochimica and Biophysica Acta-Biomembranes en 2013	108
B.	Implication du cytosquelette d'actine	125
C.	Conclusions.....	129
III.	Discussion et perspectives	131
	Chapitre 3 : Effets biologiques des impulsions nanosecondes	135
I.	Introduction	135
A.	Effets membranaires	137
B.	Effets intracellulaires	139
C.	Effet sur la viabilité cellulaire.....	140
D.	Applications	142
E.	Problématiques.....	142
II.	Effets sur la membrane plasmique.....	143
A.	Détection des nanopores par Patch-Clamp et problématique	144
B.	Résultats.....	146
1.	Formation des nanopores	146
2.	Effet des drogues dépolymérisant l'actine	148
3.	Implication du cytosquelette d'actine dans l'asymétrie des nanopores	149
C.	Conclusion	151
III.	Effet sur l'enveloppe nucléaire	152
A.	« Nanosecond electric pulses effects on gene expression », article accepté dans Journal of Membrane Biology en 2013.....	152
B.	Conclusions.....	165

IV.	Développement d'applicateur nano	165
V.	Discussion et perspectives	167
Conclusion générale et perspectives		171
Matériel et Méthodes		177
I.	Culture cellulaire	177
II.	Composés généraux	177
III.	Analyse des données	178
IV.	Chapitre 1 – Sphéroïdes	178
A.	Microscopie et cytométrie.....	178
B.	Formation.....	178
C.	Électroporation.....	179
D.	Analyse quantitative.....	180
E.	Interaction ADN/membrane.....	180
F.	Viabilité.....	180
G.	Analyse qualitative.....	181
V.	Chapitre 2 - AFM	181
A.	Appareillage	181
B.	Déroulement de l'expérience et application des champs électriques.....	181
4.	Cellules fixées	182
5.	Cellules vivantes	182
C.	Perméabilité	182
D.	Viabilité.....	183
E.	Analyse des données	183
6.	Imagerie.....	183
7.	Elasticité	183

VI. Chapitre 3 - Nanosecondes	184
A. Patch-Clamp.....	184
B. Transfert de gène.....	185
1) Appareillage	185
1. Transfert de gène	187
2. Électroporation classique	187
3. Applications nanopulse	188
4. Expression de gène sur cellules HCT116-GFP	188
5. Cytométrie en flux et analyse des données	188
6. Perméabilisation	188
C. Micro-électrodes	189
Bibliographie	191
Annexe	215

Liste des communications et publications

“*Electropermeabilization: Atomic force microscopy gives new insights in membrane destabilization process*”, Chopin L., Rols M-P., Dague E.

- 17-21 Mars 2013, Bioelectrochemistry 2013, Bochum, Germany. Présentation orale.
- 14-19 Novembre 2011, Electroporation based Technologies and Treatments, Ljubljana, Slovenia. Présentation orale.

“*Multicellular Tumor Spheroid as a way to study electro-transfection mechanism*”, Chopin L., Wasungu L., Rols M-P.

- 20-23 Juin 2011, Summer school Biological membrane dynamics, Porquerolles, France. Poster.
- 4-6 Mai 2011, Bioelectrics Symposium 2011, Toulouse, France. Poster.
- 6-8 Décembre 2010, XXVèmes journées scientifiques du GTRV, Toulouse, France. Poster.
- 26-29 Juin 2010, 3rd International Symposium « Cellular Delivery of Therapeutic Macromolecules » 2010, Cardiff, United-Kingdom. Poster.

Publications :

Chopin L., Batista-Napotnik T., Montigny A., Rebersek M., Teissie J., Rols M.-P., Miklavcic D. (2013) *Nanosecond Electric Pulse Effects on Gene Expression*. Journal of Membrane Biology. In Press. 10.1007/s00232-013-9579-y

Chopin L., Roduit C., Rols M.-P, Dague E. (2013) *Destabilization induced by electropermeabilization analyzed by Atomic Force Microscopy*. Biochim Biophys Acta. In Press. 10.1016/j.bbamem.2013.05.035

Chopin L., Formosa C., Rols M.-P, Duval E.R., Dague E. (2013) *Imaging living cells surface and quantifying its properties at high resolution using AFM in QI™ mode*, Micron – In Press 10.1016/j.micron.2013.02.003

Pillet F., Chopin L., Formosa C, Dague E. (2013), *Atomic Force Microscopy and pharmacology; from microbiology to cancerology*. Review, BBA- General Subject, revisions on going

Chopin L., Wasungu L., Rols M.-P. (2012) *First explanations for differences in electrotransfection efficiency in vitro and in vivo using spheroid model*, International Journal of Pharmaceutics - Volume 423, Issue 1, Pages 7–15 10.1016/j.ijpharm.2011.04.054

Liste des abréviations

α : angle d'ouverture de la pointe en AFM.

AFM : Microscopie à Force Atomique (Atomic Force Microscopy)

ADN : Acide Désoxy-ribo Nucléique

ARN : Acide Ribo Nucléique

CHO : Cellules d'Ovaire d'Hamster Chinois (Chinese Hamster Ovary cells)

δ : Indentation

d : distance

E : Module d'élasticité

E : champ électrique, intensité

ECT : Électro-Chimio-Thérapie

EGT : Électro-Géno-Thérapie

EP : Électroperméabilisation

E_p : Valeur seuil d'intensité

F : force

FV : Force Volume

GFP : Green Fluorescent Protein

HCT : Cellule tumorales humaines colorectales (Human Colorectal Tumor cells)

Lat : Latrunculine

nsPEF : impulsions nanosecondes (Nanosecond Pulsed Electric Field)

Ψ : Potentiel transmembranaire

PI : Iodure de Propidium (Propidium Iodide)

PS : phosphatidylsérine

QI : Quantitative Imaging

r : rayon

RE : réticulum endoplasmique

τ : temps de charge

t : temps, durée

YM : Module d'Young (Young Modulus)

ν : Coefficient de poisson

3D : Trois-dimension

Préambule

Effets des champs électriques pulsés milli et nanosecondes sur cellules et tissus.

Le transfert de gène représente un challenge pour la thérapie génique, et l'électroperméabilisation peut être une réponse à sa réussite en alliant à la fois efficacité, sûreté et ciblage. Bien que son utilisation en chimiothérapie soit sûre car localisée, la technique d'électroperméabilisation pour le transfert de gène nécessite encore des améliorations. La compréhension des mécanismes à l'origine ou découlant de l'électroperméabilisation (EP) membranaire est une étape clef dans l'évolution de la technique, son optimisation et la sécurité de son application. Aujourd'hui certaines techniques d'imagerie et de mesure sont encore peu exploitées pour répondre à ces problématiques, et il est nécessaire de les adapter pour les utiliser. De la même façon les nouvelles classes d'impulsions électriques très brèves (nanosecondes) représentent de nouvelles perspectives pour l'électroperméabilisation, et l'investigation de leurs effets est indispensable.

Cette thèse s'est attachée à étudier les effets de l'électroperméabilisation sur le vivant dans le cadre du transfert de gène, en s'intéressant à chaque étape de ce transfert, donc à chaque barrière rencontrée par le gène. Pour l'étude de chacune de ces barrières, des modèles, des techniques d'imagerie, de mesure, et des paramètres électriques émergents et pertinents dans le contexte actuel de recherche sur les effets des champs électriques ont été utilisés. Ce projet transversal combine ainsi différents types d'impulsions, en particulier les impulsions nanosecondes, et l'adaptation de la microscopie à force atomique (AFM) à l'étude de l'électroperméabilisation afin d'amener de nouvelles données dans la description du phénomène d'électroperméabilisation et des effets biologiques des ondes électromagnétiques.

L'introduction générale de ce manuscrit a pour but d'aborder les problématiques à l'origine du projet de thèse et de présenter les grandes lignes indispensables à l'appréhension du manuscrit dans son ensemble. Après avoir décrit les obstacles biologiques au transfert de gène, les solutions techniques existantes pour les franchir sont présentées. La technique d'électroperméabilisation, son principe, les modèles et techniques de détection sont détaillés afin de placer le contexte de cette étude. Des états de l'art spécifiques sont réalisés en introduction de chaque chapitre afin d'établir, au mieux, le contexte scientifique et les choix stratégiques appliqués pour la réalisation des études qui composent ce manuscrit.

Introduction générale

I. Le transfert de gène pour la thérapie génique

La thérapie génique constitue une nouvelle alternative aux traitements chimiques (chimiothérapie) et physiques (chirurgie, radiothérapie) contre le cancer ou d'autres types de maladies (Ginn *et al.*, 2013) (Figure 1).

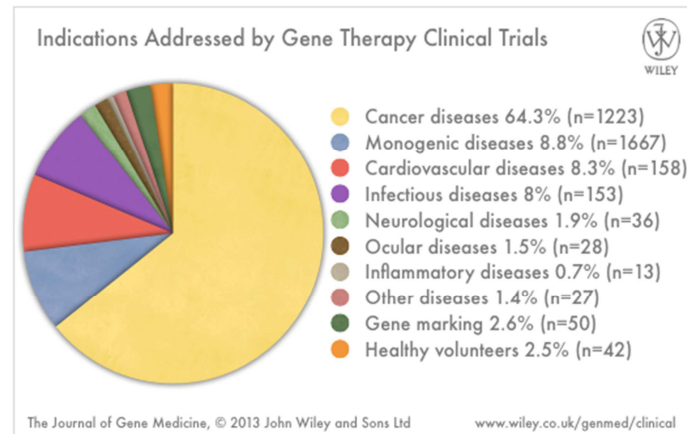


Figure 1 : Maladies actuellement traitées par thérapie génique. Adapté de Gene Therapy Clinical Trials Wordwilde <http://www.abedia.com/>

Ce type de thérapie a pour but de modifier l'expression génique au sein de l'organisme afin de pallier à un défaut d'expression ou de provoquer l'expression de protéines ayant un effet thérapeutique (Ginn *et al.*, 2013). Pour ce faire, il est nécessaire de transférer le gène d'intérêt dans les cellules cibles. Cette stratégie permet un ciblage thérapeutique contrairement aux chimiothérapies pour lesquelles il est difficile de contrôler les cibles. En effet la protéine exprimée va avoir un rôle spécifique prédéterminé et dans certaines stratégies le gène peut être transféré de manière spécifique dans un tissu. Le même type de raisonnement peut être effectué pour des molécules chimio-thérapeutiques, mais la transfection d'un gène nécessite la maîtrise de l'expression de la protéine et donc du traitement. Si le choix est fait d'une transfection transitoire, l'effet sera court dans le temps et permettra ainsi de limiter les effets secondaires pouvant être observés dans les cas de transfection stable où le gène s'insère dans le génome et peut provoquer la surexpression d'oncogène par exemple (Hacein-Bey-Abina *et al.*, 2003). La cible de ces thérapies peut être les tumeurs elles-mêmes ou d'autres tissus dans le cas de vaccination génique.

Les gènes sont le plus souvent transfectés sous forme d'ADN plasmidique. Le plasmide contient les séquences nécessaires à l'expression (promoteur...) en plus du gène lui-même. Dans le cas particulier de thérapies anti-cancéreuses, les gènes utilisés sont des gènes de régulation de la prolifération cellulaire (Jia *et al.*, 2012) ou des gènes codant des protéines du système immunitaire (Mellman *et al.*, 2011) pour provoquer un « auto-soin » de l'organisme (Figure 2) (Ginn *et al.*, 2013).

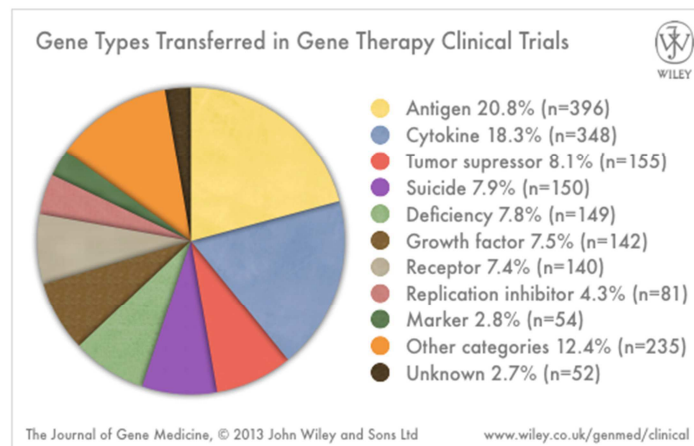


Figure 2 : Types de gènes utilisés en thérapie génique. Adapté de Gene Therapy Clinical Trials Wordlwide <http://www.abedia.com/>.

Ce dernier choix provoque une augmentation de la réponse immunitaire et une élimination « naturelle » des cellules cancéreuses détectées, contrairement à des thérapies contre la prolifération qui peuvent affecter d'autres types cellulaires naturellement prolifératifs comme par exemple les cellules souches. Les cellules ciblées pour l'expression du transgène peuvent être des cellules musculaires (Takahashi *et al.*, 2013), ou les cellules tumorales elles-mêmes dans certains cas (Daud *et al.*, 2008). Le transfert dans le muscle permet une importante production de la protéine d'intérêt car ce sont des cellules qui présentent de très bon taux de transfection (André *et al.*, 2008), néanmoins la maîtrise dans le temps de l'expression de la protéine reste délicate étant donné que les cellules musculaires se divisent peu. En revanche, la transfection des cellules tumorales présente un intérêt pour des expressions maîtrisées. Ces cellules proliférant rapidement vont perdre le plasmide au cours des divisions et ainsi limiter dans le temps l'expression de la protéine d'intérêt. D'autre part, les cellules tumorales étant la cible à éliminer, on assisterait à une sorte de rétro-contrôle en fonction de l'efficacité du traitement (Figure 3), les cellules produisant la protéine d'intérêt étant éliminées au cours du temps. Le transfert de gène dans les cellules tumorales représente

donc une stratégie intéressante car elle permettrait d'obtenir une expression et une réponse adaptées à la quantité de cellules à éliminer.

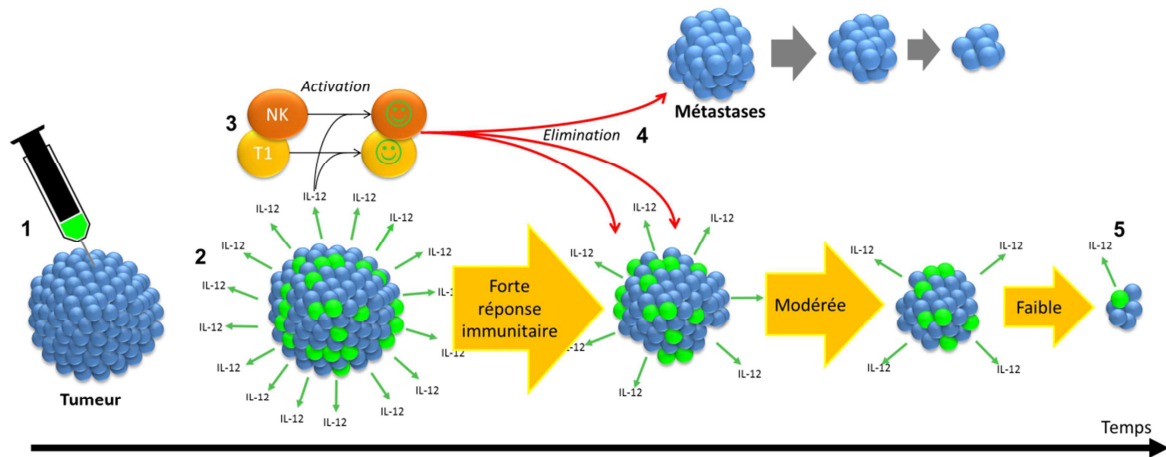


Figure 3 : Principe du transfert de gène codant pour l'interleukine 12. Le transfert est théoriquement fait dans les cellules tumorales (1) qui vont produire l'interleukine 12 (2). Elle va activer les cellules T et NK du système immunitaire inné qui est ainsi déclenché (3) et non seulement élimine les cellules tumorales transfectées, mais aussi les cellules tumorales métastatiques (4). La quantité de cellules exprimant l'interleukine diminue en raison de l'attaque des cellules tumorales par le système immunitaire, modulant la réponse immunitaire (5).

A. Les barrières au transfert de gène

Lors d'un transfert de gène trois principales barrières sont rencontrées par le plasmide avant qu'il n'accède à la machinerie de transcription qui se situe dans le noyau : les cellules environnantes, la membrane plasmique et l'enveloppe nucléaire (Figure 4).

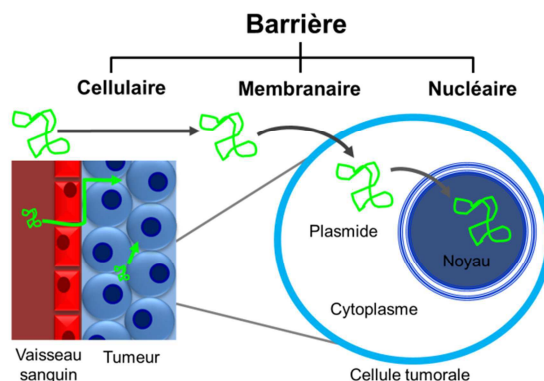


Figure 4 : les principales barrières rencontrées par le plasmide lors de la transfection.

Il est en effet montré que l'efficacité de transfection *in vivo* reste très faible comparée aux résultats obtenus *in vitro*. Si l'on s'intéresse au transfert de gènes dans les tumeurs par électroporabilité, on peut voir que seulement 5 % des cellules vont exprimer le

transgène *in vivo* contre plus de 50 % *in vitro* sur cellules cultivées en deux dimensions (Cemazar *et al.*, 2009a; Chopinet *et al.*, 2012; Golzio *et al.*, 2004; Rols *et al.*, 1998). Ces différences sont dans certains cas liées au type cellulaire, les cellules tumorales étant généralement plus difficiles à transfecter que des cellules musculaires. Cependant, cette différence de résultats entre l'*in vivo* et l'*in vitro* est aussi liée à la première barrière rencontrée par le plasmide : la barrière cellulaire. Une fois passée cette première barrière et en contact avec la cellule cible, les plasmides sont confrontés au passage de sa membrane plasmique combinée au glycocalix, qui représente la barrière protectrice de la cellule, et la deuxième rencontrée par le plasmide. Au contact des cellules (en particulier des cellules musculaires), l'ADN sous forme plasmidique peut être internalisé dans le cytoplasme sans action extérieure, cependant l'efficacité de transfection d'ADN nu sans vectorisation reste très faible (André *et al.*, 2008).

Après avoir franchi la membrane plasmique, l'ADN devra ensuite traverser le cytoplasme. Il est montré que seulement 1 à 10% des plasmides ayant réussi à franchir la membrane plasmique étaient ensuite exprimés selon la méthode de transfection ou le type cellulaire (Cohen *et al.*, 2009; Glover *et al.*, 2010). Comme montré en 2002 par Golzio *et al.*, le taux d'expression augmente 8 fois lorsque les cellules sont synchronisées en phase G2 ou mitose, phase pendant laquelle l'enveloppe nucléaire est démantelée, mettant en évidence le rôle de barrière de l'enveloppe nucléaire. En effet, le plasmide doit pouvoir franchir l'enveloppe nucléaire afin d'être au contact de la machinerie de transcription et pouvoir être exprimé.

1. La barrière cellulaire

In vivo le plasmide doit pouvoir atteindre les cellules cibles. Le problème de dissémination du plasmide est donc lié à la présence des cellules environnantes qui vont bloquer sa diffusion dans le tissu. Si on considère les cellules tumorales comme cible, la barrière cellulaire est représentée par les cellules tumorales elles-mêmes, les cellules endothéliales mais aussi le microenvironnement tumoral composé de fibroblastes-myofibroblastes, de la matrice extracellulaire, de cellules inflammatoires et immunocompétentes (lymphocytes, cellules NK, plasmocytes, histiocytes, polynucléaires) et des néovaisseaux (Billotet C. et Jouanneau J., 2008) (Figure 5).

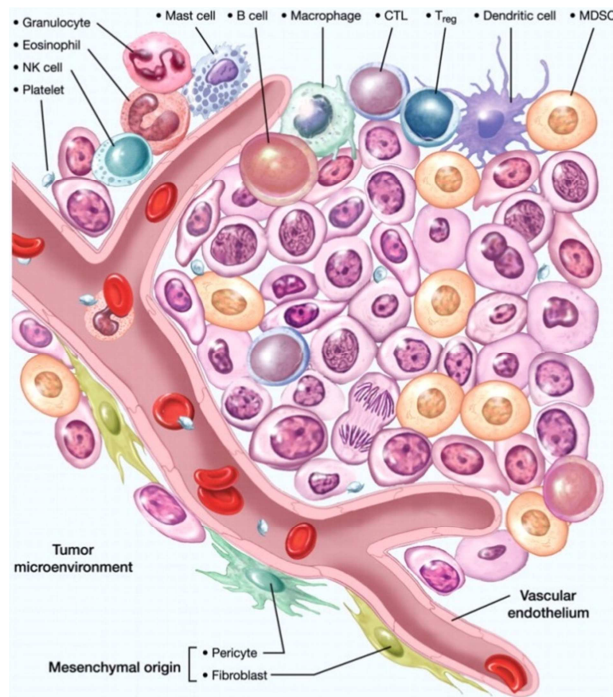


Figure 5 : Illustration du microenvironnement tumoral. Adapté de <http://cancerres.aacrjournals.org/>, Journal of Cancer Research review.

Les cellules endothéliales représentent la première barrière à franchir en cas d'injection intraveineuse du plasmide. C'est pourquoi l'ADN sous forme plasmidique peut-être injecté directement dans la tumeur. Ce procédé limite d'une part la quantité de plasmide à injecter, et permet une meilleure disponibilité au niveau tumoral car le plasmide est ainsi en contact direct avec certaines des cellules tumorales. Cependant, les cellules les plus éloignées du point d'injection sont généralement hors de portée du plasmide. De la même façon lors d'une injection intraveineuse, les cellules les plus éloignées des vaisseaux angiogéniques vont être difficilement atteintes par le plasmide. Peu de méthodes sont disponibles pour augmenter la distribution du plasmide dans la tumeur *in vivo*. *Ex vivo*, l'utilisation d'enzymes dégradant la matrice extracellulaire dans des complexes multicellulaires peut augmenter la circulation du plasmide entre les cellules (Cemazar *et al.*, 2012; Goodman *et al.*, 2007), mais généralement les autres cellules ne représentent pas une barrière dans le cas de culture à deux dimensions ou en suspension *in vitro*.

2. La barrière membranaire

La membrane plasmique est une bicouche phospholipidique constituée de lipides polaires qui prévient tout passage non contrôlé de molécules en créant une zone hautement hydrophobe entre l'extérieur de la cellule et le cytoplasme. Elle a pour rôle la protection de la

cellule, le maintien de son homéostasie, et un filtrage des molécules ou protéines pouvant entrer et sortir de la cellule. On distingue trois classes de lipides : les glycérophospholipides, les sphingolipides et les stérols (van Meer *et al.*, 2008). Pour les cellules mammifères, il est à noter que la composition en phospholipides des feuillettes internes et externes diffère. Phosphatidylcholine et sphingomyéline sont majoritairement présentes sur le feuillet externe, et phosphatidylsérine et phosphatidyléthanolamine sur le feuillet interne (van Meer *et al.*, 2008). Le changement de feuillettes de certains lipides (en particulier phosphatidylsérine) entre en jeu lors de mécanismes cellulaires comme l'apoptose (Fox *et al.*, 1990). Cependant, la composition de la membrane ne se limite pas aux lipides, car beaucoup de protéines y sont insérées afin de permettre, entre autre, une perméabilité sélective de la membrane comme discuté plus bas. De la même façon des sucres sont associés aux lipides et à ces protéines du côté intra ou extracellulaire et forment ainsi une couche de protection supplémentaire, hydrophile sur la face extracellulaire, appelée glycocalix (Figure 6).

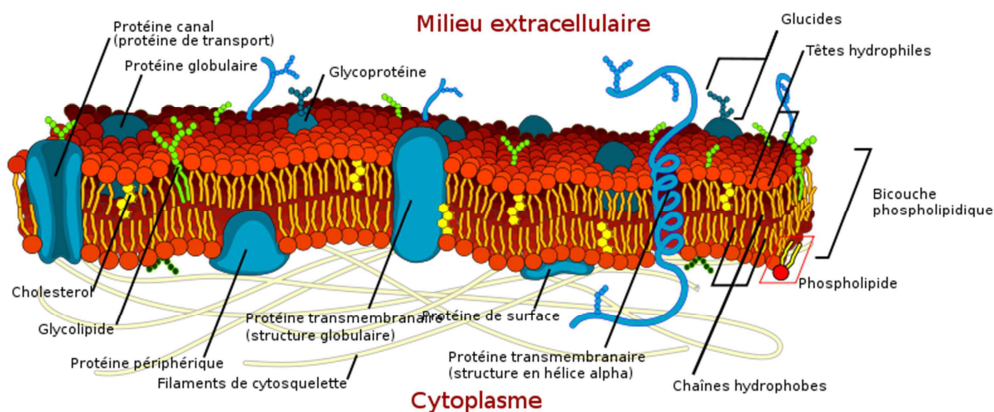


Figure 6 : Représentation de la composition de la membrane plasmique. Adapté de wikipedia.org

La composition de la membrane varie d'un type cellulaire à un autre en fonction du rôle de la cellule. L'expression des protéines varie en fonction de l'activité cellulaire, car les protéines transmembranaires ont un rôle d'échange (comme les canaux ioniques) ou de communication (récepteurs).

Du côté cytoplasmique, de nombreux composants interagissent avec la membrane par l'intermédiaire des protéines transmembranaires ou par liaison avec les lipides, et en particulier le cytosquelette (Lodish H *et al.*, 2000). Par exemple, les microtubules (formés de tubuline) ou les filaments d'actine corticale s'ancrent à la membrane, la structurent, et donnent sa forme à la cellule (Figure 7).

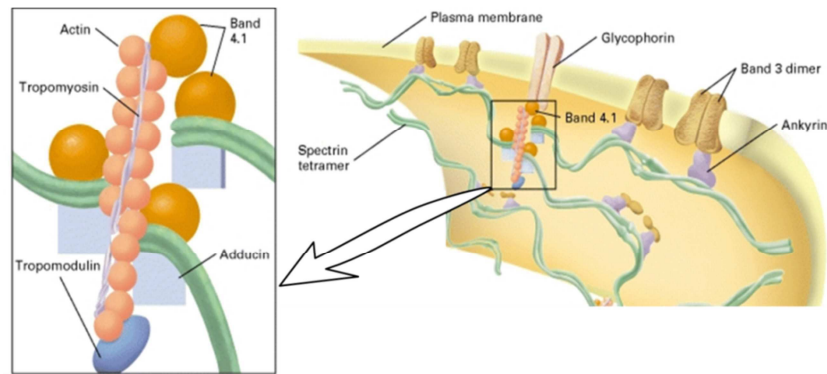


Figure 7 : Illustration de l'ancrage des filaments d'actine à la membrane par l'intermédiaire des protéines transmembranaires dans le cas des erythrocyte. Adapté de (Lodish H *et al.*, 2000).

Les petites molécules non chargées diffusent à travers la membrane selon leur gradient de concentration par un transport passif. Les petites molécules chargées et les macromolécules nécessitent quant à elles un transport spécifique à travers la membrane (Al-Awqati, 1999). Différents mécanismes ont donc été mis en place pour franchir cette barrière et contrôler les échanges avec le milieu extérieur pour le maintien de l'homéostasie, la sécrétion, la communication intercellulaire et l'internalisation de molécules :

- **Les canaux ioniques et pompes.** Ils sont responsables du passage de petites molécules chargées. Les premiers, comme leur nom l'indique, laissent passer les ions selon leur gradient électrochimique lié aux concentrations intra et extracellulaire et au potentiel membranaire. Les pompes font passer des ions contre leur gradient électrochimique en utilisant de l'énergie (ATP) selon les besoins cellulaires (Berk *et al.*, 2005).
- **L'endocytose.** L'entrée de molécules dans la cellule est assurée par l'invagination de la membrane et la création d'une vésicule fermée qui fusionne ensuite avec l'endosome (Maxfield et McGraw, 2004). Trois processus d'internalisation sont décrits (Bohdanowicz et Grinstein, 2013) : i) la pinocytose qui est un phénomène constitutif donc non spécifique, ayant lieu par la projection de lamellipodes dans le milieu extracellulaire et leur fusion ; ii) la phagocytose qui est provoquée par l'interaction de la molécule avec la membrane (reconnaissance par le biais des lectines de la matrice extracellulaire) et implique l'internalisation de grosses et très grosses molécules voire des organismes unicellulaires (les macrophages sont spécialisés dans cette fonction pour l'élimination des bactéries et autres déchets) ; iii) finalement l'endocytose, qui consiste en l'internalisation spécifique de molécules médiée par des

réactions ligand-récepteurs membranaires (Doherty et McMahon, 2009). C'est un mécanisme très sélectif. Le cytosquelette d'actine joue un rôle important dans ces mécanismes en intervenant dans les processus d'invagination et de courbure de la membrane (Skruzny *et al.*, 2012) (Figure 8).

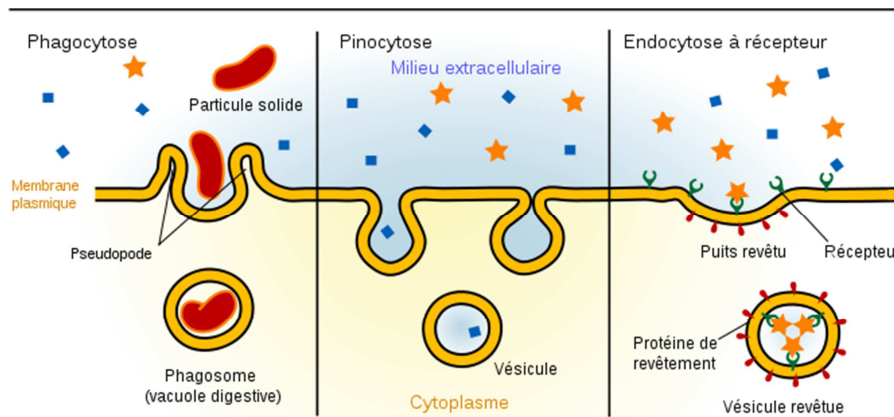


Figure 8 : Les trois types d'endocytose, adapté de Mariana Ruiz, via Wikimedia Commons.

- **L'exocytose.** La sortie de molécules du cytoplasme vers le milieu extracellulaire est assurée par le mécanisme d'exocytose, c'est-à-dire par fusion de vésicules intracellulaires contenant les molécules à libérer avec la membrane plasmique. Elle peut être constitutive ou régulée par des signaux extracellulaires (Jahn, 2004) (Figure 9).

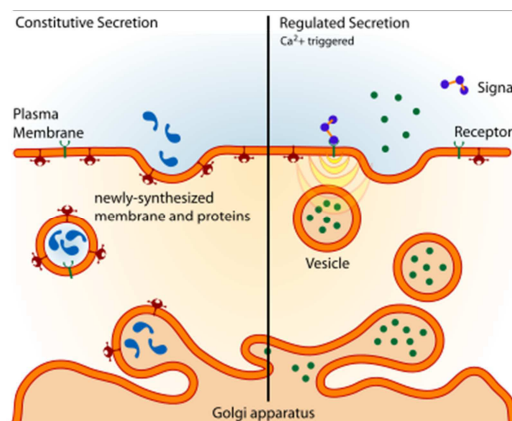


Figure 9 : Exocytose, adapté de Mariana Ruiz, via Wikimedia Commons

3. La barrière nucléaire

L'enveloppe nucléaire est composée d'une double bicouche phospholipidique continue avec le réticulum endoplasmique. Du côté intranucléoplasmique, l'enveloppe nucléaire va être recouverte d'un réseau dense de protéines appelé lamina nucléaire qui va jouer un rôle dans la

rigidité de l'enveloppe ainsi que la forme du noyau et est assimilé à un nucléosquelette (Burke et Stewart, 2013). Cette double membrane a pour effet de hautement protéger l'accès au matériel génétique, qui n'est permis que par l'intermédiaire des pores nucléaires qui la traversent. Ce complexe protéique, dont la composition n'est pas encore complètement élucidée, représente la porte d'entrée vers le nucléoplasme et exerce une sélection importante. Les pores nucléaires sont des canaux aqueux avec un diamètre externe de 100 nm et un canal central de transport de 40 nm à travers lequel les échanges bidirectionnels (vers le cytoplasme ou vers le nucléoplasme) sont effectués. Les protéines composant les pores nucléaires sont uniquement présentes dans l'enveloppe du noyau et s'appellent des nucléoporines (Figure 10).

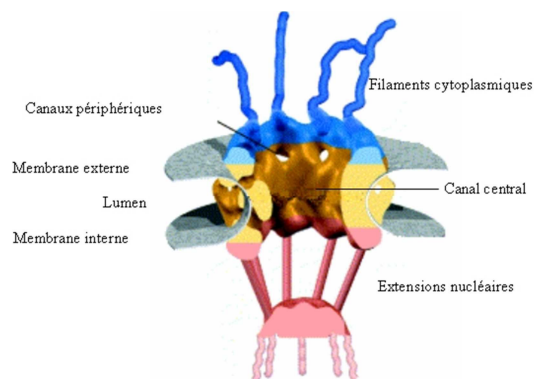


Figure 10 : Le complexe du pore nucléaire Adapté de Fahrenkrog *et al.*, 2004. © Marie-Odile Guimond, 2004.

Les nucléoporines ne traversent pas les bicouches phospholipidiques comme c'est le cas des protéines transmembranaires. En réalité les deux bicouches fusionnent et forment le pore grâce à une importante courbure. Certaines des protéines créent un pont entre les deux bicouches, et peuvent ainsi être responsables du maintien de l'espace perinucléaire (environ 50 nm). Les nucléoporines orientées vers le cytoplasme présentent un grand nombre de répétition phenylalanine-glycine qui établissent la barrière et participent à la médiation du transport actif récepteur-dépendant à travers le pore. Elles peuvent participer à l'ancrage à l'enveloppe du cytosquelette du côté cytoplasmique et de la chromatine du côté nucléoplasmique (Hetzer, 2010).

Le passage des pores par des protéines ne se fait que si elles portent un signal de localisation nucléaire (NLS), et sont ainsi prises en charge par des protéines de transport spécifiques (karyophérines) reconnues par le complexe de pore nucléaire. L'ADN est très rapidement complexé à des protéines une fois dans le cytoplasme et son transport dans le nucléoplasme est permis grâce aux protéines contenant la séquence NLS et les karyophérines. L'importation d'ADN à travers les pores nucléaires peut être médiée par des séquences

d'éléments eucaryotes tels que des séquences « enhancers » comme le SV40 DNA « nuclear targeting sequence » (DTS). Les facteurs de transcription ayant une localisation nucléaire se lient à ce type de séquence et provoquent le transport dans le noyau grâce à leur séquence NLS (Lam et Dean, 2010).

B. Comment franchir ces barrières ?

L'ADN nécessite d'être vectorisé afin de pouvoir intégrer les cellules cancéreuses. La plupart des vecteurs ont pour but de permettre au gène de passer la membrane plasmique et/ou l'enveloppe nucléaire. Certains vecteurs permettent quant à eux de cibler les cellules cancéreuses et donc de développer des stratégies complètes pour s'affranchir de la barrière cellulaire en plus de la membrane et de l'enveloppe nucléaire. Une liste non exhaustive des méthodes de vectorisation et de ciblage est présentée ci-dessous :

1. *Les vecteurs viraux.*

Les virus montrent une efficacité extrême à l'infection de leurs cellules hôtes. La stratégie thérapeutique consiste à utiliser les caractéristiques virales qui permettent à leur ADN de s'intégrer dans la cellule : le génome du virus est déléché des séquences permettant la réplication de son génome et son caractère infectieux, et le gène d'intérêt thérapeutique est inséré dans la séquence (Gardlík *et al.*, 2005). Des cellules d'emballage qui expriment les gènes produisant les protéines de capsid du virus sont utilisées pour produire le vecteur complet. Ainsi le mécanisme d'entrée dans la cellule est conservé et le gène est ainsi exprimé par la cellule cible « infectée » par le vecteur viral. Le problème présenté par certains rétrovirus est que le gène est intégré dans le génome de la cellule cible et peut donc conduire à la surexpression de gènes indésirables (type oncogène) selon le site de recombinaison (Hacein-Bey-Abina *et al.*, 2003).

2. *Les vecteurs chimiques :*

La vectorisation chimique consiste à emballer l'ADN sous forme plasmidique grâce à des molécules chargées qui facilitent le passage de la membrane. Le complexe formé est considéré comme une nanoparticule (Harrisson *et al.*, 2013). Ces molécules peuvent être des lipides (formation de liposomes) (Pitard, 2002; Sawant et Torchilin, 2012) ou des polycations (type poly-L-lysine, polyéthylèneimine) qui permettent une interaction avec la membrane plasmique et une internalisation par endocytose. Finalement il est aussi possible d'utiliser des peptides ayant la capacité de franchir la membrane plasmique (Trabulo *et al.*, 2012).

L'ensemble de ces vecteurs peut être combiné à des molécules type anticorps (Julien *et al.*, 2011) ou autres ligands (aptamères (Zhang *et al.*, 2011)) permettant un ciblage des cellules après une injection intraveineuse grâce à des récepteurs membranaires spécifiques. Les nanoparticules peuvent aussi contenir des molécules spéciales type ions qui permettent un ciblage par l'intermédiaire de techniques physiques comme la magnétofection (Cole *et al.*, 2011) (voir ci-dessous). Des techniques émergentes basées sur les nanotechnologies sont en cours de développement (Ranganathan *et al.*, 2012), comme l'utilisation de nanotubes (Madani *et al.*, 2011), mais aussi l'utilisation des cellules elles-mêmes comme vecteur (Batrakova *et al.*, 2011). L'ensemble de ces vecteurs présente la problématique de devoir être éliminé par l'organisme après avoir accompli leur mission, et à l'heure actuelle le devenir de ces containers et leurs effets sur le long terme *in vivo* restent méconnus.

3. Les vecteurs physiques

Les techniques de vectorisation physique peuvent être divisées en deux classes : les techniques d'injection et les techniques visant à perturber la membrane plasmique pour permettre l'entrée du plasmide.

La technique d'injection simple dans le tissu cible ou d'administration par voie systémique ne provoque aucune perturbation de la membrane et présente donc de faible taux de transfection (variable selon le tissu cible, comme discuté précédemment). D'une part le plasmide est rapidement dégradé par les nucléases présentes dans le sérum, d'autre part il lui sera très difficile de franchir la membrane non déstabilisée. Des variantes de l'injection directe ont été mises en place comme l'injection hydrodynamique qui a pour effet, en injectant rapidement une grande quantité de solution contenant le plasmide dans une veine, d'augmenter la pression intravasculaire et forcer le passage du plasmide dans le tissu et dans les cellules. Cette technique est souvent combinée à une vectorisation chimique (Nakamura *et al.*, 2013). La microinjection consiste quant à elle à insérer les plasmides directement dans le noyau des cellules à l'aide d'une micropipette. Elle représente donc une technique avec 100% de réussite, mais un très faible rendement (Chenuet *et al.*, 2009).

La biolistique permet de passer la barrière membranaire en bombardant le tissu de microparticules d'or ou de tungstène couplées au plasmide qui de ce fait pénètrent directement dans le cytoplasme et le noyau. Cependant seulement les cellules en surface du tissu sont transfectées, limitant cette technique à la transfection de la peau (Steitz et Tüting, 2013).

On peut dénombrer quatre techniques visant à déstabiliser la membrane plasmique. i) Le laser infrarouge femtoseconde qui produit la formation de pores dans la membrane (Rudhall *et al.*, 2012). Cependant cette technique se limite à la profondeur de pénétration du laser dans les tissus qui est très faible (2 mm) (Tsen *et al.*, 2009). ii) Les ultrasons utilisés en combinaison avec des microbulles augmentent l'efficacité de transfection par un mécanisme de formation de pores également (Escoffre *et al.*, 2013). iii) Les champs magnétiques sont utilisés en association avec des nanoparticules magnétiques qui franchissent la membrane plasmique sous l'influence du champ (Hüttinger *et al.*, 2008). iv) Finalement, l'électroperméabilisation (ou électroporation), qui consiste en l'application maîtrisée de champs électriques perturbant la membrane plasmique (Daud *et al.*, 2008; Favard *et al.*, 2007; Neumann *et al.*, 1982). Ces techniques utilisées avec de l'ADN nu peuvent provoquer une inflammation et une douleur lors de leur application. Contrairement aux autres techniques, elles n'introduisent pas de composés dans l'organisme autre que le plasmide qui, s'il n'est pas transfecté dans la cellule sera éliminé par des nucléases.

II. L'électroperméabilisation

A. Une rapide explication

L'électroperméabilisation consiste à appliquer des champs électriques pulsés provoquant la perméabilisation transitoire et localisée de la membrane plasmique des cellules se trouvant entre les électrodes. Cette déstabilisation est provoquée par un changement de différence de potentiel électrique transmembranaire.

Du fait de son imperméabilité, la membrane représente une capacité électrique dont la charge capacitive est due aux différences de concentrations des ions entre les milieux extra et intracellulaire. Le maintien d'une différence de concentration intra et extracellulaire des ions Na^+ et K^+ par la pompe Na^+/K^+ ATPase forme une différence de potentiel de -70 mV au niveau de la membrane.

Lors de l'application d'un champ électrique sur cette membrane, un potentiel transmembranaire induit $\Delta\psi_E$ s'ajoute au potentiel natif $\Delta\psi_0$. La différence de potentiel induit par les champs électriques est décrite par l'équation suivante :

$$\Delta\psi_E = f.g(\lambda).r.E.\cos\theta(M).(1-e^{-t/\tau}) \quad (1)$$

Avec f le facteur de forme de la cellule, $g(\lambda)$ la fonction décrivant les conductivités des milieux intra et extracellulaire, r le rayon de la cellule, E l'intensité du champ électrique, $\theta(M)$ l'angle entre la normale à la membrane à la position M et l'orientation du champ électrique, t le temps à partir du début de l'impulsion et τ le temps de charge de la membrane.

Cette différence induite s'ajoute au potentiel natif, et l'effet est donc dépendant de l'intensité du champ électrique, de l'endroit où l'on se trouve sur la membrane, de la durée de l'impulsion en regard du temps de charge de la membrane (Equation 1). Les charges de part et d'autre de la membrane se réorganisent du fait du champ et provoquent une hyperpolarisation côté anode et une dépolarisation côté cathode, qui participent au phénomène de perméabilisation (Figure 11).

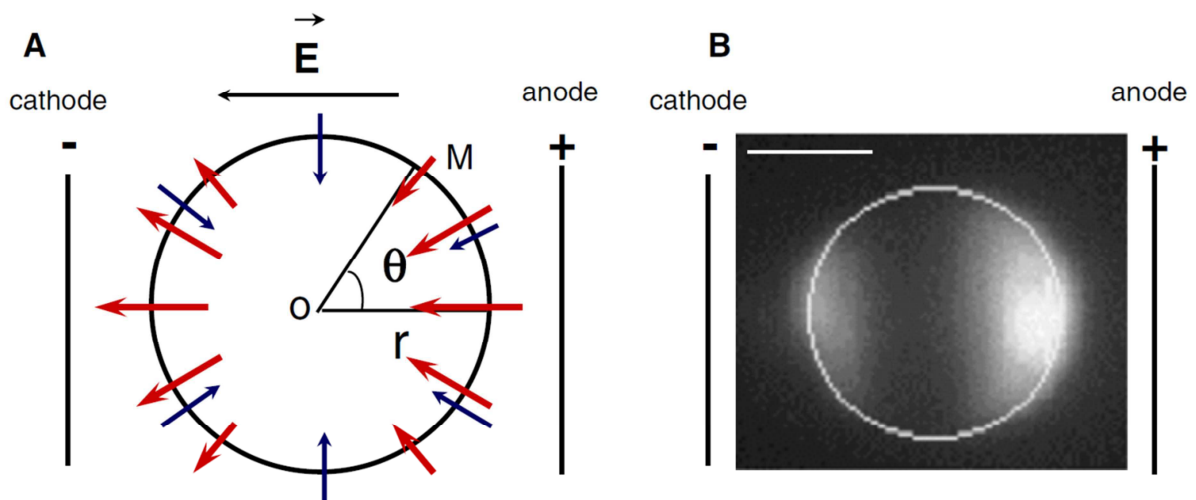


Figure 11 : Le phénomène d'électroperméabilisation. A : représentation de la membrane plasmique et du potentiel natif en bleu, et celui induit par le champ électrique en rouge. B : localisation de la perméabilisation face aux électrodes détectée par l'entrée d'iodure de propidium (PI) dans une cellule après un train d'impulsion de 10 impulsions de 5 ms, 1 Hz, 700 V/cm. Barre d'échelle : 10 μm . Adapté de Escoffre *et al.*, 2009.

En d'autres termes, la perméabilisation est dépendante des paramètres électriques appliqués. En effet la perméabilisation s'observe d'abord aux pôles de la cellule faisant face aux électrodes lorsque la différence de potentiel transmembranaire franchit la valeur seuil de ± 200 mV (Teissié et Rols, 1993) (Equation 2). Ceci se produit lorsque l'intensité des champs électriques dépasse une valeur critique E_p .

$$|\Delta\psi_E + \Delta\psi_0| \geq 200 \text{ mV} \quad (2)$$

L'intensité nécessaire pour dépasser E_p dépend de la taille de l'objet à perméabiliser, plus l'objet sera petit plus l'intensité devra être élevée. Elle détermine également la surface membranaire affectée. Ensuite, le nombre et la durée des impulsions vont avoir pour résultat

d'augmenter le niveau de perméabilisation sur la surface pré-déterminée par l'intensité électrique (Escoffre *et al.*, 2009; Rols et Teissié, 1990).

L'électroperméabilisation peut être décrite comme un processus en 5 étapes (Teissie *et al.*, 2005):

- l'initiation : lorsque l'intensité des champs électriques est supérieure à E_p et permet de franchir le seuil de perméabilisation
- l'expansion : modulée par le nombre et la durée des impulsions
- la stabilisation : maintien d'un état perméable stable même après l'arrêt des impulsions
- la récupération : perte progressive de l'état perméable et retour à l'état initial impliquant le cytosquelette
- la mémoire : des phénomènes membranaires type flip flop et macropynocytose ont encore lieu dans les heures qui suivent la perméabilisation, et les cellules conservent une fusogénicité importante

Les trois premières étapes qui constituent la réelle perméabilisation se déroulent en quelques millisecondes, la récupération en quelques dizaines de secondes à 37 °C, conduisant à une perméabilisation transitoire brève permettant de préserver la viabilité cellulaire. L'utilisation de paramètres « extrêmes » peut mener à une perméabilisation irréversible et à la mort cellulaire, et être utilisée à des fins cliniques (Al-Sakere *et al.*, 2007).

Les applications de l'électroperméabilisation sont nombreuses. En agro-alimentaire, la technique permet de potentialiser l'extraction de composés, ou la conservation des aliments (Schilling *et al.*, 2008). Utilisée dans des conditions électriques intenses, l'électroperméabilisation permet l'éradication de micro-organismes et ainsi la désinfection d'eau (Gusbeth *et al.*, 2009). Finalement, la technique est utilisée pour des applications biotechnologiques, pharmaceutiques et médicales. Elle peut permettre l'extraction de protéines (Coustets *et al.*, 2013) mais permet aussi de potentialiser l'action de molécules thérapeutiques en facilitant leur entrée dans les cellules à traiter. En particulier, l'électrochimio-thérapie (ECT) est pratiquée dans plus de 100 centres hospitaliers essentiellement localisés en Europe (Escoffre et Rols, 2012; Gehl, 2008; Mir *et al.*, 2003). Cette technique a l'avantage de cibler la zone à traiter, ici des tumeurs accessibles, en appliquant les champs électriques uniquement sur la tumeur. L'agent anti-cancéreux (cisplatine, bléomycine) pénètre

ainsi exclusivement dans les cellules où le champ électrique a été appliqué, et les éradique donc préférentiellement. Tout comme les micro-organismes, les cellules malignes peuvent aussi être éradiquées par l'application de champs électriques intenses, technique appelée IRE (Irreversible Electroporation) (Al-Sakere *et al.*, 2007). Finalement, l'électro-génothérapie (EGT) est en développement pour les soins anti-cancéreux, et s'intéresse cette fois à faire pénétrer des gènes dans les cellules cibles (Favard *et al.*, 2007; Mir, 2009). L'ensemble de ces applications est fonction de l'intensité du champ électrique appliqué, de la durée des impulsions et de la cellule cible. Par exemple en désinfection l'intensité est très élevée (plusieurs dizaines de kV/cm). En ECT, des impulsions de l'ordre de la microseconde et de forte intensité (1-2 kV/cm) sont appliquées afin de perméabiliser efficacement la membrane. En EGT, comme décrit plus bas, les impulsions appliquées sont plus longues et moins intenses. Finalement, depuis une dizaine d'année, des impulsions ultra-courtes (ns) et très intenses sont étudiées pour leur potentielle capacité à déstabiliser non seulement la membrane plasmique, mais aussi celle des organites intracellulaires.

B. L'électrotransfert de gène

La première électrotransfection a été réalisée en 1982 sur des cellules de lymphocytes de souris avec un plasmide codant pour la thymidine kinase du virus Herpès Simplex (Neumann *et al.*, 1982). Cette application particulière des champs électriques au transfert de gène dérivait de la découverte de leur capacité à rendre les cellules perméables à des petites molécules (Neumann et Rosenheck, 1972). La facilité d'utilisation de ces impulsions électriques et leur efficacité en ont très rapidement fait une technique de référence de transfert de gène transitoire *in vitro*. Rapidement des études mécanistiques s'intéressant au transfert de gène ont été conduites, mettant en évidence l'importance du caractère électrophorétique dans l'électrotransfection (Bettan *et al.*, 2000; Klenchin *et al.*, 1991; Wolf *et al.*, 1994).

Le transfert d'ADN par électroperméabilisation est un mécanisme à plusieurs étapes (pour une revue voir Escoffre *et al.*, 2009) (Figure 12):

- Migration vers la membrane : pendant l'application des champs électriques, l'ADN chargé négativement migre sous l'effet des forces électrophorétiques pendant que la membrane est perméabilisée.
- Interaction avec la membrane : la membrane perméabilisée, et déstabilisée, permet l'interaction de l'ADN sur des zones spécifiques sous forme d'agrégats où l'ADN s'accumule spécifiquement à chaque impulsion (Escoffre *et al.*, 2011; Golzio *et al.*,

2002a). Ces interactions sont « fortes » et ne sont pas rompues par les forces électrophorétiques si la polarité est inversée après 1 seconde d'interaction (Faurie *et al.*, 2004, 2010; Phez *et al.*, 2005). Il a été montré que la topologie de l'ADN n'intervient pas dans les processus d'interaction avec la membrane, alors qu'elle importe pour l'expression du plasmide (Escoffre *et al.*, 2012).

- Passage de la membrane, internalisation : cette étape représente encore une énigme du point de vue mécanistique. Le passage de la membrane par l'ADN n'est pas encore décrit, mais comme mentionné plus haut l'ADN interagit d'abord avec la membrane avant de passer dans le cytoplasme (Golzio *et al.*, 1998, 2001; Rols *et al.*, 2002a). De récentes études tendent à montrer que l'ADN est endocyté dans la cellule (Pavlin *et al.*, 2012; Rosazza *et al.*, 2011, 2012; Satkauskas *et al.*), mais la stimulation de cette endocytose ou sa spécificité reste encore non décrite.
- Migration jusqu'au noyau et expression. La migration se fait à travers le cytoplasme vraisemblablement par un transport actif impliquant le cytosquelette (Rosazza *et al.*, 2011; Vaughan et Dean, 2006). Le plasmide peut être exprimé dès 5 heures après son électrotransfert (Delteil *et al.*, 2000).

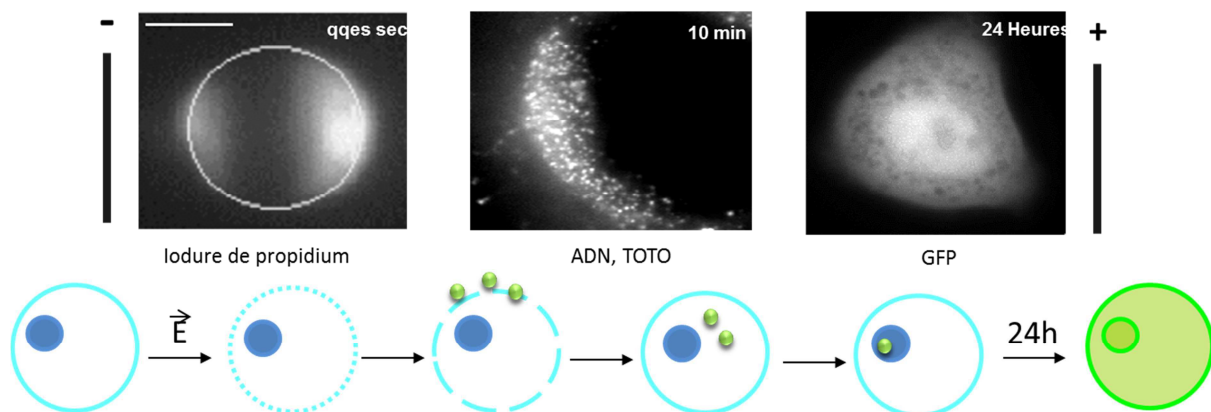


Figure 12 : les étapes du transfert de gène. Adapté de Escoffre *et al.*, 2009 et Golzio *et al.* 2002.

Les paramètres électriques ont donc été adaptés dans le but d'optimiser chacune de ces étapes nécessaires à la réussite du transfert (Rols *et al.*, 2002b). La durée des impulsions peut être relativement longue pour permettre la migration électrophorétique de l'ADN (de l'ordre de 5 ms) bien que des impulsions courtes et intenses suffisent à transférer les cellules (Daud *et al.*, 2008). L'intensité des champs sera donc d'autant plus faible que l'exposition longue pour réduire les dommages irréversibles pouvant être causés à la membrane dans le cas d'expositions trop intenses. Ainsi des intensités variant entre 400 et 800 V/cm sont appliquées

selon que les cellules sont respectivement adhérentes ou en suspension. Finalement le nombre d'impulsions sera de l'ordre de la dizaine pour permettre à suffisamment d'ADN d'entrer en contact avec la membrane sans pour autant provoquer une perméabilisation irréversible. La fréquence appliquée sera de l'ordre de 1 Hz. Des stratégies consistant à appliquer des impulsions bipolaires pour augmenter la quantité d'ADN entrant en contact avec la membrane ont été mises en place (Faurie *et al.*, 2004), ainsi que la combinaison de l'alternance entre des impulsions « HautVoltage » et « Bas Voltage » pour combiner les deux effets des champs électriques : la perméabilisation membranaire et la migration électrophorétique (André *et al.*, 2008). Finalement il est à noter que l'efficacité de transfection est dépendante du type cellulaire. En effet les résultats *in vivo* sur tumeur sont moins bon que ceux obtenus dans le muscle (Cemazar *et al.*, 2009a; Gehl *et al.*, 1999) car les cellules tumorales semblent être moins réceptives à l'électrotransfert (Marjanovic *et al.*, 2010a), et les essais cliniques réalisés ne prouvent pas que l'expression du gène ait été faite par les cellules tumorales (Daud *et al.*, 2008).

En comparaison aux autres techniques de transfert de gène, l'électroperméabilisation permet un ciblage des tissus, et dans certains cas des tumeurs. En effet le transfert de gène a majoritairement lieu entre les électrodes ou les champs électriques sont appliqués, et il est ainsi possible de choisir la localisation du transfert. De plus, cette technique ne nécessite pas de vectorisation virale ou chimique du plasmide, et permet ainsi en plus du ciblage, une sécurité du transfert en permettant l'utilisation de plasmides nus.

C. Méthodes de détection et de mesure

La détection du phénomène d'électroperméabilisation est principalement réalisée par microscopie, et s'applique au phénomène tant au niveau cellulaire que membranaire, ou global au sein d'une structure multicellulaire. Chaque étape du transfert discutée plus haut a été mise en évidence par microscopie, de la perméabilisation à l'internalisation d'acides nucléiques en passant par les phénomènes membranaires. Nous distinguerons ci-dessous les différents types de microscopie et quelques exemples de leur utilisation.

- La microscopie à lumière blanche ou contraste de phase : elle a permis entre autre d'observer le gonflement des cellules après l'application des champs électriques, phénomène décrit sous le nom de gonflement (ou « *swelling* ») et lié à l'entrée de molécules d'eau dans la cellule (Golzio *et al.*, 1998; Romeo *et al.*, 2013). De la même façon la fusion membranaire a pu être étudiée (Teissie et Rols, 1986). La

perméabilisation membranaire en tant que telle a aussi été observée par l'intermédiaire de molécules colorées (Mir *et al.*, 1988; Rols et Teissie, 1990).

- La microscopie à fluorescence : elle a permis une détection plus fine au niveau cinétique et spatial de la perméabilisation (Pucihar *et al.*, 2008; Valic *et al.*, 2003) et l'étude à l'aide de marqueurs potentiel-sensibles des changements de potentiels transmembranaires (Hibino *et al.*, 1993). Les marqueurs fluorescents ont aussi permis entre autre d'étudier les mécanismes de transfert d'acides nucléiques (Golzio *et al.*, 2002a; Paganin-Gioanni *et al.*, 2011) et les réactions intracellulaires au niveau du cytosquelette (Kanthou *et al.*, 2006; Rosazza *et al.*, 2011) et du noyau (Bellard et Teissie, 2009; Vernier *et al.*, 2003b). Les évènements au niveau membranaire sont aussi étudiés grâce à la microscopie de fluorescence sur membranes modèles (Portet *et al.*, 2009) et sur cellules vivantes (Rosazza *et al.*, 2011; Vernier *et al.*, 2004a).
- Les microscopie confocale et bi-photonique : elles ont permis l'imagerie en profondeur (jusqu'à 100 μm) des échantillons épais et donc l'étude approfondie des modèles multicellulaires (Gibot *et al.*, 2013; Wasungu *et al.*, 2009) et murins (Bellard *et al.*, 2012).
- La microscopie électronique a également été utilisée pour la détection de certains effets membranaires (Escande-Géraud *et al.*, 1988).

D'autres types de microscopies, développés récemment, commencent à être utilisés pour étudier l'électroperméabilisation, comme la microscopie CARS (Coherent anti-stokes Raman Scattering). Elle a récemment été démontrée comme une approche optique pertinente pour la détection des changements membranaires au cours de l'électroperméabilisation, s'affranchissant de marqueurs moléculaires exogènes pouvant induire des biais expérimentaux (Mauroy *et al.*, 2012). On peut aussi distinguer la technique de FRAP (Fluorescence Recovery After Photobleaching) (Escoffre *et al.*, 2011).

Bien que l'imagerie permette dans certains cas une quantification précise des phénomènes, d'autres techniques sont aussi utilisées :

- L'entrée de molécules cytotoxiques (Silve *et al.*, 2011), permet par exemple la mesure de la perméabilisation membranaire.
- La luminescence par l'intermédiaire de molécules comme la Luciférase a permis l'étude de l'expression de transgène (André *et al.*, 2008).

- La cytométrie en flux est aussi utilisée à cette fin en utilisant toujours des marqueurs fluorescents (Bartoletti *et al.*, 1989), elle permet une analyse quantitative de l'efficacité de transfection (Golzio *et al.*, 2002b; Marrero et Heller, 2012).
- L'étude du changement d'orientation des têtes polaires des phospholipides membranaires à l'origine de la perméabilisation ont été réalisées par Résonance Magnétique Nucléaire (RMN) (Lopez *et al.*, 1988).
- Des mesures relatives aux caractéristiques électriques de la membrane ont été réalisées par mesure de tension (Kramar *et al.*, 2007), de potentiel (Raffy et Teissié, 1999) et ont permis de mettre en avant l'effet des champs électriques sur le potentiel transmembranaire.

Certaines techniques sont encore émergentes dans le domaine de l'électroperméabilisation. On distinguera les études s'attachant à la fréquence diélectrique (Moiescu *et al.*, 2013), à la mesure de l'impédance (Ivorra *et al.*, 2009) ou encore les études des flux ioniques par Patch-Clamp qui donnent directement accès à la perméabilisation membranaire (Pakhomova et Pakhomov, 2010).

D. Modèles d'études

L'étude de l'électroperméabilisation se fait sur différents modèles allant des simulations numériques *in silico* au petit animal *in vivo* en augmentant graduellement leur complexité.

- *In silico* : Les modélisations mathématiques et calculs théoriques (Corovic *et al.*, 2013; Kakorin et Neumann, 2002) ainsi que les simulations numériques (Tokman *et al.*, 2013) présentent une bonne possibilité de prédiction du comportement lipidique, bien que peu représentative de la réalité membranaire. Elles décrivent aujourd'hui la formation de pores (Levine et Vernier, 2010; Tarek, 2005) et permettent de modéliser le passage de siRNA à travers la membrane (Breton *et al.*, 2012), ou encore la prédiction du comportement tissulaire (Sel *et al.*, 2005, Gowrishankar et Weaver, 2003).
- *In vitro* : Le modèle le plus simple est la bicouche phospholipidique pour étudier le comportement lipidique (Kramar *et al.*, 2007) et l'impact de la composition lipidique de la membrane (Koronkiewicz et Kalinowski, 2004; Raffy et Teissié, 1999). A un niveau supérieur de complexité se trouvent les vésicules unilamellaires qui reproduisent la membrane plasmique en version simplifiée. Elles permettent

d'observer le comportement lipidique sur vésicules unilamellaires géantes (pour une revue Portet *et al.*, 2012), ou nanovésicules (Tönsing *et al.*, 1997). Finalement, toujours *in vitro* se trouve la cellule en culture, modèle phare pour l'étude du phénomène sur le vivant sur lequel la plupart des études sont réalisées (Paganin-Gioanni *et al.*, 2011; Pucihar *et al.*, 2008).

- *In vivo* : Le petit animal (souris) représente le principal organisme d'expérimentation en ce qui concerne l'étude de l'électroperméabilisation (Cemazar *et al.*, 2009a).

Le développement de modèles intermédiaires entre les études *in vitro* et *in vivo* est en plein essor. Ces modèles *ex vivo* se rapprochent des tissus *in vivo*. Les pseudo tissus ou amas cellulaires permettent d'étudier le comportement en structure multicellulaire (Arena *et al.*, 2012; Golzio et Teissié, 2010; Kurata *et al.*, 2012).

III. Le projet

Le projet de cette thèse s'est articulé autour des trois barrières rencontrées par le plasmide lors du transfert de gène. Les effets des impulsions électriques sur ces barrières ont été étudiés afin de déterminer les mécanismes cellulaires impliqués dans leur déstabilisation ou l'implication de ces barrières dans la limitation d'efficacité de l'électrotransfert de gène. Le modèle sphéroïde adapté à l'étude en contexte multicellulaire a été utilisé pour l'étude de la barrière cellulaire, et des techniques avancées d'imagerie (microscopie confocale, microscopie à force atomique) ainsi que des techniques de détection (Patch-Clamp, cytométrie en flux) pour l'étude des effets membranaires et nucléaires (Figure 13). Cette introduction générale a permis de poser les bases de l'émergence du travail présenté dans ce manuscrit qui se décompose en trois parties.

Tout d'abord est présentée la validation d'un nouveau modèle pour l'étude du transfert de gène : le sphéroïde multicellulaire. Le sphéroïde multicellulaire présente la particularité d'être un intermédiaire entre la cellule en deux dimensions *in vitro* et la tumeur *in vivo*. Son utilisation pour l'étude de l'électroperméabilisation s'est avérée essentielle à la compréhension des mécanismes *in vivo*, comme démontré dans le chapitre 1. Outre la validation de ce modèle pour le transfert de gène, l'étude de l'optimisation de la technique dans le but de passer la barrière cellulaire et comprendre les difficultés rencontrées à la transfection tumorale a également été effectuée. Cette étude menée par microscopie

confocale, a permis de réaliser des observations des couches de cellules extérieures des sphéroïdes.

Ensuite, dans la perspective d'apporter de nouvelles réponses au mécanisme de perméabilisation, la Microscopie à Force Atomique (AFM) a été utilisée en tant que technologie innovante. Cette technique a permis la détection des effets des champs électriques sur la membrane plasmique en n'utilisant aucun intermédiaire moléculaire. Le deuxième chapitre s'intéresse ainsi aux effets membranaires de l'électroperméabilisation étudiés par AFM, amenant pour la première fois une vision nano-mécanique du phénomène, et proposant des hypothèses sur les effets de la déstabilisation membranaire.

Finalement, les effets d'impulsions nanosecondes (nsPEF) ont été étudiés. D'une part la technique de Patch-Clamp a été utilisée pour détecter la formation de nanopores dans la membrane plasmique et participer à leur description. D'autre part, le transfert de gène a été utilisé comme outil pour étudier les effets des impulsions nanosecondes sur l'enveloppe nucléaire, en déterminant le taux d'expression du transgène et ainsi l'influence des nsPEF sur l'entrée d'ADN dans le noyau. Ces études ont employé des méthodes indirectes de détection des effets. Une dernière partie s'intéresse donc au développement d'applicateur permettant d'observer les effets des impulsions nanosecondes sur cellule unique en temps réel par microscopie à fluorescence.

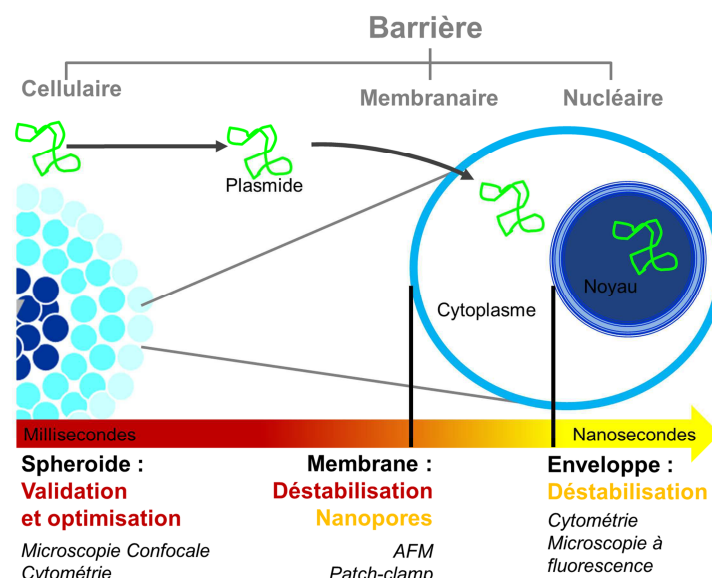


Figure 13 : Vue d'ensemble du projet de thèse.

Pour les applications thérapeutiques actuelles de l'électroperméabilisation, les champs électriques sont appliqués grâce à des électrodes, parfois intrusives, et directement en contact avec les objets biologiques. Les impulsions sont typiquement de forme trapézoïdale et de durées relativement longues (de l'ordre de quelques μ s à quelques ms). Les impulsions nanosecondes plus courtes, peuvent présenter des temps de montée et de descente brefs (inférieurs à la ns ou à quelques ns) et présenter un contenu spectral plus riche en hautes fréquences (au-delà du GHz); leurs profils temporels peuvent être variés, de type monopolaire (formes de gaussienne, de double exponentielle) ou bipolaires (sinusoïde amortie). Ces caractéristiques en font des impulsions de choix pour l'étude des effets électromagnétiques sur le vivant.

Dans le cadre de nos recherches, nous nous intéressons à l'interaction de ces ondes avec le vivant en ayant pour but de mettre en évidence des effets thérapeutiques. Néanmoins l'étude de l'interaction de ces ondes avec le vivant présente également un fort intérêt pour la défense, dans le cadre de la recherche de seuil d'innocuité des ondes produites par les systèmes d'armes du futur. Bien que pouvant être produites par des électrodes comme les impulsions longues, les impulsions nanosecondes peuvent aussi être rayonnées dans l'espace sous la forme d'une onde électromagnétique générée par une antenne d'émission. Les Applications ElectroMagnétiques de Défense (AEMD) sont susceptibles de mettre en œuvre de telles formes d'ondes, notamment pour les systèmes BUL (Bande Ultra Large). L'objectif de ce type applications électroniques de défense est de neutraliser les systèmes électroniques adverses. L'intérêt de ces systèmes est de ne pas porter atteinte aux personnes (servantes, publiques, ou adverses). C'est pourquoi les seuils de nocivités doivent être connus, ainsi que les valeurs limite d'exposition.

Des instructions et normes d'expositions sont disponibles (INSTRUCTION N° 302143/DEF/SGA/DFP/PER/5, 2003) concernant principalement les effets thermiques mais aussi athermiques pour les signaux longs (micro et millisecondes de type radar). Or, dans le cadre des impulsions brèves correspondant aux impulsions nanosecondes, la courte durée prévient a priori les effets thermiques. Des effets athermiques sont donc principalement attendus, mais peu étudiés. Ceci représente un frein aux études, évaluation et déploiement des systèmes, c'est pourquoi il est nécessaire de réaliser des études fondamentales sur les effets cellulaires et sub-cellulaires de ces impulsions afin d'évaluer leur impact sur le vivant. Le projet de cette thèse a été en partie orienté dans ce sens, afin de participer à la détermination des effets biologiques athermiques des impulsions électromagnétiques longues et courtes.

Chapitre 1 : Validation d'un modèle ex vivo pour de l'électrotransfert de gène et son optimisation: le sphéroïde multicellulaire

Les travaux présentés dans ce chapitre s'intéressent aux mécanismes d'électrotransfert d'ADN et aux passages de la barrière cellulaire présentée en introduction afin d'établir les conditions menant à une expression optimale du transgène dans les tumeurs *in vivo*.

Après trois décennies d'études *in vitro* sur la cellule unique et *in vivo* sur le petit animal, un modèle *in vitro* d'étude du transfert de gène au sein des tumeurs est apparu nécessaire pour caractériser et optimiser l'entrée d'un gène dans cette structure particulière qu'est la tumeur (Gibot et Rols, 2013). En effet, les études sur des cellules en culture apportent uniquement une réponse sur le comportement de cellules uniques sans aucune organisation tridimensionnelle en tissu. Les expériences sur le petit animal, en revanche, nécessitent la mise en place d'un protocole complexe et peu éthique. De plus, le suivi des mécanismes au niveau d'une cellule unique reste difficile sur ce modèle. Il fallait trouver une solution intermédiaire, reproduisant le contexte tumoral offert par les études sur le petit animal, en association avec les avantages des études *in vitro*. Le modèle de cellules en trois dimensions se rapprochant du tissu tumoral dit sphéroïde multicellulaire (ou sphéroïde), s'est révélé adéquat, ayant montré son utilité pour l'étude et l'optimisation de traitements ou de molécules thérapeutiques.

Ce chapitre se présente sous trois sections. Après un état de l'art sur le modèle et son utilisation pour l'étude du transfert de gène, une première partie s'intéresse à la validation du modèle pour l'étude de l'électrotransfert de gène, et une seconde partie s'intéresse à l'optimisation des conditions électriques de ce transfert.

I. Introduction

A. Les différences d'efficacité *in vivo/in vitro* de l'électrotransfert de gène

Dès les premières études de l'électrotransfert de gène (Neumann *et al.*, 1982), la technique s'est avérée très efficace *in vitro*. Les effets des impulsions de l'ordre de la milliseconde ont été rapidement mis en évidence, permettant d'obtenir des taux de transfection pouvant atteindre 60% (Rols et Teissié, 1992; Wolf *et al.*, 1994). Des modulations de ce taux de transfection peuvent être observées, qui sont liées à la phase du

cycle cellulaire (Golzio *et al.*, 2002b), ou par exemple à la durée des impulsions et leur combinaison (Cepurniene *et al.*, 2010). Néanmoins, *in vivo*, bien que la technique d'électrotransfert soit plus efficace que l'injection simple d'ADN (Andre et Mir, 2010; Bettan *et al.*, 2000; Gilbert *et al.*, 2002; Grosel *et al.*, 2006) les résultats sont variables selon le type de tissu. Le tissu musculaire présente de très bon taux de transfection (Dona *et al.*, 2003; Faurie *et al.*, 2003). Cependant, dans le cas des tumeurs, malgré la démonstration de l'efficacité de la technique en clinique (Daud *et al.*, 2008), la quantité effective de cellules tumorales transfectées reste très faible (Cemazar *et al.*, 2009b; Rols *et al.*, 1998). La compréhension à l'échelle cellulaire de cette limitation, et l'optimisation des paramètres électriques pourraient donc mener à augmenter son efficacité. Cela pourrait permettre en outre de toucher un plus grand nombre de cellules dans le cas de vaccination, de réduire la quantité d'ADN et/ou le nombre de traitements nécessaires dans le cas d'éradication des tumeurs. Dans ce contexte, l'utilisation d'un modèle *in vitro* adapté permettrait la limitation des tests sur petit animal en conservant une analyse des mécanismes au niveau de la cellule unique.

B. Le modèle sphéroïde

Les sphéroïdes multicellulaires sont décrits pour la première fois dans les années 70 par Sutherland *et al.* (Sutherland *et al.*, 1971). Ces assemblages en trois dimensions (3D) ont l'avantage d'être plus que de simples cellules en culture monocouches ou en suspension, car ils vont pouvoir représenter une synergie et une complexité proches des tissus, en particulier des tissus tumoraux (Sutherland, 1988). En effet, trois états cellulaires sont retrouvés dans un sphéroïde : des cellules prolifératives sur les couches externes, des cellules quiescentes au centre du sphéroïde, et éventuellement des cellules mortes au cœur. La présence de gradients de nutriment et d'oxygène, qui provoquent une hypoxie à l'intérieur du sphéroïde, entraîne pour certains types cellulaires une nécrose correspondant à un environnement tumoral non vascularisé (Friedrich *et al.*, 2007). Cette absence de vascularisation en fait un modèle inverse et simplifié de la tumeur, mais nous verrons par la suite que cette simplicité suffit à lever certaines interrogations sur la non-efficacité des traitements (Figure 14).

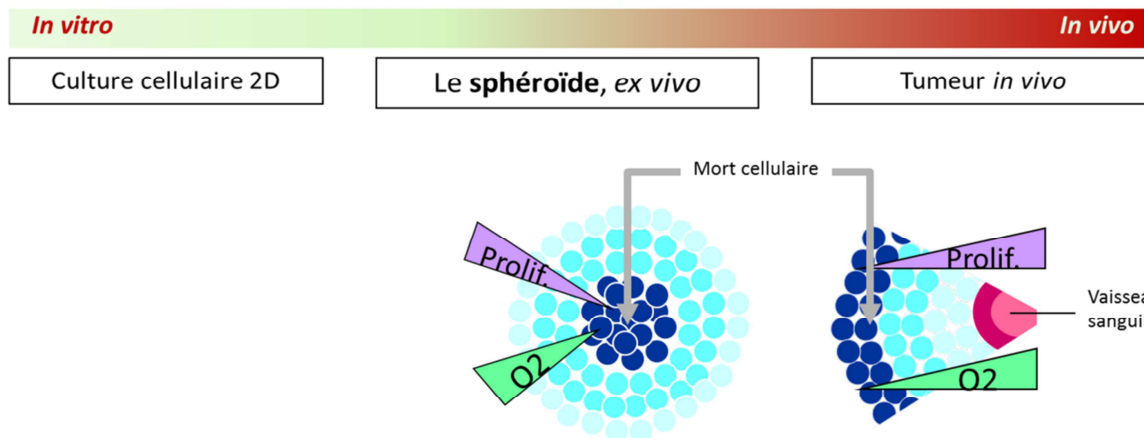


Figure 14 : le modèle sphéroïde comme modèle d'étude *ex vivo* intermédiaire entre *l'in vitro* et *l'in vivo*. ● cellules prolifératives, ● cellules quiescentes, ● cellules mortes (nécrose).

De plus, il est à noter que la plupart des types cellulaires vont sécréter les composants permettant la formation d'une matrice extracellulaire lorsqu'elles sont cultivées en 3D (Marrero *et al.*, 2009; Nederman *et al.*, 1984; Santini *et al.*, 2000). La présence de matrice extracellulaire et de différents états cellulaires crée à l'échelle du sphéroïde un microenvironnement provoquant une réponse cellulaire différente de celle obtenue sur cellules cultivées de manière classique (2D) (Lobjois *et al.*, 2009). Cependant, il est à noter que le microenvironnement tumoral implique la présence de cellules non-tumorales et du stroma (Billotet C. et Jouanneau J., 2008), qui ne sont pas toujours reproduit en modèle sphéroïdes et représentent donc une de ses limitations. Un grand nombre de types cellulaires tumoraux peuvent être cultivés sous forme sphéroïde (Dongari-Bagtzoglou et Kashleva, 2006; Marrero *et al.*, 2009; Wasungu *et al.*, 2009). Il est également possible de co-cultiver plusieurs types cellulaires afin de parvenir à un assemblage cellulaire le plus proche de la réalité (Kelm *et al.*, 2003; Marrero et Heller, 2012; Nakamura *et al.*, 1999; Wang *et al.*, 2005).

Les utilisations de ce modèle sont diverses et peuvent permettre la compréhension du comportement tumoral (Truchet *et al.*, 2008; Valcárcel *et al.*, 2008). Leur utilisation en tant que modèle pour le criblage de molécules thérapeutiques représente une grande part des travaux menés sur sphéroïdes (Friedrich *et al.*, 2009; Mehta *et al.*, 2012; Pampaloni *et al.*, 2007; Shin *et al.*, 2013). Ainsi, l'étude de l'effet de médicaments anti-tumoraux réalisée sur sphéroïde (Chitcholtan *et al.*, 2012; Dufau *et al.*, 2012; Mellor *et al.*, 2005; Pickl et Ries, 2009; Prados *et al.*, 2008) montre la pertinence du modèle pour l'évaluation de l'efficacité de ces molécules (Li *et al.*, 2008). Certains de ces travaux sont réalisés directement à partir de

cellules de patients issues de biopsies, permettant ainsi de se rapprocher au plus près du contexte biologique (Burgués *et al.*, 2007; Fehlaue *et al.*, 2006). L'efficacité de traitement anti-cancer est aussi analysée en 3D (Fehlaue *et al.*, 2006; Gibot *et al.*, 2013; Khaitan *et al.*, 2006; Monazzam *et al.*, 2007). Finalement, les techniques d'administration de médicaments sont testées sur sphéroïdes pour pouvoir déterminer la capacité de pénétration des transporteurs (Bandeekar *et al.*, 2012; Goodman *et al.*, 2007, 2008; Kim *et al.*, 2010).

C. Thérapie génique et sphéroïde

L'étude du transfert de gène sur culture multicellulaire fait bien sûr également l'objet de recherches. On peut les distinguer selon la méthode de transfert employée. La transfection virale a été largement étudiée, et montre l'efficacité de cette méthode et l'utilité du modèle, la conservation des fonctions cellulaires pré-transfection, sans toutefois amener de regard critique quant aux effets secondaires, observés sur l'homme, de ce genre d'applications (Grill *et al.*, 2002; Smith *et al.*, 2005; Tsung *et al.*, 2008; Tzanakakis *et al.*, 2002). Des études sur la lipofection ont également été menées, permettant de mettre au point la meilleure composition lipidique pour un ciblage et une pénétration des liposomes (Kostarelou *et al.*, 2004; Mellor *et al.*, 2006), et une fois de plus de valider le modèle à partir de biopsies et de le comparer avec la réponse de lignées cellulaires (Gil-Cardesa *et al.*). Finalement le sphéroïde est aussi le support d'études portant sur les nanoparticules (Goodman *et al.*, 2007) ou les couplages ADN-polycation (Han *et al.*, 2007).

Concernant l'étude de l'électrotransfert de gène, peu d'articles s'y sont intéressés. En 2004, Canatella *et al.* ont mis en évidence la barrière cellulaire physique au passage de molécules vers le cœur des cellules du sphéroïde (et donc de la tumeur) suite à l'électroperméabilisation (Canatella *et al.*, 2004). Il a fallu attendre 2009 pour que des études sur modèles 3D en lien avec l'électrotransfection voient le jour. Ces études décrivent la formation des sphéroïdes et leur potentielle pertinence pour l'étude de l'électroperméabilisation (Marrero *et al.*, 2009), ainsi que des résultats obtenus en électrotransfert de gène sur sphéroïde multicellulaire (Wasungu *et al.*, 2009). Par la suite nous nous sommes attachés à comparer par une approche rationnelle les modèles 2D et 3D (Chopinnet *et al.*, 2012), et des travaux d'optimisation avec différents types d'électrodes ont été entrepris (Marrero et Heller, 2012).

D. Problématiques

En 2009 Wasungu *et al.* présentaient la première publication s'intéressant à l'électrotransfert de gène sur sphéroïde, et amenaient les premières hypothèses quant à la différence entre l'efficacité de perméabilisation et de transfection. La question restait entière quant aux raisons de ces différences dans le cas spécifique de l'électrotransfert de gène et des potentialités que le modèle offrait pour son optimisation. En effet, une étude poussée comparant point par point les différentes étapes du transfert de gène était nécessaire pour pouvoir comprendre la faible efficacité de la méthode *in vivo*. Les réponses apportées par l'étude de ce modèle pouvaient ouvrir de nouvelles voies d'optimisation s'attachant à lever les barrières inhérentes aux tumeurs. C'est pourquoi la possibilité d'optimisation offerte par les sphéroïdes constituait le réel challenge de leur utilisation. Elles pouvaient permettre d'apporter un premier aperçu sur leur capacité à limiter l'utilisation du petit animal dans les laboratoires. C'est dans ce contexte que les travaux suivants ont été réalisés.

II. Validation du modèle

La stratégie expérimentale s'est attachée à comparer le comportement de cellules de carcinome colorectal humain (HCT116) cultivées sous forme de sphéroïdes à celui, caractérisé, de ces mêmes cellules en suspension. Un plasmide codant pour la protéine GFP a été utilisé pour visualiser l'efficacité de transfection. Nous avons choisi d'utiliser la microscopie confocale afin d'observer les sphéroïdes entiers non fixés de manière qualitative pour une première approche. Cette technique nous a permis de mesurer la fluorescence émise par les premières couches cellulaires du sphéroïde. Les résultats obtenus ont été confirmés par une analyse quantitative par cytométrie en flux après la mise en place d'un protocole de dissociation des sphéroïdes (Freyer et Sutherland, 1980).

L'analyse de l'électrotransfection s'est déroulée en quatre étapes. i) Tout d'abord la caractérisation de la perméabilisation membranaire, nous permettant de visualiser l'effet direct du champ électrique sur la membrane plasmique des cellules et ainsi de quantifier le nombre de cellules potentiellement transfectables. La perméabilisation est une étape nécessaire et indispensable à l'entrée de l'ADN plasmidique (Escoffre *et al.*, 2009). ii) Ensuite, l'observation de l'interaction ADN/membrane a été effectuée afin de localiser les cellules en contact avec l'ADN. Cette étape nécessaire au transfert de gène a lieu pendant l'application du champ électrique et dure plusieurs minutes (Phez *et al.*, 2005). iii) Le taux de

transfection a ensuite été analysé 24 heures après l'application des impulsions. iv) Finalement, la perméabilisation irréversible de la membrane induite par le champ électrique a été observée 30 minutes après l'électrotransfert, et la croissance des sphéroïdes mesurée pendant les jours suivants.

Ces travaux ont été réalisés en utilisant des champs unipolaires (10 impulsions de 5 ms à la fréquence d'1 Hz) en faisant varier la valeur du champ électrique de 0 à 800 V/cm, afin de déterminer une intensité optimale.

A. “First explanations for differences in electrotransfection efficiency *in vitro* et *in vivo* using spheroid model”, article publié dans le journal International Journal of Pharmaceutics en 2012

Dans cet article il est montré que les sphéroïdes reproduisent bien la situation *in vivo*. En effet une faible efficacité de transfection est observée sur sphéroïde (inférieure à 1 %), alors que les cellules en suspension montrent un taux de transfection de plus de 25 % pour les mêmes paramètres électriques (10x5ms, 500 V/cm, 1Hz). La perméabilité irréversible observée par l'intermédiaire de la croissance des sphéroïdes apparaît comme la principale cause d'inefficacité du transfert.



First explanations for differences in electrotransfection efficiency *in vitro* and *in vivo* using spheroid model

L. Chopinet^{a,b}, L. Wasungu^{a,b}, M.-P. Rols^{a,b,*}

^a CNRS, IPBS (Institut de Pharmacologie et de Biologie Structurale), 205 route de Narbonne, F-31077 Toulouse, France

^b Université de Toulouse, UPS, IPBS, F-31077 Toulouse, France

ARTICLE INFO

Article history:

Received 15 February 2011

Received in revised form 21 April 2011

Accepted 21 April 2011

Available online 28 April 2011

Keywords:

Electroporation

DNA

Delivery

Spheroid

ABSTRACT

Electro-gene-therapy is a promising technique for cancer treatment. However, knowledge about mechanism of gene transfer with electric field in tumor is limited. Whereas *in vitro* electrotransfection is efficient, gene expression in tumoral cells *in vivo* is weak. To determine reasons for this difference and unravel gene transfer mechanisms, we propose to use multicellular tumor spheroid as a tridimensional model *ex vivo*. Comparison of efficiency between cell in suspension and cells in spheroid allow highlighting fundamental differences. For classical electrical conditions (consisting in 10 pulses of 500 V/cm, 5 ms, 1 Hz), suspension cells present a transfection rate of $23.75\% \pm 2.450$ SEM. In the same conditions on spheroid, although plasmid DNA coding GFP interact with half of electrically permeabilized cells, less than 1% of cells are expressing the transgene. First answers to *in vivo* electrotransfection failure are given: cell mortality due to electric field is responsible of this low transfection rate, as tridimensional and multicellular structure that prevents DNA passage. These results show that spheroid is reproducing *in vivo* situation. Validation of spheroid as a relevant model for electrotransfection study opens *ex vivo* optimization possibility before *in vivo* assay.

© 2011 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Anti-tumoral treatments are a public health priority since several years. Various therapies exist but often show weaknesses in efficacy or safety. This explains the need for further development of new anti-tumoral strategies. Among them, gene therapy shows promises to implement new approaches to cancer treatment. A large variety of methods for gene delivery, including viral, chemical and physical vectors have been developed for the past twenty years. Electroporation is a physical technique first developed to transfer cytotoxic drugs in tumor (Gothelf et al., 2003; Mir et al., 1998). It consists in the transient permeabilization of the plasma membrane following electric field application (Golzio et al., 2010; Rols et al., 1992). Electropermeabilization enables poorly permeant drugs such as bleomycin and cisplatin to efficiently enter cells and tissues. This process, called electro-chemo-therapy (ECT), allows controlling the amount of drug that enter the cells as well as targeting of the entry: only cells and tissues present in between the electrodes will be permeabilized. Therefore, the method is both

efficient and safe. Indeed, it is strictly localized at the site of the tumor and the dose of cytotoxic drugs injected into the tumors is lower than the ones used in classical chemotherapy protocols. All together, these properties limit side effects and enhance drug activity. Nowadays ECT is used as a palliative treatment of cutaneous and subcutaneous cancer. In 2010, more than 1000 patients have been treated over Europe (www.cliniporator.com, Mir et al., 2003).

Besides ECT, another modality (electro-gene therapy – EGT), has been developed for more than 10 years and clinical trials are underway (Daud et al., 2008; Heller and Heller, 2006; Heller et al., 1996; Titomirov et al., 1991). As for ECT, EGT offers a gain in safety and in efficacy as gene is injected directly in the tissues where electric field pulses are applied. However, gene expression efficiency highly depends on tissues. Indeed, electrotransfection is not effective in all cell types *in vivo*. Transfection in muscle leads to impressive results with more than 80% of transfected cells (Dona et al., 2003; Mir et al., 1999), while only a few percent of cells are transfected in tumors (Rols et al., 1998). The mechanisms of gene electrotransfer have been studied on cells *in vitro* and appear to be a multistep process (Golzio et al., 2002): (i) cell membrane permeabilization, (ii) DNA migration towards cell and then insertion in their plasma membrane (Wolf et al., 1994), 2 steps occurring during pulses application, (iii) DNA translocation in the cytoplasm few minutes after pulses delivery, (iv) DNA migration into the cytoplasm towards the nucleus, and finally (v) gene expression occurring a few hours after

* Corresponding author at: CNRS, IPBS (Institut de Pharmacologie et de Biologie Structurale), 205 route de Narbonne, F-31077 Toulouse, France.

Tel.: +33 5 61 17 58 11; fax: +33 5 61 17 59 94.

E-mail address: rols@ipbs.fr (M.-P. Rols).

pulses delivery. EGT's electric field parameters have been adapted to allow the efficient membrane permeabilization and the electrophoretic accumulation of plasmid DNA on cells. EGT consists in a low voltage (≤ 800 V/cm) and long pulse duration (several milliseconds) (Rols et al., 1992) in contrary to ECT conditions (≥ 1000 V/cm, $100 \mu\text{s}$) (Rols et al., 1998).

DNA electrotransfer is therefore a complex phenomenon whose complexity, and the number of limiting steps, are further increased *in vivo*. Cells in culture are not representative of what happens *in vivo* as cells are not structured in tissue. A more complex environment is present in tumor that can prevent the efficient DNA access to cells. The mechanisms of gene transfer in a tridimensional structure as tumor need therefore to be elucidated to propose new strategies to enhance gene expression in tumors. However, study on tumors requires the use of small animal and addressing the process at the cell level *in vivo* is difficult. Therefore we propose to investigate the use of multicellular tumor spheroid (called spheroid or MCTS) as an *ex vivo* model of tumor to investigate DNA electrotransfer in a multicellular structure.

Spheroids present a multicellular tridimensional structural organization (Sutherland, 1988). They display cellular differentiation (linked to nutrient and dioxygen gradient) with quiescent or even dead cells in the core of spheroid and proliferative cells on external layers. These characteristics, all together with extracellular matrix and cell–cell interactions presence, make of the spheroid a good and easy to use model reproducing tumor structure *in vitro*.

Spheroid model was expected to give more information about DNA transfer in tumor than cultured cell in suspension as it is structurally similar to tumor. It has already been used for study and optimization of several gene transfection techniques: cationic polymers (Mellor et al., 2006), lipofection (Gil-Cardesa et al., 2010), photodynamic therapy (Madsen et al., 2006), or cell cycle study (Lobjois et al., 2009). As gene therapy is of growing interest and needs reliable and noninvasive tools, spheroids could help to point out biological, physical and technological barriers to electrotransfection in tumor and allow techniques optimization *ex vivo*. However, this model has only been poorly used in the field of electroporation (Canatella et al., 2004; Mellor et al., 2006). It has already been validated in our group for electrotransfer studies (Wasungu et al., 2009), but the direct comparison with the results obtained in cells in culture and the validation of its capacity to reproduce *in vivo* situation are still missing.

The aim of the present work was to evaluate the use of spheroid as a relevant model for study of electrotransfer process and, by doing so, to give a first answer to the actual gene transfer failure in tumor. To do so, comparison of electro-gene transfer in cells cultured *in vitro* in suspension and cells in spheroids (that mimic *ex vivo* tumor) was done. The key steps of this process were investigated. We addressed different questions concerning cell viability, permeabilization, DNA/membrane interaction, and gene expression. In the interest of optimization, we studied and compared the effect of electric field parameters on cells and spheroids. Electrotransfection was performed at different intensities (from 0 to 800 V/cm) by applying 10 pulses of 5 ms duration at a 1 Hz frequency. Our strategy was to use confocal microscopy as an efficient and non-invasive tool to visualize spheroid behavior (qualitative and spatial analysis). Additionally, flow cytometry was used for quantitative analysis of cells pulsed in suspension or in spheroids (after cell dissociation by enzymatic treatment).

2. Materials and methods

2.1. Cells

The HCT116 cell line was derived from a human colorectal carcinoma. They were selected for their ability to grow plated on Petri

dishes and to form spheroids. HCT116 cells were grown in DMEM media (Gibco) containing 4.5 g/l glucose, L-glutamine and pyruvate and supplemented with 10% (v/v) of heat inactivated fetal calf serum, 1% antibiotic mix (100 U/ml penicillin and $100 \mu\text{g/ml}$ streptomycin) in a 5% CO_2 humidified incubator at 37°C (Jouan, St. Herblain, France).

2.2. Generation of spheroids

The hanging-drop method has been adapted to produce spheroids of similar diameter (Del Duca et al., 2004). Drops of $20 \mu\text{l}$ containing 500 cells were suspended on the lid of agar coated 24-well dishes containing $500 \mu\text{l}$ of culture medium. After 72 h, required for cell aggregation, spheroids were transferred to the agar-coated bottom of the well. Multicellular spheroids were then allowed to grow for 3 days and spheroids used in the experiments sized in average around $500 \mu\text{m}$ of diameter.

2.3. Plasmid extraction

A 4.7 kb plasmid (pEGFP-C1) containing the gene coding the enhanced Green Fluorescent Protein (eGFP) under control of the CMV promoter was obtained from Clontech (Palo Alto, CA). It was purified from transfected *Escherichia coli* by using Maxiprep DNA purification system according to Qiagen instructions (Courtaboeuf, France).

2.4. Electropulsation

Electropulsation was achieved by using a CNRS cell electropulsator (Jouan, St. Herblain, France) which delivered square-wave electric pulses. An oscilloscope (Enertec, St. Etienne, France) monitored pulse shape. Stainless steel flat parallel electrodes (1 cm length, 4 mm width) placed on Petri dish were used. Ten pulses lasting 5 ms at a frequency of 1 Hz were applied at different electric field intensity at room temperature, conditions known to induce efficient and transient cell permeabilization (Rols et al., 1992).

2.5. Electropermeabilization

2.5.1. Electropermeabilization of cells in suspension

500,000 cells were resuspended after gentle centrifugation in $100 \mu\text{L}$ of pulsing buffer (10 mM $\text{K}_2\text{HPO}_4/\text{KH}_2\text{PO}_4$ buffer, 1 mM MgCl_2 , 250 mM sucrose, pH 7.4) containing propidium iodide (PI, $100 \mu\text{M}$), placed between electrodes and electric field was applied. After 5 min incubation, penetration of PI was used to monitor permeabilization (Rols et al., 2002). $300 \mu\text{L}$ of PBS was added to cells in order to determine by flow cytometry (Becton Dickinson FAC-Scan; Becton-Dickinson Biosciences, Franklin Lakes, NJ, USA) both the percentage of fluorescent cells (permeabilized cells) and level of fluorescence associated. The excitation wavelength was 488 nm (argon laser) and the fluorescence of intracellular propidium iodide was collected for cell gated with the scatters to exclude debris in FL-2 channel (band pass 585 ± 42 nm). A minimum of 5×10^3 events were acquired in list mode and analyzed with Cellquest software (Becton Dickinson).

2.5.2. Electropermeabilization of spheroids

As for suspension cells, spheroids were placed in $100 \mu\text{l}$ of pulsing buffer containing PI. After electric pulses application and 5 min incubation at room temperature, spheroids were analyzed with confocal microscopy or flow cytometry. Confocal microscopy studies were realized as follow: spheroids placed in a CoverWell imaging chambers (Sigma Aldrich) in $300 \mu\text{L}$ PBS (Dubleco's Phosphate Buffer saline) were observed using a Zeiss LSM 510, scanning in z axis every $10 \mu\text{m}$ on $200 \mu\text{m}$ (excited with a Helium–Neon laser

set at 543 nm wavelength and emitted light collected through a 585 nm long pass filter).

In order to have quantitative data of permeabilization, spheroids were also dissociated 15 min in trypsin–EDTA 1× (Eurobio) and dissociated cells were then analyzed by flow cytometry (Becton Dickinson FACScan; Becton-Dickinson Biosciences, Franklin Lakes, NJ, USA).

2.6. Electrotransfection

2.6.1. Electrotransfection of cells in suspension

As described for electropermeabilization, 500,000 cells were resuspended after gentle centrifugation in 100 μ L of pulsing buffer containing 1 μ g of plasmid DNA, placed between electrodes and electric field was applied. Cells were cultivated in Petri dish at 37 °C 5% CO₂ in 1.5 mL of culture medium. After 24 h, cell monolayer was washed with PBS to remove all non-adherent cells. Cells were harvested by trypsinization, resuspended in 400 μ L PBS and analyzed by flow cytometry to evaluate both the percentage of fluorescent cell (i.e. percentage of eGFP expressing cell, transfected cells) and the mean level of fluorescence associated. The excitation wavelength was 488 nm (argon laser) and the fluorescence of eGFP was collected for cell gated with the scatters to exclude debris in FL-1 channel (bandpass 520 \pm 42 nm). A minimum of 5 \times 10³ events were acquired in list mode and analyzed with Cellquest software (Becton Dickinson).

2.6.2. Electrotransfection of spheroids

Spheroids were taken and added to 100 μ L of pulsing buffer containing 10 μ g of plasmid DNA already in between electrodes and pulses were applied. Spheroids were cultured in agar coated wells of 24-wells plate with 500 μ L of culture medium at 37 °C in a 5% CO₂ incubator for 24 h before confocal analysis (excited with an argon laser set at a 488 nm wavelength and emission collected through a band pass filter from 505 nm to 550 nm) or dissociation and flow cytometer analysis (see Section 2.5).

2.7. DNA/membrane interaction

DNA/membrane interaction was realized for cells in suspension and spheroid as described for electrotransfection but using a fluorescently labeled DNA. Plasmid DNA was stained with the DNA intercalating dye TOTO-1 (Molecular Probe, Eugene, OR): 2.3 \times 10⁻⁴ M dye was incubated with DNA at a concentration of 1 μ g/ μ L for 60 min on ice. This concentration yields to a ratio of dye to base pair of 1 to 5. Directly after electropulsation, cells and spheroids were observed under confocal microscope (excited with an argon laser set at a 488 nm wavelength and emission collected through a band pass filter from 505 nm to 550 nm).

2.8. Viability

2.8.1. Viability of cells in suspension

It was determined on cells cultured on Petri dish 24 h after electrotransfection. Culture medium was removed and cell monolayer was washed two times with PBS and then 1 mL of 0.1% (m/v) crystal violet solution was added. After 20 min incubation under gentle agitation, crystal violet solution was removed, cell monolayer washed two times with PBS, and then lysed with acetic acid 10% during 10 min. Lyse product was diluted 1/40 before optic density lecture at 595 nm with spectrophotometer (Pharmacia Biotech, Novaspex II). Control DO value is considered as 100% cell viability.

2.8.2. Measure of spheroids growth

As a reflection of cells viability, spheroids growth was quantified over several days. Spheroid growth was followed by taking pictures

of spheroids over 9 days with a Leica macroflu microscope coupled to a coolSNAP HQ camera (Roper scientific, Photometrics). The measure of the projected area of the spheroid on each image was realized and automated using image J software. The relative projected area was expressed as the ratio of the measured area at any given time on the measured area at the beginning of the experiment. This normalized projected area was plotted as a function of time to represent spheroid growth following different treatments.

3. Results

3.1. Comparison between electropermeabilization of cells in suspension and in spheroids

Membrane destabilization induced by electric field leads to small molecules transfer into cells. Using this ability, the entry of the fluorescent probe propidium iodide (PI) was used to monitor permeabilization (Rols et al., 2002). The permeabilization of cells in suspension and cells in spheroids was studied as presented in Fig. 1. In Fig. 1A, permeabilization of cells pulsed in suspension is reported. Two parameters are of interest: percentage of fluorescent cells (Fig. 1A, left panel), that represents the fraction of cells that have been permeabilized, and fluorescence level inside the cells (Fig. 1A, right panel), that is directly proportional to the amount of molecule incorporated into the cells. Results show that membrane permeabilization depends on electric field intensity. Cells are permeabilized above a threshold value, situated between 300 and 400 V/cm, 400 V/cm conditions giving significant number of cell permeabilized in comparison with control (34.49% \pm 9.741 SEM). Below that threshold, the percentage of fluorescent cells is similar to the one of the control, i.e. in absence of electric field where less than 5% of cells are permeable representing dead cells with loss of membrane integrity. In terms of fluorescence intensity, substantial accumulation of PI inside cells is detected between 400 V/cm and 500 V/cm (1187 a.u. \pm 232.1 SEM, significant in comparison of 400 V/cm condition, Fig. 1A right panel). From 300 to 800 V/cm, the number of permeable cells increases to reach more than 80% above 500 V/cm (82.15% \pm 5.085 SEM for 600 V/cm significant in comparison of 400 V/cm condition). The amount of PI inside cells increases from 300 V/cm to 700 V/cm. Under those experimental conditions, up to 80% of cells should be potentially transfectable.

Electropermeabilization of cells present in spheroid was then studied by using both confocal microscopy to have a global qualitative view, and flow cytometry to quantify the cell response at the single cell level after dissociation of the cells from the spheroids. Images obtained by confocal microscopy are presented in Fig. 1B. 3D projections of confocal acquisitions for different spheroids subjected to increasing electric field intensity are shown. This allowed us to visualize the spatial distribution of permeabilized cells in the spheroids. The number of permeabilized cell increases with the electric field intensity homogeneously at the spheroid surface. Permeabilization is detected for field intensities as low as 200 V/cm. At 500 V/cm, all the cells on the spheroid surface are fluorescent. In Fig. 1C, optical slices in z axis show that fluorescence signal in the spheroid core decrease. Inner cells are not detected from 40 μ m depth and only external cells layers are visible. It was therefore impossible to assess the permeabilization state of the cells deep in the core of the spheroid, as this decrease can be due to the absence of permeabilization or to technical limitation. To address this issue, we next performed spheroid enzymatic dissociation that enabled us to use flow cytometry to quantify permeabilization of all cells of the spheroid. As shown in Fig. 1D, a maximum of 30.31% \pm 4.992 SEM of cells are permeabilized in the spheroid at 400 V/cm (29.59% \pm 3.809 SEM at 300 V/cm, both conditions being significant in comparison with the control). Above this electric

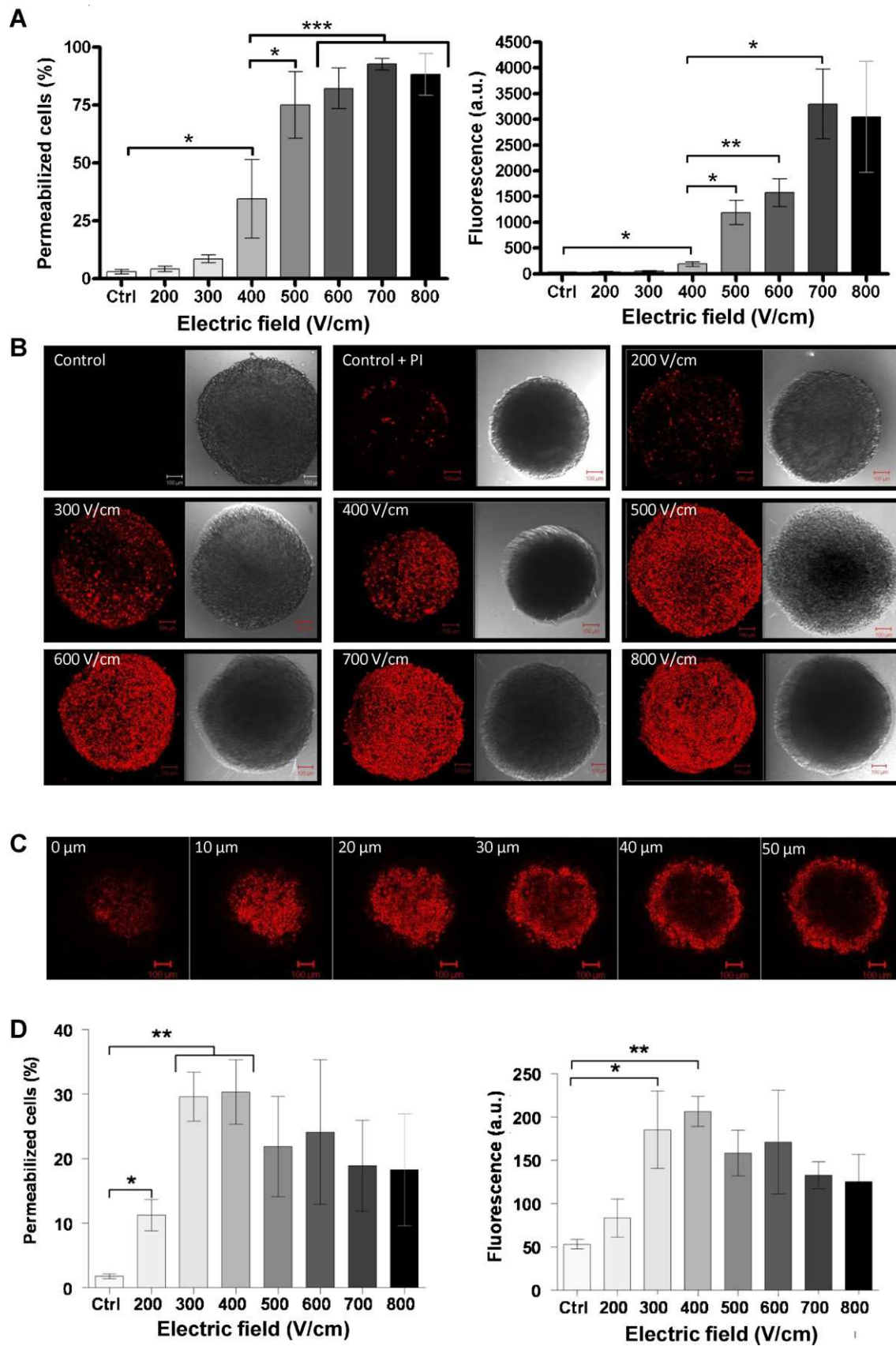


Fig. 1. Electroporation of cells in suspension and in spheroids. (A) HCT116 cell permeabilization assessed with propidium iodide uptake (triplicate, mean \pm SEM, ANOVA test) and fluorescence analysis for different electric field intensity (triplicate, mean \pm SEM, Unpaired Student's *t*-test). (B) 3D projection of permeabilized spheroid confocal acquisitions (propidium iodide uptake) and phase contrast corresponding images. This experiment was performed 3 times and one characteristic picture is presented here. For all images scale bar represents 100 μ m. (C) Optical slices of confocal acquisition for 800 V/cm and fluorescence signal decrease from 40 μ m depth. (D) Permeabilized cell percentage in dissociated spheroids assessed with propidium iodide uptake and matching fluorescence intensity depending on electric field intensity (triplicate, mean \pm SEM, Unpaired Student's *t*-test). **P*<0.05, ***P*<0.005, ****P*<0.001.

field intensity, this percentage decreases to $21.87\% \pm 7.774$ SEM at 500 V/cm for example, not significant compared to 400 V/cm. The associated fluorescence intensity curve follows the same profile reaching a maximum for 400 V/cm ($206.5 \text{ a.u.} \pm 17.88$ SEM significant compared to control).

3.2. Observation of DNA/membrane interaction on single cells in suspension and cells in spheroids

DNA/membrane interaction is a key step in DNA electrotransfer. Submitted to electrophoretic forces, plasmid DNA migrates towards the cells and forms aggregates in the electropermeabilized region of the membrane (Golzio et al., 2002). These aggregates remain visible several minutes after electric field application. Images of these particular structures can be obtained with a confocal microscope using TOTO-1 fluorescently labeled plasmid.

For single cell in suspension, results are coherent with earlier published studies showing DNA/membrane interaction spots on the side of the cell facing the cathode (Fig. 2A). On spheroids, our studies of DNA/membrane interaction shows for the first time the same process, i.e. interaction of DNA with cells present in a tissue model as shown in Fig. 2B. Interestingly, the interaction of DNA on spheroid's cells happens on one hemisphere. As for single cells, it corresponds to the hemisphere facing the cathode (Fig. 2B-1). Moreover, aggregates are visible as for single cells (Fig. 2B-2). Acquisitions in z-axis revealed that this interaction takes place only on the cells present on the external cell layer of the spheroid (Fig. 2C). Indeed, each optical slice presents a different fluorescence profile. In comparison with permeabilization picture (Fig. 1C), where at $15 \mu\text{m}$ depth cells can be detected, DNA is detected only on one cell monolayer surrounding spheroid before $15 \mu\text{m}$ depth. This demonstrates that DNA does not interact with inner cells.

3.3. Comparison of electrotransfection between single cells in suspension and spheroids

Electrotransfection is carried out with a plasmid coding the enhanced green fluorescent protein (eGFP). Transfection rate is evaluated 24 h after electrotransfection by visualizing eGFP expression with confocal microscopy and quantifying it with flow cytometry. 10 times more plasmid is used for spheroid transfection than for cells in suspension as shown in Wasungu et al. (2009). This higher amount of DNA was expected to allow some plasmid DNA to cross cellular barrier (first layers of cell) and reach inner cells.

Flow cytometry analysis performed in cells pulsed in suspension is presented in Fig. 3A. As for cell permeabilization, transfection is observed above 300 V/cm intensity, reinforcing the idea that permeabilization is a necessary condition for plasmid uptake (Wolf et al., 1994). Percentage of cells expressing eGFP is increasing by increasing the electric field strength and reach $23.75\% \pm 2.450$ SEM at 500 V/cm (significant compared to 400 V/cm). Transfection's efficacy, assessed by fluorescence intensity, is maximal at 500–600 V/cm ($17.07 \text{ a.u.} \pm 3.150$ SEM at 500 V/cm, significant compared to control but not to 600 V/cm). Above that value, both transfection rate and efficacy decrease because of cell damage due to a too high field and/or DNA cytotoxicity.

In spheroids, eGFP expression is only detected for electric field values close to 400 and 500 V/cm (Fig. 3B). These values allow only a few cells to express eGFP. eGFP expressing cells are localized on one spheroid side, according to the observation of DNA/membrane interaction. No significant results have been observed with flow cytometry analysis as very few cells are transfected (data not shown).

3.4. Viability of cells in suspension and spheroids growth

The viability of cells in suspension was measured 24 h after pulse application. As shown in Fig. 4A, cell viability starts to be affected above 400 V/cm: $64.66\% \pm 8.530$ SEM of cells are still viable at 500 V/cm. Above this intensity, the cell viability is much more affected (only $24.77\% \pm 5.061$ SEM of cells being viable at 600 V/cm and $3.813\% \pm 0.5138$ SEM at 800 V/cm).

Spheroids viability was evaluated by their ability to grow over a period of 9 days. Only three characteristic conditions (control, 500 V/cm and 800 V/cm) are presented in Fig. 4B. Control conditions show the normal growth behavior of the spheroids: spheroids diameter increases by a factor 5 during this period. When submitted to 500 V/cm intensity electric field pulses, the spheroid growth stops during the first 48 h and then goes back to a normal growth rate. This may reflect some cell mortality on the external proliferative cell layers. With the more drastic condition of 800 V/cm, there is a decrease in spheroid size, indicating the loss of a large number of cells most probably on the external layer. Spheroids reach back their normal growth rate after 6 days. Those results show that viability is affected by electrotransfection, especially at higher electric field intensity and gives a first explanation to the poor transfection efficiency.

4. Discussion

Electrotransfection is a complex process involving at least 5 consecutive steps: membrane permeabilization, DNA electrophoresis and interaction with the destabilized cell membrane, DNA entry in cell, nuclear envelope crossing and expression (Escoffre et al., 2009). Difference of efficacy between *in vitro* and *in vivo* studies points out that other limiting step could be present *in vivo* and that technique's optimization is still needed. The spheroid model was expected to give more information about DNA transfer in tumor than cultured cell in suspension as it is structurally similar to tumor. In this paper, we have studied and compared DNA transfer in cells in suspension and in spheroid in order to address the use of spheroid as a relevant model in electrotransfection studies.

Behavior of cells in response to electric field is totally different for cells in suspension and spheroids. For isolated cells, 500 V/cm pulses can lead to $74.96\% \pm 8.269$ SEM of permeabilization, $23.75\% \pm 2.450$ SEM of transfection while maintaining cell viability up to 64.66 ± 8.530 SEM. Therefore this electric field value seems to be the optimum electric field intensity for HCT116 cells in suspension, leading to a rather good transfection level associated to high permeabilization and viability. For spheroids, all cells cannot be permeabilized by electric field (at least in conditions allowing propidium iodide uptake). Permeabilization upper limit around 30% indicates that, whatever the electrical field conditions, only a fraction of cells can be efficiently permeabilized. Combining these data with confocal observations lead to think that only the external cells layers can be permeabilized and that these cells represent one third of the spheroid. This can be due to electric field property inside the spheroid structure, effect on transmembrane potential being modified into such complex structure (Pavlin et al., 2002). Moreover, cells shape in spheroid is strongly affected by cell–cell contact and far from ovoid shape of cells in suspension. That is in agreement with the fact that cell shape and orientation affect electric field effect (Valic et al., 2003). Another possible explanation is that PI can have a reduce accessibility to cells present in the core of the spheroid. A third reason for this limited permeabilization is related to the cellular state. Due to nutrient and dioxygen gradient, cells in spheroid core may be apoptotic or necrotic (Sutherland, 1988) and consequently not able to accumulate PI intracellularly due to their leaky membrane. To conclude, the 3D and multicellular structure

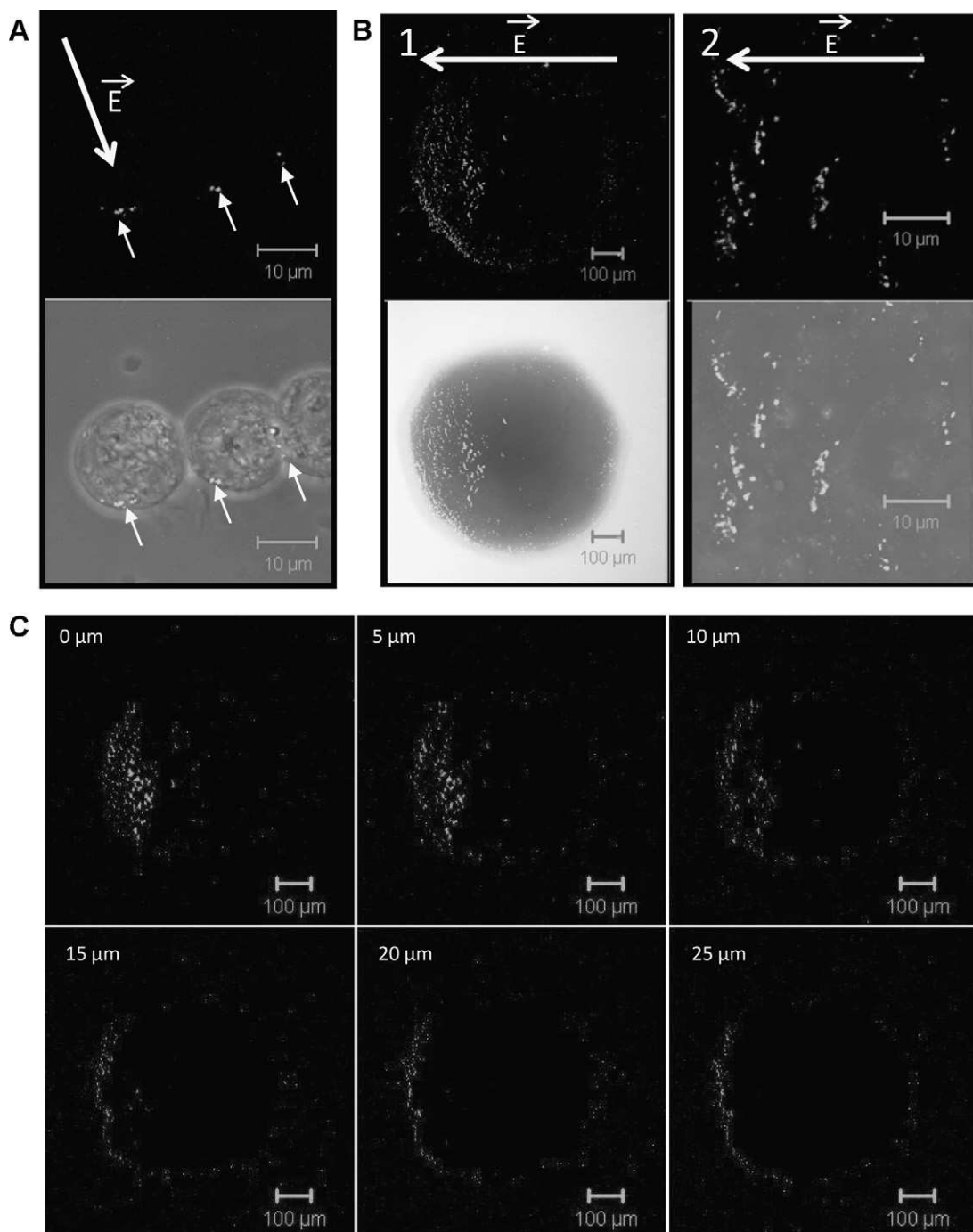


Fig. 2. DNA/membrane interaction on single cells in suspension and cells in spheroids. Cells in suspension and spheroids were electropulsated (10 pulses of 5 ms, 1 Hz at 500 V/cm) in the presence of fluorescently labeled plasmid DNA. (A) 3D projection of confocal acquisitions and phase contrast of cells in suspension. Small arrows point to DNA aggregates and large arrow indicates electric field direction. The scale bar represents 10 μm . (B) 3D projection of confocal acquisitions and phase contrast of electropulsated spheroid. This experiment was performed 3 times and one characteristic picture is presented here. Large arrow indicates electric field direction. 1: entire spheroid, scale bar is 100 μm , 2: zoom in, scale bar is 10 μm . (C) Confocal slice of an electropulsated spheroid between the surface of the spheroid and 25 μm depth with 5 μm step, showing interaction only on external layer. The scale bar represents 100 μm .

of spheroid that mimics tumor organization, with the presence of extracellular matrix, can be responsible for the limited permeabilization. Electrical field conditions have therefore to be optimized. Since increasing the voltage leads to a decrease in cell viability, another strategy consists in applying shorter pulses (several hundred of microseconds instead of 5 ms) in order to apply higher electric field values. This is actually what is already done in electrochemo-therapy protocols using shorter pulse and higher voltage (Marty et al., 2006). Under these conditions we have observed that

all cells can be permeabilized even the ones present inside spheroid (personal communication). EGT conditions are therefore less efficient on 3D structure even when optimized on cultured cells.

Another key point of this paper is the DNA/membrane interaction that has been observed for the first time on a tissue-like structure. Observation of unique cells in spheroid was possible and highly improved the analysis of the mechanism. Pictures of fluorescent plasmid DNA show that it cannot cross all cell layers to reach the core of the spheroid even at high concentration (10 times

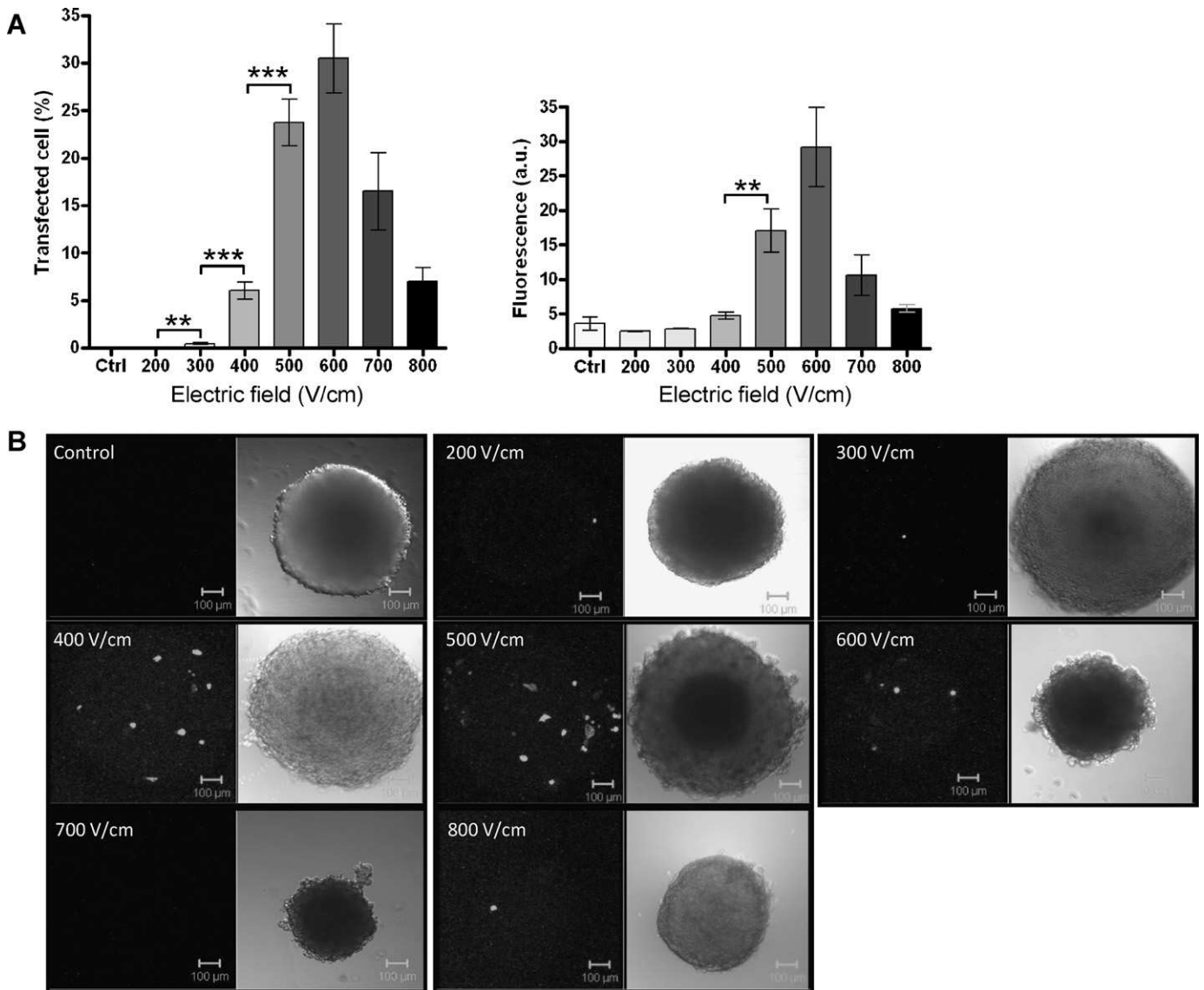


Fig. 3. Comparison of electrotransfection between single cells in suspension and spheroids. (A) Transfection rate of cell in suspension assessed with eGFP expression and matching fluorescence intensity depending on electric field intensity (triplicate, mean \pm SEM, ANOVA test). (B) 3D projection of confocal acquisitions and phase contrast of spheroid electrotransfected with DNA coding eGFP at different electric field intensity (as indicated). This experiment was performed 3 times and one characteristic picture is presented here. The scale bar represents 100 μ m. * P <0.05, ** P <0.01, *** P <0.001.

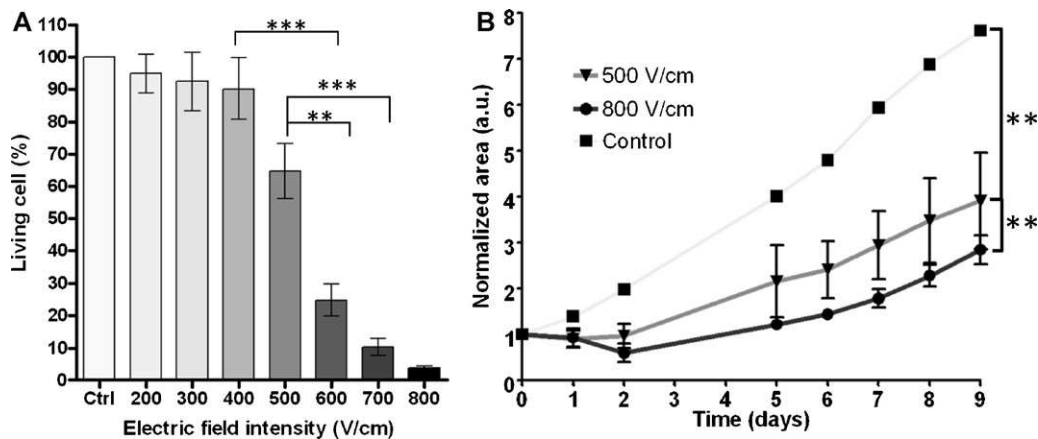


Fig. 4. Electric field effect on cell viability. (A) Viability of cell in suspension 24 h after electrotransfection depending on electric field intensity (triplicate, mean \pm SEM, ANOVA test). (B) Spheroid growth curves with DNA during electric field application. For easier reading, only control, 500 and 800 V/cm are presented here (triplicate, mean \pm SEM, Paired Student's t -test) * P <0.05, ** P <0.005, *** P <0.001.

more than the one used for cells in suspension). This is probably the first cause of poor transfection results in tumor. While 80% of transfection rate is obtained in muscle tissue, in murine tumor only 5% of cells are expressing transgene. Interaction between tumoral cells must be specific and create a so dense environment that DNA cannot pass through them (Smrekar et al., 2003; Zaharoff et al., 2002). The same behavior seems to happen in spheroid, showing that DNA/interaction results can be extrapolated to tumor and that the spheroid model is relevant to mimic tumor. This limited number of cells in interaction with DNA gives another explanation for the poor transfection. Indeed less than 1% of cells are transfected. This last result encourages reconsidering DNA amount used. Indeed, the higher DNA amount (100 µg/ml), initially chosen to allow some plasmid DNA to cross cellular barrier (first layers of cell) and reach inner cells, do not have any of the expected effect. Therefore, attention should be paid on DNA amount for optimization of transfer conditions. Other ways to improve plasmid DNA biodistribution inside the spheroids should be explored such as electrophoresis, to force and direct DNA migration, or the addition of enzymes to disrupt junctions between cells.

Finally, viability results can also explain the poor expression of transgene. As Fig. 4 shows, growth is strongly affected by electric pulse, meaning that those electric fields are killing the entire proliferative cell layer. Spheroid structure presents the proliferative cells on the last external layers. Therefore proliferative cells are the ones potentially transfectable (permeabilized and in contact with DNA) but also the ones affected by electroporation. Around 30% of cells are permeabilized and half of them get contact with DNA, we should consequently expect to have near 15% of transfected cells. However, due to cell death, only a few cells are viable and permeabilized, leading to 1% of expressing eGFP cells.

Spheroid is a safe and easy to use model as it is an *ex vivo* (and *in vitro*) one. This model allows us to visualize directly electric field effect on a complex tridimensional structure close to tissue and preventing small animal use. As in tumor, nutrient and oxygen gradient are presents, creating different physiological cell state (dead, quiescent, proliferative cells). Extracellular matrix and cell interconnection are present as well (Santini et al., 2000). These characteristics are specific to multicellular tumor spheroid (and tumor) and make of it an interesting and useful *in vitro* model more close to tumor tissue than cell monolayer (Friedrich et al., 2007). MCTS could offers possibility to mix different type of cells (Nakamura et al., 1999) and so to get closer to tumor environment. The absence of blood vessel is one of its the major drawbacks, positioning proliferative cells on the external layers (Sutherland, 1988). Eventually, although spheroid is a simple representation of tumor, it is cheaper and more ethic than mouse and allow single cell study, quantification and direct observation of cell behavior. Despite its drawbacks, results obtained with spheroid are nicely reproducing *in vivo* situation. We showed here that less than 1% of spheroid cell can express transgene and that this may be caused both by electric field (low voltage, long pulse duration parameters) and multicellular structure. As previously described (Canatella et al., 2004), electric field is locally reduced in spheroid because of cell size and prevent permeabilization of cells. Furthermore, the cells themselves, their junctions and the secreted extracellular matrix will hinder DNA electrophoresis. Even if this process is inverted in spheroid as DNA is all around the spheroid and not injected inside (like in tumor protocol), the physical cell barrier should be the same in both case, and *in vivo* transfected cells appear in external layers too (Mesojednik et al., 2007). As shown in other studies (Goodman et al., 2007), collagenase treatments help nanoparticles enter deeper in the structure, pointing out the importance that has the extracellular matrix in passive and active passages through cells layers. Nevertheless, the optimal electric field condition of 500 V/cm (using 10 pulses of 5 ms, 1 Hz) is the same for cells in

suspension and spheroid, this value giving the best transfection rate in both models.

5. Conclusion

Reproducing *in vivo* situation, spheroids clearly mimic *in vivo* tumor results, opening up possibility of optimization *ex vivo* before *in vivo* tests on small animals. A lot of tumoral cell type can be cultured in spheroid (Freyer and Sutherland, 1980; Grill et al., 2002; Kelm et al., 2003; Kumar et al., 2008) and so characterization and optimization could be finely tuned for each tumor type, allowing the emergence of specific conditions depending on the cell type.

Spheroid will enhance our understanding of the underlying process of DNA electrotransfer, give explanations to *in vivo* limitation of the technique and help in the emergence of new protocols.

Acknowledgments

This work was supported by Agence Nationale de la Recherche (ANR), Association Française contre les Myopathies (AFM) and Direction Générale de l'Armement (DGA).

References

- Canatella, P.J., Black, M.M., Bonnicksen, D.M., McKenna, C., Prausnitz, M.R., 2004. Tissue electroporation: quantification and analysis of heterogeneous transport in multicellular environments. *Biophys. J.* 86, 3260–3268.
- Daud, A.I., DeConti, R.C., Andrews, S., Urbas, P., Riker, A.I., Sondak, V.K., Munster, P.N., Sullivan, D.M., Ugen, K.E., Messina, J.L., Heller, R., 2008. Phase I trial of interleukin-12 plasmid electroporation in patients with metastatic melanoma. *J. Clin. Oncol.* 26, 5896–5903.
- Del Duca, D., Werbowetski, T., Del Maestro, R.F., 2004. Spheroid preparation from hanging drops: characterization of a model of brain tumor invasion. *J. Neurooncol.* 67, 295–303.
- Dona, M., Sandri, M., Rossini, K., Dell'Aica, I., Podhorska-Okolow, M., Carraro, U., 2003. Functional *in vivo* gene transfer into the myofibers of adult skeletal muscle. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 312, 1132–1138.
- Escoffre, J.M., Portet, T., Wasungu, L., Teissie, J., Dean, D., Rols, M.P., 2009. What is (still not) known of the mechanism by which electroporation mediates gene transfer and expression in cells and tissues. *Mol. Biotechnol.* 41, 286–295.
- Freyer, J.P., Sutherland, R.M., 1980. Selective dissociation and characterization of cells from different regions of multicell tumor spheroids. *Cancer Res.* 40, 3956–3965.
- Friedrich, J., Ebner, R., Kunz-Schughart, L.A., 2007. Experimental anti-tumor therapy in 3D: spheroids – old hat or new challenge? *Int. J. Radiat. Biol.* 83, 849–871.
- Gil-Cardesa, M.L., Villaverde, M.S., Fiszman, G.L., Altamirano, N.A., Cwirenbaum, R.A., Glikin, G.C., Finocchiaro, L.M., 2010. Suicide gene therapy on spontaneous canine melanoma: correlations between *in vivo* tumors and their derived multicell spheroids *in vitro*. *Gene Ther.* 17, 26–36.
- Golzio, M., Escoffre, J.M., Portet, T., Mauroy, C., Teissie, J., Dean, D.S., Rols, M.P., 2010. Observations of the mechanisms of electromediated DNA uptake—from vesicles to tissues. *Curr. Gene Ther.* 10, 256–266.
- Golzio, M., Teissie, J., Rols, M.P., 2002. Direct visualization at the single-cell level of electrically mediated gene delivery. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 99, 1292–1297.
- Goodman, T.T., Olive, P.L., Pun, S.H., 2007. Increased nanoparticle penetration in collagenase-treated multicellular spheroids. *Int. J. Nanomed.* 2, 265–274.
- Gothelf, A., Mir, L.M., Gehl, J., 2003. Electrochemotherapy: results of cancer treatment using enhanced delivery of bleomycin by electroporation. *Cancer Treat. Rev.* 29, 371–387.
- Grill, J., Lamfers, M.L., van Beusechem, V.W., Dirven, C.M., Pherai, D.S., Kater, M., Van der Valk, P., Vogels, R., Vandertop, W.P., Pinedo, H.M., Curiel, D.T., Gerritsen, W.R., 2002. The organotypic multicellular spheroid is a relevant three-dimensional model to study adenovirus replication and penetration in human tumors *in vitro*. *Mol. Ther.* 6, 609–614.
- Heller, L.C., Heller, R., 2006. *In vivo* electroporation for gene therapy. *Hum. Gene Ther.* 17, 890–897.
- Heller, R., Jaroszeski, M., Atkin, A., Moradpour, D., Gilbert, R., Wands, J., Nicolau, C., 1996. *In vivo* gene electroinjection and expression in rat liver. *FEBS Lett.* 389, 225–228.
- Kelm, J.M., Timmins, N.E., Brown, C.J., Fussenegger, M., Nielsen, L.K., 2003. Method for generation of homogeneous multicellular tumor spheroids applicable to a wide variety of cell types. *Biotechnol. Bioeng.* 83, 173–180.
- Kumar, H.R., Zhong, X., Hoelz, D.J., Rescorla, F.J., Hickey, R.J., Malkas, L.H., Sandoval, J.A., 2008. Three-dimensional neuroblastoma cell culture: proteomic analysis between monolayer and multicellular tumor spheroids. *Pediatr. Surg. Int.* 24, 1229–1234.
- Lobjois, V., Frongia, C., Jozan, S., Truchet, I., Valette, A., 2009. Cell cycle and apoptotic effects of SAHA are regulated by the cellular microenvironment in HCT116 multicellular tumour spheroids. *Eur. J. Cancer* 45, 2402–2411.

- Madsen, S.J., Sun, C.H., Tromberg, B.J., Cristini, V., De Magalhaes, N., Hirschberg, H., 2006. Multicell tumor spheroids in photodynamic therapy. *Lasers Surg. Med.* 38, 555–564.
- Marty, M., Sersa, G., Garbay, J.R., Gehl, J., Collins, C.G., Snoj, M., Billard, V., Geertsen, P.F., Larkin, J.O., Miklavcic, D., Pavlovic, I., Paulin-Kosir, S.M., Cemazar, M., Morsli, N., Soden, D.M., Rudolf, Z., Robert, C., O'Sullivan, G.C., Mir, L.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. *Eur. J. Cancer Suppl. Electrochemother.* 4, 3–13.
- Mellor, H.R., Davies, L.A., Caspar, H., Pringle, C.R., Hyde, S.C., Gill, D.R., Callaghan, R., 2006. Optimising non-viral gene delivery in a tumour spheroid model. *J. Gene Med.* 8, 1160–1170.
- Mesojednik, S., Pavlin, D., Sersa, G., Coer, A., Kranjc, S., Grosel, A., Tevz, G., Cemazar, M., 2007. The effect of the histological properties of tumors on transfection efficiency of electrically assisted gene delivery to solid tumors in mice. *Gene Ther.* 14, 1261–1269.
- Mir, L.M., Bureau, M.F., Gehl, J., Rangara, R., Rouy, D., Caillaud, J.M., Delaere, P., Branellec, D., Schwartz, B., Scherman, D., 1999. High-efficiency gene transfer into skeletal muscle mediated by electric pulses. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 96, 4262–4267.
- Mir, L.M., Glass, L.F., Sersa, G., Teissie, J., Domenge, C., Miklavcic, D., Jaroszeski, M.J., Orłowski, S., Reintgen, D.S., Rudolf, Z., Belehradec, M., Gilbert, R., Rols, M.P., Belehradec Jr., J., Bachaud, J.M., DeConti, R., Stabuc, B., Cemazar, M., Coninx, P., Heller, R., 1998. Effective treatment of cutaneous and subcutaneous malignant tumours by electrochemotherapy. *Br. J. Cancer* 77, 2336–2342.
- Mir, L.M., Morsli, N., Garbay, J.R., Billard, V., Robert, C., Marty, M., 2003. Electrochemotherapy: a new treatment of solid tumors. *J. Exp. Clin. Cancer Res.* 22, 145–148.
- Nakamura, K., Hanibuchi, M., Yano, S., Tanaka, Y., Fujino, I., Inoue, M., Takezawa, T., Shitara, K., Sone, S., Hanai, N., 1999. Apoptosis induction of human lung cancer cell line in multicellular heterospheroids with humanized antiganglioside GM2 monoclonal antibody. *Cancer Res.* 59, 5323–5330.
- Pavlin, M., Pavselj, N., Miklavcic, D., 2002. Dependence of induced transmembrane potential on cell density, arrangement, and cell position inside a cell system. *IEEE Trans. Biomed. Eng.* 49, 605–612.
- Rols, M.P., Coulet, D., Teissie, J., 1992. Highly efficient transfection of mammalian cells by electric field pulses. Application to large volumes of cell culture by using a flow system. *Eur. J. Biochem.* 206, 115–121.
- Rols, M.P., Delteil, C., Golzio, M., Dumond, P., Cros, S., Teissie, J., 1998. In vivo electrically mediated protein and gene transfer in murine melanoma. *Nat. Biotechnol.* 16, 168–171.
- Rols, M.P., Golzio, M., Gabriel, B., Teissie, J., 2002. Factors controlling electropermeabilisation of cell membranes. *Technol. Cancer Res. Treat.* 1, 319–328.
- Santini, M.T., Rainaldi, G., Indovina, P.L., 2000. Apoptosis, cell adhesion and the extracellular matrix in the three-dimensional growth of multicellular tumor spheroids. *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* 36, 75–87.
- Smrekar, B., Wightman, L., Wolschek, M.F., Lichtenberger, C., Ruzicka, R., Ogris, M., Rodl, W., Kurs, M., Wagner, E., Kircheis, R., 2003. Tissue-dependent factors affect gene delivery to tumors in vivo. *Gene Ther.* 10, 1079–1088.
- Sutherland, R.M., 1988. Cell and environment interactions in tumor microregions: the multicell spheroid model. *Science* 240, 177–184.
- Titimirov, A.V., Sukharev, S., Kistanova, E., 1991. In vivo electroporation and stable transformation of skin cells of newborn mice by plasmid DNA. *Biochim. Biophys. Acta* 1088, 131–134.
- Valic, B., Golzio, M., Pavlin, M., Schatz, A., Faurie, C., Gabriel, B., Teissie, J., Rols, M.P., Miklavcic, D., 2003. Effect of electric field induced transmembrane potential on spheroidal cells: theory and experiment. *Eur. Biophys. J.* 32, 519–528.
- Wasungu, L., Escoffre, J.M., Valette, A., Teissie, J., Rols, M.P., 2009. A 3D in vitro spheroid model as a way to study the mechanisms of electroporation. *Int. J. Pharm.* 379, 278–284.
- Wolf, H., Rols, M.P., Boldt, E., Neumann, E., Teissie, J., 1994. Control by pulse parameters of electric field-mediated gene transfer in mammalian cells. *Biophys. J.* 66, 524–531.
- Zaharoff, D.A., Barr, R.C., Li, C.Y., Yuan, F., 2002. Electromobility of plasmid DNA in tumor tissues during electric field-mediated gene delivery. *Gene Ther.* 9, 1286–1290.

B. Perméabilité irréversible et viabilité

La perméabilité membranaire des cellules suite à l'application des impulsions électriques en présence d'ADN plasmidique a été visualisée après marquage à l'iodure de propidium (PI) des cellules 30 minutes après l'application des impulsions électriques. La durée de 30 minutes permet normalement à la membrane plasmique de recouvrer son intégrité et son caractère imperméable aux petites molécules comme le PI, d'après les études *in vitro* sur cellules isolées (Teissie *et al.*, 2005). Ce temps dépend des paramètres électriques appliqués ainsi que de la température. En étendant les résultats obtenus sur cellules isolées aux sphéroïdes, il est possible de considérer que les cellules dans lesquelles le PI est détecté après cette durée sont perméabilisées de manière irréversible, et donc mortes des suites de l'électroperméabilisation. On observe que dès 300 V/cm le nombre de cellules positives est nettement plus important que sur le contrôle non-électroperméabilisé (Figure 2).

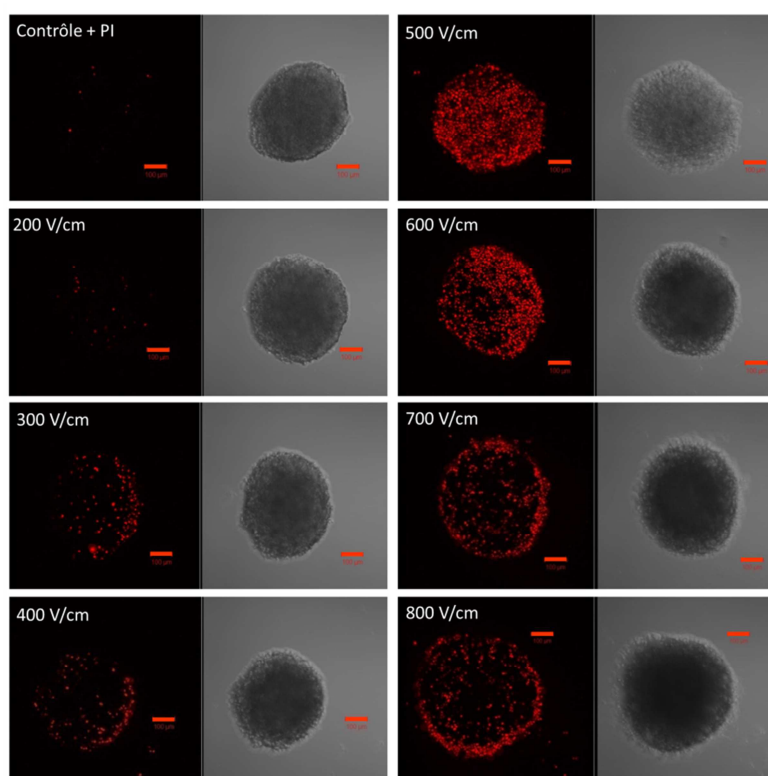


Figure 15 : Perméabilité irréversible observées 30 minutes après l'électrotransfection par entrée de PI. Projection 3D des acquisitions en z au microscope confocal des sphéroïdes électrotransfectés en présence d'ADN et contraste de phase. Barre d'échelle : 100 μ m.

A 500 V/cm, le profil est similaire à celui obtenu lors de l'observation de la perméabilisation 5 minutes après l'électrotransfert. Ceci indique que la quasi-totalité des cellules perméabilisées, en contact avec l'ADN, l'est toujours dans les 30 minutes suivant les

impulsions. Ce constat corrobore le faible taux de cellules transfectées observé 24h plus tard (Chopinnet *et al.*, 2012). Il est à noter que les clichés montrent des sphéroïdes dont la couche cellulaire externe ne semble pas positive au PI de façon homogène, mais laisse apparaître des zones non-marquées et que de nombreuses cellules positives sont présentes dans le milieu autour du sphéroïde. Ceci est dû au fait que les cellules mortes se détachent du sphéroïde pendant les manipulations nécessaires à son incubation et son observation.

La croissance des sphéroïdes soumis à l'électrotransfection a été suivie à l'aide d'un microscope classique droit. Les aires projetées des sphéroïdes ont ensuite été mesurées et reportées sur un graphique (Figure 16) et sont considérées proportionnelles au nombre de cellules formant le sphéroïde.

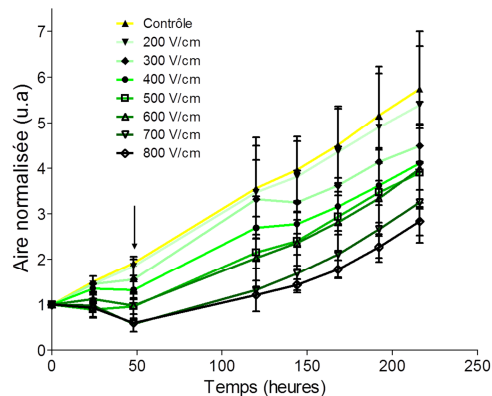


Figure 16 : Courbe de croissance des sphéroïdes électrotransfectés (triplicata), moyenne \pm SEM, la flèche indique la reprise de croissance.

Sur ces courbes de croissance il est possible de distinguer trois groupes. Un premier groupe dit « non-affecté » de 0 à 300 V/cm, ces sphéroïdes ont une croissance similaire à celle du contrôle (pente de $0,020 \text{ h}^{-1}$). Un deuxième groupe dit « peu affecté » à 400 V/cm, ces sphéroïdes ont une croissance plus lente que le contrôle les deux premiers jours (pente de $0,0075 \text{ h}^{-1}$) puis similaire au-delà de 72 h (pente de $0,016 \text{ h}^{-1}$). Un troisième groupe dit « affecté » de 500 à 800 V/cm. Dans ces conditions, les sphéroïdes cessent de croître durant les 48 heures suivant l'application des impulsions, voire diminuent de taille (pente de $-0,01 \text{ h}^{-1}$). Ils reprennent ensuite progressivement une croissance normale (pente de $0,018 \text{ h}^{-1}$). Ces observations mettent en évidence l'effet létal de l'électrotransfert de gène. Le groupe "peu affecté" ne s'arrête pas de croître. Ceci nous amène à penser que dans ces conditions le champ électrique n'affecte pas la croissance du sphéroïde. Le dernier groupe (« affecté ») voit sa croissance stoppée et perd un grand nombre de cellules (perte visible sur toute la

circonférence du sphéroïde). Ceci indique que plusieurs couches de cellules sont mortes, et la plupart des cellules prolifératives également vu l'organisation cellulaire d'un sphéroïde (cf. introduction de ce chapitre).

La même expérience a été réalisée en l'absence d'ADN. Les résultats montrent des profils de marquage au PI 30 minutes après l'application des champs représentant globalement la même importante perméabilité irréversible (Figure 17).

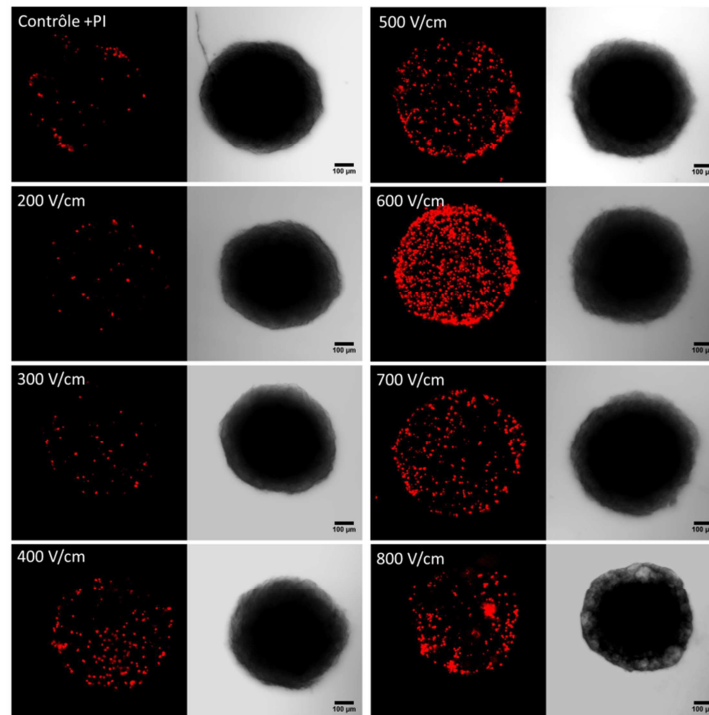


Figure 17 : Perméabilité irréversible 30 minutes après l'application des champs électriques en l'absence d'ADN. Projection 3D des acquisitions en z au microscope confocal des sphéroïdes électrotransfectés et contraste de phase. Barre d'échelle : 100 µm.

Au niveau de la croissance des sphéroïdes, il est à noter que la reprise de croissance est plus rapide qu'en présence d'ADN. On observe la même répartition des groupes, sauf la condition à 500 V/cm qui est « peu affectée ». Les sphéroïdes « affectés » reprennent progressivement le rythme de croissance du contrôle dès 24h (Figure 18, flèche) indiquant un nombre de cellules affectées moins important. Ceci indique que la cytotoxicité de l'ADN joue un rôle dans la mort des cellules suite à l'électrotransfection, mais que les impulsions électriques seules sont la principale cause de perméabilité irréversible des premières couches cellulaires.

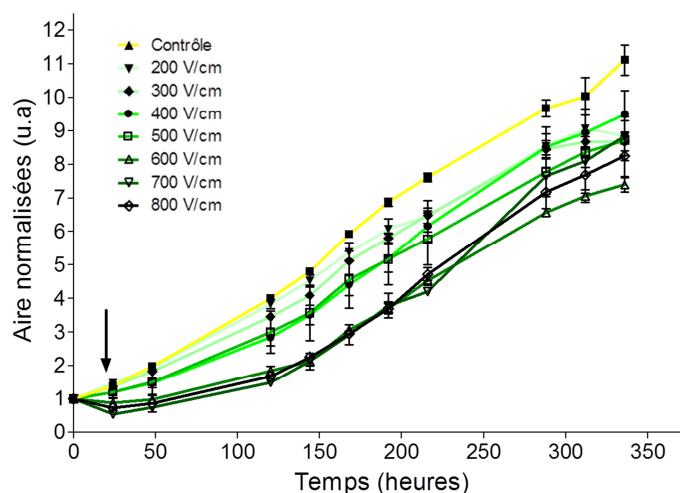


Figure 18 : Courbe de croissance des sphéroïdes soumis aux impulsions électriques sans ADN (triplicata), moyenne \pm SEM, la flèche indique la reprise de croissance.

C. Conclusion : Le sphéroïde - un modèle pour l'étude de l'électrotransfection

Dans cette première partie nous avons pu mettre en place les outils nécessaires à la visualisation des sphéroïdes. L'observation par microscopie confocale s'est révélée adéquate pour l'observation des premières couches de cellules (jusqu'à 40 μm de profondeur), mais pas au-delà. La mise en place de la technique de dissociation à la trypsine a donc permis une quantification précise de la perméabilité ou de la transfection (Chopinnet *et al.*, 2012). Ces techniques ont été validées et une première approche générale du comportement de cellules en structure tridimensionnelle a été effectuée. Il a été observé que des conditions de transfert de gène EGT « classiques » (10 impulsions de 5 ms à 500 V/cm) menant à une perméabilisation de plus de 80% de cellules en suspension et à plus de 25% de transfection en conservant 70% de cellules viables ne permettent pas l'obtention de résultats similaires sur les sphéroïdes. Ce modèle à trois-dimensions formé de cellules cohésives se rapproche donc grandement des tumeurs de part son incapacité à présenter plus de 5% de cellules transfectées en conditions EGT (Rols, Delteil *et al.* 1998). D'autre part, les cellules transfectées n'ont été détectées qu'en surface, comme c'est le cas *in vivo* (Spanggaard *et al.*, 2012), confirmant que les cellules internes ne sont pas en contact avec l'ADN plasmidique (Canatella *et al.*, 2004). La difficulté de passage de l'ADN à travers les couches de cellules est donc également responsable de ce faible taux de transfection, comme il l'est *in vivo* (Henshaw *et al.*, 2007). Il n'est également pas exclu que les paramètres cellulaires déjà responsables *in vitro* de la variation d'efficacité de transfection, comme la phase du cycle cellulaire, aient un impact sur la transfection en contexte 3D (Golzio *et al.*, 2002b). Grâce aux observations qualitatives au

microscope confocal, une autre cause directe du faible taux de transfection a pu être mise en avant. Une mortalité importante a été observée dès 300 V/cm, due majoritairement au champ électrique et dans une moindre mesure à la cytotoxicité de l'ADN.

Les résultats de ce travail ont permis de confirmer la similitude de comportement entre les sphéroïdes et les tumeurs *in vivo* pour l'électrotransfection et d'amorcer l'optimisation de la technique *in vitro*.

III. Optimisation de l'électrotransfection sur sphéroïdes

Au regard des résultats obtenus dans la partie précédente, nous nous sommes intéressés à optimiser les conditions en faisant varier la polarité du champ électrique et le nombre d'impulsions appliquées. Les conditions expérimentales et analytiques sont identiques à celles décrites dans la première partie.

A. Application d'impulsions électriques de polarité alternée

Une des solutions pour augmenter le nombre de cellules en contact avec l'ADN lors des impulsions est d'inverser la polarité du champ entre deux séries d'impulsions (Faurie *et al.*, 2004; Rebersek *et al.*, 2007). L'ADN, une fois entré en contact avec la membrane électroperméabilisée, va y former des agrégats. Cette interaction est nécessaire à son internalisation (Golzio *et al.*, 2002a). L'application de ces champs qui seront appelés bipolaires permet donc d'assurer la migration de l'ADN dans un sens et dans l'autre, et ainsi de répartir l'ADN sur les deux faces du sphéroïde et d'augmenter la surface du sphéroïde en contact avec l'ADN. Ainsi, nous espérons provoquer une interaction ADN/membrane sur toute la surface du sphéroïde et augmenter le nombre de cellules transfectées.

Les conditions électriques utilisées sont les mêmes que dans la première partie : 10 impulsions de 5ms, fréquence : 1 Hz, pour la même gamme de champ électrique. La polarité est inversée après les 5 premières impulsions.

1. Interaction ADN/membrane

En réalisant l'électropulsation en présence d'ADN marqué au TOTO nous avons pu étudier l'interaction ADN/membrane sur les sphéroïdes en conditions bipolaires. Nous avons pu constater, conformément à notre hypothèse, que cette interaction se fait sur toute la surface du sphéroïde (Figure 19-A). De plus, on observe un marquage moins intense que lors de

l'application d'impulsions unipolaires, et plus uniformément réparti sur les cellules (Figure 19-B et C). Cette baisse d'intensité s'explique en raison du nombre d'impulsions délivré pour chaque polarité qui correspond à la moitié du nombre appliqué en unipolaire. En effet, le nombre d'impulsion va augmenter la quantité d'ADN formant les agrégats (Rols *et al.*, 1992), avec seulement 5 impulsions dans chaque polarité il y aura donc moins d'ADN en contact avec chaque cellule que lors de l'application de 10 impulsions en conditions unipolaire.

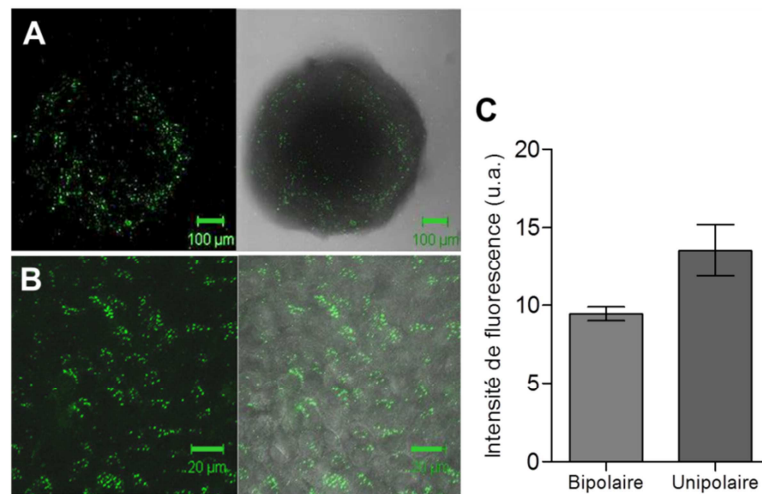


Figure 19 : Interaction ADN-TOTO avec la membrane plasmique en conditions bipolaires. A : sur sphéroïde entier, B : zoom, C : intensité de fluorescence moyenne sur une face du sphéroïde et SEM.

2. Transfection et aspect morphologique

Suite aux observations d'interaction ADN/membrane, nous espérons observer une expression de la GFP répartie sur tout le sphéroïde, étant donné que toutes les cellules de la surface sont en contact avec l'ADN. Cependant, nous n'avons pu observer aucune transfection en conditions bipolaires et ce quelle que soit l'intensité de champ électrique appliqué (Figure 20-A). Par contre, nous avons pu remarquer la destruction des sphéroïdes suite à l'application de ces impulsions bipolaires. L'apparition d'amas cellulaires se détachant du sphéroïde est observée durant les 24 premières heures suivant l'application de champ électrique supérieur ou égal à 500 V/cm (Figure 20-A à partir de 500 V/cm). Ces structures sont composées de cellules mortes fusionnées (PI positives à 24h) et disparaissent au cours du temps (Figure 20-B). De plus, elles apparaissent uniquement lors de l'application de champs électriques bipolaires.

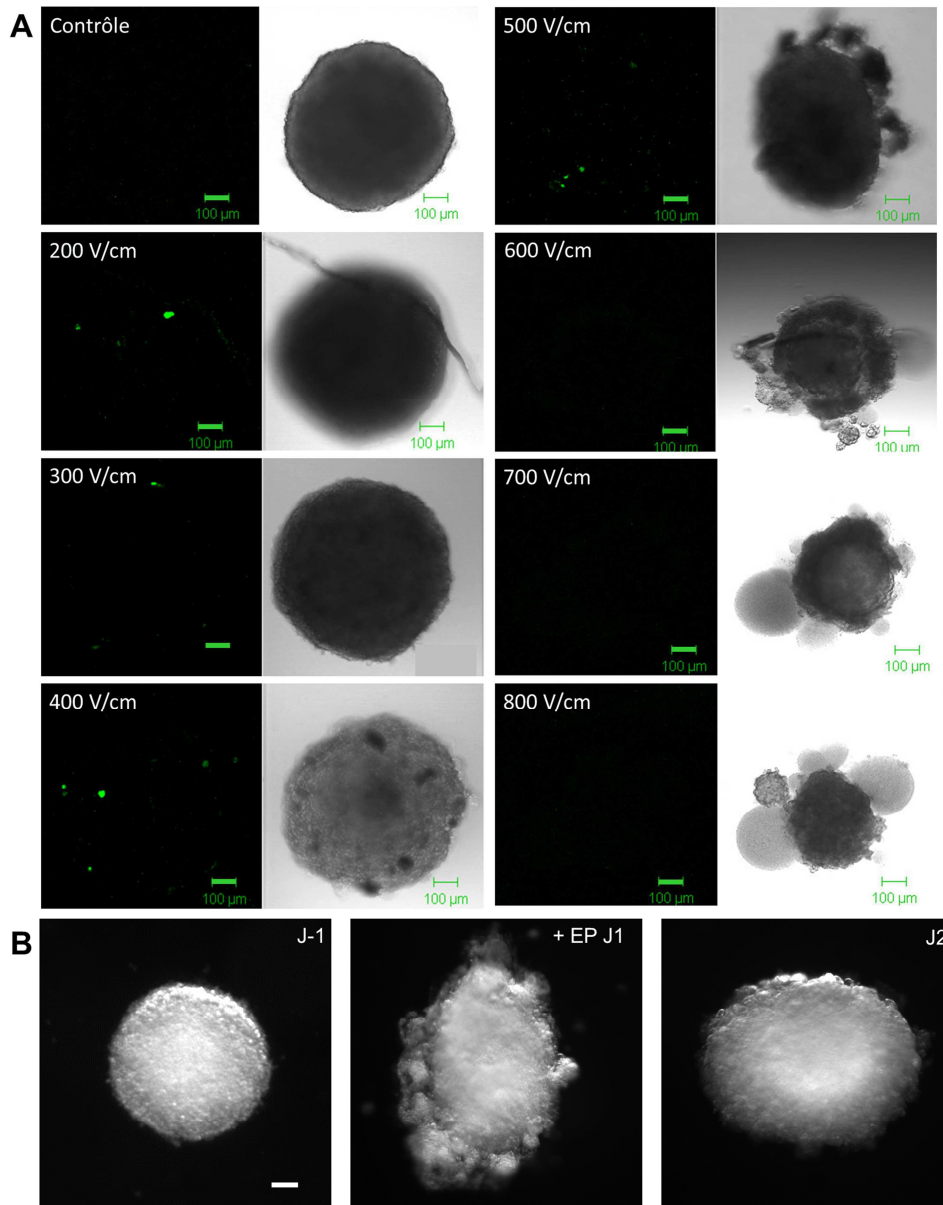


Figure 20 : A : Résultat de transfection de sphéroïdes en conditions bipolaires. B : disparition des amas cellulaires le jour après l'application des impulsions pour la condition 500 V/cm, application des champs électriques à $J=0$. Barre d'échelle : 100 μm .

3. Perméabilité irréversible et viabilité

En comparaison des observations effectuées dans la première partie en conditions unipolaires, le taux de perméabilité irréversible post-électrotransfection est le même (Figure 21-A). Les courbes de croissance présentent trois groupes distincts : un premier groupe « non affecté » jusqu'à 300 V/cm (pente de 0.12 h^{-1}), un deuxième groupe « peu affecté » composé des sphéroïdes ayant subi des impulsions à 400 V/cm (pente de 0.11 h^{-1}) et un troisième groupe « affecté » qui présente une croissance quasi-nulle durant les 72 premières heures

(pente de 0.04 h^{-1}) puis reprennent un rythme similaire au contrôle (pente de 0.12 h^{-1}). Néanmoins, à 800 V/cm , la croissance ne reprend pas le même rythme que pour le contrôle (pente de 0.09 h^{-1} au-delà de 72 heures contre 0.12 h^{-1} pour le contrôle, Figure 21). La différence de croissance du contrôle de la Figure 21 par rapport à la Figure 18 est liée à la taille initiale des sphéroïdes. Ceux de la Figure 21, comme le montrent les images, étaient plus petits (environ $400 \mu\text{m}$) que ceux mesurés Figure 18 ($600 \mu\text{m}$), et ont donc pu croître plus.

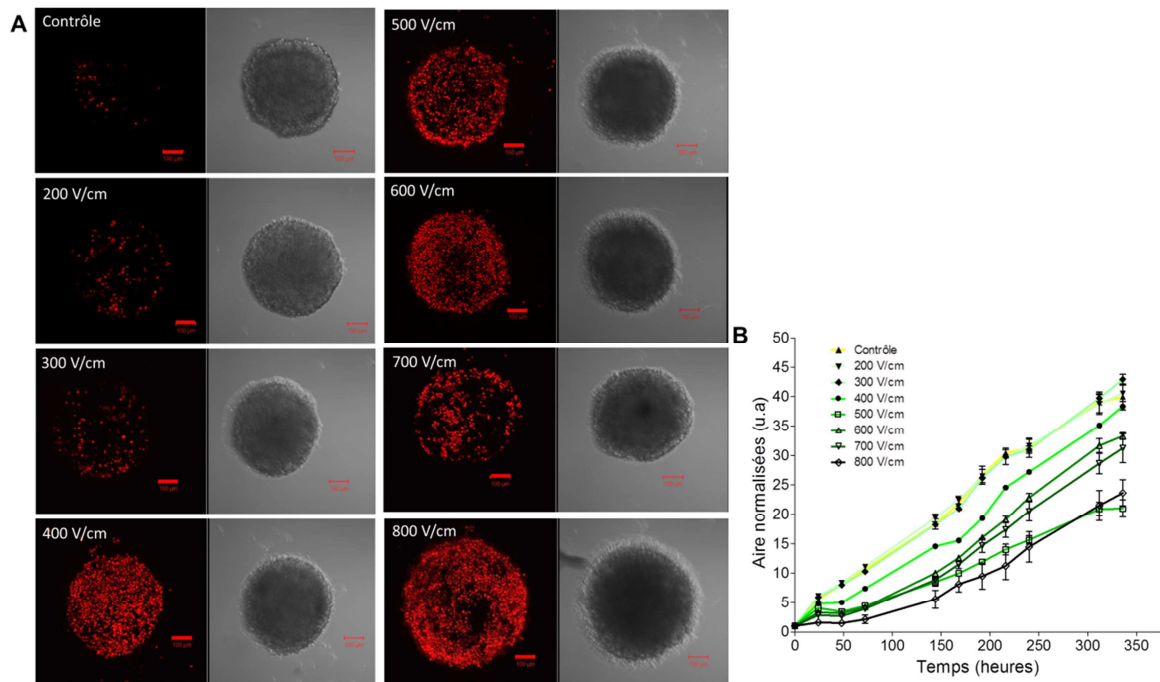


Figure 21 : A : Perméabilité irréversible par marquage au PI 30 minutes après l'application de champs bipolaires. B : Courbe de croissance des sphéroïdes en conditions bipolaires (triplicata), moyenne et SEM.

4. Conclusion

L'absence d'amélioration par l'utilisation de champs bipolaires s'explique par une mortalité plus importante. Le changement de polarité est létal pour les couches cellulaires externes du sphéroïde. Toutefois, les observations de l'interaction ADN/membrane ont montré que la quantité d'ADN en contact avec chaque cellule était plus faible qu'en unipolaire. Nous avons vu sur les sphéroïdes contrôle sans ADN que les champs électriques ont un rôle dans la mortalité cellulaire qui affecte la croissance des sphéroïdes. Ces résultats confirment l'hypothèse que la cytotoxicité de l'ADN n'est pas seule responsable de la mortalité cellulaire. Cette dernière serait plutôt engendrée par la force des champs électriques appliqués au-delà de 500 V/cm .

Ces résultats diffèrent des résultats obtenus suite à l'application d'impulsions bipolaires sur cellules cultivées en deux dimensions (Faurie *et al.*, 2004; Rebersek *et al.*, 2007). Les expériences similaires sur cellules CHO (Chinese Hamster Ovary cells) ont montré une augmentation de 20% du taux de transfection suite à l'application de champs bipolaires inversés, mais aucun effet sur la viabilité cellulaire (Faurie *et al.*, 2004). Cette induction de la mortalité serait donc inhérente au modèle tridimensionnel et démontre encore une fois la différence de sensibilité de cellules isolées par rapport aux cellules d'un sphéroïde.

B. Effet de la diminution du nombre d'impulsions

Au regard des résultats obtenus avec les impulsions bipolaires, il apparaît que l'utilisation de l'unipolarité à 500 V/cm est jusque-là la meilleure condition électrique (Chopinnet *et al.*, 2012). Nous nous sommes donc interrogés sur l'effet du nombre d'impulsions qui pourrait permettre d'éviter l'effet létal du champ électrique en diminuant l'exposition des cellules à ce champ. Ceci pourrait aussi provoquer une baisse de la quantité d'ADN entrant en contact avec les cellules, et donc diminuer sa cytotoxicité. Nous avons donc choisi de faire varier le nombre d'impulsions à 500 V/cm en utilisant 4, 6 et 8 impulsions.

1. *Transfection*

Nous avons observé que de 4 à 8 impulsions, le nombre de cellules transfectées en conditions bipolaires était plus élevé qu'en conditions unipolaires (Figure 22-A) et que les cellules transfectées étaient localisées sur les deux faces du sphéroïde. De plus, principalement à 8 impulsions des fusions cellulaires ont été observées (Figure 22-B).

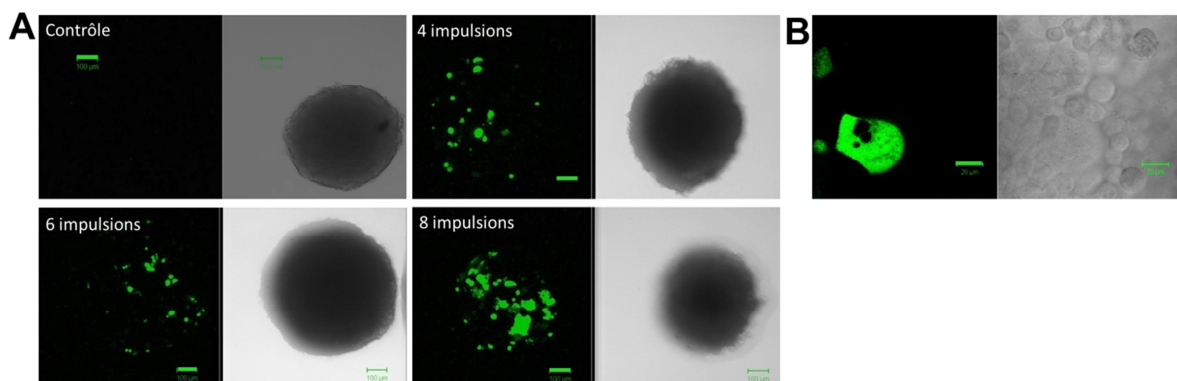


Figure 22 : A : Résultat de transfection de sphéroïdes en diminuant le nombre d'impulsion. Barre d'échelle : 100 µm. B : Zoom sur une cellule résultant d'une fusion. Barre d'échelle : 20 µm.

2. Perméabilité irréversible et viabilité

Le marquage des cellules au PI, 30 minutes après l'application des impulsions, montre que le nombre de cellules perméabilisées de manière irréversible est beaucoup plus faible pour 4, 6 et 8 impulsions que pour 10 (cf. partie IIC). De la même façon, lors des impulsions EGT classiques, les cellules mortes se détachent du sphéroïde lors de sa manipulation, ce qui ne permet qu'une observation partielle du phénomène. Cependant il est clairement visible que les cellules mortes sont localisées sur un seul hémisphère du sphéroïde (Figure 20-C), vraisemblablement celui en contact avec l'ADN. Dans ces conditions il est donc possible de n'observer que la perméabilité irréversible liée à la cytotoxicité de l'ADN. Suite aux résultats de transfection, l'importance de la mortalité liée aux champs électriques est donc avérée en comparaison aux cellules ayant subi un plus grand nombre d'impulsions (partie 1). La croissance des sphéroïdes pour les différents nombres d'impulsions est légèrement plus faible que celle du contrôle et s'accompagne toujours d'un arrêt de croissance jusqu'à 48h (Figure 23).

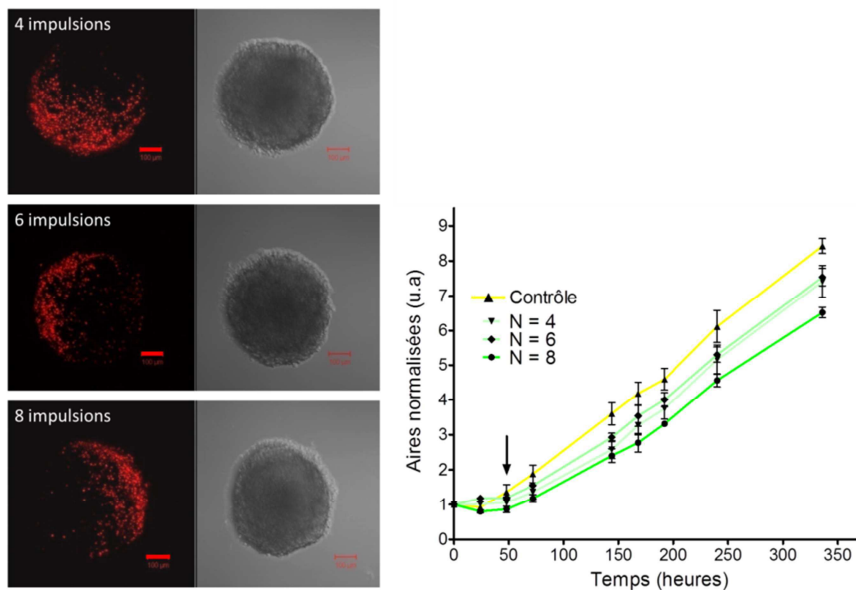


Figure 23 : A : Perméabilité irréversible observée par marquage au PI en diminuant le nombre d'impulsion. B : Courbe de croissance des sphéroïdes selon le nombre d'impulsions (triplicata), moyenne et SEM.

3. Conclusion

La diminution du nombre d'impulsions semble apporter une amélioration non-négligeable dans la survie cellulaire et le taux de transfection. 4 impulsions permettent de doubler le nombre de cellules exprimant la GFP par rapport aux résultats obtenus avec 10 impulsions.

L'apparition de fusions cellulaires n'est pas un obstacle à l'expression du transgène, et a déjà été observée *in vivo* suite à l'application de champs électriques (Mekid et Mir 2000). La perméabilité irréversible est présente sur un seul hémisphère du sphéroïde, probablement celui entrant en contact avec l'ADN, dont la cytotoxicité peut donc être mise en cause dans ces conditions.

IV. Discussion et perspectives

Le modèle sphéroïde a déjà été utilisé pour l'étude et l'optimisation de plusieurs techniques de transfert de gène comme présenté en introduction de ce chapitre, ou d'autres études comme la thérapie photodynamique (Madsen *et al.*, 2006) et l'étude du cycle cellulaire dans les tumeurs (Lobjois *et al.*, 2009). La thérapie génique nécessite la mise au point d'outils fiables et peu invasifs. Dans ce but, l'utilisation du modèle sphéroïde peut permettre de pointer les obstacles physiques et technologiques à l'électrotransfection dans une structure tumorale, ainsi que l'optimisation des paramètres *in vitro*. Le sphéroïde est un modèle prometteur et commence à être utilisé dans plusieurs groupes de recherche pour l'étude de l'électrotransfert (Canatella *et al.*, 2004; Marrero et Heller, 2012; Wasungu *et al.*, 2009).

La comparaison systématique des résultats entre cellules en culture et cellules en sphéroïde a permis de montrer que ce modèle reproduisait les résultats obtenus *in vivo* (Chopinnet *et al.*, 2012). Une première explication de la difficulté à obtenir un bon taux de transfection *in vivo* a pu être mise en évidence. Il a été montré dans ce chapitre que le faible taux de transfection était lié à une absence de croissance due à la perméabilité irréversible des cellules. La cytotoxicité de l'ADN, déjà montrée comme étant un frein à la transfection (Li *et al.*, 1999), n'est pas dans notre cas la principale cause de mortalité. En effet, les résultats obtenus montrent que les impulsions électriques elles-mêmes sont la cause de perméabilité irréversible (Figure 18) et permettent de concevoir une sensibilité au champ différente entre les cellules dans le sphéroïde et une cellule isolée. Il semblerait que la présence de cellules adjacentes soit la cause de la perméabilité irréversible de la totalité des cellules des couches externes des sphéroïdes. Ces cellules sont en effet toujours perméables au PI 30 minutes après l'application des champs électriques (Figure 15). Nous pouvons émettre l'hypothèse que l'environnement cellulaire dans le sphéroïde ne permet pas aux cellules de retrouver leur intégrité membranaire après l'application des impulsions contrairement aux cellules isolées. En effet, sur une cellule isolée le phénomène dit « resealing », de retour de l'état perméable

vers l'état imperméable, s'opère dans la minute qui suit l'électroperméabilisation à 37°C, préservant ainsi leur osmolarité et permettant leur survie. Il apparaît que dans un contexte multicellulaire, le resealing n'a pas lieu assez rapidement pour permettre la survie cellulaire, car il peut permettre l'entrée d'ions comme le calcium, létal pour la cellule en forte concentration, ou la sortie d'ATP indispensable aux mécanismes cellulaires. Ce non-retour de l'état perméable peut être engendré par les contacts membranaires entre les cellules (au niveau membranaire ou protéique via la matrice extra-cellulaire). Alors que les champs électriques forceraient les mouvements des phospholipides et provoqueraient la perméabilisation (Escoffre *et al.*, 2007; Tarek, 2005), leur mobilité passive nécessaire au retour à l'état stable initial, sans aucune force extérieure sur leur charge, serait bloquée par les interactions avec les cellules voisines. Ces observations montrent des phénomènes inhérents à la structuration en tissus qui, bien que peu visibles *in vivo*, ont pu être étudiés *ex vivo* grâce au modèle sphéroïde. Une étude cinétique de la perméabilisation membranaire dans la demi-heure suivant l'application des champs électriques et au-delà permettrait de confirmer que l'état imperméable n'est jamais retrouvé.

Cependant, la condition de 500V/cm reste la plus favorable à la transfection. C'est pourquoi nous avons conservé cette valeur au cours de l'étape d'optimisation. Les tentatives d'optimisation se sont orientées tout d'abord vers l'utilisation de champs bipolaires. L'utilisation des deux polarités a augmenté l'effet létal du champ étant donné que dans ces conditions, bien que toutes les cellules de la surface du sphéroïde soient en contact avec l'ADN, aucune ne parvient à survivre pour exprimer la GFP 24 heures après l'application du champ. La diminution du nombre d'impulsions a permis d'augmenter le taux de transfection. Des cas de fusions membranaires ont été visualisés dans ces conditions 24h après l'application des impulsions sur des cellules exprimant le transgène. La fusion est un mécanisme apparaissant *in vivo* sur certains types cellulaires dans le cas d'application de champ électrique (Mekid et Mir, 2000). Ces observations de fusion corroborent l'hypothèse d'une déstabilisation supplémentaire des membranes plasmiques en contact avec des cellules voisines, et l'impact sur la viabilité discuté précédemment.

De nombreux paramètres restent à explorer en ce qui concerne l'optimisation. i) Tout d'abord, au regard des essais effectués, bien que l'utilisation de champ bipolaire soit délétère avec 10 impulsions de 5 ms, il peut s'avérer que ce soit une bonne solution en appliquant moins d'impulsions. D'autres types d'impulsions pourraient aussi être appliquées, comme l'alternance entre fort et faible voltage (Hojman *et al.*, 2007; Orio *et al.*, 2012). ii) Il sera aussi

nécessaire de diminuer la quantité d'ADN car lors de l'utilisation de nombre plus faible d'impulsions (de 4 à 8) sa cytotoxicité est mise en cause dans la perméabilité irréversible et la mortalité (Li *et al.*, 1999). L'utilisation de plasmide réduit aux seules séquences permettant son expression (mini-circle) est aussi envisageable, car cela favorise le passage de l'ADN vers les couches internes de cellules et son internalisation (Chabot *et al.*, 2013). iv) Après avoir caractérisé les protéines de la matrice extracellulaire (Collagène, fibronectine, intégrines), la déstabilisation enzymatique (Cemazar *et al.*, 2012; Goodman *et al.*, 2007) de cette dernière peut être une autre piste d'étude. Bien que difficilement applicable *in vivo*, ces travaux permettraient une meilleure compréhension du mécanisme de perméabilisation en trois dimensions et du passage de l'ADN entre les cellules (Henshaw *et al.*, 2007). v) Finalement, la détermination des paramètres optimum doit être effectuée sur plusieurs lignées cellulaires afin de savoir si des paramètres universels sont applicables, et si non, de pouvoir caractériser les paramètres selon le type de tumeur visé. Des sphéroïdes ont été réalisés au laboratoire à partir de différentes lignées cellulaires : LPB (fibrosarcome murin), B16 (mélanome murin) et TSA (carcinome mammaire murin) en plus des cellules HCT116. Des études récentes ont été appliquées à des sphéroïdes de mélanomes (Marrero et Heller, 2012).

Au-delà des conditions expérimentales, l'étude de sphéroïdes plus complexes peut aussi permettre une optimisation en travaillant sur un modèle encore plus proche de la réalité biologique. En effet, l'évolution du modèle sphéroïde s'oriente vers la conception d'un modèle aux caractéristiques tumorales augmentées. Divers axes sont ainsi explorés : la co-culture de plusieurs types cellulaires pouvant permettre de reproduire le microenvironnement tumoral ou la présence du système immunitaire (Griffiths *et al.*, 2000; Guet *et al.*, 2011; Kelm *et al.*, 2003; Marrero et Heller, 2012; Wang *et al.*, 2005) ; la culture de sphéroïdes géants permettant une étude de l'effet sur tumeur de 1 cm (Marrero *et al.*, 2009), qui pourrait permettre d'étudier en amont de nouvelles géométries d'électrodes (Guo *et al.*, 2011) ; et finalement l'ultime développement consistant à produire un sphéroïde vascularisé (Correa de Sampaio *et al.*, 2012; Laib *et al.*, 2009; Wartenberg *et al.*, 2001). L'angiogenèse étant une étape clef de la formation tumorale, un modèle pouvant la représenter fidèlement permettrait d'importantes évolutions au niveau de la compréhension du phénomène, et l'émergence de traitements orientés contre ce phénomène. D'autre part, d'importants travaux de modélisation sur structures multicellulaires sont également en développement, permettant ainsi de pouvoir effectuer une étude en amont et d'obtenir une prévision des résultats (Corovic *et al.*, 2013; Marjanovic *et al.*, 2010b; Shirinifard *et al.*, 2009).

Finalement, d'autres techniques d'analyses peuvent être employées afin d'obtenir des informations sur les comportements des cellules au cœur du sphéroïde. Bien sûr, des cryo-coupes peuvent donner accès aux couches internes de cellules (Gibot *et al.*, 2013), mais des techniques d'imagerie telles que la microscopie bi-photonique ou la feuille de lumière (Bruns *et al.*, 2012) permettent l'étude sur sphéroïdes en conditions natives.

L'ensemble de ces travaux a donc permis de valider ce modèle et donc d'envisager des études mécanistiques poussées et ainsi la compréhension du système permettant l'expression de gène *in vivo* lors de la thérapie génique. L'optimisation fine de la technique avant l'utilisation du petit animal est donc rendue possible.

Chapitre 2 : Etude des effets de l'électroperméabilisation par AFM

Les travaux présentés dans ce chapitre ont pour objectif l'étude du phénomène d'électroperméabilisation à l'échelle de la cellule unique. Pour atteindre cet objectif nous avons choisi de réaliser une étude par microscopie à force atomique (AFM).

La perméabilisation membranaire induite par l'application d'impulsions électriques a principalement été étudiée par microscopie optique de façon indirecte par l'entrée de petites molécules (Paganin-Gioanni *et al.*, 2011; Rols et Teissié, 1990; Silve *et al.*, 2011). L'évolution de l'AFM vers l'étude du vivant a conduit à une technologie potentiellement utilisable pour réaliser des mesures directes de la perméabilisation sur cellules vivantes en conditions physiologiques. Cette technologie devait pouvoir fournir des données quantitatives du phénomène en imageant la membrane plasmique et en mesurant son élasticité au plus près, c'est à dire directement sur la membrane cellulaire. L'adaptation de la technique à l'étude de l'électroperméabilisation s'est révélée délicate, mais a permis de mettre en évidence des effets jusqu'alors inexplorés à l'interface entre la cellule et son environnement.

Ce chapitre se décompose en trois parties. Une introduction décrira le contexte et le fonctionnement de l'AFM ainsi que son utilisation pour la biologie. Seront ensuite présentées l'étude de l'élasticité membranaire suite à sa perméabilisation, et finalement l'implication du cytosquelette dans ce phénomène.

I. Introduction

A. Les effets membranaires de l'électroperméabilisation : tour d'horizon

La question des effets membranaires au niveau structural et moléculaire reste encore à ce jour ouverte. En effet peu d'études permettent d'évaluer l'impact de l'électroperméabilisation directement sur la membrane des cellules.

Différents modèles ont été utilisés, le plus simple étant la bicouche phospholipidique, qui a permis la mise en évidence de la rupture de ces bicouches au-delà de valeurs seuils de champs électriques (Kramar *et al.*, 2012), et ainsi la déstabilisation de la structure lipidique. De la même façon, des études par RMN ont mis en évidence le déplacement des têtes polaires des phospholipides sous l'influence des impulsions électriques (Lopez *et al.*, 1988; Stulen, 1981). Cependant l'imagerie de ces modèles reste difficile, et ils sont relativement éloignés de

la membrane plasmique. C'est pourquoi un modèle membranaire plus complexe, des vésicules lipidiques, a été mis en place, sur lequel des observations directes pendant l'application des champs électriques ont pu être réalisées. Ces vésicules unilamellaires géantes se rapprochent de la membrane plasmique dans le sens où elles forment un compartiment circulaire d'une taille similaire à la cellule (dizaine de microns de diamètre), mais restent une bicouche simple, sans interaction avec des composants internes ou externes. Sur ces vésicules ont été montrées : la formation de pores (Tekle *et al.*, 2001), une électrodéformation (Riske et Dimova, 2006), ou encore la formation de tubules, ou de vésicules pendant les impulsions électriques (Portet *et al.*, 2009). L'application d'impulsions électriques sur la bicouche de la vésicule provoque donc une réorganisation lipidique. Ces changements de structuration des vésicules amènent la preuve directe d'un impact sur la bicouche phospholipidique, et confirment les études sur bicouches simples, sans toutefois qu'ils aient jamais pu être observés sur cellule. Encore une fois, la simplicité du modèle, confrontée à la complexité de la membrane plasmique, rendent difficile l'extrapolation des résultats obtenus et la corrélation directe des mécanismes se déroulant sur vésicule à ceux du vivant.

La plus simple observation de perméabilisation de la membrane plasmique a été réalisée par la mesure du passage de molécules à travers la membrane (Gabriel et Teissié, 1997; Kinoshita et Tsong, 1977). Néanmoins ces observations ne renseignent pas directement sur les événements membranaires mais sur leur résultat macroscopique : la perméabilisation. Les études les plus directes et résolutes de déstabilisation lipidique sont le flip-flop des phospholipides (thèse J-M Escoffre, 2010), la formation de « blebs » (Gass et Chernomordik, 1990; Rassokhin et Pakhomov, 2012) impliquant une restructuration membranaire, ou encore la fusion provoquée par la disparition des forces de répulsion et d'hydratation à la surface de la membrane (Finaz *et al.*, 1984; Teissie et Rols, 1986). Des études par microscopie électronique sur cellules fixées ont montré la formation de microvillis et de filipodes dans les minutes après l'application d'impulsions (Escande-Géraud *et al.*, 1988), ou la formation de « pores » qui s'est révélée être un artefact lié aux conditions osmotiques (Chang et Reese, 1990) et n'a jamais pu être mise en évidence par la suite. De plus, des événements membranaires sur le long terme ont été observés plusieurs heures après l'application des champs électriques sous la forme de macropynocytose (Rols *et al.*, 1995). Le mécanisme de déstabilisation lipidique reste encore à décrire, et les informations pouvant être amenée par les nouvelles techniques d'imagerie ou de mesure seront peut être celles permettant de faire le lien entre les différents phénomènes énoncés précédemment.

Avant ces travaux de thèse, un seul article s'est intéressé à l'étude de l'électroporabilisation par AFM (Chernysh *et al.*, 2009). Cet article décrit l'imagerie avant et après électroporation d'érythrocytes séchées ou fixées au glutaraldéhyde. L'imagerie de leur membrane réalisée sur des zones de $1 \mu\text{m}^2$ montre une variation de la période des surfaces de second ordre sur erythrocytes électroporabilisées dans des conditions électriques de 1700 V/cm et des impulsions de 9 ms. Les conditions électriques et le modèle cellulaire utilisés restent relativement éloignés de ceux utilisés en ECT (aux alentours de 1000 V/cm mais des impulsions de quelques centaines de microsecondes) ou pour l'étude de l'électrotransfert de gène (500 V/cm en moyenne pour une durée de 5 ms). Une étude plus approfondie sur un modèle cellulaire adapté et vivant en utilisant des conditions électriques pertinentes était nécessaire afin de révéler pleinement les potentialités offertes par l'AFM.

B. La microscopie à force atomique

La microscopie à force atomique (AFM) a vu le jour en 1985, mise au point par G Binnig, C.F Quate et CH. Gerber (Binnig *et al.*, 1986). L'AFM est un microscope aveugle. Comme le braille permet aux aveugles de lire, l'AFM repose sur le même principe, non plus regarder grâce à la lumière, mais obtenir une image de surface en trois dimensions grâce au toucher (Figure 24).

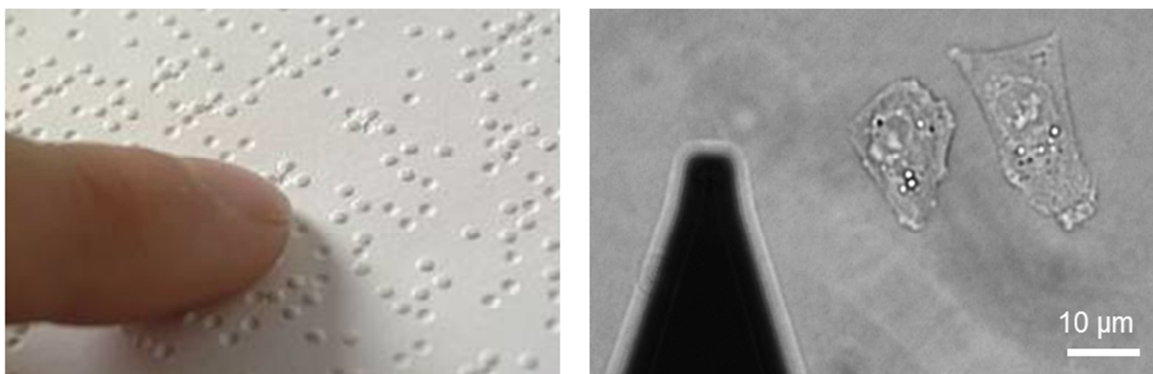


Figure 24 : L'AFM s'apparente au braille, un microscope aveugle capable de toucher l'échantillon pour en déterminer sa surface. Adapté de www.blog.3suisses.fr

On obtient donc pas une image au sens propre du terme mais une convolution de l'interface de l'échantillon. Cette représentation 3D est obtenue grâce à une nano-pointe, dont la position verticale s'ajuste en permanence pour appliquer sur l'échantillon une force constante lors du déplacement (balayage). En plus de l'imagerie 3D, la possibilité d'appliquer une force sur l'échantillon (de réellement le toucher) permet l'acquisition de données biophysiques, et donne à l'AFM une dimension supplémentaire, en le positionnant non

seulement comme un microscope, mais aussi comme un appareil de mesure de forces. Des informations d'élasticité et d'interaction entre la pointe et des molécules de surface peuvent être mesurées. Par exemple, si la pointe est fonctionnalisée avec un anticorps, d'une part les caractéristiques de l'interaction peuvent être obtenues (force d'adhésion, distance de rupture, déplieement moléculaire...), d'autre part, une cartographie de ces interactions à la surface, par exemple d'une cellule, peut être dessinée. La diversité des approches permises par l'AFM en fait une technologie de choix pour les études biophysiques et mécanistiques du vivant, en le plaçant comme complémentaire des techniques d'imageries du vivant plus classiques que sont la microscopie à fluorescence et la microscopie électronique. Cette introduction présente les bases du fonctionnement de l'AFM, ainsi que les applications qui en découlent.

1. Fonctionnement

L'AFM est un microscope à sonde locale, dérivé du Scanning Tunneling Microscope (Binnig *et al.*, 1986, 1982). L'AFM a ouvert la voie de l'utilisation de ce type de microscopie à tout type d'échantillon. La microscopie à force atomique repose sur des mesures de forces interatomiques et elle s'applique à toute sorte de matériaux, conducteurs ou non, et fonctionne aussi bien dans l'air qu'en milieu liquide.

La sonde est représentée par une pointe de quelques micromètres de long et seulement quelques nanomètres de large à son extrémité qui est approchée de l'échantillon. Cette pointe est fixée à l'extrémité d'un levier souple. Un faisceau laser se reflète sur le levier et est réfléchi sur une photodiode. Les déplacements de la pointe à l'approche de l'échantillon affectent la courbure du levier, et donc le faisceau laser se déplace sur la photodiode. Il est ainsi être possible de mesurer les déplacements verticaux de la pointe en suivant les déplacements du laser sur la photodiode (Figure 25).

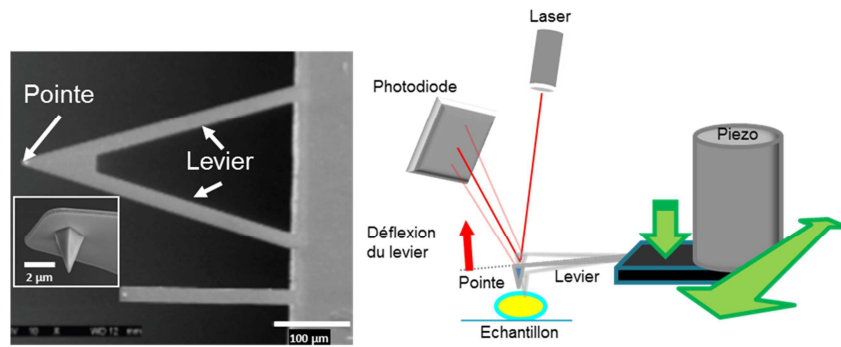


Figure 25 : à gauche : une pointe et un levier (MEB). A droite : illustration du fonctionnement d'un AFM

Grâce à une calibration du levier consistant à mesurer sa sensibilité en m/V (déformation sur le verre) et sa constante de raideur (méthode du bruit thermique (Hutter et Bechhoefer, 1993)) en N/m , il est possible de traduire directement les déplacements du laser sur la photodiode en distance et en force (Emerson et Camesano, 2006). Cette calibration permet d'établir l'image de hauteur de l'échantillon (en nm) et de contrôler la force appliquée (en nN) sur l'échantillon pendant le balayage. Elle est aussi utile pour l'analyse des courbes de force en fonction de la distance entre la pointe et l'échantillon.

L'interaction entre la pointe et l'échantillon est soumise aux diverses forces présentes dans la gamme de sensibilité et l'ordre de grandeur qui concerne l'AFM (nanonewton et nanomètre). Les principales forces d'interaction entre la pointe et l'échantillon sont des forces répulsives et attractives à très courte portée, les forces de Van der Waals, qui peuvent affecter le déplacement du levier à l'approche de l'échantillon et lors du retrait de manière non spécifique.

Nous distinguerons deux types d'utilisations : celles dites d'imagerie, qui consistent à obtenir la topographie de surface de l'échantillon, et celles de spectroscopie de force, qui consistent à mesurer les paramètres nano-mécaniques de l'échantillon.

a. *Imagerie*

L'imagerie par AFM consiste à balayer l'échantillon avec la pointe. Nous discuterons ici seulement les modes « contact » et « tapping », qui sont appliqués au vivant. Les modes d'imagerie sont relativement lents comparés à la microscopie de fluorescence par exemple, et nécessitent pour imager une cellule mammifère un temps d'acquisition de l'ordre de la demi-heure. En mode dit « contact », la pointe est approchée de l'échantillon et le balaye en maintenant la force d'interaction constante (Le Grimmelc *et al.*, 1998). Cela donne accès à

une topographie iso-force de l'échantillon. Le système détecte les déplacements du levier, et corrige sa position selon les variations de hauteur de l'échantillon en conservant la force d'appui constante. Les variations de hauteur sont ainsi traduites par le mouvement du levier (Figure 26) (El-Kirat-Chatel et Dufrêne, 2012).

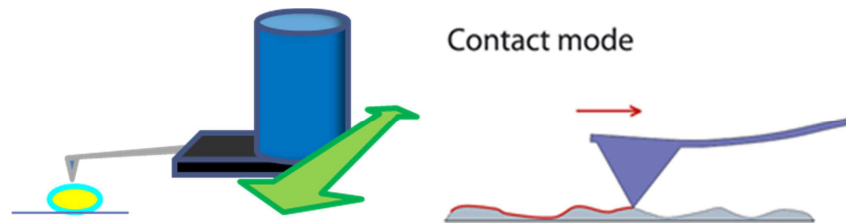


Figure 26 : Illustration du mode contact d'imagerie. La pointe scanne la surface de l'échantillon selon un axe x-y à force constante. Adapté de www.jpk.com

Dans le cas d'échantillons mous ou peu immobilisés qui ne résistent pas à la force de cisaillement exercée par la pointe, ou dans le cas où l'on souhaite obtenir une image à une haute résolution (de l'ordre du nanomètre), le mode « tapping », ou contact intermittent peut être utilisé (Möller *et al.*, 1999). Dans ce mode le levier oscille à sa fréquence de résonance grâce à une impulsion électrique avec une amplitude donnée (environ 20 nm). La pointe est donc repoussée par les forces répulsives à l'approche de l'échantillon lors de la phase la plus basse de l'oscillation. Ce mode limite ainsi les forces latérales, et l'amplitude qui reste identique permet de détecter la hauteur de l'échantillon point par point (Figure 27) (pour exemple Espenel *et al.*, 2008).

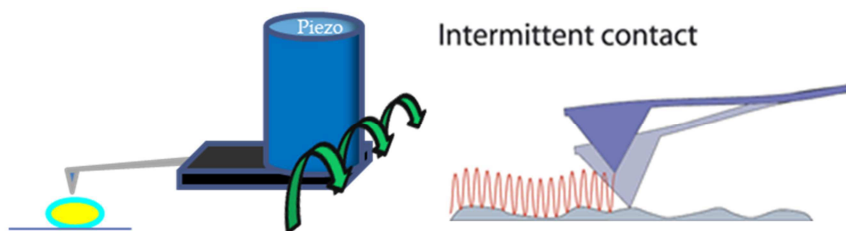


Figure 27 : Illustration du mode intermittent d'imagerie. Le levier oscille à sa fréquence de résonance en scannant l'échantillon selon un axe x-y. Adapté de www.jpk.com

b. Spectroscopie de force

La spectroscopie de force consiste à appliquer une force à l'échantillon, par l'intermédiaire de la pointe qui indente alors dans l'échantillon (si celui-ci est mou). Le mouvement appliqué à la pointe est un mouvement d'aller et retour sur un même point grâce à

la céramique piezo-électrique, qui permet de mesurer à l'aller l'élasticité de l'échantillon, au retour les éventuelles forces d'interactions (Figure 28).

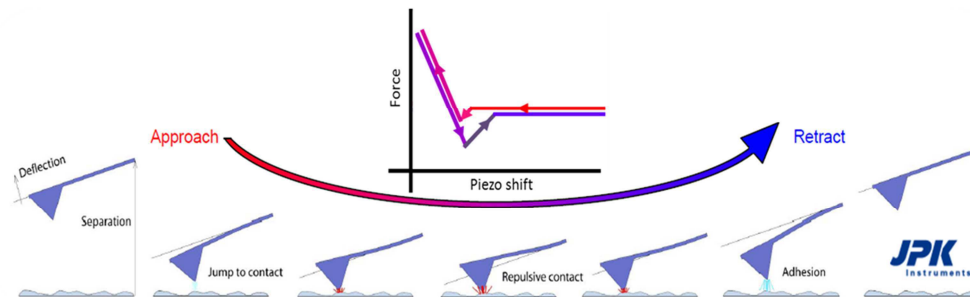


Figure 28 : Illustration du mode spectroscopie de force. Une pression est appliquée au levier, qui entre en contact avec l'échantillon et produit une courbe de force-distance. Adapté de www.jpk.com

Le résultat obtenu est appelé « courbe de force » qui est composé de deux courbes, celle d'approche, celle de retrait. Ces courbes traduisent i) à l'aller la force, résultant de la résistance de l'échantillon lors de l'appui de la pointe, en fonction de la distance z parcourue par la pointe, et ii) au retour l'adhésion liée à l'interaction éventuelle de la pointe et de l'échantillon (Heinz et Hoh, 1999). Une hystérèse est observée entre la courbe d'approche et celle de retrait liée à une différence de réponse de l'échantillon entre les deux phases de la mesure. On définit le point de contact entre la pointe et l'échantillon à partir du moment où la pointe indente dans l'échantillon (Figure 29).

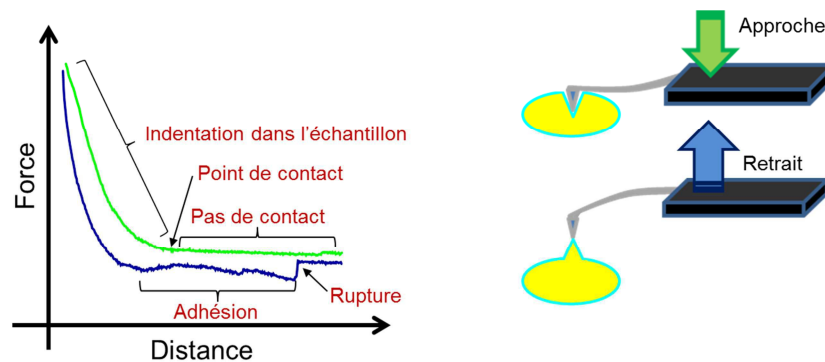


Figure 29 : Illustration du mode spectroscopie de force. Courbe d'approche en vert et de retrait en bleue. Description des différentes parties et évènements reconnaissables sur les courbes.

Sur la courbe d'approche, il est possible de mesurer l'élasticité de l'échantillon grâce à la résistance de l'échantillon à la pression de la pointe qui induit une courbure du levier (Kasas et Dietler, 2008; Kuznetsova *et al.*, 2007). Plus l'échantillon est mou, plus la force augmente lentement en fonction de la distance (Figure 30).

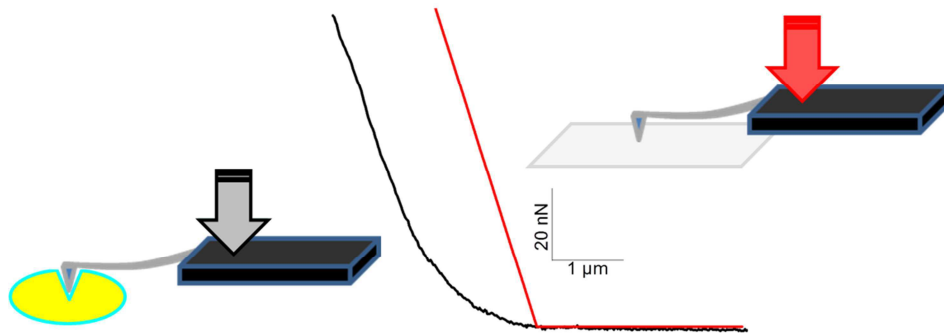


Figure 30 : Comparaison de l'élasticité d'une lame de verre dure (rouge) à celle d'une cellule molle (noir).

Sur le retour, une interaction peut se faire entre la pointe et une molécule (Figure 31-2) (Cao et Li, 2011; Franz *et al.*, 2007). Ces interactions sont liées à des interactions hydrophobes, électrostatiques ou covalentes et sont assimilées à une adhésion. Elle induit une courbure du levier lors du retrait qui se traduit par une variation de force (Figure 31-6), jusqu'à la rupture de l'interaction et le retour à la ligne de base (Figure 31-7).

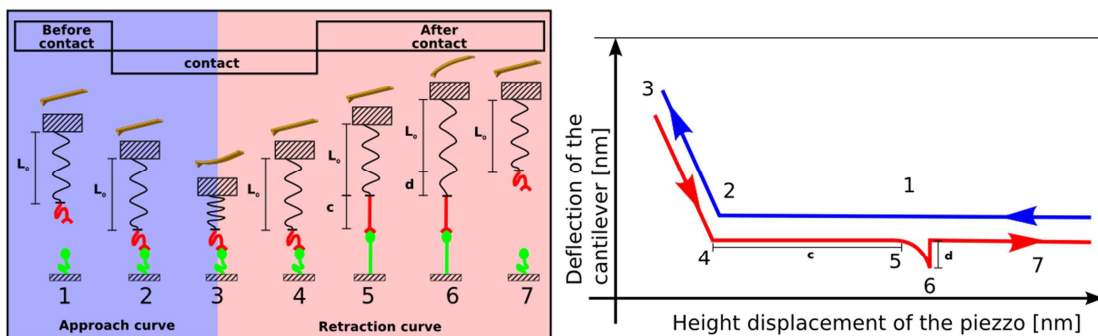


Figure 31 : A gauche : illustration du phénomène d'adhésion entre une pointe fonctionnalisée par une molécule (rouge) et une molécule échantillon (vert). La pointe est représentée comme un ressort en noir. A droite : courbe de force correspondante. Au retrait (courbe rouge), la force d'adhésion est visible au point 6 qui affecte la courbure du levier. Adapté de www.freesbi.ch

La réalisation de courbes de force peut se faire en un point de l'échantillon ou suivant une matrice, ce qui permet de repérer spatialement les propriétés mesurées (Figure 32). Il est ainsi possible d'obtenir des cartes où chaque pixel représente une courbe de force, qui après analyse représente l'élasticité ou les interactions (Radmacher *et al.*, 1994). Ceci représente un mode particulier appelé « Force Volume », pour lequel non seulement les données de spectroscopie de force peuvent être obtenues sur une zone donnée (ou la totalité de notre échantillon) mais aussi la hauteur de notre échantillon, amenant alors à une imagerie indirecte de la surface de notre échantillon en détectant le point de contact entre la pointe et

l'échantillon. L'acquisition de ces « Force Volume » est limitée en résolution numérique (64px²) et en vitesse.

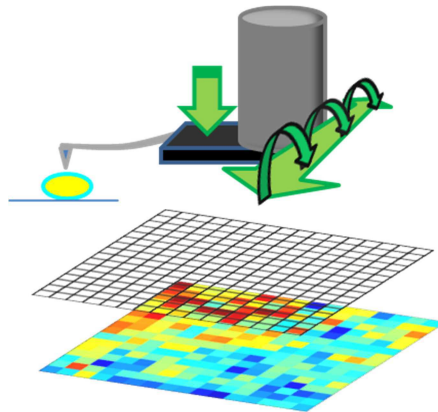


Figure 32 : Illustration du mode « Force Volume » qui consiste à réaliser des courbes de force en suivant une matrice et mène à la réalisation de cartes des données nano-mécaniques de l'échantillon sur une surface donnée (élasticité ou adhésion).

c. *«Imaging living cells surface et quantifying its properties at high resolution using AFM in QI™ mode»*, article accepté dans le journal *Micron* en 2013 .

Les développements logiciels relatifs aux modes d'acquisition permettent aujourd'hui de réaliser des acquisitions de type « Force Volume » rapides, permettant ainsi d'augmenter la résolution tout en ayant des temps d'acquisition raisonnables vis-à-vis de la dynamique du vivant. C'est le cas du mode Quantitative Imaging de JPK, qui dans le cadre de notre étude nous a permis d'acquérir des images haute résolution des cellules CHO vivantes, qui ne résistaient pas à l'utilisation du mode contact ou intermittent. L'utilisation de ce mode et la mise en évidence de sa polyvalence ont fait l'objet d'une publication.



Imaging living cells surface and quantifying its properties at high resolution using AFM in QITM mode

L. Chopinet^{a,b,c,1}, C. Formosa^{a,c,d,e,1}, M.P. Rols^{b,c}, R.E. Duval^{e,f,g}, E. Dague^{a,c,d,*}

^a Centre National de la Recherche Scientifique, Laboratoire d'Analyse et d'Architecture des Systèmes (LAAS), Toulouse, France

^b Centre National de la Recherche Scientifique, Institut de Pharmacologie et de Biologie Structurale, Toulouse, France

^c Université de Toulouse, Toulouse, France

^d Institut des Technologies Avancées en Sciences du Vivant, Toulouse, France

^e CNRS, SRSMC (Structure et Réactivité des Systèmes Moléculaires Complexes), UMR 7565, Nancy, France

^f Université de Lorraine, SRSMC, UMR 7565, Faculté de Pharmacie, Nancy, France

^g ABC PlatformR, Nancy, France

ARTICLE INFO

Article history:

Received 13 December 2012

Received in revised form 6 February 2013

Accepted 7 February 2013

Keywords:

Atomic force microscopy

Quantitative imaging

Microorganisms

Eukaryotic cells

Imaging

Nanomechanical properties

ABSTRACT

Since the last 10 years, AFM has become a powerful tool to study biological samples. However, the classical modes offered (imaging or tapping mode) often damage sample that are too soft or loosely immobilized. If imaging and mechanical properties are required, it requests long recording time as two different experiments must be conducted independently. In this study we compare the new QITM mode against contact imaging mode and force volume mode, and we point out its benefit in the new challenges in biology on six different models: *Escherichia coli*, *Candida albicans*, *Aspergillus fumigatus*, Chinese hamster ovary cells and their isolated nuclei, and human colorectal tumor cells.

© 2013 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Since 25 years, Atomic Force Microscopy has emerged as a valuable tool in biology, to study the morphology of living cells, their surface roughness, and their nanomechanical properties (elasticity through Young modulus (YM) values, Single molecule force spectroscopy) (Müller and Dufre, 2011). Technological improvements were required to make this jump from physics to biology.

Classically, AFM provides two imaging modes to probe biological sample known as contact mode and tapping mode. In contact mode, the AFM tip raster scans over the sample to obtain high resolution images of sample surface in terms of height, the sample topography being measured by detecting changes in the deflection of the tip as a function of position on the surface (Liu and Wang, 2010). However, when applied to deformable soft samples, the resulting topographic images are poorly correlated with the variations in height across the sample since the AFM tip deforms

the surface during the raster scan. As a second imaging mode, tapping mode allows to image soft sample and with a very good resolution (Milhiet et al., 2011). In this mode, very stiff cantilever is used, and is oscillating near its resonance frequency during the scan, without being in contact with the sample. Change in the amplitude of oscillation during raster scanning report on the surface topography. Consequently, the lateral forces between the tip and the sample can be significantly reduced, which, in principle, avoid the deformation artifacts associated with contact-mode imaging. However, in a biological system where the electrolyte concentration is high, interactions with low-range surface forces affect the vibrating tip during its trajectory. These forces can influence the oscillation amplitude; therefore the contact between the tip and the sample becomes unavoidable, leading to a deformation of the sample.

Recent developments have conducted to high speed AFM (Kodera et al., 2010) or multi-frequency force spectroscopy (Garcia and Herruzo, 2012) in order to image sample faster. Those two modes overcome the time limitation by increasing the scan rate. However no biophysical properties can be extracted from the data, since these two advanced modes functions with oscillating tips. Indeed, besides topography imaging, AFM can also be used in force spectroscopy mode to measure biophysical properties of samples (such as elasticity and molecular organization of the sample surface) (Formosa et al., 2012b; Heinisch and Dufre, 2010). A major

* Corresponding author at: Centre National de la Recherche Scientifique, Laboratoire d'Analyse et d'Architecture des Systèmes (LAAS), 7 avenue du colonel Roche, F-31400 Toulouse, France. Tel.: +33 561337841.

E-mail address: edague@laas.fr (E. Dague).

¹ These two authors contributed equally to the work.

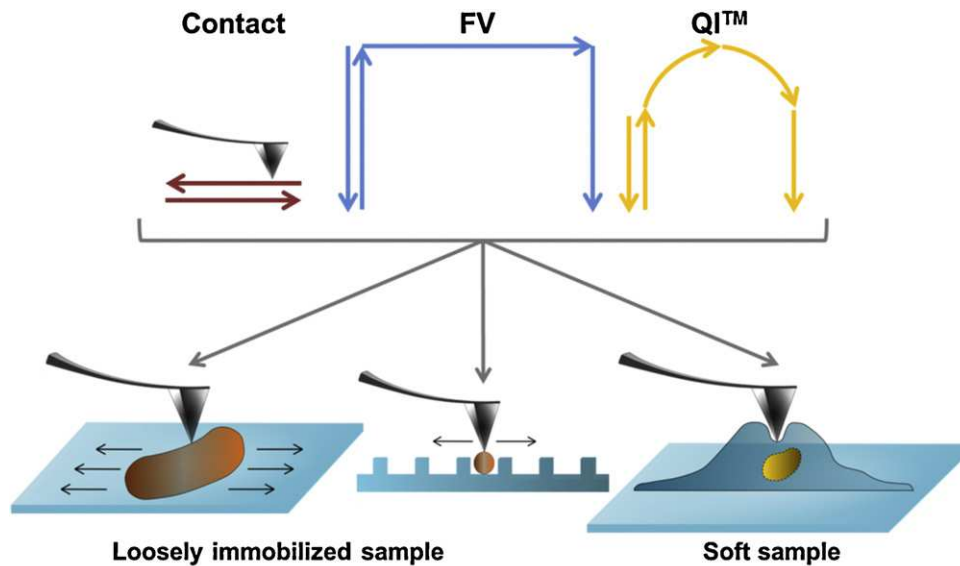


Fig. 1. Schematic outline representation. Contact, force volume (FV) and quantitative imaging™ (QI™) modes were applied to 3 different kinds of sample: loosely immobilized sample on PEI charged surface or on microstructured PDMS stamps, and soft sample.

interest of AFM is to combine imaging and force spectroscopy in order to make a link between structures and functions (Dufrene, 2004).

It was therefore needed to find a way to measure mechanical properties and image cells in liquid conditions, without altering their cell surface, or removing them from the substrate by lateral forces exerted by the scanning tip. A solution to this problem was to use a force-volume (FV) (also known as force mapping) mode. This mode, originally proposed by Radmacher et al. (1994), involves collecting a matrix of force curves across the sample surface that are individually analyzed, allowing spatial reconstruction of topographic maps. This avoids the problem of lateral forces associated with contact-imaging of soft surfaces, since the tip moves from point to point across the surface, the AFM tip being completely detached from the surface before moving to the next point. A particular interest of this mode is the possibility to extract the zero-force contact point from the fit to each force curve. From the zero-force contact points, an image that approximates the underformed (“true”) sample topography can be reconstructed. However, there is still the main problem of using a FV mode: the time needed to acquire each force curve being too long, acquiring high resolution arrays can take hours, which is a problem while working on short term effects with living cells under physiological conditions. Moreover, the FV, because of its low resolution, does not give accurately precise images (Gaboriaud et al., 2008), leading to misinterpretations of the data collected. Therefore, if imaging data and mechanical properties want to be recorded, each will ask an individual acquisition with two different modes (contact/tapping imaging and FV), requiring for more and more time.

We present in this study a new advanced mode called quantitative imaging™ (QI™, (“QITM mode-quantitative imaging with the NanoWizard 3 AFM”)), which allows acquiring high-resolution maps on challenging samples such as soft or loosely bound ones. We present a comparison of the mode with contact mode and force volume mode. In this quantitative imaging mode, force curves can be collected at the same speed and resolution as normal imaging. Thanks to the software OpenFovea developed by Kasas’ team that analyzes the elasticity as a function of the indentation (Longo et al., 2012; Roduit et al., 2012b), we overcame the data treatment problem caused by the acquisition of thousands of force curves. The

data can then be interpreted to provide information on elasticity or adhesion. This mode is based on force curve acquisition, processed quicker than a FV as the tip move laterally when retracted to be positioned above the next point measurement before approaching. The time to record a single force curve is up to $1.000 \mu\text{m/s}$, and the resolution up to 512px^2 . As one force curve is recorded for each pixel, it allows having in a single acquisition both mechanical properties and topography data of the sample. We will demonstrate in this study that imaging and measuring soft sample or loosely immobilized ones in liquid is possible.

We applied this new imaging mode on four different biological samples (Fig. 1):

- living adherent mammalian cells (Chinese hamster ovary and human colorectal tumor cells), that are very soft and thus do not withstand forces exerted by a scanning tip,
- Chinese hamster ovary cell nuclei on PDMS without any fixation or PEI coated glass slides,
- yeasts cells and *Aspergillus fumigatus* spores immobilized in PDMS micro-structured stamps with no chemical fixation and are thus loosely bound to the substrate,
- *Escherichia coli* cells, immobilized on PEI coated glass slides under physiological conditions, meaning imaged in an ionic buffer that weaken the electrostatic interactions and make the bacterial cells loosely attached to the sample.

Through these different biological models and the data acquired with QI™ mode, we show how this imaging/spectroscopy mode is of interest for the challenges in biological sample characterization, and allows imaging of unexplored types of eukaryotic and prokaryotic cells.

2. Materials and methods

2.1. Atomic force microscopy

JPK NanoWizard 3 (JPK instrument, Berlin, Germany) coupled with an axiovert microscope from Zeiss was used for most of the experiment, with contact mode, force volume or QI™ mode and

cells imaging was done using the Petri Dish Heater. catalyst AFM from Bruker (Bruker, USA), coupled with Nikon fluorescence microscope was used for contact imaging of CHO cells with the Perfusing Stage Incubator. We used MLCT cantilevers (Bruker probes) with spring constant ranging from 0.028 to 0.042 N/m for mammals cells and from 0.011 to 0.019 for yeast and bacterial samples. QI™ and force mapping settings used are the following on mammals cells: Z-length: 5 μm; applied force: 4 nN; speed: 166 μm/s for QI™ imaging for slow imaging, 1000 μm/s for fast imaging; 24.98 μm/s for force mapping. QI™ mode has been described in this technical report (“QITM mode-quantitative imaging with the NanoWizard 3 AFM”).

2.2. Bacterial sample preparation

E. coli (strain ATCC 22925; American type culture collection [ATCC]) were stocked at -80°C , revived on Mueller Hinton agar (Difco, 225250–500 g) and grown in Mueller Hinton broth (Difco, 275730–500 g) for 24 h at 35°C under static conditions. *E. coli* cells were immobilized on polyethylenimine (PEI, Fluka P3124–100 mL) coated glass slides as described previously. Briefly, freshly oxygen plasma activated glass slides were covered by a 0.2% PEI solution in deionized water and left for incubation overnight. Then glass slides were rinsed with 20 mL of Milli-Q water and nitrogen dried. Bacterial cultures were harvested by centrifugation, washed two times in Milli-Q water, and resuspended to a concentration of $\sim 10^8$ cells/mL in phosphate buffered-saline 1X (10 mM) (PBS, Sigma, P2194–10PAK). A total of 1 mL of the suspension was applied to the PEI coated glass slide, allowed to stand for 1 h and rinsed with PBS 1X. AFM images and force–distance curves were recorded in PBS 1X in quantitative imaging mode with an AFM NanoWizard III (JPK Instruments, Berlin, Germany).

2.3. Yeast sample preparation

Candida albicans (from ABC® platform, Nancy, France) were stocked at -80°C , revived on standard YPD Agar (Difco, 225250–500 g) and grown in YPD Broth (Difco, 275730–500 g) for 24 h at 30°C under static conditions. *C. albicans* cells were immobilized on microstructured PDMS stamps fabricated as described previously (Dague et al., 2011). Yeasts cultures were harvested by centrifugation, washed two times in acetate buffer (18 mM sodium acetate, 1 mM MnCl_2 , 1 mM CaCl_2), and resuspended to a concentration of $\sim 10^8$ cells/mL in acetate buffer. A total of 100 μL of the suspension was deposited on the PDMS stamps by convective/capillary assembly. AFM images and force–distance curves were recorded in acetate buffer in quantitative imaging mode with an AFM Nanowizard III (JPK Instruments, Berlin, Germany).

2.4. Mammalian cell sample preparation

Chinese Hamster Ovary cells (wild type Toronto from ATCC) were grown in Minimum Eagle's Medium (MEM) supplemented with 8% fetal calf serum (Gibco), 1% penicillin ($100 \mu\text{mL}^{-1}$) (Gibco) and 1% streptomycin (100mg mL^{-1}) (Sigma), and incubated at 37°C in humidified atmosphere with a 5% CO_2 incubator. Human Colorectal Tumor cells from ATCC, were grown in Dubelco modified Eagle's medium (DMEM; Gibco) without pyruvate supplemented with 8% fetal calf serum and 1% same antibiotics mixture as CHO cells. 75,000 cells for each type were grown in Petri dish during 24 h before measurement, and classical medium was replaced by MEM-HEPES medium (CM1MEM46–6U, Eurobio) supplemented with 8% fetal calf serum and cells were placed in the PetriDishHeater (JPK instrument, Berlin Germany) that maintained 37°C during all the experiment. For experiment on catalyst (Bruker,

USA), classical medium was used and 5% CO_2 gas was exposed through the perfusing stage incubator.

2.5. Nucleus extraction

All the extraction process was run at 4°C . 1 mL extraction buffer (15 mM Tris–HCl, pH 7.5, 0.15 M NaCl, 5 mM MgCl_2 , 10 mM CaCl_2 , 0.1% Tween 20, and a mixture of protease inhibitors (Roche Applied Science), 1 mM AEBSF (Euromedex 50985), 0.5% NP10) was added to -80°C frozen culot of cells previously harvested and centrifuged in PBS (10 min 4°C $500 \times g$). Cells were resuspended and homogenized gently by pipette 15 times. Then 3×15 s with 5 min between each at minimal speed of Thurnax T25 basic homogenizer were applied, and fractions were centrifuged 10 min at $800 \times g$, washed in PBS and centrifuged 3 min at $500 \times g$ to obtain 70% extracted nuclei.

2.6. Data analysis

JPK data processing (JPK Instrument, Berlin, Germany) software was used for image processing. Images are flattened (order 1). OpenFovea 0.1a152 software was used for force curve analysis with the following settings: Model: cone; tip size: 0.62 rad; Poisson ratio: 0.5; method: raw: $F = ((2E \tan \alpha) / (\pi(1 - \nu^2))) \delta^2$. This Hertz model gives the force F as a function of the indentation (δ) and of the Young modulus (E). The opening angle (α) of this sort of tip is 35° and we arbitrary choose a Poisson ratio (ν) of 0.5. Size of indentation segment where Hertz fit was done is specified in figure legend.

3. Results

3.1. Imaging

3.1.1. Loosely immobilized micro-organisms and organelle

E. coli and *C. albicans* cells were scanned, both in contact mode and QI™ mode (Fig. 2a–d) under physiological conditions.

E. coli, a gram-negative bacterium, is the model bacteria. Moreover it is the bacteria the most frequently found in nosocomial infections (23%) and should therefore be highly investigated by AFM in order to explore therapeutic targets at the nanoscale (Formosa et al., 2012a). Nevertheless, few AFM studies are dedicated to *E. coli* (Abu-Lail and Camesano, 2006; Cerf et al., 2009, 2008; Fantner et al., 2010; “Quantitative imaging of living biological samples by PeakForce QNM atomic force microscopy”), because of immobilization difficulties. The classical method using electrostatic interactions works poorly with this weakly negatively charged (De Kerchove and Elimelech, 2005) bacterium. The electrostatic interactions between the cell and the polycationic surface are not strong enough to immobilize the cell. When imaged in contact mode, we can see in Fig. 2a that the bacteria do not withstand the lateral forces exerted by the scanning tip, and are removed from the surface, even with the lowest applied force (0.5 nN). Any images of this microorganism are therefore impossible to record. Recent works by Longo et al. (2012) present nanoindentation images of *E. coli* cells. This is also a way to image this bacterial species, however, the lateral resolution shown by the authors is of 32px^2 , which is very low and does not allow a detailed observation of the bacterial cell wall. Here, we show height image (Fig. 2b) of *E. coli* cells, at a resolution of 256px^2 . Its dimensions can therefore be precisely determined since the height image obtained was calculated from the point of contact on each force curve recorded.

Candida albicans is also a dangerous microorganism. It is responsible for nosocomial infections, and causes a range of conditions including painful superficial infections, severe surface infections, and life-threatening blood-stream infections (Sudbery et al., 2004).

It is therefore a need to be able to image this yeast, in order to study its morphology, or the effects of antifungal molecules on its cell wall. Teams are already working on round cells of *C. albicans* with atomic force microscopy using porous membrane to trap them (Alsteens et al., 2008; Beussart et al., 2012). But this technique causes mechanical stress on the cells. Here, we chose to refine a recent immobilizing method based on microstructured PDMS stamps (Dague et al., 2011). PDMS is a biocompatible polymer that does not affect the viability or the morphology of the yeasts cells. For these cells, we also used contact mode; as we can see on Fig. 2c, the beginning of the cell can be scanned, but very soon the scanning tip removes the cell from its hole, even with a very low applied force, as for *E. coli* samples. In QI™ mode, however, high

resolution “zero-force” height image of the entire cells can be obtained (Fig. 2d).

As a last example of non-immobilized sample, we took isolated mammalian cell nuclei. Nucleus is one of the most important organelle of the mammalian cells as it contains genetic information. AFM on nuclei or other organelles studies are using flattened nuclear envelope on glass slide (Oberleithner et al., 1994), dried sample (Layton and Boyd, 2011) or only elasticity measurement through plasma membrane (McKee et al., 2011). As for bacteria and yeast, imaging isolated whole nucleus required its immobilization. We can see that contact image deformed nucleus, even if immobilized thanks to positive charge interaction on PEI glass slide with negative charge of nucleus envelope (Fig. 2e) (Layton and

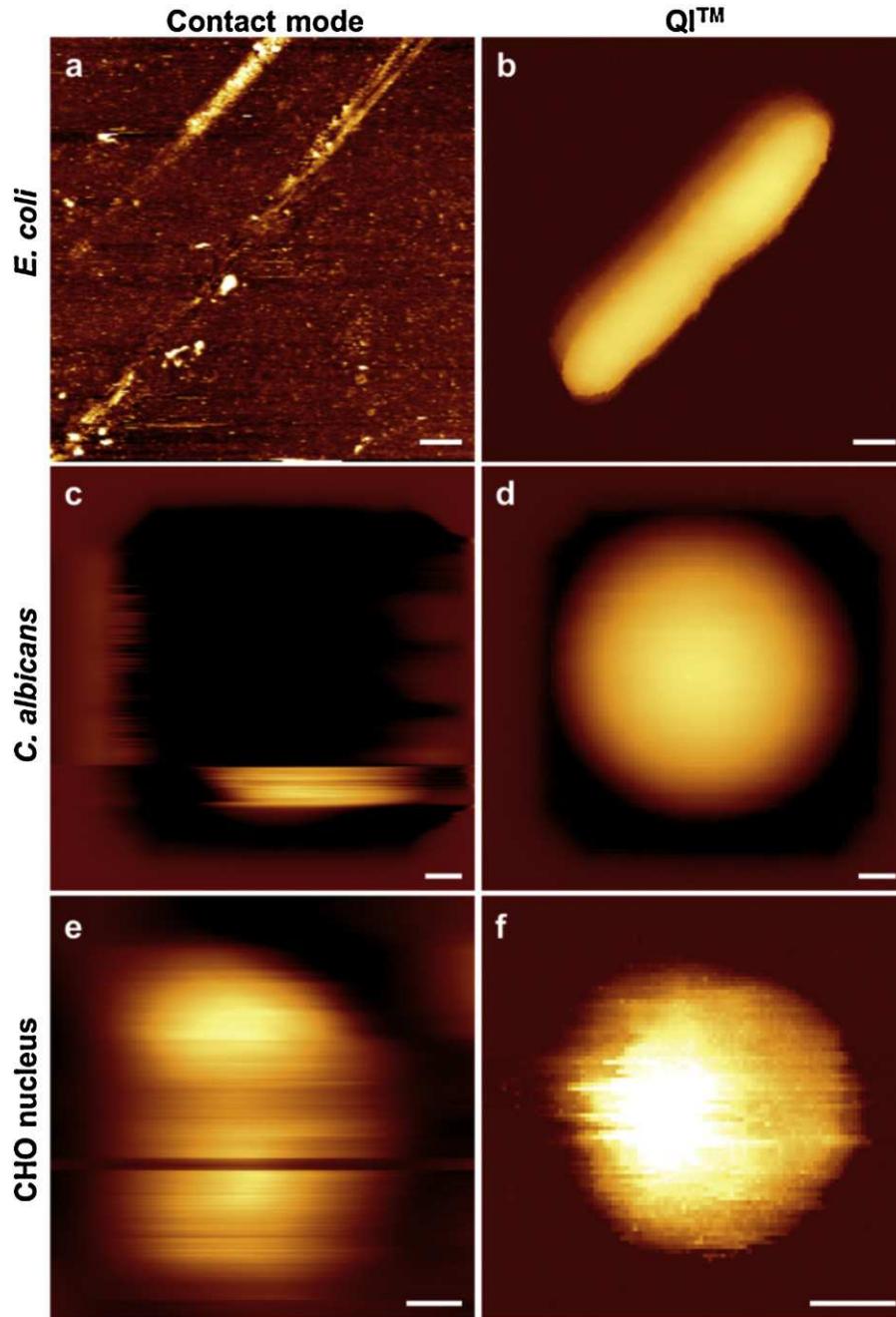


Fig. 2. Imaging of loosely immobilized samples. Contact height image (resolution: 512 lines) of (a) an *E. coli* cell (z -range = 1.2 μm), (c) a *C. albicans* cell (z -range = 2 μm) and (e) of a CHO nucleus (z -range = 1.8 μm). QI™ height image (256 px²) of (b) a *E. coli* cell (z -range = 20 nm), (d) a *C. albicans* cell (z -range = 2 μm) and (f) a CHO nucleus (z -range = 2 μm). The QI™ height images correspond to the contact height images. Scale bar a–d: 0.5 μm ; e and f: 2 μm .

Boyd, 2011). With QITM mode, imaging of nucleus can be achieved when nucleus is on PDMS without any electrostatic immobilization (Fig. 2f). Thanks to the non-destructive interaction between tip and sample, direct mechanical measurements in correlation with image acquisition can now be achieved on cells organelles.

3.1.2. Mammalian cells

Mammalian cell plasma membrane is very sensitive to tip when imaged in contact. Most of the time, their ability to adhere to the substrate they grow on allows the cells not to be removed by the scanning tip (Schulze et al., 2009). Though, this may not be sufficient, and different glass coating like poly-lysine, fibronectin or laminin must be used to enhance cell adhesion on substrate (Yokokawa et al., 2008). Despite these several immobilization techniques, the membrane/wall composition of eukaryotic cells is often a reason of unsuccessful AFM trials on living cells and incites to work on fixed cells. We studied living CHO cells that are a regular model for *in vitro* studies (Gamper et al., 2005) or, for example, membrane protein production (as ions channels) (Che Abdullah et al., 2011) and living HCT116 cells that are of interest for *in vitro* studies of cancer cell behavior and cancer treatment (Brattain et al., 1981). As shown in Fig. 3, one can managed to obtain good image of CHO or HCT116 cells after several try changing orientation of scanning not to disturb the cell (Fig. 3a and b), but most of the time some extensions related to tip/membrane interactions are visible (Fig. 3b) and do not give a good representation of the cell surface. Fig. 3c and d gives a good example of the quality obtained when imaging with QITM mode at the same speed than classical contact imaging (Fig. 3c and d, 45 min required, 166 $\mu\text{m/s}$ tip speed), or imaging faster (Fig. 3e, 15 min required, 1000 $\mu\text{m/s}$ tip speed). QITM

mode images, because of their higher resolution, give more defined images of the cell surface (Fig. 3d), than FV image (Fig. 3f).

3.2. Mechanical properties

QITM mode is not only useful for imaging difficult samples; it is also useful for nanomechanical measurements on those samples. Mechanical properties recording require a very well defined localization and thus a high resolution and correlation with the image of the sample. The correlation can be lost when switching from a mode to another. Here we present the direct correlation between height images (Fig. 4a and d) and elasticity maps for HCT116 (Fig. 4b and c) and *C. albicans* cells (Fig. 4e and f) showing the distribution of YM values on the sample. In each case, the same data were recorded using QITM mode (Fig. 4c and e) and FV mode (Fig. 4d and f). When comparing the two methods using Fovea software (Roduit et al., 2012a, 2012b), we show that QITM mode is more resolute, due to the number of recorded force curves ($n=65\,536$ at a resolution of 256px^2) and allow a detailed view of the sample. For HCT116 cells, even if images show part of cytoskeleton network at cells membrane extremities either with QITM mode or FV (Fig. 3d and f) by high YM value represented in yellow–red colors; in FV mode, the YM values seem to be homogeneously distributed all over the cell (Fig. 4b). When seen in QITM, cytoskeleton fibers stiffness (most likely actin fibers) at cells extremities are well detected as a higher YM is displayed (red lines underlying stress fiber underneath the membrane) (Fig. 4c). Beyond the abilities to record a well resolved map, a QITM force measurement has a better intrinsic resolution too. We can clearly follow the stress fiber along the cell structure. On *C. albicans*, the curvature of the cell induces artificially soft force curves at the edge that must not be analyzed (outside of

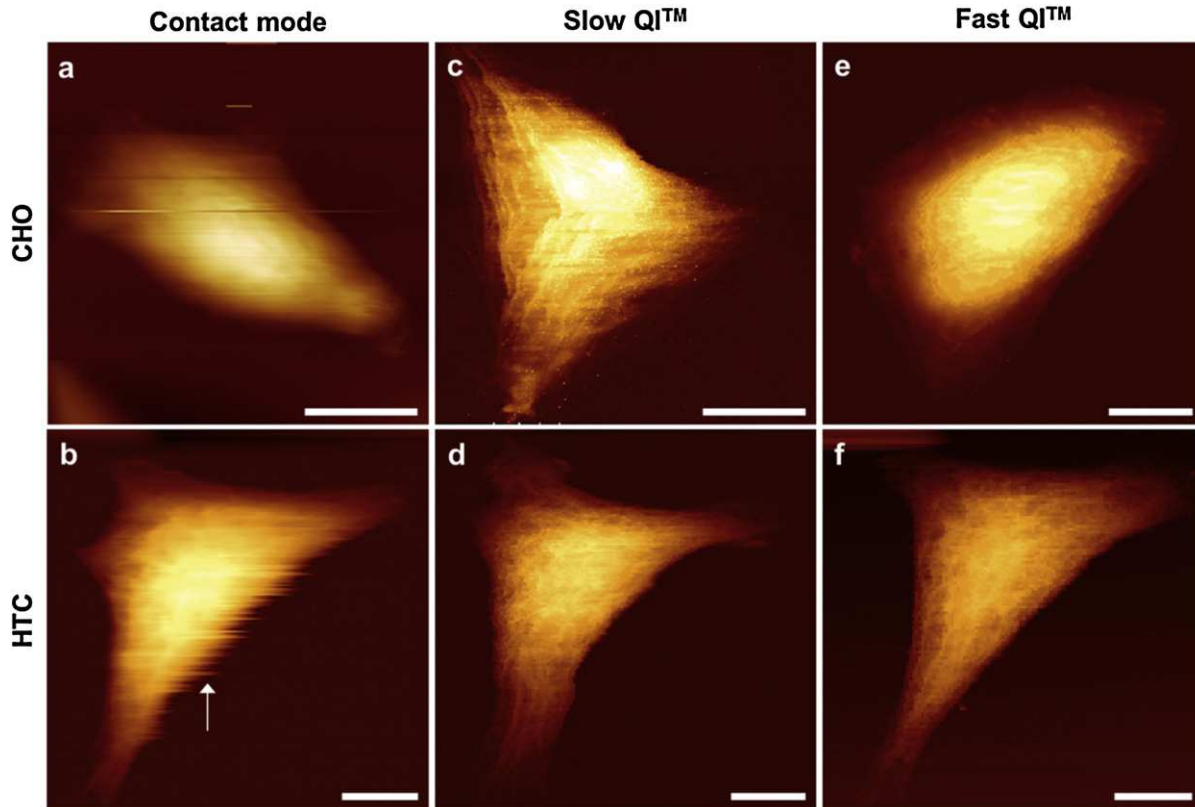


Fig. 3. Imaging of soft samples: mammals cells. Contact height image (resolution: 512 lines) of (a) a CHO cell (z -range = $4.5\ \mu\text{m}$) and (b) an HTC116 cell (z -range = $4.5\ \mu\text{m}$), the arrow point membrane extensions related to tip/membrane interactions. QITM height image of (c) another CHO cell (256px^2 , speed = 45 min), and (d) the same HTC116 cell (256px^2 , speed = 45 min). (e) QITM height image of (c) another CHO cell (256px^2 , speed = 15 min). (f) Force volume height image (128px^2 , speed = 15 min) of an HTC cell and. Scale bar: $10\ \mu\text{m}$. z -range for c–f: $7\ \mu\text{m}$.

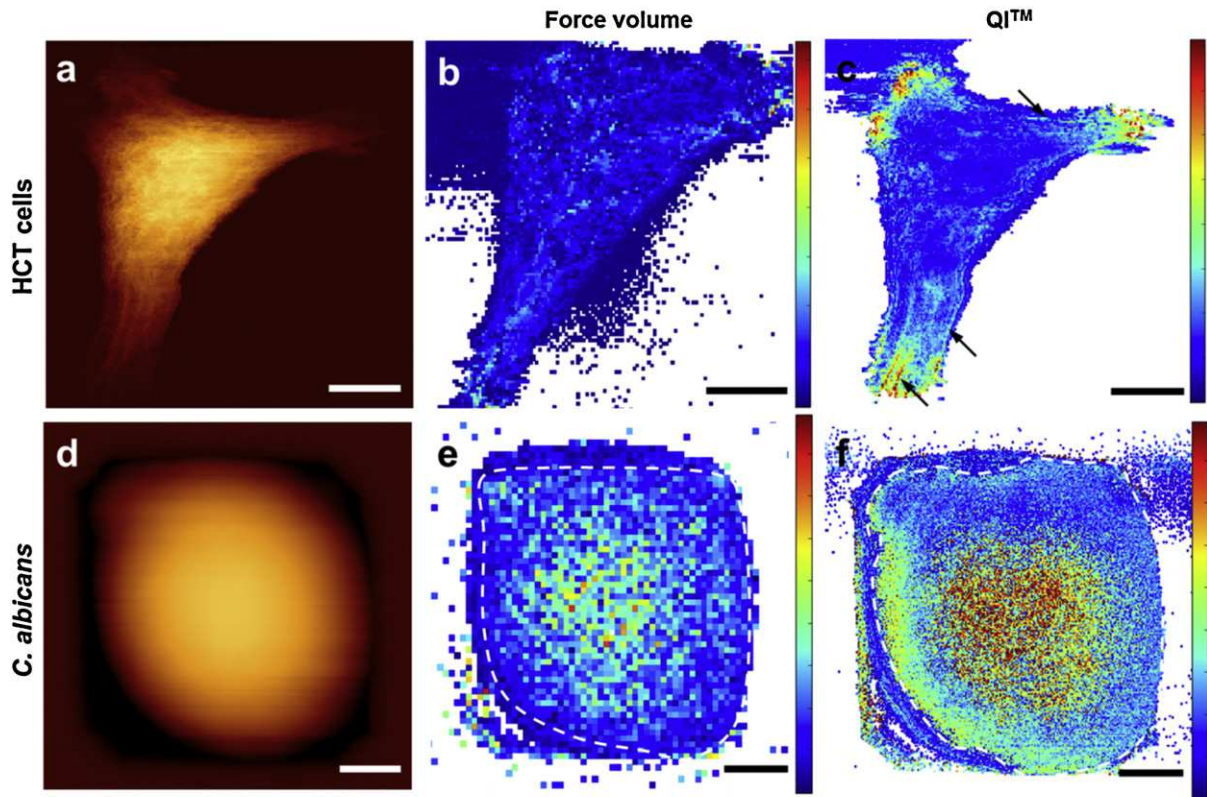


Fig. 4. Mechanical properties. QI™ height image (256 px²) of (a) an HCT116 cell (z-range = 7 μm). (b) Force volume elasticity map (128 px²) of the same HCT116 cell (YM-scale = 0–10 kPa). (c) QI™ elasticity map (256 px²) of the same HCT116 cell (YM-colorscale = 0–10 kPa). Arrows show the stress fibers revealed by QI™ measurement. (d) QI™ height image (256 px²) of a *C. albicans* cell (z-range = 2 μm). (e) Force volume elasticity map (64 px²) of the same *C. albicans* cell (YM-colorscale = 0–500 kPa). White dashed line circles the region of interest. (f) QI™ elasticity map (256 px²) of the same *C. albicans* cell (YM-colorscale = 500 kPa). White dashed line circles the region of interest. a–c: 10 μm, scale bar d–f: 1 μm.

the white region of interest drawn). In the FV mode only a small amount of force curves should finally be interpreted to extract relevant YM (250 force curves). As QI™ record more force curves, the amount of force curves that is not affected by *C. albicans* curvature is higher (4500 force curves) and the region of interest can be more accurately defined, which results in a better analysis.

If extent QI™ force curves can be analyzed for extracting YM values, retract force curves can also be analyzed. This gives access to nano-adhesive properties of entire cells, in the same time as recording the height image of the sample. This is indeed a powerful tool that can allow probing with high resolution, for example, the hydrophobic properties of cells (Alsteens et al., 2007). We present here, on Fig. 5a and d, images of spores of *A. fumigatus* trapped in PDMS microstructured stamps. On the adhesion image recorded in QI™ mode, we can directly see that the spores of the wild-type strain of *A. fumigatus* (KU strain) are adhesive, whereas the spores of the mutant strain (5T) do not show adhesion at all (Fig. 5b and e). This can be explained by the fact that wild-type spores present auto-organized hydrophobic proteins (rodlets) on their surface (Fig. 5c), whereas the mutant strain do not express these

proteins (Fig. 5f), but present an hydrophilic polysaccharidic surface (Dague et al., 2008). So simply by imaging a sample, QI™ mode offers the possibility to directly visualize the adhesive properties of this sample. This gives the opportunity to ask new questions concerning the samples observed, questions that would not have been asked in the first place.

4. Discussion

This study of QI™ mode has been conducted in order to test the potentialities of this mode for biology (Table 1). (i) The first advantage of QI™ is to allow high resolution force measurements in the meantime of imaging. This point reduces drastically the time needed for each experiment and allows the direct correlation of image and mechanical/adhesion data on the same cell/sample (Fig. 4). (ii) Speed of recording can be increased to obtain images in short time; this allows accessing short time effect of component of interest (Fig. 3c). (iii) This mode allows imaging loosely bound samples; therefore there is no need to use chemical or denaturing immobilization in order to image the samples. The experiments can

Table 1
Comparative table of quantitative imaging™ mode (QI™), force volume mode (FV) and contact imaging mode.

	QI™	FV	Contact
Sample damage	++ (None)	++ (None)	-- Constant force is applied
Speed	++ (1000 μm/s)	– (2498 μm/s)	-- (≈10 μm/s, but large range)
Z-length	++ (8 μm)	++ (8 μm)	/
x–y resolution	++ (512 px ²)	– (128 px ²)	++ (1024 px ²)
Force resolution	10 pN	10 pN	No force measurement
Analysis	++ (Any model)	++ (Any model)	No force measurement

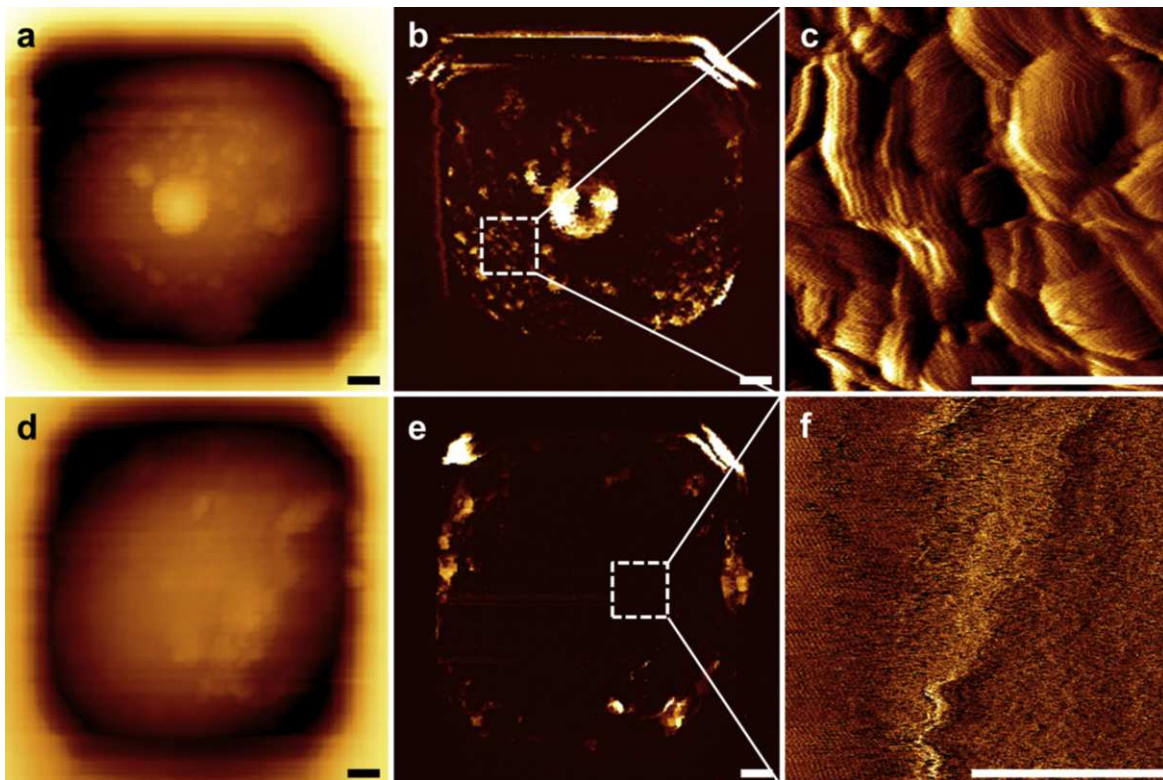


Fig. 5. Adhesive properties. QI™ height image (resolution: 256 px²) of (a) an *A. fumigatus* spore strain Ayg (wild-type) (z -range = 0.5 μm) and (d) an *A. fumigatus* strain 5T (z -range = 0.5 μm). (b and e) Adhesion image (z -range = 2 nN) corresponding to the height images. (c and f) Contact mode vertical deflection images of the white dashed squares on b and d. Scale bar: 0.25 μm .

then be performed in conditions of controlled temperature and in liquid, which is closer to the physiological reality of biology. (iv) The ramp size of the force curves benefit of half of the piezo length (7.5 μm). For adhesive samples like *A. fumigatus* spores, without a long enough ramp size, the interactions between the tip and the samples are never broken and prevent imaging of the spore. Such a ramp is accessible with QI™ mode, without any impact on the scan speed. (v) For mechanical/adhesive properties, the number of recorded force curves can be up to 512 \times 512. For each pixel, a force curve is recorded and saved, allowing an analysis of each individual force curve (Fig. 4).

Other AFM constructors have designed modes similar to QI™ for imaging/mechanical/adhesive properties measurements at high speed and resolution. A few years ago Bruker proposed a solution named PeakForce QNM (Adamcik et al., 2012; Heu et al., 2012; Pittenger et al., 2010; Sweers et al., 2011). This mode is also a FV based mode, with a force exerted on the sample maintained constant. The force curves are recorded at a maximum speed of 2 kHz, with a maximum force curve ramp size of 300 nm. This produces a paradox: to image adhesive samples hard cantilevers must be used (and it works (Heu et al., 2012)). But in order to measure the nanomechanical properties of soft samples, soft cantilevers should be used. However, PeakForce QNM technique is able to measure YM of materials ranging from soft gels (1 MPa) to rigid polymers (20 GPa) (Young et al., 2011). In an application note the supplier claims that PeakForce QNM provides quantitative modulus results over the range of 700 kPa–700 GPa (Pittenger et al., 2010). In another application note (“Quantitative imaging of living biological samples by PeakForce QNM atomic force microscopy”), the authors were able to measure low Young modulus (ranging from 75 to 250 kPa) using softer cantilevers (Berquand, 2011). A recent study demonstrated that PFQNM is suitable for high resolution chemical force spectroscopy (Alsteens et al., 2012). The three

different samples that we present in this study all have a low Young modulus; CHO cells are approximately of 30 kPa (Kuznetsova et al., 2007).

QI™ mode can also be used in Single Molecule Force Spectroscopy (SMFS), with functionalized AFM tips. It will then be possible to map the whole surface of the cell at high speed and resolution. Thus, complete cartography of proteins at the surface of cells will be possible, which is of great interest for the biologist community. Recent works by Alsteens et al. (2010) have showed the localization of Als5 at the surface of yeast over-expressing Als5p, using AFM tips functionalized by an antibody anti-Als5p. Their pioneering results are nevertheless of low resolution (roughly 16 nm), because of the limitations in terms of speed and resolution of the AFM they used. With QI™, the same kind of experiments could be performed at a higher resolution, and at the scale of the whole cell. Also QI™ retract force curves are real precise, so for example, an interaction of 50 pN can be measured, as well as in any other FV mode.

5. Conclusion

In conclusion, QI™ mode gives the opportunity to simultaneously image and measure soft or loosely immobilized samples, fast, at a good resolution, resulting in force-curve data that can be analyzed by any model. The versatility of this mode makes it the most appropriate for kinetic studies on difficult biological samples, if image data are required, or mechanical/adhesive properties, or both.

Acknowledgements

We thank Direction Générale de l'Armement (DGA) for Cécile Formosa and Louise Chopinet 3 years Ph.D. grants, ANR Young

Scientist Program “AFMyst” (#30024332) that provided financial support, Charles Roduit for providing us an updated Fovea software and, S.Roga for nucleus extraction protocole, and F. Pillet for its critical and careful reading of the manuscript.

References

- Abu-Lail, N.I., Camesano, T.A., 2006. Specific and nonspecific interaction forces between *Escherichia coli* and silicon nitride, determined by Poisson statistical analysis. *Langmuir* 22, 7296–7301.
- Adamcik, J., Lara, C., Usov, I., Jeong, J.S., Ruggeri, F.S., Dietler, G., Lashuel, H.A., Hamley, I.W., Mezzenga, R., 2012. Measurement of intrinsic properties of amyloid fibrils by the peak force QNM method. *Nanoscale* 4, 4426–4429.
- Alsteens, D., Dague, E., Rouxhet, P.G., Baulard, A.R., Dufrêne, Y.F., 2007. Direct measurement of hydrophobic forces on cell surfaces using AFM. *Langmuir* 23, 11977–11979.
- Alsteens, D., Dupres, V., Mc Evoy, K., Wildling, L., Gruber, H.J., Dufrêne, Y.F., 2008. Structure, cell wall elasticity and polysaccharide properties of living yeast cells, as probed by AFM. *Nanotechnology*, 384005.
- Alsteens, D., Dupres, V., Yunus, S., Latgé, J.-P., Heinisch, J.J., Dufrêne, Y.F., 2012. High-resolution imaging of chemical and biological sites on living cells using peak force tapping atomic force microscopy. *Langmuir* 28, 16738–16744.
- Alsteens, D., Garcia, M.C., Lipke, P.N., Dufrêne, Y.F., 2010. Force-induced formation and propagation of adhesion nanodomains in living fungal cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 107, 20744–20749, <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.1013893107>.
- Beaussart, A., Alsteens, D., El-Kirat-Chatel, S., Lipke, P.N., Kucharíková, S., Van Dijck, P., Dufrêne, Y.F., 2012. Single-molecule imaging and functional analysis of α 5 adhesins and mannans during candida albicans morphogenesis. *ACS Nano* 6, 10950–10964.
- Brattain, M.G., Fine, W.D., Khaled, F.M., Thompson, J., Brattain, D.E., 1981. Heterogeneity of malignant cells from a human colonic carcinoma. *Cancer Research* 41, 1751–1756.
- Cerf, A., Cau, J.-C., Vieu, C., 2008. Controlled assembly of bacteria on chemical patterns using soft lithography. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 65, 285–291.
- Cerf, A., Cau, J.-C., Vieu, C., Dague, E., 2009. Nanomechanical properties of dead or alive single-patterned bacteria. *Langmuir* 25, 5731–5736.
- Che Abdullah, C.A., Asanithi, P., Brunner, E.W., Jurewicz, I., Bo, C., Azad, C.L., Ovalle-Robles, R., Fang, S., Lima, M.D., Lepro, X., Collins, S., Baughman, R.H., Sear, R.P., Dalton, A.B., 2011. Aligned, isotropic and patterned carbon nanotube substrates that control the growth and alignment of Chinese hamster ovary cells. *Nanotechnology* 22, 205102, <http://dx.doi.org/10.1088/0957-4484/22/20/205102>.
- Dague, E., Delcorte, A., Latgé, J.-P., Dufrêne, Y.F., 2008. Combined use of atomic force microscopy, X-ray photoelectron spectroscopy, and secondary ion mass spectrometry for cell surface analysis. *Langmuir* 24, 2955–2959.
- Dague, E., Jauvert, E., Laplatine, L., Viallet, B., Thibault, C., Rossier, L., 2011. Assembly of live micro-organisms on microstructured PDMS stamps by convective/capillary deposition for AFM bio-experiments. *Nanotechnology* 22, 395102, <http://dx.doi.org/10.1088/0957-4484/22/39/395102>.
- De Kerchove, A.J., Elimelech, M., 2005. Relevance of electrokinetic theory for soft particles to bacterial cells: implications for bacterial adhesion. *Langmuir* 21, 6462–6472.
- Dufrêne, Y.F., 2004. Using nanotechniques to explore microbial surfaces. *Nature Reviews Microbiology* 2, 451–460.
- Fantner, G.E., Barbero, R.J., Gray, D.S., Belcher, A.M., 2010. Kinetics of antimicrobial peptide activity measured on individual bacterial cells using high-speed atomic force microscopy. *Nature Nanotechnology* 5, 280–285.
- Formosa, C., Grare, M., Duval, R.E., Dague, E., 2012a. Nanoscale effects of antibiotics on *P. aeruginosa*. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine* 8, 12–16.
- Formosa, C., Grare, M., Jauvert, E., Coutable, A., Regnouf-de-Vains, J.B., Mourer, M., Duval, R.E., Dague, E., 2012b. Nanoscale analysis of the effects of antibiotics and CX1 on a *Pseudomonas aeruginosa* multidrug-resistant strain. *Science Reports* 2, 575, <http://dx.doi.org/10.1038/srep00575>.
- Gaboriaud, F., Parcha, B.S., Gee, M.L., Holden, J.A., Strugnell, R.A., 2008. Spatially resolved force spectroscopy of bacterial surfaces using force–volume imaging. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 62, 206–213.
- Gamper, N., Stockand, J.D., Shapiro, M.S., 2005. The use of Chinese hamster ovary (CHO) cells in the study of ion channels. *Journal of Pharmacological and Toxicological Methods* 51, 177–185.
- Garcia, R., Herruzo, E.T., 2012. The emergence of multifrequency force microscopy. *Nature Nanotechnology* 7, 217–226.
- Heinisch, J.J., Dufrêne, Y.F., 2010. Is there anyone out there? Single-molecule atomic force microscopy meets yeast genetics to study sensor functions. *Integr. Biol.* 2, 408–415.
- Heu, C., Berquand, A., Elie-Caille, C., Nicod, L., 2012. Glyphosate-induced stiffening of HaCaT keratinocytes, a peak force tapping study on living cells. *Journal of Structural Biology* 178, 1–7.
- Kodera, N., Yamamoto, D., Ishikawa, R., Ando, T., 2010. Video imaging of walking myosin V by high-speed atomic force microscopy. *Nature* 468, 72–76.
- Kuznetsova, T.G., Starodubtseva, M.N., Yegorenkov, N.I., Chizhik, S.A., Zhdanov, R.I., 2007. Atomic force microscopy probing of cell elasticity. *Micron* 38, 824–833.
- Layton, B.E., Boyd, M.B., 2011. Atomic Force Microscopy of Isolated Mitochondria, in *Atomic Force Microscopy in Biomedical Research*. Pier Carlo Braga, Davide Ricci.
- Liu, S., Wang, Y., 2010. Application of AFM in microbiology: a review. *Scanning* 32, 61–73.
- Longo, G., Rio, L.M., Roduit, C., Trampuz, A., Bizzini, A., Dietler, G., Kasas, S., 2012. Force volume and stiffness tomography investigation on the dynamics of stiff material under bacterial membranes. *Journal of Molecular Recognition* 25, 278–284.
- McKee, C.T., Raghunathan, V.K., Nealey, P.F., Russell, P., Murphy, C.J., 2011. Topographic modulation of the orientation and shape of cell nuclei and their influence on the measured elastic modulus of epithelial cells. *Biophysical Journal* 101, 2139–2146.
- Milhiet, P.-E., Dosset, P., Godefroy, C., Le Grimellec, C., Guigner, J.-M., Larquet, E., Ronzon, F., Manin, C., 2011. Nanoscale topography of hepatitis B antigen particles by atomic force microscopy. *Biochimie* 93, 254–259.
- Müller, D.J., Dufrêne, Y.F., 2011. Atomic force microscopy: a nanoscopic window on the cell surface. *Trends in Cell Biology* 21, 461–469.
- Oberleithner, H., Brinckmann, E., Schwab, A., Krohne, G., 1994. Imaging nuclear pores of aldosterone-sensitive kidney cells by atomic force microscopy. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 91, 9784–9788.
- Pittenger, B., Erina, N., Su, C., 2010. Quantitative mechanical property mapping at the nanoscale with PeakForce QNM. Bruker application note <http://nanoscaleworld.bruker-axs.com/nanoscaleworld/media/p/418.aspx>
- JPK Instruments QTM mode-Quantitative Imaging with the NanoWizard 3 AFM <http://www.jpk.com/afm.230.en.html>
- Berquand, A., 2011. Quantitative imaging of living biological samples by PeakForce QNM atomic force microscopy Bruker application note <http://nanoscaleworld.bruker-axs.com/nanoscaleworld/media/p/2028.aspx>
- Radmacher, M., Cleveland, J.P., Fritz, M., Hansma, H.G., Hansma, P.K., 1994. Mapping interaction forces with the atomic force microscope. *Biophysical Journal* 66, 2159–2165.
- Roduit, C., Longo, G., Benmessaoud, I., Volterra, A., Saha, B., Dietler, G., Kasas, S., 2012a. Stiffness tomography exploration of living and fixed macrophages. *Journal of Molecular Recognition* 25, 241–246.
- Roduit, C., Saha, B., Alonso-Sarduy, L., Volterra, A., Dietler, G., Kasas, S., 2012b. OpenFovea: open-source AFM data processing software. *Nature Methods* 9, 774–775.
- Schulze, C., Müller, K., Käs, J.A., Gerdemann, J.C., 2009. Compaction of cell shape occurs before decrease of elasticity in CHO-K1 cells treated with actin cytoskeleton disrupting drug cytochalasin D. *Cell Motility and the Cytoskeleton* 66, 193–201.
- Sudbery, P., Gow, N., Berman, J., 2004. The distinct morphogenic states of *Candida albicans*. *Trends in Microbiology* 12, 317–324.
- Sweers, K., Van der Werf, K., Binnink, M., Subramaniam, V., 2011. Nanomechanical properties of alpha-synuclein amyloid fibrils: a comparative study by nanoindentation, harmonic force microscopy, and Peakforce QNM. *Nanoscale Research Letters* 6, 270.
- Yokokawa, M., Takeyasu, K., Yoshimura, S.H., 2008. Mechanical properties of plasma membrane and nuclear envelope measured by scanning probe microscope. *Journal of Microscopy* 232, 82–90.
- Young, T.J., Monclus, M.A., Burnett, T.L., Broughton, W.R., Ogin, S.L., Smith, P.A., 2011. The use of the PeakForceTM quantitative nanomechanical mapping AFM-based method for high-resolution Young's modulus measurements of polymers. *Measurement Science and Technology*, 22.

d. Analyse

Bien que représentant la dernière étape, l'analyse n'en est pas moins l'étape déterminante de l'interprétation des données AFM. Sans analyse adéquate, pas de résultats fiables. L'analyse permet d'obtenir des images de topographie de l'échantillon, des cartes d'élasticité ou d'adhésion, mais aussi des informations sur l'élasticité moyenne de l'échantillon, sur les distances et forces de rupture lors du dépliage de protéines ou d'interactions spécifiques en étudiant la fréquence de distribution des valeurs. Concernant les images, l'analyse consiste à corriger l'inclinaison de l'échantillon (sur le microscope) pour obtenir une image plane et à régler les échelles de couleur pour obtenir un rendu adéquat à l'observation effectuée. Pour les données de spectroscopie de force, l'analyse est différente pour la courbe d'approche et la courbe de retrait.

L'analyse des courbes d'approche passe tout d'abord par le calcul de l'indentation, qui permet d'extraire la déformation interne du levier, afin de n'analyser que celle liée à l'échantillon (Figure 29) (Kasas et Dietler, 2008). Dans un premier temps il est indispensable de détecter le point de contact. Plusieurs techniques existent pour déterminer ce point sur les courbes d'approche et de retrait, la plus simple consistant à ajuster la partie de la courbe n'étant pas en contact (horizontale) par une droite, et à considérer le premier point en dehors de cet ajustement comme le point de contact. C'est-à-dire le point où la pointe commence à indenter l'échantillon. La détermination du point de contact est un exercice difficile et faisant l'objet de nombreux travaux (Gaboriaud *et al.*, 2008). Dans un deuxième temps à toutes les courbes obtenues sur l'échantillon est soustraite la courbe de déflexion du levier obtenue par exemple sur du verre, ou tout autre matériau non déformable par la pointe. On obtient ainsi des courbes force-distance (Heinz et Hoh, 1999).

Sur la courbe d'approche les informations d'élasticité de l'échantillon peuvent être obtenues en l'ajustant avec un modèle. Le modèle de Hooke (Heinz et Hoh, 1999) est un modèle linéaire permettant l'analyse de courbes enregistrées sur des surfaces se déformant de façon linéaire, mais les échantillons biologiques sont mieux ajustés avec le modèle de Hertz (Carl et Schillers, 2008) principalement utilisé par la communauté et adapté selon le type de pointe. Pour une pointe conique :

$$F = ((2.E.\tan\alpha)/(\pi.(1-\nu^2))).\delta^2$$

Où F représente la force, E le module d'élasticité ou module d'Young, α l'angle d'ouverture de la pointe, ν le coefficient de Poisson arbitrairement approximé à 0,5 car incalculable sur les échantillons vivants.

En ajustant E , il est donc possible de rapprocher la courbe théorique au plus près de la courbe mesurée. On obtient ainsi le module d'élasticité, ou module d'Young, qui décrit l'élasticité de l'échantillon (Figure 33).

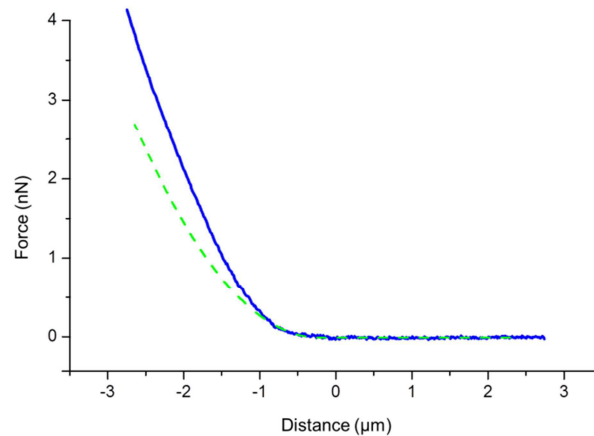


Figure 33 : Courbe expérimentale en bleu, et courbe théorique tracée avec le modèle de Hertz en vert. Le modèle théorique est appliqué au premier micromètre et décrit bien l'élasticité de l'échantillon sur cette distance.

Ce module peut être calculé sur toute la longueur de la courbe de force à partir du point de contact, donc moyenné, ou sur une partie de cette courbe correspondant à une profondeur précise d'indentation dans l'échantillon. Ainsi, il est possible de déterminer l'élasticité membranaire au plus près en ajustant le modèle de Hertz seulement sur les 50 premiers nanomètres d'indentation, qui correspondent au 50 premiers nanomètres en contact avec la pointe, soit, dans le cas des cellules mammifères, à la membrane plasmique et des composants intracellulaires. Le logiciel OpenFovea permet l'analyse de la courbe d'indentation en profondeur et ainsi de détecter des éléments internes en segmentant la courbe d'approche (Roduit *et al.*, 2012).

D'autres modèles plus complexes décrivent de manière plus précise la réponse de l'échantillon à l'indentation de la pointe. Certains de ces modèles permettent le calcul de l'élasticité sur la courbe de retrait par exemple, ou prennent en compte l'évolution non linéaire de la réponse de l'échantillon à l'indentation de la pointe.

La courbe au retrait peut donner accès à de nombreuses informations sans nécessairement fonctionnaliser la pointe. En particulier les « tethers » membranaires sont visualisables sur

une pointe nue, ils correspondent à la formation de nanotubes de membrane phospholipidique fixés à la pointe (Friedrichs *et al.*, 2013; Müller *et al.*, 2009) (Figure 34A-B). Mais les interactions spécifiques avec des protéines sont aussi analysables et caractérisées par le calcul de la longueur de l'interaction avant rupture, et de la force de rupture en utilisant des pointes fonctionnalisées (Dupres *et al.*, 2007; Formosa *et al.*, 2012; Marszalek et Dufrêne, 2012) (Figure 34-C). Des modèles physiques modélisant ces interactions sont utilisés, comme pour le calcul du module d'Young, pour ajuster les événements d'adhésion sur la courbe théorique et extraire les distances et forces.

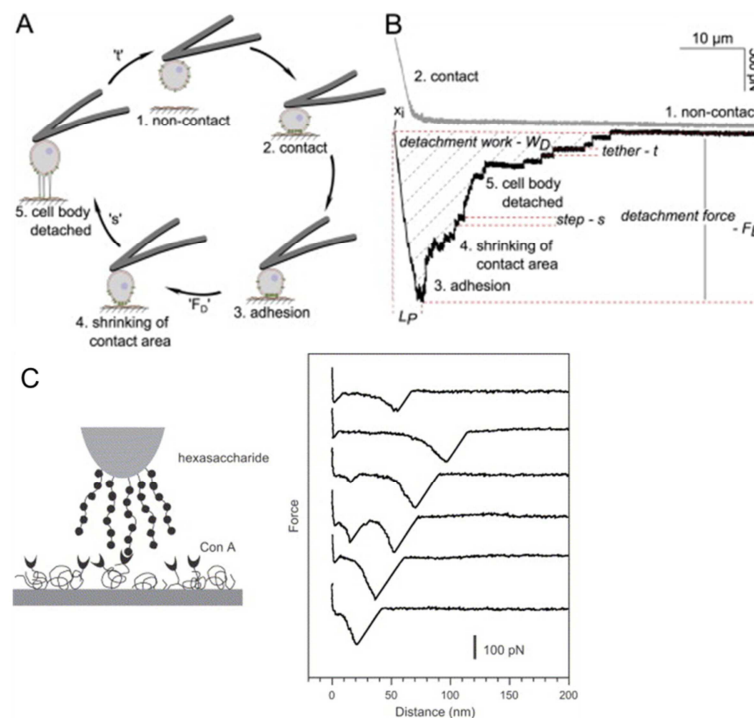


Figure 34 : Exemple et explication du phénomène de « tether » (A et B), exemple de courbe d'adhésion entre un hexasaccharide et la concavoline A (C). Adapté de Frierdrich et al, 2013 et Dupres *et al.*, 2007 respectivement.

e. Paramètres expérimentaux

Le succès d'une expérience AFM est lié à plusieurs paramètres physico-chimiques et techniques qu'il est nécessaire de prendre en compte avant toute tentative. Il est possible de distinguer 6 facteurs influençant l'expérience AFM et caractérisant le type de données obtenues ainsi que leur qualité (Figure 35).

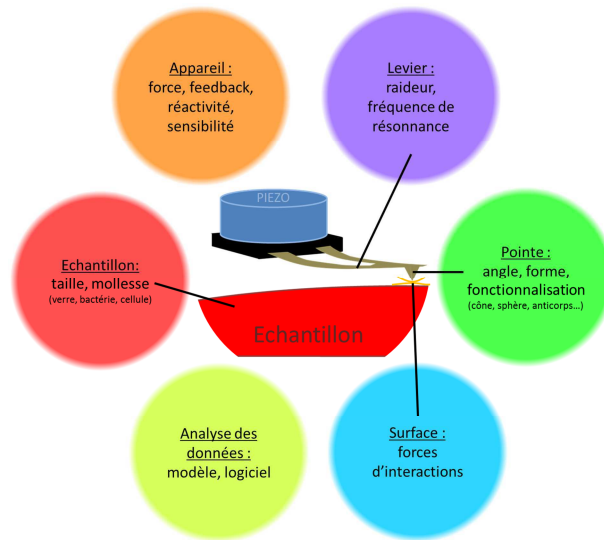


Figure 35 : Les facteurs influençant l'acquisition de données par AFM.

- L'échantillon :

C'est le paramètre clé qui conditionne les choix s'appliquant aux facteurs suivants. La nature de l'échantillon, sa taille, sa mollesse (élasticité, dureté), s'il est vivant ou non, imagé en air ou en liquide sont d'une importance capitale. La nature de l'expérience à réaliser, imagerie ou spectroscopie de force, décide également quel mode utiliser, quel levier, quelle pointe et quelle analyse.

- L'appareil utilisé :

Il conditionne le type de données obtenues en offrant à l'utilisateur des modes spécifiques adaptés à certaines utilisations (comme nous l'avons vu, le mode QI de JPK, Partie B-1-c, (Chopin et al., 2013a), ou encore le mode HyperDrive (Formosa et al., 2012)) adapté à l'imagerie des échantillons mous en liquide, particulièrement les bicouches phospholipidiques artificielles, mais aussi les modes de spectroscopie de force et d'imagerie classiques. Les avancées actuelles sont basées sur une analyse rapide de la réaction de la pointe/levier à l'échantillon et des « feedbacks » nombreux ainsi que l'optimisation du mouvement de la pointe qui permettent l'acquisition de données de haute résolution très rapidement.

- Le levier :

Le choix du levier est dépendant de l'échantillon et de l'application (donc du mode). Deux paramètres caractérisent le levier : sa constante de raideur et sa fréquence de résonance. Le premier est déterminant pour toute application en contact avec l'échantillon. Pour des

mesures d'élasticité sur un échantillon mou un levier souple sera mieux adapté, alors que sur un échantillon dur, un levier raide permettra d'obtenir de meilleurs résultats. Pour les mesures de force d'interaction et l'imagerie les mêmes types de considération seront faites. La fréquence de résonance importe lors de l'utilisation de mode tapping oscillant ou non-contact.

- La pointe :

Différents types de pointe sont proposés dans le commerce, ils sont adaptés à différentes utilisations. Il existe des pointes coniques et pyramidales, dont l'angle d'ouverture varie et influence la résolution des images. Une pointe trop fine induit des forces sur l'échantillon, donc des pyramides plus larges sont préférées pour les échantillons biologiques qui ne supportent pas d'autres types de pointe. Ces pointes peuvent être utilisées pour toutes les applications (imagerie, spectroscopie de force). Il existe également des « pointes » sphériques, adaptées pour les mesures d'élasticité, qui permettent une mesure d'élasticité moyenne de l'échantillon, et non plus en un point comme le permettent les pointes pyramidales. Beaucoup d'autres formes de pointes sont en vente s'adaptant à des utilisations précises (Machida *et al.*, 2010). Le modèle utilisé pour l'analyse des données doit être adapté selon la forme de la pointe qui influence la nature des données acquises (Carl et Schillers, 2008).

- La surface de l'échantillon :

La présence de forces entre la pointe et l'échantillon influence certaines mesures, mais l'AFM peut mesurer ces forces d'interaction. Pour mesurer des forces d'interactions spécifiques liées à certaines protéines, la pointe peut être fonctionnalisée avec des anticorps, ou des fonctions chimiques permettant la liaison spécifique avec la molécule d'intérêt.

- L'analyse :

L'analyse des images obtenues par AFM est en général permise grâce au logiciel fourni par le fabricant de la machine. L'utilisation des modes de spectroscopie de force pour la mesure d'élasticité ou la mesure de forces d'interactions entre la pointe et l'échantillon peut amener à l'obtention de courbes de force présentant la mesure d'évènements particuliers (comme par exemple des courbes présentant des tethers au retrait, ou des perçages de membrane à l'approche (Yokokawa *et al.*, 2008)). L'analyse de ces courbes requiert des modèles mathématiques permettant de mesurer sur la courbe les caractéristiques de ces évènements (distance, force). De plus, la rapidité croissante d'acquisition provoque la génération d'un nombre très important de courbes à analyser, et il est préférable de trouver

des solutions adaptées pour permettre une analyse systématique impartiale et automatisée des données. Plusieurs logiciels « maison » sont accessibles dans la communauté, mais la création d'OpenFovea par C. Roduit a réellement permis une avancée considérable dans l'analyse des données de spectroscopie de force en permettant une analyse automatique et en profondeur des courbes de forces (Roduit *et al.*, 2012).

L'ensemble de ces facteurs doivent être considérés point par point et des solutions mises en place pour la réussite de l'expérience.

2. « *Atomic Force Microscopy et pharmacology; from microbiology to cancerology* », revue acceptée avec révisions mineures au journal *Biophysica Biochimica Acta – General Subjects*

Tout d'abord développé pour des surfaces inertes, l'AFM a rapidement été utilisée pour des études biologiques. Une des premières applications de l'AFM sur cellule vivante date de l'année 1992, par Hederson *et al.*, et s'est intéressé à imager des cellules gliales (Henderson *et al.*, 1992). Auparavant, des articles ont présenté des résultats sur cellules fixées (Butt *et al.*, 1990) ou membranes isolées (Worcester *et al.*, 1988). Cependant, il est à noter que le nombre d'articles relatifs à des organismes vivants est toujours très faible par rapport au nombre total d'articles utilisant la technique AFM. Ceci est dû à la difficulté d'imager et mesurer le vivant par AFM, mais les progrès techniques comme le mode QI permettent aujourd'hui d'augmenter le nombre d'applications sur le vivant et rendre la technique abordable aux biologistes. Un grand nombre d'études AFM s'intéresse aux micro-organismes, beaucoup moins aux cellules mammifères en raison de la difficulté de les imager ou les mesurer car ce sont des échantillons très mous. L'extrait de la revue suivant présente les travaux réalisés sur cellules mammifères selon l'axe de la pharmacologie et donne une bonne représentation de la diversité des études permises par l'AFM. La version complète de ce chapitre est disponible en annexe (annexe 1).

Atomic Force Microscopy and pharmacology; from microbiology to cancerology

Pillet F.^{a,c}, Chopinet L.^{b,c}, Formosa C.^{a,c}, Dague E.^{a,c}

a CNRS ; LAAS ; 7 avenue du colonel Roche, F-31077 Toulouse Cedex 4, France.

b CNRS ; IPBS - UMR 5089 ; BP64182, 205 route de Narbonne, F-31077 Toulouse Cedex 4, France.

c Université de Toulouse ; UPS, INSA, INP, ISAE ; UT1, UTM, LAAS, ITAV ; F-31077 Toulouse Cedex 4, France

3. AFM FOR MAMMAL CELLS PHARMACOLOGY'S STUDIES

This part focuses on the insights that Atomic Force Microscopy can give in the field of pharmacology for mammal's cells, from the general understanding of therapeutics treatment to special cases of diseases, with a whole part concerning cancer study. Most of the studies in this field are performed on cells lines or patient isolated cells *in vitro*, but recent progress have made possible to study entire biopsies, thus enlarging the use of AFM.

3.1 General applications

The use of atomic force microscopy for pharmacology's studies on mammalian cells have been led by 2 types of research field: 1) the understanding of cell response to an external stress (infection, injury) characterized by immune and differentiation or gene expression response; 2) the investigation of drug effect on cells, from internalization efficiency to affectation of cellular processes and active effect on pathogens. The following section will be then divided in 2 parts related to these concerns.

3.1.1 Cell response to external stress

In the complex context of multicellular organisms, the cell response to an external stress is of interest to accurately target the dysfunction in case of disease. For example, the study of keratinocyte reaction to surfactant by AFM can help in the understanding of chemical stresses on the skin, showing that despite a morphological effect, no differences in stiffness are measured at non cytotoxic doses of sodium lauryl sulphate (1). But AFM can also help in immune response characterization. Immune response is based on first, the detection of pathogen and then, their elimination. On one hand, lymphocytes B are involved in the humoral immune response, and recognize molecular component in extra cellular fluids that directly inform of the pathogen presence in the organism. These cells are responsible for antibody production. Their activation is a complex mechanism that appeared to change their nanomechanics. Wang *et al.* have shown, using AFM, that activation of B cells by pokeweed mitogen (PWM) or *Staphylococcus aureus* Cowan I (SAC) induces the clustering of B cell receptors at the cell surface, responsible for cytoplasm biochemical activation cascade and improvement of cell adhesion to antigen. This clustering is visible by topographic analysis such as roughness and particle (cluster) size (Fig. 14-A). Cell adhesion capacities have also been evaluated by force spectroscopy (2). On the other hand, Lymphocyte T cells are responsible for cell-mediated immune response. To achieve their goals, these cells need to

reach the site of infection (inflammation site), and then to cross endothelial barriers, which involves cell-cell adhesion, namely lymphocyte T - vascular endothelial cell adhesion. This crossing implies a change in adhesion protein expression pattern, like integrin and selectin, by endothelial cells. Zhang *et al.* have investigated the adhesion dynamics of the T-cell - endothelial interaction by force spectroscopy study between a functionalized tip where a lymphocyte cell is attached and endothelial cell on the substrate (3). The adhesion forces have been measured and discriminated using antibodies against major adhesion proteins expressed by endothelial cells (Fig. 14-B). These experiments lead to the conclusion that these proteins are the ones involved in lymphocyte B adhesion to endothelial cell. This inflammatory process involves also the increase of temperature, and thus heat stress. HSP60 protein (heat shock protein) production by endothelial cells has been studied by single molecule force spectroscopy and revealed the presence of this protein at the membrane surface of heat stressed cells and its possible implication in arthrogenesis (4). Finally, macrophages phagocytosis plays an important role in the elimination of pathogens and dead cells following immune response (5).

As another stress that an organism is subjected to, injury is one of the most common one. In the process of maintaining blood vessel integrity, platelet activation is the first and key process. Topographical analysis of platelets activation has shown cytoskeleton reorganization at a resolution of 50 nm. A redistribution of the platelets granula and vesicles towards the lamellipodia of the cell have also been observed; this phenomenon leading to increase plasma membrane surface thus improving aggregation (Fig. 14 C) (6).

We can see through these different examples that most of cellular responses involving different gene expression pattern are linked to cell membrane reorganization and changes in nanomechanical properties of the cell. These processes are observed for other mechanisms like cell differentiation or pathway activation. Han *et al.*, in 2011 have validated the IGF-II (insulin-like growth factor) autocrine signaling pathway as a suitable target for the detection of muscle differentiation using AFM. They have been able to discriminate differentiated cells from others by the detection of IGF-II at the cell surface thanks to anti-mouse IGF-II antibody immobilized on the AFM tip (7). Using the same concept, Qiu *et al.* have characterized quantitatively the TRA-1-81 (un-differentiation marker) expression level on Human Embryonic stem cells surface to capture the “turn-on” signal and understand the mechanism of their early differentiation (8). Another way to discriminate differentiated cell can be to measure their elasticity, as it is the case for the change from osteoblast (stiff) to osteocytes

(soft) (9). This stiffness is directly correlated to the capacity to adhere to substrate, and is accurate to test the biocompatibility of implant materials (10).

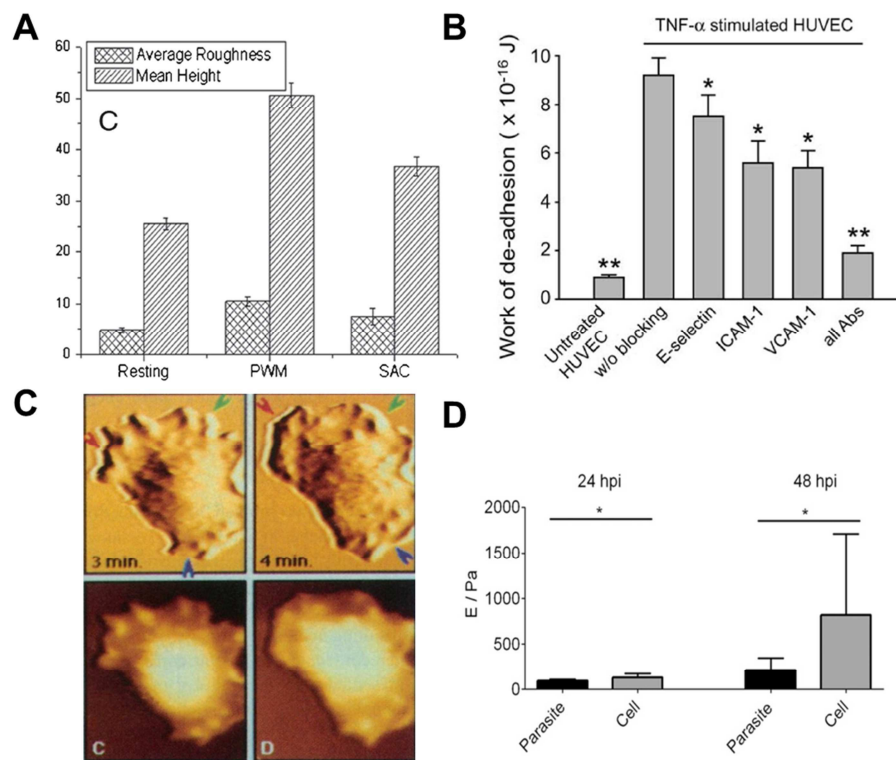


Figure 14: AFM in pharmacology. (A) The average roughness and mean height particles of surface nanostructure of resting and B lymphocytes after their activation by pokeweed mitogen (PWM) or *Staphylococcus aureus Cowan I* (SAC). Mean \pm SD. (B) Lymphocyte T activation and consequent adhesion to jurkat cells (w/o), and diminution of adhesion when using neutralizing antibodies against adhesive protein (selectin, ICAM-1, VCAM-1). The error bar is standard error with $N > 15$ in each case. * $P < 0.05$ compared with the $TNF-\alpha$ -stimulated HUVEC. ** $P < 0.05$ compared with any other groups. (C) AFM imaging of platelet activation along time, height image (z-range 0-1.9 μm) and corrugation images (z-range 0-280 nm). (D) Increase in stiffness of human hepatoma cells infected by *Plasmodium Flaciparum*. ($P < 0.05$). Reprinted with permission from references (2, 3, 6, 11).

3.1.2 Drug effects and disease studies

Drug effect investigation can be done by the three classical measurements: adhesion force, elasticity or imaging, as for example this study about the effects of an anti-malaria compound on leukemic cells (12) or hormonal effects that have been widely studied and well documented by Hillebrand *et al.* (13). i) Single molecule force spectroscopy has resolved at the molecular resolution the dynamics of AMPAR neuron receptors trafficking under NMDA stimulation (14). ii) Effects of asthma drugs (aminophylline) on red blood cell elasticity have

been correlated to their reduced capacity to transport oxygen in capillaries by increasing their stiffness and thus reverse the drug purpose (15). iii) These elasticity changes are linked to a change in cell shape too. Imaging of cells leads to the understanding of molecule side effect, as for example chlorpromazine. Li *et al.* have shown that this schizophrenia drug affects endothelial cell morphologically (16). HgCl₂ toxic effects have been also characterized by imaging cells in contact with the molecule (17). Finally imaging can also be used to study the mechanism of drug internalization, as for example the study of the direct DNA insertion thanks to the AFM tip for nanomedicine (18).

We will now focus on the special case of cardio-vascular affections. Indeed, cardiac cells (cardiomyocytes) present the distinctive feature of being contractile, and AFM is nevertheless technically of interest to study them, as shown by Liu *et al.* This group has measured cell contractility with or without incubating them with Ibutilide, a classical drug used to treat arrhythmia, and started to determine its cellular target and mechanism of action (19). The last development allows synchronizing AFM measurements with the contractility of the cells, providing the possibility to detect specific events (20). The evaluation of recovery after infarct by elasticity measurements showed that stroma cell-derived factor 1 α (SDF-1 α) increases the elasticity of peri-infarct mice tissue border zone and stiffening the scar, thus conducting to a better resistance to ventricular remodeling and infarct expansion (21). The importance of the protein Ephrin B1 in the lateral membrane of cardiomyocytes has also been assessed by AFM. The deletion of Ephrin B1 makes the cardiomyocytes stiffer and progressively leads to the cardiac tissue disorganization. This protein is essential for the stability of cardiac tissue architecture cohesion (22). Nevertheless, beyond the whole cell study, AFM can be run on organelles like mitochondria, which dysfunction is known to be implicated in the pathology of myocardial infarction. The release of cytochrome C by mitochondria was correlated to its swelling by fluorescence microscopy, thus not quantitatively. Lee *et al* have shown that mitochondria indeed swell during apoptosis; the authors also gave quantitative morphological analysis of rat heart mitochondria ischemic or not in native conditions. Furthermore, AFM allows them to detect nano-mechanical surface properties changes of ischemic cell mitochondria that are linked to their swelling (23).

Vascular diseases are also subjected to investigation by AFM. The inner part of blood vessel is responsible for blood pressure regulation through different mechanism like the release of vasoactive substance namely nitric oxide. The release of nitric oxide by the inner endothelial cells have been shown to be correlated with (and maybe regulated by) cell cortex stiffness

changes (24). Artherosclerosis lesions are affecting arterial cells stiffness too, specifically in branches and curved region of blood vessel, where endothelial cells appear to be stiffer than others endothelial cells (25). This may be related to oxidized low-density lipoproteins (ox-LDL) cell exposure (26).

Furthermore, AFM can give answers to the questions raised by the pathogen infection process. For example the plasmodium falciparum liver infection can be characterized by an increase in stiffness associated to a cell response to infection (and not the presence of the microorganism itself) (Fig. 14 D), and may further enhance the understanding of this clinically silent step (11).

3.2 A tool for cancer-study development

Considered as the disease of the 20's century, cancer remains one of the most complicated and unsolved disease, meaning that no recovery treatment exists and only the eradication of tumor cells shows consistent results. In the following section accent will be put on the progress AFM allows for understanding this disease and the consequent medical applications that emerge with this nano-mechanical tool.

3.2.1 Nanomechanic of cancer cell

In 1999, Lekka *et al.* have for the first time compared the elasticity of cancerous cells versus “normal” ones (27). They studied human epithelial bladder cells lines and show that cancerous cells present a lowest young modulus value than normal cells (Fig. 15 A). This article was part of a set investigating several cancer types : prostate cancer cells (28), breast cancer cells (29) or cervical ones (30), all showing a decrease in stiffness for cancer cells, except in the case of leukemic cells where cell stiffness increase leading to leukostasis (Fig. 15 B) (31). In 2007, the same observations were published on cells directly taken from the body (pleural) fluids of patients with suspected lung, breast and pancreas cancer (32), validating the decrease of elasticity as a characteristic of cancerous cells, *in vitro* and *in vivo* (Fig. 15 C). These observations lead the authors to wonder why there was this particular change in elasticity and so to investigate the mechanics of the cancer cells. Rapidly the idea of the involvement of cytoskeleton in this measured softness was pointed out (33) and studied (34). Moreover, the changes in elasticity of melanoma cell lines have shown that the decrease in stiffness was directly correlated to the metastatic potential of the cells (35), the stiffness being the lowest for melanoma B16-F10 cells that produce a large number of foci, and the

highest with a reduce number of foci (Fig. 16 A). The same relation has been shown for esophageal cells lines in different phases of premalignancy (36).

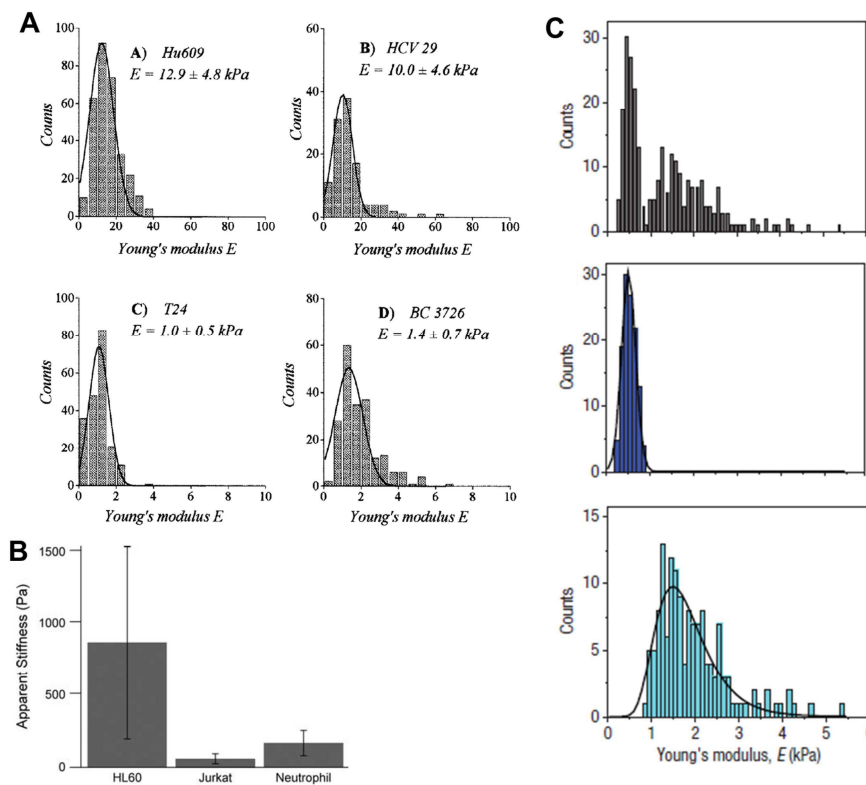


Figure 15: Cancer cell characteristics. (A) Elasticity of bladder cells lines, non-malignant ureter cells (HU609), non-malignant bladder urothelium (HCV29), bladder transitional cell carcinoma (T24), HCV29 cells transfected with v-ras oncogene (BC3726). (B) Increase in cell elasticity of leukemic cells (HL60) leading to leukostasis. (C) Elasticity of cancer cells collected from patients with suspected metastatic cancer from seven different clinical samples. Grey: measurement for all cells together. Dark blue: cancer cells. Light blue: normal cells. Reprinted with permission from references (27, 31, 32).

All together, these data demonstrate that the nanomechanical properties of cancerous cells are linked to their condition, which enable them to change their elastic properties (deformability) in order to cross the cells barriers to create metastasis in the organism (leave the primary site, pass into circulation, stop at a secondary site and migrate again across the vascular barrier). Beyond this metastatic state, cancerous cells must be able to sense their environment to efficiently invade the right targeted-tissue. Firstly, the young modulus of cancer cells was shown to change when cultured on different substrates, indicating a perception of their environment, and yet different capacities depending on their “function” (27). For example elasticity of breast cancer cells decreases on fibronectin (37), which is related to the cancerous nature of the cells as shown on prostate cancer cells versus non-cancerous cells cultured on collagen (Fig. 16 B) (38). The extra cellular matrix is thus of importance in

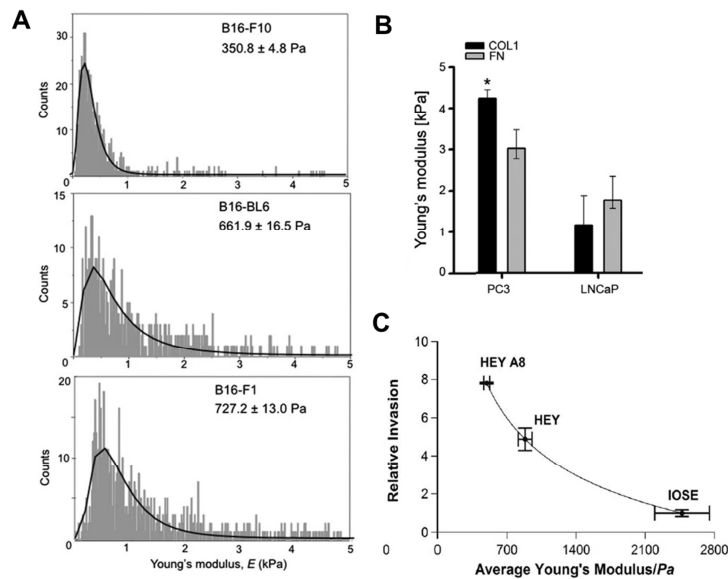


Figure 16: Relation between stiffness and metastatic state. (A) Young's modulus distribution of murine melanoma cell of decreasing metastatic potential (B16-F10, B16-BL6 and B16-F1 cells). (B) Substrate related elasticity of PC3 and LNCaP cell when culture on collagen (COL1) or fibronectin (FN). (C) Invasion versus average stiffness for ovarian surface epithelial cells (IOSE), and ovarian cancer (HEY and HEY A8 cells are HEY A8 cells that are more tumorigenic). Reprinted with permission from (35, 38, 39).

cancer cell phenotypes (40–42). Secondly, stiffness has been correlated to the capacity of invasion too as shown in Figure 16 C on ovarian cancer cells (39) or prostate cancer cells (43). These invasive properties were also determined by the cells ability to adhere differently to the substrate depending on its nature (38, 43). Therefore, it was shown that the rigidity of the substrate influences the invasive cell response as the invasive mechanism implies the degradation of extracellular matrix: cells are then able to sense their environment and choose where to invade (44). Likewise, during their invasion process, cancer cells can adhere to other cells, and this can be measured by direct cell-cell interactions for example between prostate metastatic cells known to form bone metastases and bone cells (45). Reeves *et al.* have demonstrated the ability of prostate cancer cells fixed on the AFM tip to form contact with bone marrow endothelial cells fixed on the substrate (46). By blocking extracellular part of trans-membrane protein such as integrin and selectin using specific antibodies, they observed a decrease in adhesion events between the two cell types. This result has demonstrated that cell-cell interaction in invasive process is performed through these specific proteins (Fig. 17 A). Following the same idea, N-cadherin levels (calcium adhesion transmembrane proteins, that are characteristic of various cancers and involved in cell adhesive properties) have been measured on cancer and normal bladder cell surface with an antibody fixed on the AFM tip (47). Results showed an enhanced level of the protein in cancer cells accompanied by higher

unbinding forces, meaning that N-cadherin protein is more stable in cancerous cells (Fig. 17 B). Furthermore, the presence of cell referenced as good secondary site for metastasis may enhance the invasion capacities of the cancer cells, as shown by Jin *et al.* on breast cancer cells that change their shape and make specialized migration structures in presence of the bone morphogenetic protein 2 (Fig. 17 C) (48).

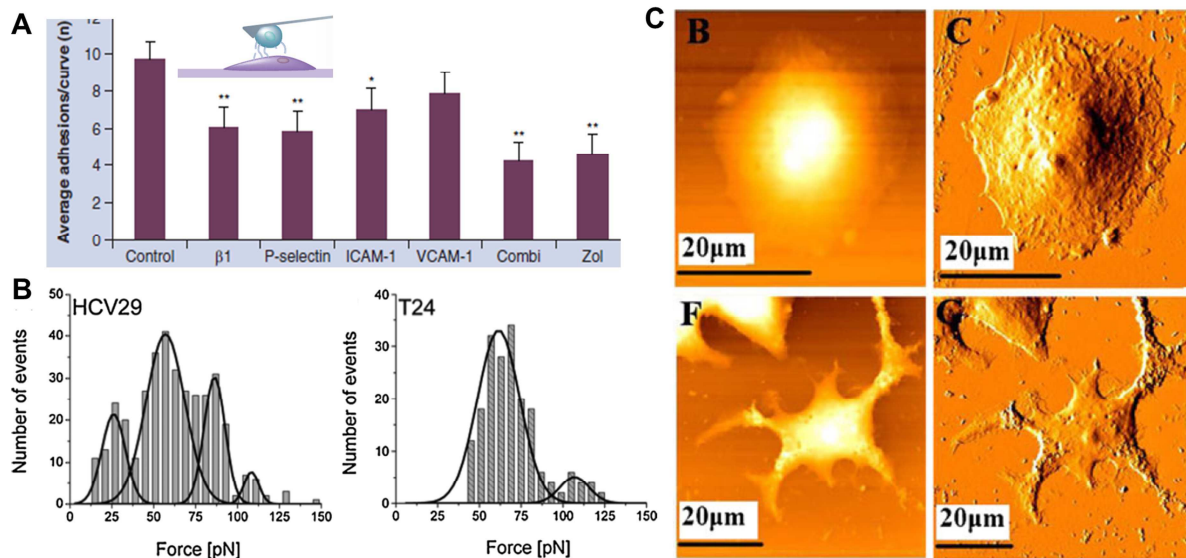


Figure 17: Direct link between cancerous cell elasticity and their interaction with environment. (A) Effect of antibodies against specific cell adhesion molecule and zoledronic acid on tumor–endothelial cell adhesive interactions, control: normal binding between the two type of cell. (B) Distribution of the unbinding force for N-cadherin–GC4 complex in non-malignant HCV29 cells and malignant T24 bladder cells. (C) Morphological changes of MCF-7 cells treated without (B, C) or with (F, G) 30 $\mu\text{g/L}$ BMP2 for 24 h. Reprinted with permission from references (46–48).

Cancerous cell changes in gene expression are directly related to the alteration of their function. The data presented above shows that morphological and force spectroscopy investigation help in resolving and understanding cancer cell mechanism and behavior.

3.2.2 Treatment

After the determination of cancer cell characteristics and its subsequent link to their behavior, the treatment of patient by eradication of tumor is a second challenge for scientists. We will describe in this section the benefice of AFM for treatment efficiency and mode of action studies.

The first step regarding the efficiency of a therapeutic agent is the targeting of the cancer cells and its delivery. Indeed, most of the current chemical does not specifically affect the cancerous cells and thus need to be addressed. AFM can help in determining this targeting by the study of nanocarriers: nanoparticle interaction with melanoma cells (49) or nanoliposomes

containing the well-known cisplatin drug intra cellular delivery in ovarian cancer cells (50). These nanoliposomes have been shown to be well internalized in the cytoplasm in the size range of 100-300 nm (Fig. 18 A). Discrimination of chemical groups adhesion specificity to enhance the targeting of cancerous cell by these nanocarriers can be measured directly on cells by functionalizing the AFM tip with the molecule (51). The functionalization with these type of carriers can also be achieved through antibodies, for example against MUC-1, a cell surface marker for prostate, breast, and lung cancer (52). Some antibodies are able, not only to target the cancer cells, but also to provoke apoptosis of the cell. This is the case of antibodies against epidermal growth factor receptor HER2, namely Trastuzumab and Pertuzumab, which inhibit the dimerization of HER2 with other epidermal growth factor (53). This method has also been used to study two cells interaction and helped to solve Zoledronic acid role on prostate cancer that reduced the adhesive interactions between cancer cells and bone marrow endothelial cells (46).

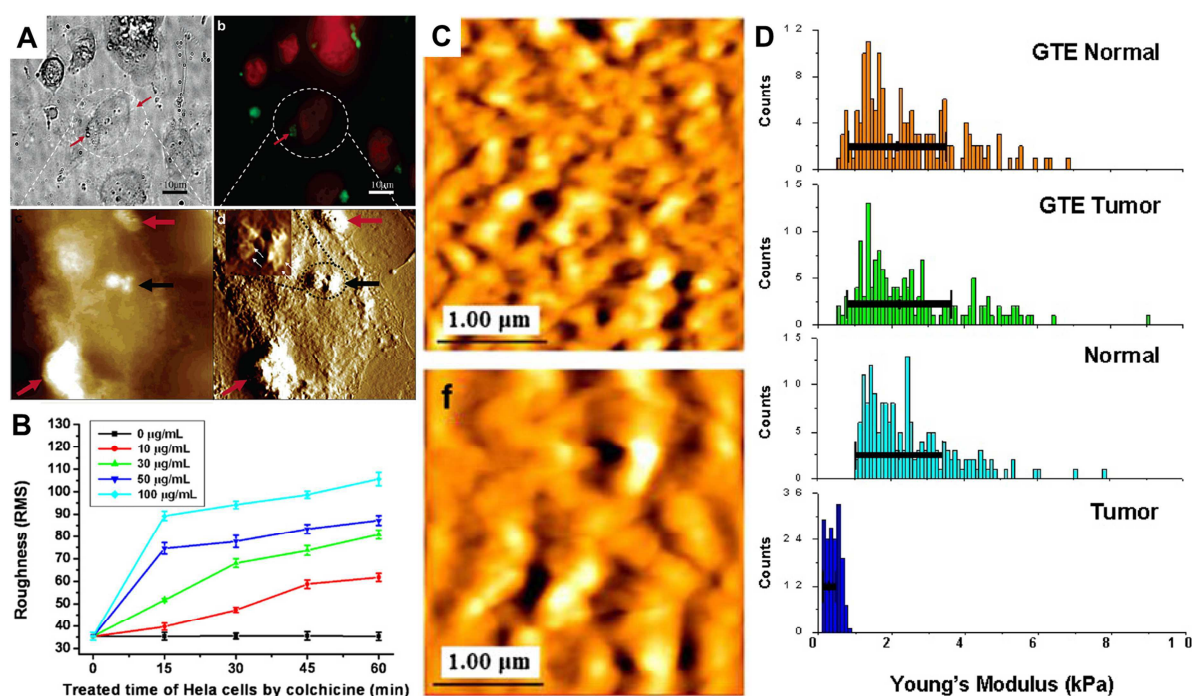


Figure 18: Cancer treatment effects. (A) Internalization of small liposomes containing cisplatin in human ovarian cancer cell line (A2780) after 1h incubation, top left: contrast phase image, top right: fluorescence images nucleus in red and liposomes in green, bottom left: height image, bottom right: error image. Black arrow: pointing at liposomes on cell surface, red arrows: in the cytoplasm. (B) Root-mean-square roughness variation of cell Hela cell membrane along time depending on colchicine dose. (C) AFM topography data of control MCF-7 cells (top) and MCF-7 cells treated with 40 μM alterporriol L (bottom). (D) Young's modulus of patient lung metastatic tumor and normal mesothelial cells before (ctrl) and after treatment with Green Tea Extract (GTE) for 24 h. Reprinted with permission from references (50, 54–56).

As stated in the previous section, interaction with their environment is of importance for cancerous cells. It is one of the effect of immune system on cancer cells, as shown by Braet *et al* that demonstrated that natural killer cells affect the adhesion to substrate properties of colon carcinoma cells (57). As membrane is the interface with cell's environment, it is one of the key actors that scientist look at when investigating anti-cancer treatment effects. Imaging cell surface after treating them with new drugs gives access to the way that drugs affect the cell and can help improving it. Some ex-vivo studies performed on lipid bilayers helped in defining the mechanism of action of anti-cancer compounds by imaging breast cancer cell native membrane rafts (58) or Latarcin2a peptide lytic activity on model membranes (59). Several drug have been studied by imaging membrane on the complete cell: Colchicine on different organs carcinoma cells (dose dependent increase in roughness, Figure 18B) (54), Celecoxib on human colorectal cells (60), Paclitaxel on carcinoma cells (61, 62), Alterporiol on breast cancer cells (dose dependent increase in membrane particule size, Fig. 18 C) (55), lithium unexpected effect on carcinoma cells (63) and curcumin anti-cancer effect on liver cells (64). Membrane is also the site where interactions with the environment occur, and the drug Celastrol affecting the invading capacity of endothelial cell in angiogenesis has been shown to reduce adhesion/affinity to fibronectin protein (65). Ones must not forget that some drugs are affecting inner cell's components, like the bacterial protein Azurin that stabilize the p53 protein and thus enable apoptosis. The molecular details of this interaction have been assessed by AFM (66).

Of course the elasticity of the cell stays a good parameter to judge on the efficiency of a therapeutic molecule, as for example green tea extract that restores selectively the elasticity of cancerous cells thus confirming its anti-cancer non-destructive activity (Fig. 18 D) (56). However, depending on the effect or the cell, elasticity can show a different tendency. For example, elasticity can reflect the apoptotic effect of a drug, then ones must be looking at a decrease in Young modulus values as it is the case for Paclitaxel (61), and an increase in elasticity can label the resistance of tumor cells to an apoptotic agent like for the TRAIL (TNF-related apoptosis inducing ligand) (67).

3.2.3 Futures applications

We have described above the use of AFM for *in vitro* analysis of cancer cells, their properties, and their response to treatment. However the AFM can also be used as a diagnosis tool. *In vitro*, the discrimination between cancerous cells and healthy ones can be achieved by several

assays. First, imaging cells can give answers to the question “are these cells cancerous?”. The down-regulation of tumor suppressor protein as the matrix associated region protein SMAR1 has been studied by roughness measurement at the surface of cancer cells, and an increase in roughness was shown on cancer cells allowing the differentiation between cancer cell and healthy ones (68). Secondly, adhesion measurements can inform on the glycosylation state of the cell, directly correlated to their cancer state (69). As previously mentioned, the elasticity of the cell is a reliable measurement that undoubtedly makes the difference between cancer and non-cancer cells. Cross *et al.* have been the first to study cells from patients and thus gave the first diagnosis on lung, breast, pancreas cells (Fig. 14 C) (32), and later adenocarcinoma (70). The last improvements are turned to biopsies (Fig. 19) (47, 71, 72) and allow the correlation between cancer phenotypes and stiffness. These studies open up the use of AFM for bio-medical application of interest for clinical applications, and recent advances in force-curve analysis may help to finely tune these features (73, 74).

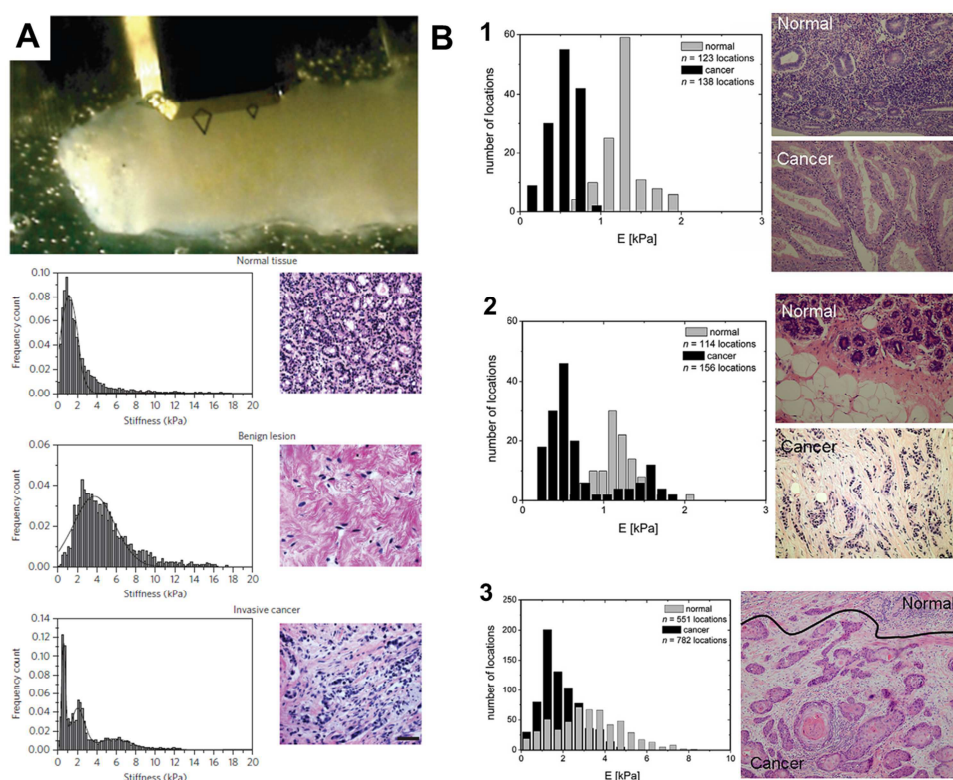


Figure 19: Detection of cancerous cell from patient. (A) Top view of an oriented, immobilized biopsy with the cantilever positioned for AFM measurement. Scale bar, 500 μm . Elasticity of human breast tissue at different step of malignancy. (B) Stiffness distributions in tissues sections accompanied by the corresponding histological staining. (1) Nonneoplastic endometrium (gray columns) and well differentiated endometrioid carcinoma (black columns) of the uterine corpus. (2) Nonneoplastic breast tissue (gray columns) and infiltrating ductal carcinoma (black columns). (3) Vulvar cancer. Black columns denote cancer while gray ones, non-neoplastic parts of the tissue section separated by black line in the histological image. Reprinted with permission from references (71, 72).

References

1. Kobiela, T., K. Lelen-Kaminska, M. Stepulak, M. Lekka, M. Malejczyk, *et al.* 2013. The influence of surfactants and hydrolyzed proteins on keratinocytes viability and elasticity. *Skin Res. Technol. Off. J. Int. Soc. Bioeng. Skin Isbs Int. Soc. Digit. Imaging Skin Isdis Int. Soc. Skin Imaging Issi.* 19: e200–208.
2. Wang, Q., M. Wang, S. Li, X. Xing, X. Liu, *et al.* 2012. AFM detection of mitogen-induced morphological changes in human B lymphocyte. *Scanning.* 34: 60–67.
3. Zhang, X., E.P. Wojcikiewicz, and V.T. Moy. 2006. Dynamic adhesion of T lymphocytes to endothelial cells revealed by atomic force microscopy. *Exp. Biol. Med. Maywood Nj.* 231: 1306–1312.
4. Pfister, G., C.M. Stroh, H. Perschinka, M. Kind, M. Knoflach, *et al.* 2005. Detection of HSP60 on the membrane surface of stressed human endothelial cells by atomic force and confocal microscopy. *J. Cell Sci.* 118: 1587–1594.
5. Beckmann, M., H.A. Kolb, and F. Lang. 1994. Atomic force microscopy of peritoneal macrophages after particle phagocytosis. *J. Membr. Biol.* 140: 197–204.
6. Fritz, M., M. Radmacher, and H.E. Gaub. 1994. Granula motion and membrane spreading during activation of human platelets imaged by atomic force microscopy. *Biophys. J.* 66: 1328–1334.
7. Han, S.-W., S. Mieda, C. Nakamura, T. Kihara, N. Nakamura, *et al.* 2011. Successive detection of insulin-like growth factor-II bound to receptors on a living cell surface using an AFM. *J. Mol. Recognit. Jmr.* 24: 17–22.
8. Qiu, D., J. Xiang, Z. Li, A. Krishnamoorthy, L. Chen, *et al.* 2008. Profiling TRA-1-81 antigen distribution on a human embryonic stem cell. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 369: 735–740.
9. Sugawara, Y., R. Ando, H. Kamioka, Y. Ishihara, S.A. Murshid, *et al.* 2008. The alteration of a mechanical property of bone cells during the process of changing from osteoblasts to osteocytes. *Bone.* 43: 19–24.
10. Domke, Dannöhl, Parak, Müller, Aicher, *et al.* 2000. Substrate dependent differences in morphology and elasticity of living osteoblasts investigated by atomic force microscopy. *Colloids Surf. B Biointerfaces.* 19: 367–379.
11. Eaton, P., V. Zuzarte-Luis, M.M. Mota, N.C. Santos, and M. Prudêncio. 2012. Infection by Plasmodium changes shape and stiffness of hepatic cells. *Nanomedicine Nanotechnol. Biol. Med.* 8: 17–19.
12. Cai, X., S. Gao, J. Cai, Y. Wu, and H. Deng. 2009. Artesunate induced morphological and mechanical changes of Jurkat cell studied by AFM. *Scanning.* 31: 83–89.
13. Hillebrand, U., M. Hausberg, D. Lang, C. Stock, C. Riethmüller, *et al.* 2008. How steroid hormones act on the endothelium--insights by atomic force microscopy. *Pflügers Arch. Eur. J. Physiol.* 456: 51–60.

14. Yersin, A., H. Hirling, S. Kasas, C. Roudit, K. Kulangara, *et al.* 2007. Elastic properties of the cell surface and trafficking of single AMPA receptors in living hippocampal neurons. *Biophys. J.* 92: 4482–4489.
15. Zuk, A., M. Targosz-Korecka, and M. Szymonski. 2011. Effect of selected drugs used in asthma treatment on morphology and elastic properties of red blood cells. *Int. J. Nanomedicine.* 6: 249–257.
16. Li, Y., J. Zhang, and B. Zhang. 2009. Atomic force microscopy study on chlorpromazine-induced morphological changes of living HeLa cells In Vitro. *Scanning.* 31: 259–265.
17. Lasalvia, M., G. Perna, E. Mezzenga, E. Migliorini, M. Lazzarino, *et al.* 2011. Atomic force microscopy investigation of morphological changes in living keratinocytes treated with HgCl₂ at not cytotoxic doses. *J. Microsc.* 243: 40–46.
18. Afrin, R., U.S. Zohora, H. Uehara, T. Watanabe-Nakayama, and A. Ikai. 2009. Atomic force microscopy for cellular level manipulation: imaging intracellular structures and DNA delivery through a membrane hole. *J. Mol. Recognit. Jmr.* 22: 363–372.
19. Liu, Y., J. Feng, L. Shi, R. Niu, Q. Sun, *et al.* 2012. In situ mechanical analysis of cardiomyocytes at nano scales. *Nanoscale.* 4: 99–102.
20. Saenz Cogollo, J.F., M. Tedesco, S. Martinoia, and R. Raiteri. 2011. A new integrated system combining atomic force microscopy and micro-electrode array for measuring the mechanical properties of living cardiac myocytes. *Biomed. Microdevices.* 13: 613–621.
21. Hiesinger, W., M.J. Brukman, R.C. McCormick, J.R. Fitzpatrick III, J.R. Frederick, *et al.* 2012. Myocardial tissue elastic properties determined by atomic force microscopy after stromal cell-derived factor 1 α angiogenic therapy for acute myocardial infarction in a murine model. *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.* 143: 962–966.
22. Genet, G., C. Guilbeau-Frugier, B. Honton, E. Dague, M.D. Schneider, *et al.* 2012. Ephrin-B1 is a novel specific component of the lateral membrane of the cardiomyocyte and is essential for the stability of cardiac tissue architecture cohesion. *Circ. Res.* 110: 688–700.
23. Lee, G.-J., S.-J. Chae, J.H. Jeong, S.-R. Lee, S.-J. Ha, *et al.* 2011. Characterization of mitochondria isolated from normal and ischemic hearts in rats utilizing atomic force microscopy. *Micron Oxf. Engl.* 1993. 42: 299–304.
24. Fels, J., P. Jeggle, K. Kusche-Vihrog, and H. Oberleithner. 2012. Cortical actin nanodynamics determines nitric oxide release in vascular endothelium. *Plos One.* 7: e41520.
25. Miyazaki, H., and K. Hayashi. 1999. Atomic force microscopic measurement of the mechanical properties of intact endothelial cells in fresh arteries. *Med. Biol. Eng. Comput.* 37: 530–536.
26. Chouinard, J.A., G. Grenier, A. Khalil, and P. Vermette. 2008. Oxidized-LDL induce morphological changes and increase stiffness of endothelial cells. *Exp. Cell Res.* 314: 3007–3016.
27. Lekka, M., P. Laidler, D. Gil, J. Lekki, Z. Stachura, *et al.* 1999. Elasticity of normal and cancerous human bladder cells studied by scanning force microscopy. *Eur. Biophys. J. Ebj.* 28: 312–316.
28. Faria, E.C., N. Ma, E. Gazi, P. Gardner, M. Brown, *et al.* 2008. Measurement of elastic properties of prostate cancer cells using AFM. *Analyst.* 133: 1498–1500.

29. Li, Q.S., G.Y.H. Lee, C.N. Ong, and C.T. Lim. 2008. AFM indentation study of breast cancer cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 374: 609–613.
30. Iyer, S., R.M. Gaikwad, V. Subba-Rao, C.D. Woodworth, and I. Sokolov. 2009. Atomic force microscopy detects differences in the surface brush of normal and cancerous cells. *Nat. Nanotechnol.* 4: 389–393.
31. Rosenbluth, M.J., W.A. Lam, and D.A. Fletcher. 2006. Force microscopy of nonadherent cells: a comparison of leukemia cell deformability. *Biophys. J.* 90: 2994–3003.
32. Cross, S.E., Y.-S. Jin, J. Rao, and J.K. Gimzewski. 2007. Nanomechanical analysis of cells from cancer patients. *Nat. Nanotechnol.* 2: 780–783.
33. Lekka, M., P. Laidler, J. Ignacak, M. Łabedz, J. Lekki, *et al.* 2001. The effect of chitosan on stiffness and glycolytic activity of human bladder cells. *Biochim. Biophys. Acta.* 1540: 127–136.
34. Mescola, A., S. Vella, M. Scotto, P. Gavazzo, C. Canale, *et al.* 2012. Probing cytoskeleton organisation of neuroblastoma cells with single-cell force spectroscopy. *J. Mol. Recognit. Jmr.* 25: 270–277.
35. Watanabe, T., H. Kuramochi, A. Takahashi, K. Imai, N. Katsuta, *et al.* 2012. Higher cell stiffness indicating lower metastatic potential in B16 melanoma cell variants and in (-)-epigallocatechin gallate-treated cells. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* .
36. Fuhrmann, A., J.R. Staunton, V. Nandakumar, N. Banyai, P.C.W. Davies, *et al.* 2011. AFM stiffness nanotomography of normal, metaplastic and dysplastic human esophageal cells. *Phys. Biol.* 8: 015007.
37. Leporatti, S., D. Vergara, A. Zacheo, V. Vergaro, G. Maruccio, *et al.* 2009. Cytomechanical and topological investigation of MCF-7 cells by scanning force microscopy. *Nanotechnology.* 20: 055103.
38. Docheva, D., D. Padula, M. Schieker, and H. Clausen-Schaumann. 2010. Effect of collagen I and fibronectin on the adhesion, elasticity and cytoskeletal organization of prostate cancer cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 402: 361–366.
39. Xu, W., R. Mezencev, B. Kim, L. Wang, J. McDonald, *et al.* 2012. Cell stiffness is a biomarker of the metastatic potential of ovarian cancer cells. *Plos One.* 7: e46609.
40. Alcaraz, J., R. Xu, H. Mori, C.M. Nelson, R. Mroue, *et al.* 2008. Laminin and biomimetic extracellular elasticity enhance functional differentiation in mammary epithelia. *Embo J.* 27: 2829–2838.
41. Zhao, G., J. Cui, Q. Qin, J. Zhang, L. Liu, *et al.* 2010. Mechanical stiffness of liver tissues in relation to integrin $\beta 1$ expression may influence the development of hepatic cirrhosis and hepatocellular carcinoma. *J. Surg. Oncol.* 102: 482–489.
42. Lamontagne, C.-A., and M. Grandbois. 2008. PKC-induced stiffening of hyaluronan/CD44 linkage; local force measurements on glioma cells. *Exp. Cell Res.* 314: 227–236.
43. Bastatas, L., D. Martinez-Marin, J. Matthews, J. Hashem, Y.J. Lee, *et al.* 2012. AFM nano-mechanics and calcium dynamics of prostate cancer cells with distinct metastatic potential. *Biochim. Biophys. Acta.* 1820: 1111–1120.

44. Parekh, A., N.S. Ruppender, K.M. Branch, M.K. Sewell-Loftin, J. Lin, *et al.* 2011. Sensing and modulation of invadopodia across a wide range of rigidities. *Biophys. J.* 100: 573–582.
45. Puech, P.-H., K. Poole, D. Knebel, and D.J. Muller. 2006. A new technical approach to quantify cell-cell adhesion forces by AFM. *Ultramicroscopy.* 106: 637–644.
46. Reeves, K.J., J. Hou, S.E. Higham, Z. Sun, J.P. Trzeciakowski, *et al.* 2012. Selective measurement and manipulation of adhesion forces between cancer cells and bone marrow endothelial cells using atomic force microscopy. *Nanomed.* .
47. Lekka, M., D. Gil, W. Dąbroś, J. Jaczewska, A.J. Kulik, *et al.* 2011. Characterization of N-cadherin unbinding properties in non-malignant (HCV29) and malignant (T24) bladder cells. *J. Mol. Recognit. Jmr.* 24: 833–842.
48. Jin, H., J. Pi, X. Huang, F. Huang, W. Shao, *et al.* 2012. BMP2 promotes migration and invasion of breast cancer cells via cytoskeletal reorganization and adhesion decrease: an AFM investigation. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 93: 1715–1723.
49. McNamee, C.E., S. Armini, S. Yamamoto, and K. Higashitani. 2009. Determination of the binding of non-cross-linked and cross-linked gels to living cells by atomic force microscopy. *Langmuir Acs J. Surfaces Colloids.* 25: 6977–6984.
50. Ramachandran, S., A.P. Quist, S. Kumar, and R. Lal. 2006. Cisplatin nanoliposomes for cancer therapy: AFM and fluorescence imaging of cisplatin encapsulation, stability, cellular uptake, and toxicity. *Langmuir Acs J. Surfaces Colloids.* 22: 8156–8162.
51. McNamee, C.E., Y. Aso, S. Yamamoto, Y. Fukumori, H. Ichikawa, *et al.* 2007. Chemical groups that adhere to the surfaces of living malignant cells. *Pharm. Res.* 24: 2370–2380.
52. Sulchek, T., R. Friddle, T. Ratto, H. Albrecht, S. DeNardo, *et al.* 2009. Single-molecule approach to understanding multivalent binding kinetics. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1161: 74–82.
53. Zhang, X., X. Shi, L. Xu, J. Yuan, and X. Fang. 2012. Atomic force microscopy study of the effect of HER 2 antibody on EGF mediated ErbB ligand-receptor interaction. *Nanomedicine Nanotechnol. Biol. Med.* .
54. Wang, J., Z. Wan, W. Liu, L. Li, L. Ren, *et al.* 2009. Atomic force microscope study of tumor cell membranes following treatment with anti-cancer drugs. *Biosens. Bioelectron.* 25: 721–727.
55. Huang, C., H. Jin, B. Song, X. Zhu, H. Zhao, *et al.* 2012. The cytotoxicity and anticancer mechanisms of alterporriol L, a marine bianthraquinone, against MCF-7 human breast cancer cells. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 93: 777–785.
56. Cross, S.E., Y.-S. Jin, Q.-Y. Lu, J. Rao, and J.K. Gimzewski. 2011. Green tea extract selectively targets nanomechanics of live metastatic cancer cells. *Nanotechnology.* 22: 215101.
57. Braet, F., D. Vermijlen, V. Bossuyt, R. De Zanger, and E. Wisse. 2001. Early detection of cytotoxic events between hepatic natural killer cells and colon carcinoma cells as probed with the atomic force microscope. *Ultramicroscopy.* 89: 265–273.

58. Corsetto, P.A., A. Cremona, G. Montorfano, I.E. Jovenitti, F. Orsini, *et al.* 2012. Chemical-physical changes in cell membrane microdomains of breast cancer cells after omega-3 PUFA incorporation. *Cell Biochem. Biophys.* 64: 45–59.
59. Won, A., A. Ruscito, and A. Ianoul. 2012. Imaging the membrane lytic activity of bioactive peptide latarcin 2a. *Biochim. Biophys. Acta.* 1818: 3072–3080.
60. Venkatesan, P., S. Das, M.M.R. Krishnan, C. Chakraborty, K. Chaudhury, *et al.* 2010. Effect of AEE788 and/or Celecoxib on colon cancer cell morphology using advanced microscopic techniques. *Micron Oxf. Engl.* 1993. 41: 247–256.
61. Kim, K.S., C.H. Cho, E.K. Park, M.-H. Jung, K.-S. Yoon, *et al.* 2012. AFM-Detected Apoptotic Changes in Morphology and Biophysical Property Caused by Paclitaxel in Ishikawa and HeLa Cells. *Plos One.* 7: e30066.
62. Wang, X.-P., T.-S. Chen, L. Sun, J.-Y. Cai, M.-Q. Wu, *et al.* 2008. Live morphological analysis of taxol-induced cytoplasmic vacuolization [corrected] in human lung adenocarcinoma cells. *Micron Oxf. Engl.* 1993. 39: 1216–1221.
63. Bai, Z., H. Zhang, L. Zhu, W. Zuo, J. Ye, *et al.* 2010. Lithium inhibits cell volume regulation by acting on chloride channels and modifies ultrastructures of the cell membrane in nasopharyngeal carcinoma cells. *Eur. J. Pharmacol.* 641: 88–95.
64. Jiang, J., H. Jin, L. Liu, J. Pi, F. Yang, *et al.* 2012. Curcumin Disturbed Cell-Cycle Distribution of HepG2 Cells via Cytoskeletal Arrangement. *Scanning.* .
65. Ke, C., H. Jin, and J. Cai. 2012. AFM Studied the Effect of Celastrol on β 1 Integrin-Mediated HUVEC Adhesion and Migration. *Scanning.* .
66. Taranta, M., A.R. Bizzarri, and S. Cannistraro. 2008. Probing the interaction between p53 and the bacterial protein azurin by single molecule force spectroscopy. *J. Mol. Recognit. Jmr.* 21: 63–70.
67. Targosz-Korecka, M., R. Biedron, A.M. Szczygiel, G. Brzezinka, J. Szczerbinski, *et al.* 2012. Stiffness changes of tumor HEp2 cells correlates with the inhibition and release of TRAIL-induced apoptosis pathways. *J. Mol. Recognit. Jmr.* 25: 299–308.
68. Kaul-Ghanekar, R., S. Singh, H. Mangain, A. Jalota-Badhwar, K.M. Paknikar, *et al.* 2009. Tumor suppressor protein SMAR1 modulates the roughness of cell surface: combined AFM and SEM study. *Bmc Cancer.* 9: 350.
69. Lekka, M., P. Laidler, M. Labeledz, A.J. Kulik, J. Lekki, *et al.* 2006. Specific detection of glycans on a plasma membrane of living cells with atomic force microscopy. *Chem. Biol.* 13: 505–512.
70. Cross, S.E., Y.-S. Jin, J. Tondre, R. Wong, J. Rao, *et al.* 2008. AFM-based analysis of human metastatic cancer cells. *Nanotechnology.* 19: 384003.
71. Lekka, M. 2012. Atomic force microscopy: A tip for diagnosing cancer. *Nat. Nanotechnol.* 7: 691–692.
72. Plodinec, M., M. Loparic, C.A. Monnier, E.C. Obermann, R. Zanetti-Dallenbach, *et al.* 2012. The nanomechanical signature of breast cancer. *Nat. Nanotechnol.* 7: 757–765.

73. Murphy, M.F., F. Lilley, M.J. Lalor, S.R. Crosby, G. Madden, *et al.* 2013. Evaluation of a nonlinear Hertzian-based model reveals prostate cancer cells respond differently to force than normal prostate cells. *Microsc. Res. Tech.* 76: 36–41.
74. Sokolov, I., V. Kalparthi, M. Kreshchuk, and M.E. Dokukin. 2012. On averaging force curves over heterogeneous surfaces in atomic force microscopy. *Ultramicroscopy.* 121: 16–24.

C. Problématique

Notre étude a consisté en l'adaptation de la technologie AFM à l'électroperméabilisation. Cette adaptation s'est attachée à réaliser un travail dynamique au cours du temps d'imagerie et de mesure pour exploiter au maximum les ressources de l'AFM. Cela nécessitait de surpasser la technique en l'utilisant de manière rapide pour pouvoir mesurer les effets transitoires des champs électriques. Cette étape a donc requis de la mise au point méthodologique pour capter le phénomène et également la recherche du mode le mieux adapté à la visualisation rapide des effets membranaires. Par la suite, les résultats obtenus nous ont permis d'aller au-delà de la phase d'adaptation, et nous avons pu confirmer des effets déjà observés par des techniques indirectes et en mettre en évidence de nouveaux. Ainsi, l'AFM apparait comme une technique permettant grâce à son regard nano-échelle et une analyse nano-mécanique d'augmenter la compréhension des phénomènes d'électroperméabilisation avec une résolution élevée et sans avoir recours à l'utilisation de marqueurs fluorescents ou de facteurs chimiques.

II. Application de l'AFM à l'étude de l'électroperméabilisation : mesure des effets sur l'élasticité membranaire

La stratégie expérimentale s'est attachée à étudier les effets des champs électriques par imagerie AFM et par spectroscopie de force. Le modèle cellulaire choisi est la cellule CHO, cellule modèle de l'étude mécanistique de l'électroperméabilisation au sein de notre équipe. La perméabilisation étant un effet transitoire, il a été décidé de commencer à travailler sur cellules fixées pour réussir à capter le phénomène et à adapter la technique et les paramètres d'acquisitions avant de travailler sur cellules vivantes adhérentes, dans un environnement contrôlé (température et pH). L'utilisation du mode QI de JPK a permis l'observation membranaire, et la mesure quantitative de l'élasticité membranaire avant et après application des impulsions électriques. Les impulsions électriques utilisées sont celles du transfert de gènes soit 8 x 5 ms, 1 Hz, 400 V/cm pour des cellules adhérentes.

A. « Destabilization induced by électropermeabilization analyzed by Atomic Force Microscopy », article accepté dans le journal Biochimica and Biophysica Acta-Biomembranes en 2013

Dans cet article à paraître dans le journal BBA-Biomembranes il est montré que l'AFM permet l'imagerie et la mesure de la déstabilisation membranaire suite à l'application de champs électriques. L'imagerie au cours du temps montre une déstabilisation transitoire de la membrane plasmique dans les 15 minutes suivant l'application des champs électriques. Les mesures de modules d'Young au cours du temps montrent une diminution de l'élasticité membranaire et un retour progressif vers l'élasticité initiale. Ce changement d'élasticité n'est pas corrélé à la visualisation de la perméabilisation par entrée d'iodure de propidium dans la cellule qui montre une perméabilisation rapide et transitoire. Le retour d'élasticité observé est un phénomène lent, confirmant les études antérieures ayant montré des effets membranaires sur le long terme au niveau de sa capacité à fusionner avec d'autres membranes ainsi que des effets comme la macropinocytose (Rols *et al.*, 1995). De plus, la diminution d'élasticité est observée sur toute la cellule, et pas seulement aux pôles faisant face aux électrodes, introduisant un effet généralisé des champs électriques sur l'ensemble de la cellule contrairement aux observations directes de perméabilisation membranaire par iodure de propidium (Gabriel and Teissié, 1997). Ces informations obtenues par AFM mettent en évidence non pas la perméabilisation membranaire mais d'autres effets nouveaux se généralisant sur toute la cellule.



Destabilization induced by electropermeabilization analyzed by atomic force microscopy



Louise Chopinet^{a,b,c}, Charles Roduit^d, Marie-Pierre Rols^{b,c,*}, Etienne Dague^{a,c,e,**}

^a CNRS, LAAS, 7 avenue du colonel Roche, F-31400 Toulouse, France

^b Centre National de la Recherche Scientifique, Institut de Pharmacologie et de Biologie Structurale (IPBS) UMR 5089, BP64182, 205 route de Narbonne, F-31077 Toulouse Cedex 4, France

^c Univ de Toulouse, LAAS, IPBS, ITAV, F-31400 Toulouse, France

^d Département de Biologie Cellulaire et de Morphologie, Université de Lausanne, Lausanne, Switzerland

^e CNRS, ITAV, USR 3505, F-31106 Toulouse, France

ARTICLE INFO

Article history:

Received 15 March 2013

Received in revised form 29 May 2013

Accepted 31 May 2013

Available online 10 June 2013

Keywords:

Electroporation

Electropermeabilization

Atomic force microscope

Living cells

Cytoskeleton

Stiffness

ABSTRACT

Electropermeabilization is a physical method that uses electric field pulses to deliver molecules into cells and tissues. Despite its increasing interest in clinics, little is known about plasma membrane destabilization process occurring during electropermeabilization. In this work, we took advantage of atomic force microscopy to directly visualize the consequences of electropermeabilization in terms of membrane reorganization and to locally measure the membrane elasticity. We visualized transient rippling of membrane surface and measured a decrease in membrane elasticity by 40%. Our results obtained both on fixed and living CHO cells give evidence of an inner effect affecting the entire cell surface that may be related to cytoskeleton destabilization. Thus, AFM appears as a useful tool to investigate basic process of electroporation on living cells in absence of any staining or cell preparation.

© 2013 Published by Elsevier B.V.

1. Introduction

Electropermeabilization (EP) consists in the local application of electric field pulses to cells and tissues which renders the plasma membrane transiently and locally permeable to non-permeant molecules [1]. This physical method is used in clinics to potentiate the cytotoxic effect of anticancer drugs (electrochemotherapy) [2,3] and has great promise for gene transfer (electrogenotherapy and vaccination) [4–6]. In 2012, more than 3000 patients have been treated by electrochemotherapy, while 8 clinical trials were ongoing.

However the electric field effects are still poorly understood at the molecular level [7]. Indeed, membrane permeabilization had only been indirectly studied by the entry of fluorescent or radioactive markers and countable molecules into cell populations during and after

pulse application [8,9], or by transmembrane potential measurements [7]. Permeabilization has been described as localized at the sides of the cell facing the electrodes [10], which is explained by the change in membrane polarization at these two polar positions regarding electric field (hyperpolarization facing the anode and depolarization facing the cathode) [11]. Furthermore, physical mechanisms at the molecular level described by numerical simulation have shown water wire in lipid bilayer during pulse application [12], indicating lipid abilities to change their transmembrane orientation, in agreement with both theoretical [13] and experimental studies [14]. Finally, lipid loss inducing several membrane alterations (pores, tubules and vesicles formation) has been observed on giant unilamellar vesicles submitted to electric pulses [15]. All these observations tend to prove the existence of lipid disorganization due to electric field application and different ways of membrane destabilization. However, most of these studies used fluorescent dyes that can create some artifact as they are most of the time charged, while simulations were undertaken with non-relevant electrical conditions regarding biological application. Consequently, the need of data recorded directly at the single cell level without any staining or preparation was clearly felt and required further measurements. In this context, our challenge was to visualize the effects of membrane destabilization resulting in permeabilization to small molecules and to perform direct quantitative biophysical measurements using atomic force microscopy (AFM).

Abbreviation: AFM, Atomic Force Microscopy; EP, Electropermeabilization; YM, Young Modulus; CHO, Chinese Hamster Ovary Cell; QI™, Quantitative Imaging™

* Correspondence to: M.-P. Rols, Centre National de la Recherche Scientifique, Institut de Pharmacologie et de Biologie Structurale (IPBS) UMR 5089, BP64182, 205 route de Narbonne, F-31077 Toulouse Cedex 4, France. Tel.: +33 56115811.

** Correspondence to: E. Dague, CNRS, ITAV, USR 3505, FCNRS, LAAS, 7 avenue du colonel Roche, F-31400 Toulouse, France. Tel.: +33 561337841.

E-mail addresses: rols@ipbs.fr (M.-P. Rols), edague@laas.fr (E. Dague).

During the last decades AFM has emerged as a valuable tool to explore the cell membrane biophysical properties [16,17]. We have chosen to use its force spectroscopy mode to measure EP effects on cell membrane elasticity at the single cell level. We used the innovative Quantitative Imaging (QI™) mode from JPK [18], which is a high speed and resolution force volume mode designed for soft and loosely immobilized samples. Based on the force volume mode measurement, QI™ mode allows to record images at a high speed without exerting lateral pressure on the sample [19]. We worked with Chinese hamster ovary (CHO) cells with electrical conditions which were used for gene transfer [20]. It is a commonly used model for electroporation study [9] that has not been much studied by AFM [21]. We studied both fixed and living cells to access the different steps of membrane electropermeabilization. Force measurements allowed quantifying and describing along time the effect, and height images of living cells gave first assumptions on effect of electric field on membrane shape (Fig. 1.A). Nanomechanics revealed that electric field provokes a decrease in YM of plasma membrane by 40% and that the effect observed may be longer than showed by fluorescence imaging after pulse application. This paper states that AFM can be used to study electroporation

phenomenon at the single cell level, and can be a helpful tool to investigate at the basic level of electro-destabilization.

2. Materiel and methods

2.1. Sample preparation

2.1.1. Fixed cells

150,000 Chinese hamster ovary cells (wild type ATCC) were grown during 48 h on a coverslip in minimum Eagle's medium (MEM 0111, Eurobio, France) supplemented with 8% fetal calf serum (Lonza Group Ltd, Switzerland), and incubated at 37 °C in humidified atmosphere with a 5% CO₂ incubator. Prior to electrical pulse application, cells were washed 3 times with phosphate-buffered saline (PBS) 1× (Invitrogen, USA). 1 mL of pulsation buffer (PB) at 4 °C (10 mM K₂HPO₄/KH₂PO₄ buffer, 1 mM MgCl₂, 250 mM sucrose, pH 7.4) was added, electrodes were placed in contact with glass surface and pulses delivered. Immediately after pulse application, PB was removed, and 1 mL of 4% paraformaldehyde solution (Sigma-Aldrich, Saint-Louis, MO) in PBS 1× was added, and coverslip was placed at 4 °C for 30 min.

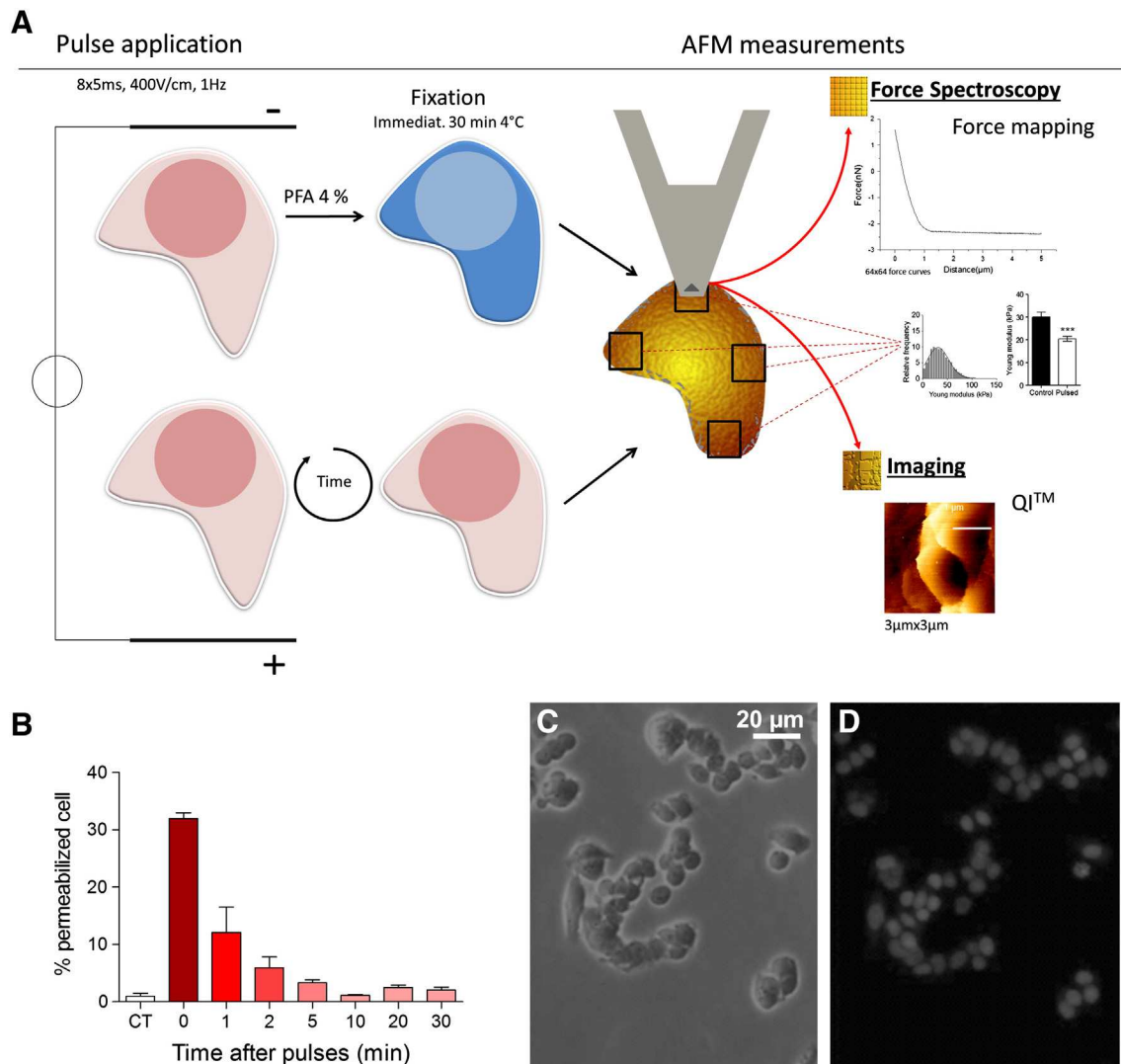


Fig. 1. Experiment outline and permeabilization control. (A) Experiment outline. Cells are pulsed and then either fixed or kept alive to be imaged and measured by AFM. (B) Permeabilization and membrane resealing along time. CT is the control representing cell not subjected to electric pulses. The number of PI positives cells is directly related to the membrane permeabilization and decreases along time. (C) and (D) Phase contrast and fluorescence image of cell 5 min after pulse application with PI.

Before AFM measurements, cells were washed 3 times with PBS 1×. The coverslip was placed on the microscope stage and PBS was added all along the measurement to avoid drying.

2.1.2. Living cells

75,000 CHO cells were grown in Petri dish during 24 h in the same cell culture conditions described in Section 2.1.1. Before measurements, classical MEM medium was replaced by MEM–HEPES medium (CM1MEM46-6U, Eurobio, France) supplemented with 8% fetal calf serum (Lonza Group Ltd, Switzerland) and cells were placed in the PetriDishHeater (JPK) that maintained 30 °C during all the experiment. Before pulse application, head of AFM was removed, cells were washed 3 times with 1 mL PBS 1×, 1 mL PB was added and electrodes were placed in contact with the Petri dish bottom. Pulsed were delivered and AFM head was replaced.

2.2. Electropermeabilization

The generator used for this study was Jouan (Herberlain, France). Electrical parameters for gene transfer were used: 8 square-wave electric pulses of 5 ms duration at 400 V/cm applied at a frequency of 1 Hz through stainless steel parallel electrodes directly on the glass slide (fixed cells) or the Petri dish (living cells) in PB [20].

2.3. Resealing

Adherent cells were pulsed in a Petri dish as previously described then kept at 37 °C or 30 °C and 0.1 mM propidium iodide (PI, Sigma-Aldrich, Saint-Louis, MO) in PB buffer was added at different time after pulse exposure. Fluorescence (Leica DMRIB microscope, filter: BP 515–560, Mirror 590, LP 590, 40× objective) and phase contrast images of cells were recorded and number of PI positives cells were counted thanks to ImageJ software, as well as total number of cell per plan. The ratio between the two numbers minus the number of dead cells gave the percentage of permeabilized cells.

2.4. AFM measurements

An AFM Nanowizard 3 (JPK Instrument, Berlin, Germany) was used. We used MLCT cantilevers (Bruker probes, USA) with spring constant ranging from 0.028 to 0.042 N·m⁻¹. QI™ and force mapping settings used were the following: Z-length 5 μm; applied force 4 nN; speed: 166 μm/s for QI™ imaging on fixed cells, 1000 μm/s for living cells; 24.98 μm/s for force mapping. Before each experiment, sensitivity and spring constant (thermal noise method [22]) of cantilever were calibrated.

2.5. Data analysis

JPK data processing software was used for image processing. Images were flattened (order 1) and a 3D projection was made. The Hertz model gives the force F as a function of the indentation (δ) and of the Young modulus (YM). The opening angle (α) of this sort of tip was 35° and we arbitrary choose a Poisson ratio (ν) of 0.5. $F = ((2 \cdot E \cdot \tan \alpha) / (\pi \cdot (1 - \nu^2))) \cdot \delta^2$. OpenFovea 0.1a152 software was used for force curve analysis with the following settings: model: cone; tip size: 0.62 rad; Poisson ratio: 0.5; method: raw. Frequency distributions were obtained with OriginPro 8 software, and histograms were plotted with GraphPad Prism software, that was used for statistical analysis too.

3. Results

To access the membrane destabilization effects, we performed two types of measurements on CHO cells, one on cells fixed directly after EP in order to capture the first step of destabilization at high resolution (that was time consuming and incompatible with living

cell dynamics), and one on living cell to record dynamic along time. On each cell we explored 4 regions on the cell membrane: 2 regions in front of the electrodes (where membrane permeabilization occurred) and 2 regions perpendicular to the electric field as indicated on Fig. 1.A. Because of the permeabilization pattern around the cell [11], we wanted to make measurement at these places to detect any evidence of preferential effect whether the areas are facing the electrode or not. Force measurement and imaging were recorded on these areas for fixed cells. For living cell, only force measurements were performed on these areas, and whole cells were imaged along time. Each single force curve has been analyzed to extract the tip indentation and fit it with the Hertz model. OpenFovea software [23] had been used to extract the Young modulus (YM) values on the first 50 nm of indentation, including membrane and as few inner cell component as possible [24]. The results were analyzed both qualitatively through elasticity map and quantitatively by pooling all the data in frequency distribution and histograms.

The membrane permeabilization had been 'classically' visualized by propidium iodide (PI) entry into the cells which is possible only when the membrane is permeable [7] (Fig. 1.B–D). Under the electric field conditions used at 37 °C, around 30% of the cells were permeabilized and viable just after EP. Adding PI at different times after EP allowed us to assess the lifetime of the permeabilization process. As shown Fig. 1.B, membrane recovery occurred in less than 10 min. At that time, the number of permeabilized cells were, indeed, not different from control condition.

3.1. Experiments on fixed cells

In the first AFM experiment, cells were fixed immediately after EP. This allowed us to perform AFM measurements on cells that 'froze' in less than 1 min after EP. Imaging cells with the QI™ mode showed a bumpy membrane without any indication of specific alteration due to electric pulses, even at higher magnification, compared to control cells (Fig. 2.A–B and supplementary data Figs. 1–2). We therefore explored 4 regions on the cell membrane: 2 regions in front of the electrodes (where membrane permeabilization occurred) and 2 regions perpendicular to the electric field as indicated on Fig. 2.B (where no permeabilization is induced by the EP according to fluorescent images [11]). In each regions of interest ($3 \times 3 \mu\text{m}^2$), a force map of 64×64 force curves was recorded (4096 curves). As shown by elasticity map, stiff areas are present on control cell (heterogeneous pattern), and pulsed regions are on the whole soft and homogeneous (Fig. 2.C and D). This decrease in stiffness is visible on force-curve profiles (Fig. 2.E), that shows measurement of a soft surface after pulse application as the force increases slower. Surprisingly, no significant or repeatable differences have been measured between regions facing electrodes and the other ones (See Table A and Figs. 1–2 of supplementary data). This result indicates a propagation of the effect on the whole membrane, the decrease in stiffness being measured uniformly around the cell. When merging the YM data of the 4 regions, this change in elasticity was quantitatively measured: YM of the plasma membrane being significantly decreased from 30.0 ± 2.0 kPa for untreated cells to 20.5 ± 1.0 kPa for electropermeabilized cells (Fig. 2.F). This decrease in the average YM value is paired with a reduction of the standard deviation indicating a rapid homogenization and a global change of membrane elasticity (Fig. 2.G). These results give evidence for global propagation around the cell of the perturbation/reorganization on membrane in the minute following EP.

3.2. Experiments on living cells

In a second set of experiments, EP had been directly performed on the AFM stage on living cells with the same electrodes and electrical parameters. We took advantage of the AFM ability to work in liquid at controlled temperature to slow down the process working at 30 °C.

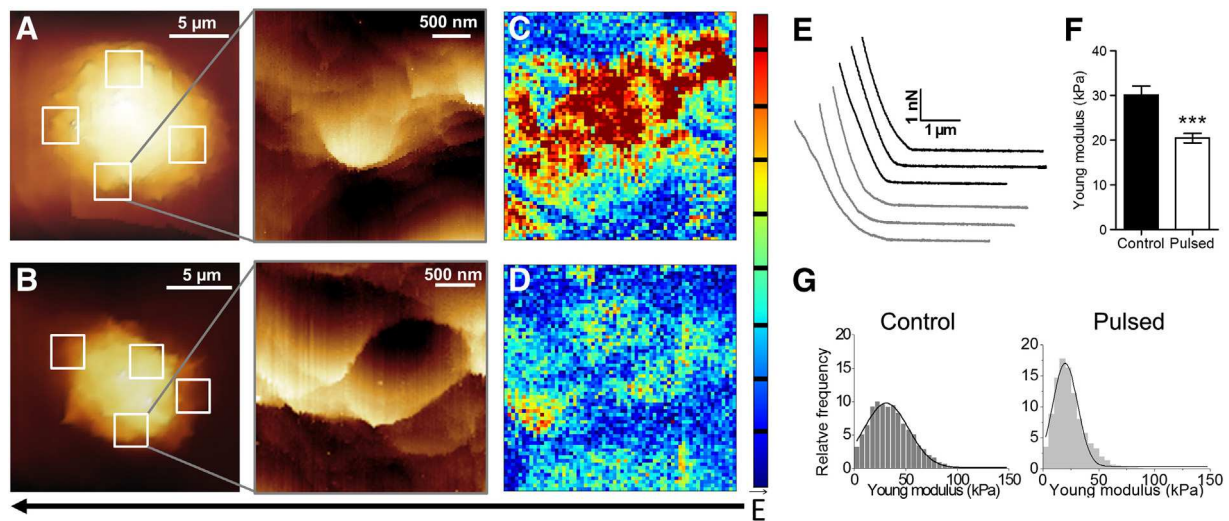


Fig. 2. Images and elasticity of plasma membrane on fixed cells. (A) QI™ image (z range = $7 \mu\text{m}$, 256 px^2) of one fixed control CHO cell (3D projection). White boxes: localization of region where force volume measurements are done (64×64 force curves). QI™ image of one of these $9 \mu\text{m}^2$ region is presented (z range = $1 \mu\text{m}$, 128 px^2). (B) QI™ image (z range = $7 \mu\text{m}$, 256 px^2) of one CHO cell fixed immediately after pulse application (3D projection) and magnification: QI™ image of one $9 \mu\text{m}^2$ area (z range = $1 \mu\text{m}$, 128 px^2). White boxes: localization of region where force volume measurements are done (64×64 force curves). QI™ image of one of these $9 \mu\text{m}^2$ regions is presented (z range = $1 \mu\text{m}$, 128 px^2). (C) and (D) Elasticity maps of the corresponding area magnified in A and B (colors scale: 8 kPa per black dash). (E) Force curve profiles, black: control, gray: pulsed cells. (F) YM values for control ($n = 3$), and fixed cells ($n = 3$) (mean \pm SEM), all YM values of the 3 cells are plotted ($n = 49,000$). Statistical test: unpaired t -test, *** P value < 0.0001 . (G) Frequency distribution of YM values for one region measured of one control and one fixed cell ($n = 4096$ force curves for each histogram) and mean value (kPa) extracted from Gaussian fit \pm error.

3.2.1. Imaging

Fig. 3.A presents AFM height images of a control cell not submitted to electroporation where no change in membrane surface is detected. Underlying the cytoskeleton fibers are detected under the membrane all the time (see supplementary data Figs. 3 and 4 for a detailed analysis of images). In Fig. 3.B a cell had been imaged and measured before and after EP. QI™ imaging of cells shows a well-organized membrane before EP (Fig. 3.B.1). Indeed, few membrane extensions are visible and membrane surface is quite homogeneous and smooth compared to post-pulse membrane (see supplementary data Fig. 4 for a detailed analysis of these images). Between 3 and 15 min after EP,

cell membrane is still disturbed (Fig. 3.B.2). A lot of extensions rippling membrane are visible around the cell. The numerical zoom shows a magnification of this rippling. Additionally to this observed effect, the absence of cytoskeleton fibers under the membrane surface indicates a relaxed structuration. 23 min after pulse application the cell spreads out again thanks to the cytoskeleton that is visible again, plasma membrane had recovered its structure, and is as smooth as before EP (Fig. 3.B.3). Cross sections of living cells images (Fig. 4, see Fig. 3 for localization of sections) revealed no significant change in cell height after EP (2 cells on 3 showed a slight increase in height of about $1 \mu\text{m}$, see supplementary data Fig. 4), but an

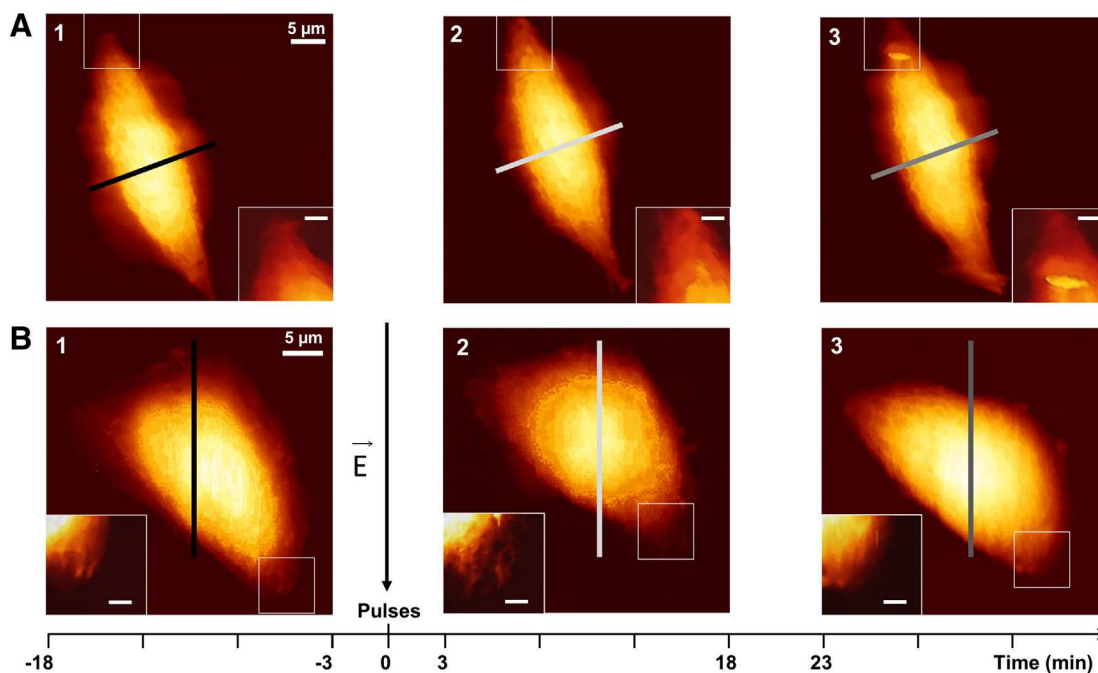


Fig. 3. Living cells images. (A) QI™ height image (z range = $7 \mu\text{m}$) of a control cell along time. No pulsation but change from culture medium to pulsation buffer at $t = 0$ min. Inserts show numerical zoom and membrane detail (scale bar = $1 \mu\text{m}$). (B) QI™ height image (z range = $7 \mu\text{m}$) of one CHO cell before (1), 3 min (2) and 23 min (3) after pulse application with time scale. Inserts show numerical zoom and membrane details (scale bar = $1 \mu\text{m}$).

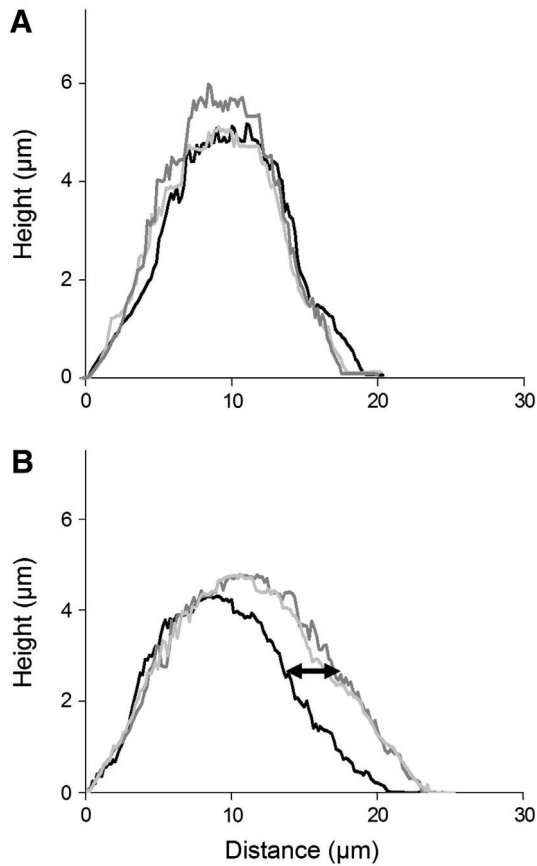


Fig. 4. Cross section along axis indicated for one control (A) and one pulsed cells (B) presented in Fig. 3. Black line: before EP, light-gray: 15 min after EP, dark-gray: 30 min after EP. The double arrow indicates the swelling induced by electroporation.

increase in cell width of about $4.71 \mu\text{m}$ (± 0.73 , $n = 3$). This phenomenon of cell swelling had already been observed by optical microscopy [25].

3.2.2. Elasticity measurements

We then measured the elasticity of plasma membrane at various times after EP, still at 30°C . As for fixed cells, 4 regions were explored in a sequential manner along time, 16×16 force volumes have been recorded. Elasticity maps of these regions along time show, as for fixed cell, a heterogeneous distribution of stiff areas before pulse application and a decrease in elasticity combined to its spatial homogenization 8 min after the pulse (Fig. 5.A and supplementary data Fig. 5 for the 4 regions of one cell). The return of stiff areas is visible as soon as 17 min after pulse application. As previously observed, force curve profiles are changing undoubtedly showing the effect of EP on elasticity and its recovery (Fig. 5.B). No changes related to electric field direction has been observed between the 4 regions measured (See Table B in supplementary data for 6 different cells representing 61% of the total measured cell, 31% of cells showing no effect to EP, and 8% dying). The histograms (Fig. 5.C–D) present the merged results of the 4 regions for the meantime, for one control cell and one pulsed cell, respectively. The raw data are quite different from fixed cell but this can be explained by the fixation method that unambiguously makes the membrane stiffer. YM value decreases just after EP (from 18.8 ± 2.0 kPa to 11.2 ± 0.5 kPa at 8 min, Fig. 5.D). Then, this value increases slowly and tends to reach the initial value 35 min after EP. This recovery is not correlated to plasma membrane resealing, as an event at 30°C , a membrane resealing is operated in less than 10 min (Fig. 5.E).

4. Discussion

This study shows the impact of electrical pulses at the plasma membrane level in the minute following permeabilization through direct imaging of cell membrane and measurement of its stiffness.

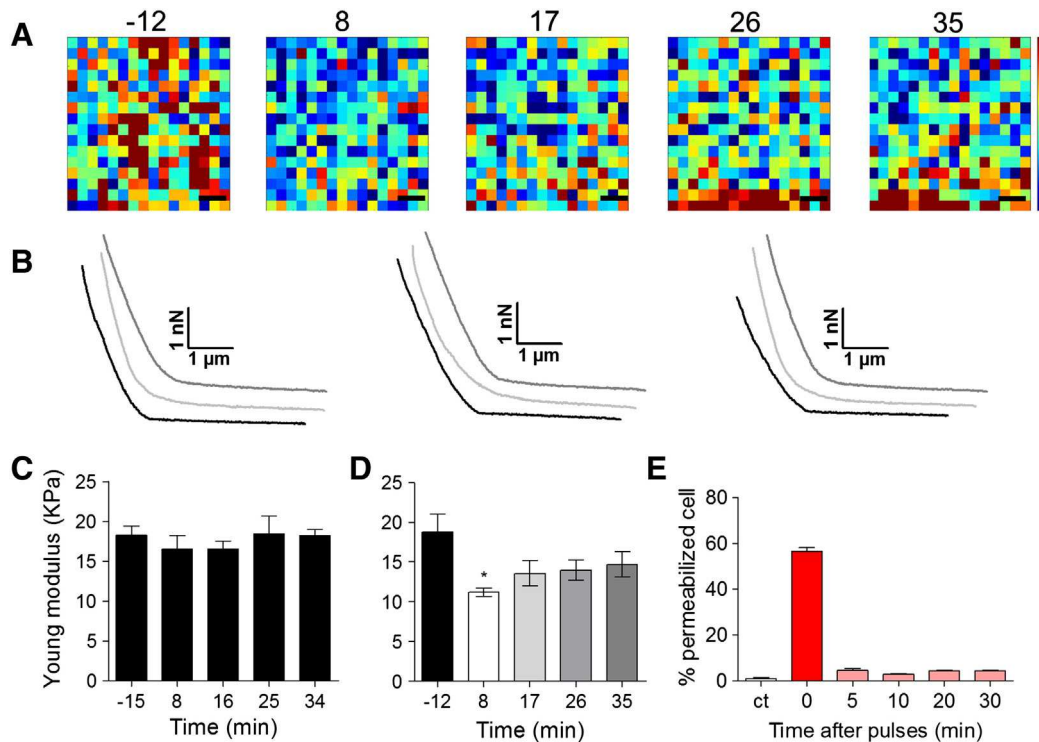


Fig. 5. Living cell measurements. (A) Elasticity map for 1 region measured along time (color scale maximum: 36 kPa). (B) Force curve profiles, 3 examples. Black: before pulse application, light gray: 8 min after EP, dark gray: 35 min after EP. (C) YM values (see Fig. 1 for force curve acquisition pattern) for one cell without pulse application but pulsation buffer addition at $t = 0$ min ($n = 1024$ force curves, mean \pm SEM). The time indicates the half of the total time required to record all the data for one point. (D) YM values for a cell before and after pulses application at $t = 0$ min. Statistical test: unpaired *t*-test, *P value < 0.05 ($n = 1024$ force curves, mean \pm SEM). (E) Permeabilization and membrane resealing along time at 30°C in PB.

Results show that electric field provokes a change in membrane elasticity, namely an increase in softness characterized by a decrease in YM values. We have performed the measurements which are the closest possible to pulse application by fixing the cells, but still, the measurements were recorded on the cells that are froze in the minute following EP. The permeabilization and the membrane resealing are occurring in the millisecond and second range following pulse application [7]. Thus, the effect measured is not the direct permeabilization of membrane, but a longer effect that is still present in the minutes following EP (Fig. 2). Both theory describing the electropermeabilization process and experiments of fluorescent molecule uptake which were performed on the cells, state that electropermeabilization is induced on the side of the cells facing the electrodes because of the membrane polarization changes. In our conditions no differences in stiffness decrease have been measured depending on electric field direction (Table A supplementary data). We conclude that AFM allows sensing a different effect of EP than standard fluorescent microscopy using PI detection uptake does, as it is happening later than permeabilization and on the whole cell. Experiments on living cell confirm this hypothesis. Indeed, by decreasing the temperature, we managed to record the same decrease in stiffness after pulse application (Fig. 5.A–D). Stiffness measurements along time show a slow recovery process that tends to reach initial cell stiffness 35 min after EP. However, at 30 min after pulse application, even at 30 °C, the membrane is completely resealed (Fig. 5.E), which confirms that no direct link between permeabilization event and the decrease in stiffness can be done. These observations show that the decrease in stiffness is a dynamic process that is present after membrane permeabilization and can be slowed down by a decrease in temperature. All together, these measurements lead to the conclusion that even if membrane permeabilization is locally induced in specific regions of the cell and is transient (fluorescence imaging), its consequences on stiffness are global and still present when membrane resealing has occurred.

Height images of living cells show post-electroporated membrane and give evidence of real membrane disorganization and a complete re-organization for the first time on living cells (Fig. 3 and supplementary data Figs. 3–4). These observations of the visible effect of EP on cell membrane shown by AFM images may not be induced only by membrane disorganization but also by cytoskeleton reorganization as stress fibers are not visible from 15 to 23 min after EP (Fig. 3.B.2).

Images give also access to height and width parameter of the cells. Cell swelling has been measured after electroporation (Fig. 4) in agreement with previous studies [25]. However, this effect that is due to water entry into cell cytoplasm cannot be considered as the first cause of decrease in elasticity after EP. Indeed, we extracted the Young modulus value by fitting the indentation curve by a Hertz model. This Young modulus reflects the elasticity of our sample. Changes due to osmotic pressure can be calculated through the spring constant of the sample, but is not reflected by the Young modulus [26]. Thus the data we present in Fig. 4 do not reflect the change in osmotic pressure shown by swelling. Moreover, an increase in cell size should indicate an increase in stiffness as more volume must be contained in the same compartment that is the plasma membrane. Here we measure a decrease in stiffness, so the opposite, will confirm that we see the membrane destabilization and not the effect of cell swelling.

Thanks to OpenFovea software [23] we chose to measure elasticity of the 50 first nanometers in contact with the tip, containing the plasma membrane, but also the transmembrane proteins, and the part of the cytoskeleton network branched on these proteins or directly on lipids [27–29]. The change in elasticity may thus not be a measurement of lipid bilayer disorganization but may reflect an internal effect of EP which affects plasma membrane. All together, the data presented lead to the hypothesis that AFM measures a dynamic effect of EP on the internal structure of the cell which lasts longer than membrane permeabilization and recovers slowly. As images show the absence of

cytoskeleton fibers after pulse application, we hypothesize that this is linked to cortical actin, as proposed by Fels et al. [30]. Several papers showed the actin restructuration after EP [20,31] or its role in membrane permeabilization [32] and thus support the implication of actin in the measured effect. Cortical actin network being linked to membrane, the destabilization of lipids during pulse application may destabilize actin interactions, thus reducing membrane resistance to an external pressure, resulting in a decrease in stiffness. Force measurements give quantitative data about this destabilization by showing a decrease in stiffness of the membrane happening later than membrane permeabilization, and lasting longer, confirming the side effect and not the direct effect of electric pulses. Changes in membrane shape (rippling) and cell swelling contribute to the assumption that as lipids are disturb, direct interaction between cortical actin network and plasma membrane is not preserved during pulse application, as it can be interpreted like the detachment of membrane lipid bilayer from cortical actin grid (swelling) and its movement free of any anchorage (rippling). This detachment may explain why no actin fibers were imaged during the 15 min following pulse application. Even if this interpretation is convenient, the actual observations do not allow concluding whether membrane detachment hypothesis is the good one. Indeed, the membrane elasticity may also reflect the destabilization of the actin fiber structure itself. Moreover, it must not be forgotten that tubulin fibers can also have a role in the described phenomenon, as microfilament has also been shown to be affected by electropermeabilization [31,33].

5. Conclusion

For the first time, we succeed to measure changes in living cell membrane elasticity and membrane shape due to EP process through physical measurements by AFM in real time. We demonstrate in this study that AFM can be used for electroporation process investigation and may allow further quantification of the destabilization process in terms of elasticity. First, stiffness data gives new insight of the permeabilization process showing a lasting effect of EP. Measurements of this process are possible and numerical data are obtained. Data obtained on fixed cell, although giving YM values modified by fixation, are useful because they can give access to information at a specific moment of EP phenomenon. Secondly, height images of membrane and living cells at high resolution can be recorded and give direct visual information about EP effect. Eventually, we show here that AFM senses a side effect of EP, linked to membrane permeabilization and that may be related to cytoskeleton.

This new way of analysis can open the field of characterization of cell type sensibility to electric field and help in electrical parameter optimization. Assuming that membrane response to EP is related to cytoskeleton, next measurements will focus on its implication.

Acknowledgements

We thank J-M Escoffre, J. Teissié and René Vezinet (CEA, DAM, GRAMAT, F-46500 Gramat, France) for the stimulating discussions. Direction Générale de l'Armement (L. Chopinet 3 years PhD grant from DGA/MRIS) and Agence Nationale de la Recherche (Young Scientist Program "AFMyst" ANR-11-JSV5-001-01, n°(SD) 30024331) provided financial support. This research was conducted in the scope of the EBAM European Associated Laboratory (LEA). ED and MPR are researchers at the Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS).

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data to this article can be found online at <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbame.2013.05.035>.

References

- [1] E. Neumann, K. Rosenheck, Permeability changes induced by electric impulses in vesicular membranes, *J. Membr. Biol.* 10 (1972) 279–290.
- [2] L.M. Mir, Bases and rationale of the electrochemotherapy, *Eur. J. Cancer Suppl.* 4 (2006) 38–44.
- [3] E. Spugnini, Book review of: “Clinical aspects of electroporation” by Stephen T Kee, Julie Gehl, Edward W Lee, *Biomed. Eng. Online* 10 (2011) 89.
- [4] A.I. Daud, R.C. DeConti, S. Andrews, P. Urbas, A.I. Riker, V.K. Sondak, P.N. Munster, D.M. Sullivan, K.E. Ugen, J.L. Messina, R. Heller, Phase I trial of interleukin-12 plasmid electroporation in patients with metastatic melanoma, *J. Clin. Oncol.* 36 (2009) 5896–5903.
- [5] L. Low, A. Mander, K. McCann, D. Dearnaley, T. Tjelle, I. Mathiesen, F. Stevenson, C.H. Ottensmeier, DNA vaccination with electroporation induces increased antibody responses in patients with prostate cancer, *Hum. Gene Ther.* 20 (2009) 1269–1278.
- [6] Y. Tamzali, L. Borde, M.P. Rols, M. Golzio, F. Lyazrhi, J. Teissie, Successful treatment of equine sarcoids with cisplatin electrochemotherapy: a retrospective study of 48 cases, *Equine Vet. J.* 44 (2012) 214–220.
- [7] J. Teissie, M. Golzio, M.P. Rols, Mechanisms of cell membrane electropermeabilization: a minireview of our present (lack of ?) knowledge, *Biochim. Biophys. Acta Gen. Subj.* 1724 (2005) 270–280.
- [8] G. Pucihar, T. Kotnik, D. Miklavcic, J. Teissie, Kinetics of transmembrane transport of small molecules into electropermeabilized cells, *Biophys. J.* 95 (2008) 2837–2848.
- [9] B. Valic, M. Golzio, M. Pavlin, A. Schatz, C. Faurie, B. Gabriel, J. Teissie, M.-P. Rols, D. Miklavcic, Effect of electric field induced transmembrane potential on spheroidal cells: theory and experiment, *Eur. Biophys. J.* 32 (2003) 519–528.
- [10] J.-M. Escoffre, T. Portet, C. Favard, J. Teissie, D.S. Dean, M.-P. Rols, Electromediated formation of DNA complexes with cell membranes and its consequences for gene delivery, *Biochim. Biophys. Acta* 1808 (2011) 1538–1543.
- [11] J.-M. Escoffre, T. Portet, L. Wasungu, J. Teissie, D. Dean, M.-P. Rols, What is (still not) known of the mechanism by which electroporation mediates gene transfer and expression in cells and tissues, *Mol. Biotechnol.* 41 (2009) 286–295.
- [12] M. Tarek, Membrane electroporation: a molecular dynamics simulation, *Biophys. J.* 88 (2005) 4045–4053.
- [13] Z.A. Levine, P.T. Vernier, Life cycle of an electropore: field-dependent and field-independent steps in pore creation and annihilation, *J. Membr. Biol.* 236 (2010) 27–36.
- [14] A. Lopez, M.P. Rols, J. Teissie, 31P NMR analysis of membrane phospholipid organization in viable, reversibly electropermeabilized Chinese hamster ovary cells, *Biochemistry* 27 (1988) 1222–1228.
- [15] T. Portet, F. Camps i Febrer, J.-M. Escoffre, C. Favard, M.-P. Rols, D.S. Dean, Visualization of membrane loss during the shrinkage of giant vesicles under electropulsation, *Biophys. J.* 96 (2009) 4109–4121.
- [16] D.J. Müller, Y.F. Dufrêne, Atomic force microscopy: a nanoscopic window on the cell surface, *Trends Cell Biol.* 21 (2011) 461–469.
- [17] M. Sun, J.S. Graham, B. Hegedüs, F. Marga, Y. Zhang, G. Forgacs, M. Grandbois, Multiple membrane tethers probed by atomic force microscopy, *Biophys. J.* 89 (2005) 4320–4329.
- [18] JPK instrument, QI technical report, <http://www.jpk.com/jpk-tech-quantitative-imaging.download.809b337b01062d2f968b2354a2270a4b.pdf> 2012.
- [19] L. Chopinet, C. Formosa, M.P. Rols, R.E. Duval, E. Dague, Imaging living cells surface and quantifying its properties at high resolution using AFM in QI™ mode, *Micron*, 2013.
- [20] C. Rosazza, J.-M. Escoffre, A. Zumbusch, M.-P. Rols, The actin cytoskeleton has an active role in the electrotransfer of plasmid DNA in mammalian cells, *Mol. Ther.* 19 (2011) 913–921.
- [21] H. Lucius, T. Friedrichson, T.V. Kurzchalia, G.R. Lewin, Identification of caveolae-like structures on the surface of intact cells using scanning force microscopy, *J. Membr. Biol.* 194 (2003) 97–108.
- [22] J.L. Hutter, J. Bechhoefer, Calibration of atomic-force microscope tips, *Rev. Sci. Instrum.* 64 (1993) 1868–1873.
- [23] C. Roduit, B. Saha, L. Alonso-Sarduy, A. Volterra, G. Dietler, S. Kasas, OpenFovea: open-source AFM data processing software, *Nat. Methods* 9 (2012) 774–775.
- [24] C. Roduit, F.G. van der Goot, P. De Los Rios, A. Yersin, P. Steiner, G. Dietler, S. Catsicas, F. Lafont, S. Kasas, Elastic membrane heterogeneity of living cells revealed by stiff nanoscale membrane domains, *Biophys. J.* 94 (2008) 1521–1532.
- [25] M. Golzio, M.P. Mora, C. Raynaud, C. Delteil, J. Teissie, M.P. Rols, Control by osmotic pressure of voltage-induced permeabilization and gene transfer in mammalian cells, *Biophys. J.* 74 (1998) 3015–3022.
- [26] X. Yao, J. Walter, S. Burke, S. Stewart, M.H. Jericho, D. Pink, R. Hunter, T.J. Beveridge, Atomic force microscopy and theoretical considerations of surface properties and turgor pressures of bacteria, *Colloids Surf. B: Biointerfaces* 23 (2002) 213–230.
- [27] J. Gilden, M.F. Krummel, Control of cortical rigidity by the cytoskeleton: emerging roles for septins, *Cytoskeleton (Hoboken)* 67 (2010) 477–486.
- [28] J. Saarikangas, H. Zhao, P. Lappalainen, Regulation of the actin cytoskeleton-plasma membrane interplay by phosphoinositides, *Physiol. Rev.* 90 (2010) 259–289.
- [29] G.R. Chichili, W. Rodgers, Cytoskeleton-membrane interactions in membrane raft structure, *Cell. Mol. Life Sci.* 66 (2009) 2319–2328.
- [30] J. Fels, P. Jeggler, K. Kusche-Vihrog, H. Oberleithner, Cortical actin nanodynamics determines nitric oxide release in vascular endothelium, *PLoS One* 7 (2012) e41520.
- [31] C. Kanthou, S. Kranjc, G. Sersa, G. Tozer, A. Zupanic, M. Cemazar, The endothelial cytoskeleton as a target of electroporation-based therapies, *Mol. Cancer Ther.* 5 (2006) 3145–3152.
- [32] M.P. Rols, J. Teissie, Experimental evidence for the involvement of the cytoskeleton in mammalian cell electropermeabilization, *Biochim. Biophys. Acta* 1111 (1992) 45–50.
- [33] C. Blangero, M.P. Rols, J. Teissie, Cytoskeletal reorganization during electric-field-induced fusion of Chinese hamster ovary cells grown in monolayers, *Biochim. Biophys. Acta* 981 (1989) 295–302.

Destabilization induced by électropermeabilization analyzed by Atomic Force Microscopy

Louise Chopinet^{abc}, Charles Roduit^d, Marie-Pierre Rols^{bc*} and Etienne Dague^{ace*}

a Centre National de la Recherche Scientifique, Laboratoire d'Analyse et d'Architecture des Systèmes (LAAS), Toulouse, 4 France ; 7 avenue du colonel Roche, F-31077 Toulouse Cedex 4, France.

b Centre National de la Recherche Scientifique ; Institut de Pharmacologie et de Biologie Structurale (IPBS) UMR 5089 ; BP64182, 205 route de Narbonne, F-31077 Toulouse Cedex 4, France.

c Université de Toulouse ; UPS, INSA, INP, ISAE ; UT1, UTM, LAAS, ITAV ; F-31077 Toulouse Cedex 4, France

d Département de Biologie Cellulaire et de Morphologie, Université de Lausanne, Lausanne, Switzerland

e Centre National de la Recherche Scientifique ; Institut des Technologies Avancées en Sciences du Vivant (ITAV) UMS3039 ; F31106 Toulouse, France

* Corresponding authors: edague@laas.fr +33561337841, rols@ipbs.fr +3356115811

Supplementary data

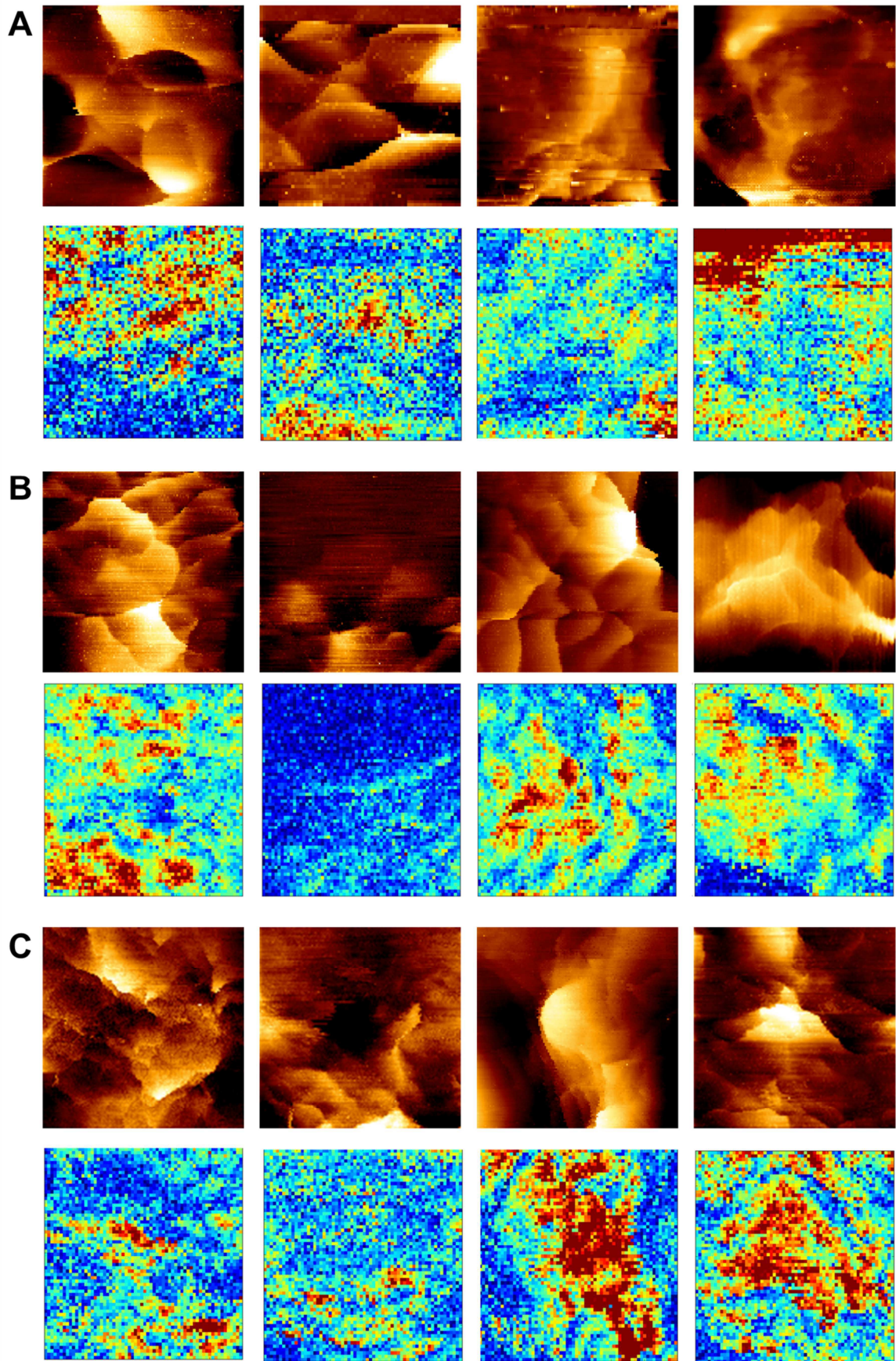


Figure 1: Height images (z-range = 1 μm) and corresponding elasticity maps (color scale = 79 kPa) of the 4 areas of 3 control cells.

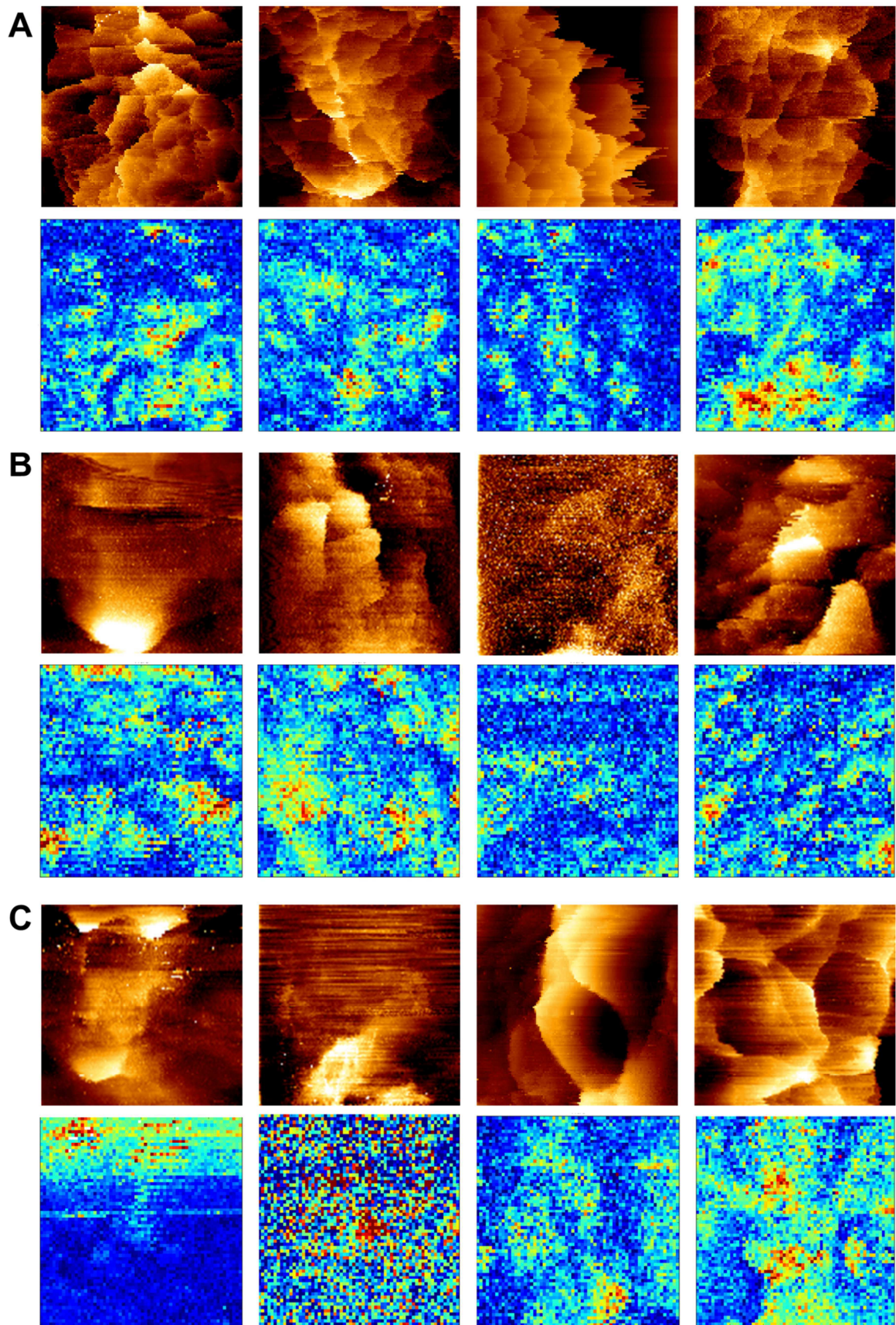


Figure 2: Height images (z -range = $1\ \mu\text{m}$) and corresponding elasticity maps (color scale = $79\ \text{kPa}$) of the 4 areas of 3 pulsed cells.

Young modulus (kPa)		Cathode (-)	Left	Anode (+)	Right
Pulsed	Mean	16	23,4	20,5	9,5
	SD	9,5	12	11,4	10,8
	Mean	18	24	15	19,3
	SD	12,4	13,5	9	10,4
	Mean	28,7	20,7	21,3	19,8
	SD	12,2	13,1	11	11
Control	Mean	21,4	31,1	36	27,6
	SD	13,2	27,6	22,2	24,4
	Mean	40,8	15,8	37,7	31,6
	SD	16,3	11,1	16,2	16,1
	Mean	31	24,8	30	33,3
	SD	21,6	17,6	12,5	13,1

Table A: YM values and standard error for each square area of 3 pulsed fixed cells and 3 controls fixed cells showing the decrease in stiffness after pulse application linked to a uniform effect of EP.

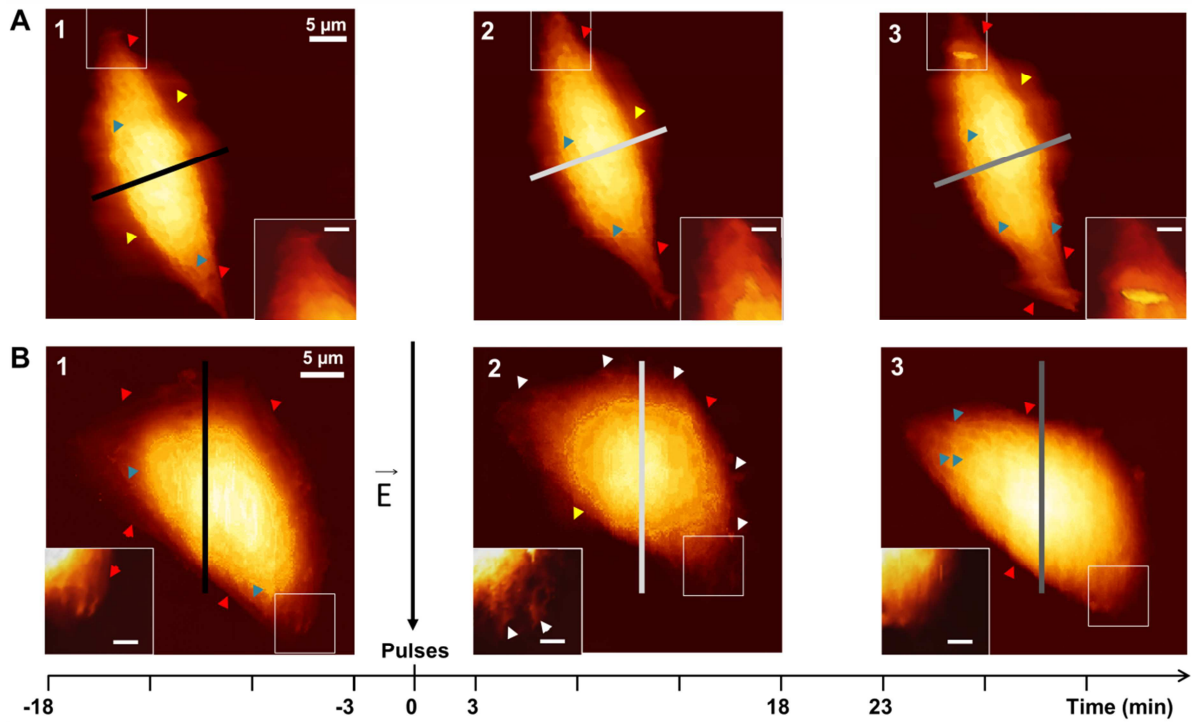


Figure 3: Control and pulsed living cell images along time. Blue arrows point cytoskeleton fibers, red: smooth delimitation of membrane border, yellow: fuzzy membrane, white: membrane rippling. In control cell cytoskeleton, fuzzy area and well determined border are present all the time. On pulse cell, we can see that cytoskeleton fiber profile disappear after pulse application as well defined border. Not significant fuzzy area (because present on control cell) appears after pulse application. Specific membrane rippling is observed only on pulsed cell. 23 minutes after pulse application, new well defined cell border are presents, and cytoskeleton fibers are visible again.

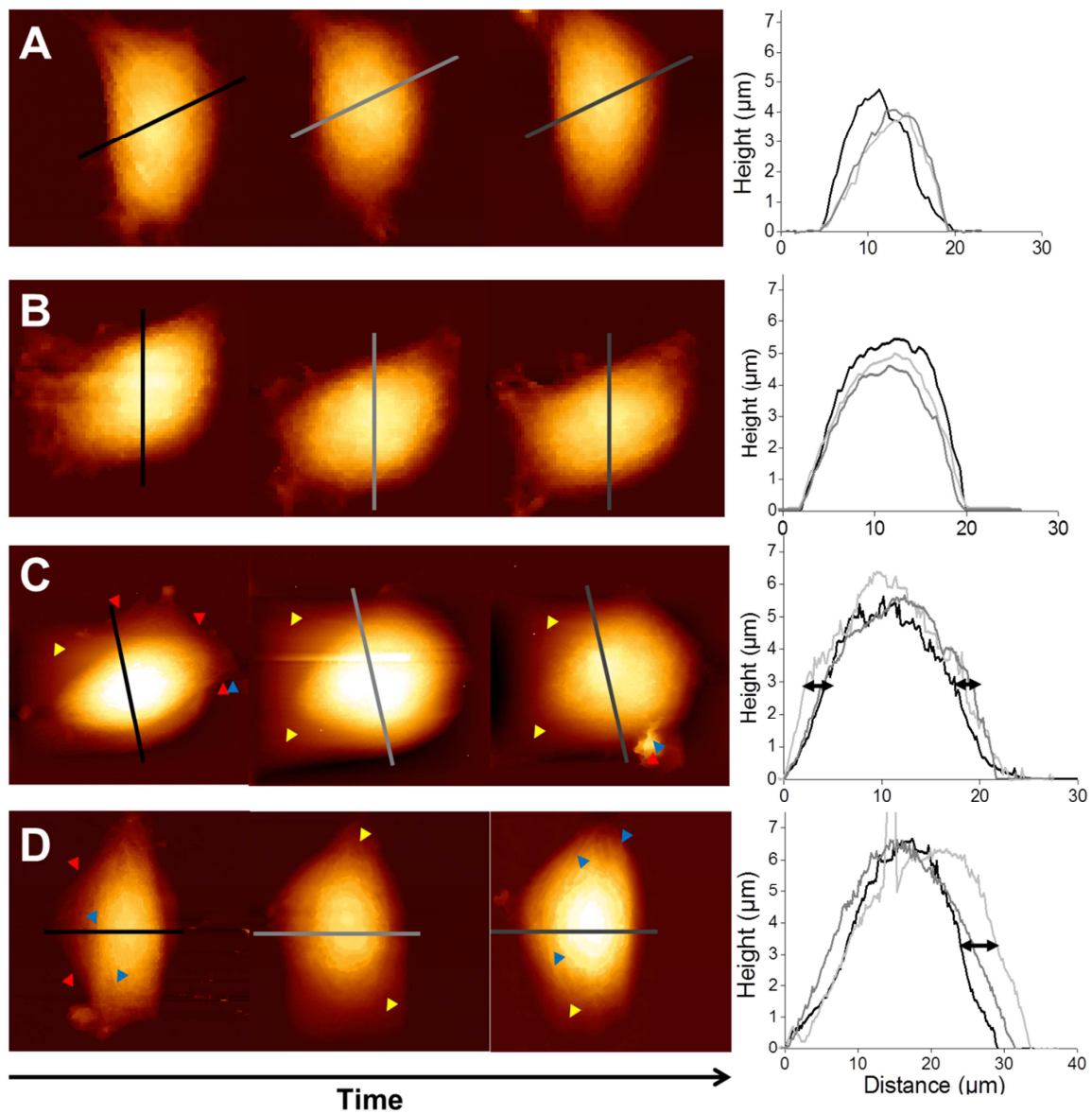


Figure 4: Height images and corresponding cross section of A and B: control living cells (z -range = 7 μm), C and D: pulsed cells. The cell membrane being disturbed, fuzzy areas appears after pulse application. Cell swelling is measured after pulse application. Black: before pulses, light grey: 3-18 min after, dark grey: 23-35 min.

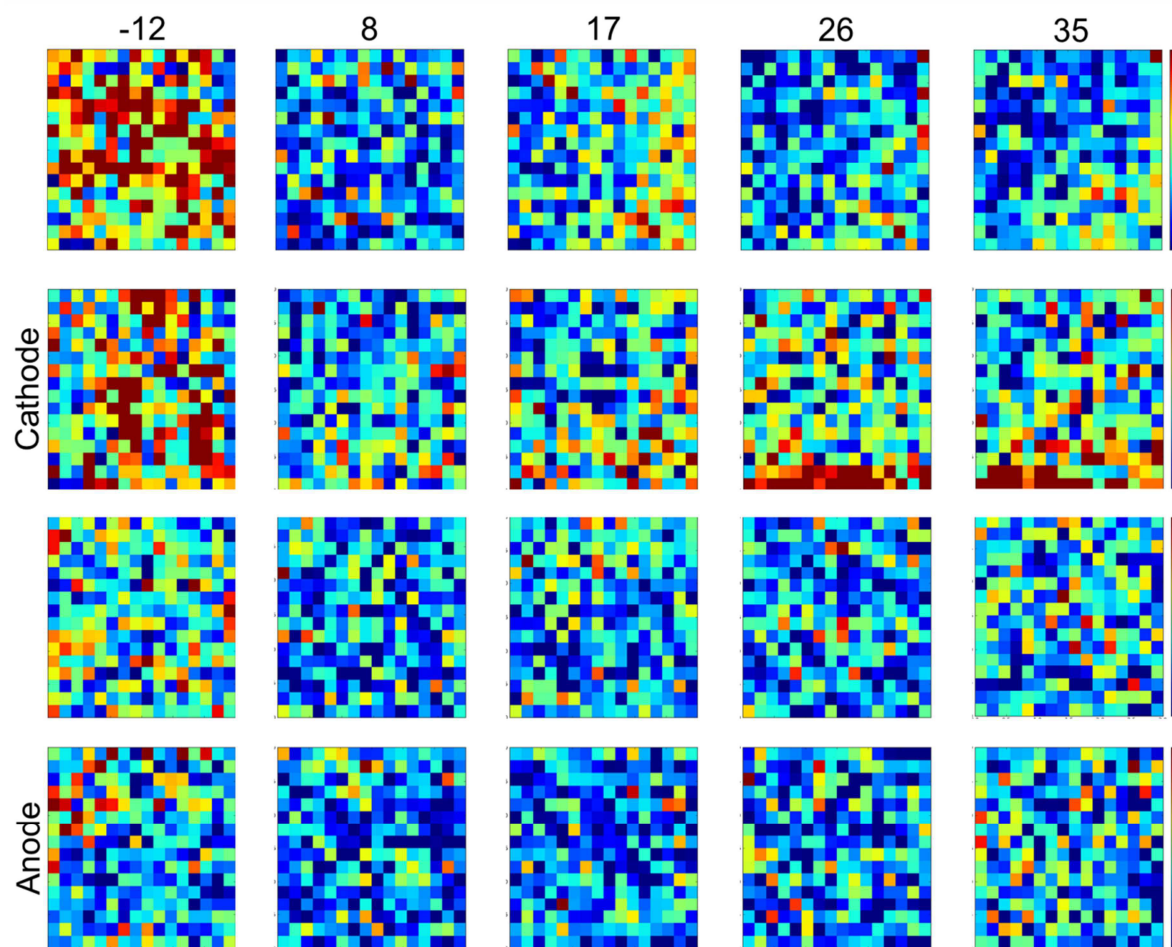


Figure 5: stiffness maps of one living cell for the 4 measured area along time (color scale: 35 kPa). Time = 0 corresponds to pulse application.

Young modulus (kPa)		t-1	t+1	t+2	t+3	t+4
Pulsed	Mean	31,6	15,3 *	19,3 *	19,9	2,1
	SD	5,2	1,0	0,9	1,3	1,2
	Mean	13,2	8,7 *	13,0	17,8	18
	SD	1,0	1,5	0,8	3	3,5
	Mean	18,8	11,2 *	13,6	14	14,7
	SD	2,3	0,5	1,6	1,3	1,5
	Mean	19,2	12,6	12,9	12,8	13,1
	SD	6,1	2,7	1,6	3,1	2,1
	Mean	22,4	16,1 *	18	18,5	18,6
	SD	4	2	2	0,2	2,9
	Mean	14,7	9,1 *	8	9,3	10,8
	SD	4,2	1,5	0,9	2,7	3,3
Control	Mean	15,9	14,7	12,5	14,7	15
	SD	1,6	1,7	1,1	1,3	2,1
	Mean	18,3	16,5	16,5	18,4	18,2
	SD	1,1	1,7	1,0	2,2	0,7
	Mean	17,6	18,5	24,4	24	26,8
	SD	1,4	3,0	3,4	3,9	2,4
	Mean	34	34,6	39,3	43,7	40,7
	SD	13	11,7	14,2	8	6,4
	Mean	18	19	16,2	16,2	16,6
	SD	3,1	5,7	1,8	2,7	2,8
	Mean	14,6	14,8	15	15,9	14
	SD	2	4	6,3	7,1	6,1

Table B: YM mean and standard deviation for the 4 square areas of measurement for 6 pulsed living cells and 6 control living cell along time (t-1 = before pulse application). 61% of the measured cells present the effect, 31% of cells showing no effect to EP, and 8% dying. Stars correspond to a P value <0.05, unpaired student t-test: values significantly different from YM initial value at t-1.

B. Implication du cytosquelette d'actine

Grâce aux résultats obtenus précédemment, nous avons pu mettre en évidence que l'AFM ne permettait pas une mesure du phénomène de perméabilisation membranaire comme visualisé par entrée d'iodure de propidium, mais mettait en avant une déstabilisation membranaire de longue durée se traduisant par une diminution de l'élasticité membranaire. Des études ont montré que la diminution d'élasticité des cellules était liée à une déstabilisation du cytosquelette d'actine et non de tubuline (Rotsch et Radmacher, 2000). Le réseau d'actine est composé d'actine globulaire polymérisée qui va former des filaments interagissant avec la membrane par l'intermédiaire de protéines transmembranaires. On peut distinguer deux types de filaments : les microfilaments et fibres de stress qui sont composées de plusieurs filaments d'actine et de protéines de liaison, et l'actine corticale qui est présente sous la membrane plasmique en réseau dense de soutien sous forme de filaments simples (Alberts B *et al.*, 2002) (Figure 36).

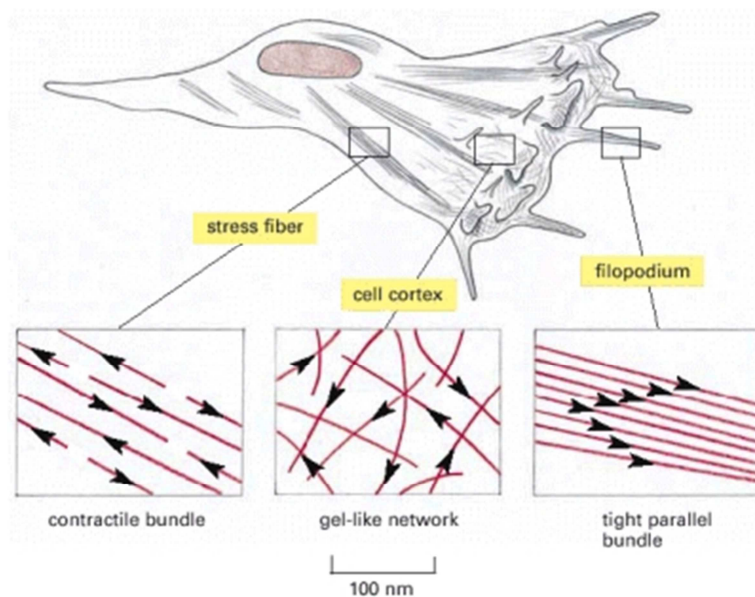


Figure 36 : Représentation schématique des différents états de l'actine dans la cellule. Adapté de Alberts B *et al.*, 2002.

Dans le but de déterminer l'implication du cytosquelette d'actine dans ce phénomène, nous avons réalisé des expériences sur des cellules dont la polymérisation de l'actine a été inhibée par la Latrunculine B (1 heure, 0,1 μ M - LatB) (Coué *et al.*, 1987; Rosazza *et al.*, 2011).

Des images par AFM et des mesures d'élasticité ont été réalisées suivant le même protocole que précédemment. Les mesures d'élasticité en 4 points de la cellule ont été acquises en mode Force Volume. Les images ont été réalisées en mode QI, plus lentement que celles présentées dans l'article précédent afin d'obtenir des courbes de force de bonne qualité (non bruitées) pour permettre leur analyse. De fait, la résolution a été diminuée afin de conserver un temps d'acquisition court pour continuer à réaliser les mesures au cours du temps. L'efficacité de la Latrunculine B a été analysée par microscopie confocale en utilisant des cellules transfectées de manière transitoire avec un gène codant pour de l'actine couplée à la GFP (Figure 37). On peut observer le marquage uniforme des cellules contrôle 24h après transfection, et le marquage ponctiforme sur les cellules traitées LatB 24h après transfection. De plus la forme des cellules traitées est fortement affectée.

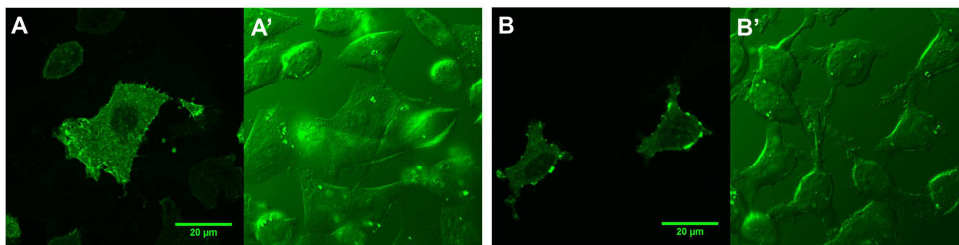


Figure 37 : Effet de la Latrunculine B sur cellules électrotransfectées 24h avant avec un plasmide codant pour de l'actine-GFP. A : Images de fluorescence et contraste de phase associé (A') de cellules contrôle non traitées pour lesquelles l'actine est distribuée de manière homogène dans la cellule. B : Images de fluorescence et contraste de phase associé (B') cellules traitées pendant 1 heures à 0,1 μM de Latrunculine B ou l'actine est dépolymérisée et présente une localisation ponctiforme.

De plus, les effets de la latrunculine sont visibles par simple observation de l'altération de la forme des cellules en contraste de phase (Figure 36 A' et B'). Les effets de la drogue ont donc été vérifiés sans nécessiter de transfection actine-GFP au préalable pour les expériences AFM, évitant tout biais relatif à la production et présence d'actine couplée à la GFP (Figure 38).

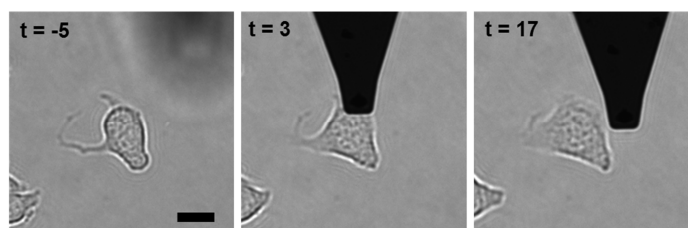


Figure 38 : Observation d'une cellule traitée Latrunculine B pendant 1 heure 0,1 μM au cours de l'expérience AFM. La drogue est retirée à $t = 0$ min. Barre d'échelle : 10 μm .

L'analyse de l'élasticité sur des cellules avant et après le traitement LatB montre une diminution de l'élasticité d'environ 30 kPa (Figure 39-A). Les mesures sur cellules traitées puis placées dans du milieu de pulsation à $t = 0$, montrent un retour de l'élasticité au cours du temps (Figure 39-B). L'écart entre l'élasticité à $t = -5$ min (dépolymérisation complète de l'actine) et $t = 33$ min (repolymérisation de l'actine) correspond à l'écart observé après l'application des impulsions présentées précédemment, soit une dizaine de kPa. Le retour de l'élasticité se fait progressivement, comme lors de l'application des champs électriques. En revanche, si les impulsions électriques sont appliquées sur cellules traitées (toujours à $t = 0$ en même temps que la drogue est retirée), on n'observe aucun retour de l'élasticité (Figure 39-C et Tableau 1).

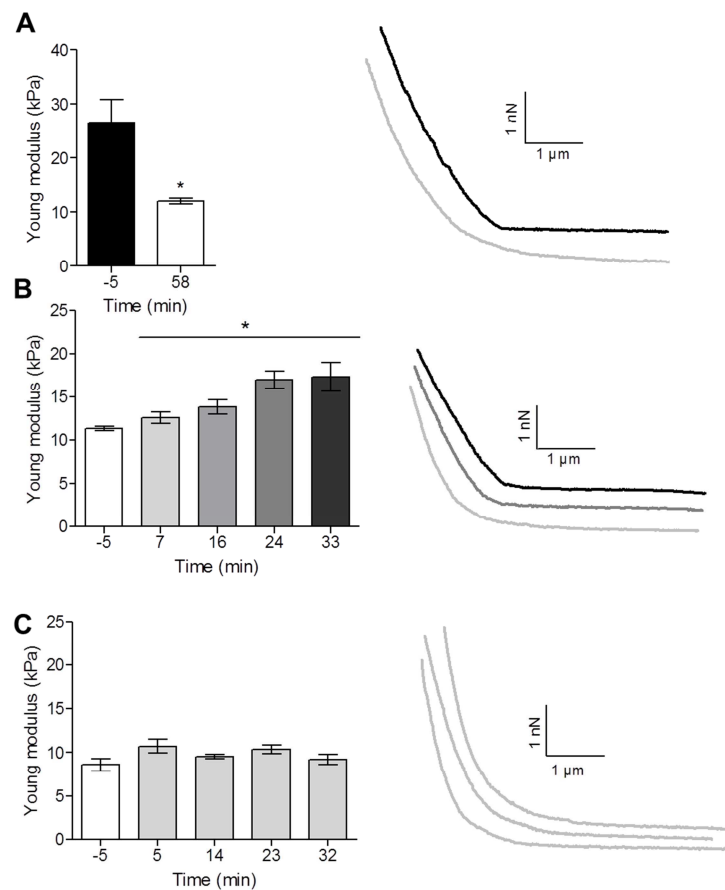


Figure 39 : Elasticité membranaire après traitement LatB. A : Diminution de l'élasticité après l'heure de traitement lat B et exemples de courbes de force associées. B : retour au cours du temps lorsque la drogue est retirée à $t = 0$ et remplacée par du tampon de pulsation à 30 °C et exemples de courbes de forces associées. C : absence de récupération de l'élasticité lorsque la drogue est retirée et que les impulsions électriques sont appliquées à $t = 0$ dans du tampon de pulsation à 30 °C et exemples de courbes de force associées. Student Unpaired t-test, Moyenne et SEM, * $P < 0,05$, ** $P < 0,005$.

Module d'Young (kPa)		t-1	t+1	t+2	t+3	t+4
Electroperméabilisé (+LatB)	Moyenne	8,7	9,9	10,5	9,2	8,9
	SD	0,7	0,9	1,2	1,1	1,3
	Moyenne	8,6	10,7	9,5	10,4	9,2
	SD	0,7	0,8	0,2	0,5	0,5
	Moyenne	10,4	10,7	9,9	10	10,1
	SD	2,1	1,3	1,6	1,8	1,9
Contrôle (+LatB)	Moyenne	11,3	12,6 *	13,8 *	17 *	17,3 *
	SD	0,6	1,3	1,7	1,9	3,2
	Moyenne	11,1	22,3	19 *	20,5 *	26,2
	SD	1,2	9,6	4,1	3,4	15,8
	Moyenne	4	4,3	6,1 *	6,4	8,4 **
	SD	0,4	0,7	0,9	1,5	1

Tableau 1 : Valeurs de module d'Young correspondant à la figure 39.

L'imagerie en mode QI permet de mettre en évidence la formation *de novo* des fibres de cytosquelette d'actine lorsque la drogue est retirée (Figure 40-A). Sur les images de hauteur il est possible de voir que la cellule s'allonge et produit de nombreuses fibres dans le sens longitudinal. En revanche, sur une cellule soumise aux impulsions électriques, bien qu'elle semble s'étaler au cours du temps, il est difficile de distinguer des fibres sous la membrane (Figure 40-B).

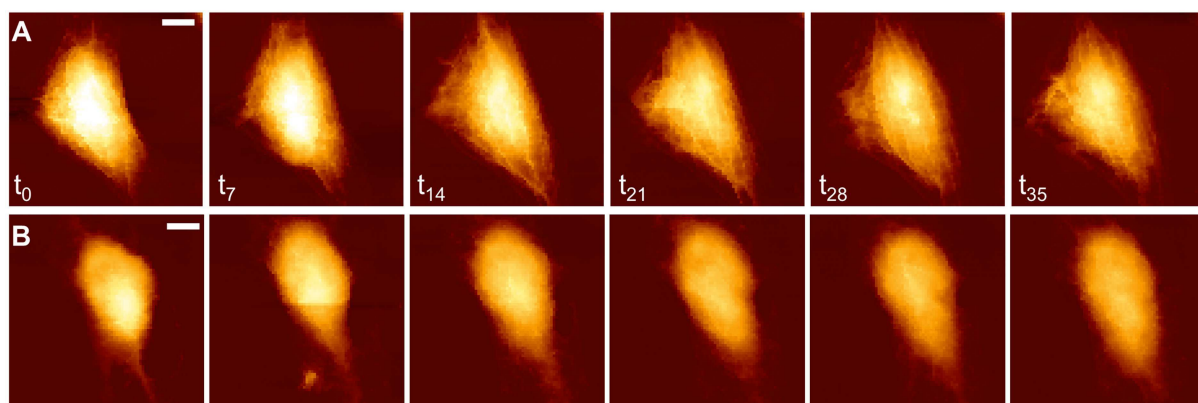


Figure 40 : Imagerie par mode QI de cellules traitées LatB. A : observation de la formation de microfilament après retrait de la drogue à $t = 0$. B : lorsque les impulsions électriques sont appliquées et que la drogue est retirée à $t = 0$, les fibres du cytosquelette ne sont pas visibles. Barre d'échelle : $5 \mu\text{m}$, échelle de couleur : $0\text{-}6\mu\text{m}$, résolution 75 px^2 .

Ces acquisitions QI ont été obtenues à basse résolution afin d'augmenter la qualité des courbes de force de pouvoir analyser l'élasticité point par point tout en conservant un temps

d'acquisition court. Ceci a permis de mesurer l'élasticité des fibres du cytosquelette qui sont plus dures que le reste de la cellule (Figure 41).

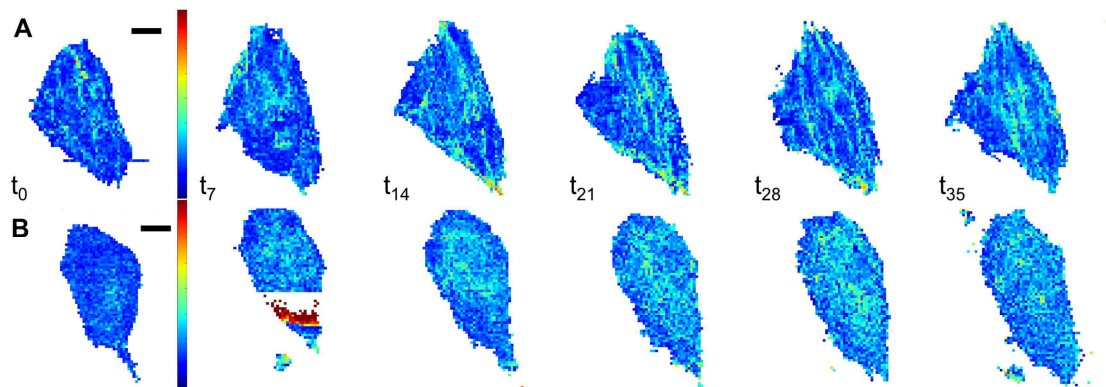


Figure 41 : Carte d'élasticité des cellules présentée Figure 15 à 100 nm d'indentation. Les fibres du cytosquelette sont plus rigides que le reste de la cellule. A : cellule traitée LatB, B : cellule traitée LatB et électroporée. Barre d'échelle : 5 µm, échelle de couleur : 0-60 kPa.

L'analyse a été réalisée avec le logiciel OpenFovea sur des segments de 50 nm d'indentation. Les fibres de cytosquelette d'actine ne sont mesurables qu'à partir de 100 nm d'indentation, indiquant qu'elles ne se trouvent pas directement sous la membrane. On peut voir sur la cellule traitée LatB et la cellule traitée et électroporée les mêmes différences que sur les images de hauteur de la Figure 40. La cellule reforme ses fibres de cytosquelette d'actine au cours du temps seulement dans le cas où elle n'est pas soumise aux impulsions électriques.

C. Conclusions

Les différences d'élasticité observées sur cellules soumises au traitement LatB (Figure 38) correspondent aux différences d'élasticité mesurées suite à l'application des champs électriques de l'ordre de la dizaine de kPa. Cette similitude entre les deux traitements (électroporée et LatB) étaye l'hypothèse selon laquelle les impulsions électriques ont un effet sur le cytosquelette d'actine. L'analyse de l'élasticité dans les 50 premiers nanomètres d'indentation montre une diminution d'élasticité brutale suivie d'une récupération progressive partielle dans les 35 minutes suivant l'application des champs électriques. Les cellules traitées LatB montrent la même diminution d'élasticité après l'heure de traitement et une récupération de l'élasticité similaire (Figure 39-B).

L'analyse des images obtenues par mode QI nous permet d'aller plus loin dans la compréhension de cet effet. D'une part, les images de hauteur des cellules soumises aux

impulsions électriques seules montrent que les fibres de cytosquelette d'actine ne sont plus visibles après l'application des champs électriques (Figure 3 de l'article (Chopin et al., 2013b)). Ce phénomène est accompagné d'un gonflement de la cellule, mais pas de changement de forme, ce qui peut indiquer que le réseau d'actine cytoplasmique n'est pas perturbé par les impulsions. En effet, comme on peut le voir sur les cellules traitées LatB, la dépolymérisation de l'actine affecte fortement la forme de la cellule (Figure 37 et Figure 38). Cependant après électroperméabilisation, la membrane montre de fortes ondulations, pouvant indiquer un impact sur l'actine corticale. D'autre part, les images de cellules traitées LatB montrent l'absence de microfilaments et leur formation *de novo* suite au retrait de la drogue. Sur les cellules traitées et électroperméabilisées en même temps que le retrait de la drogue, on n'imagine pas de microfilament, mais on observe que la cellule s'étale progressivement au cours du temps, amenant à considérer que l'actine cytoplasmique (microfilaments et liaison avec les points focaux d'adhésions) peut être capable de polymériser suite au retrait de la drogue, mais que l'actine corticale peut être affectée par les champs électriques.

L'ensemble de ces observations mène à l'hypothèse que les champs électriques affectent l'actine corticale et non l'actine cytoplasmique. En effet, d'une part le gonflement cellulaire et d'autre part l'impossibilité d'imager des filaments d'actine suite à l'électroperméabilisation amène à penser que ce qui se trouve directement en interaction avec la membrane est déstabilisé (directement par les impulsions, ou indirectement par déstabilisation de la bicouche phospholipidique). Ceci va donc d'un côté rendre plus faible l'élasticité dans les 50 premiers nanomètres d'indentation, et de l'autre, empêcher l'imagerie des filaments d'actine sous-jacents (avec la force d'appui utilisée) en « libérant » la membrane de son ancrage. Cette interprétation peut être confortée par le fait que dans des travaux antérieurs utilisant les mêmes conditions électriques et les mêmes cellules, l'observation de l'actine marquée par microscopie confocale montre que les filaments d'actine cytoplasmique ne sont pas affectés (Rosazza et al., 2011).

Il a été récemment montré que dans les 100 premiers nanomètres d'indentation était mesurée l'élasticité liée au réseau d'actine corticale (Fels et al., 2012). Ainsi, l'ensemble de ces observations tend à montrer que la diminution d'élasticité mesurée après électropulsation est liée à une déstabilisation du cytosquelette d'actine corticale.

III. Discussion et perspectives

Dans l'introduction de ce chapitre nous avons mis en évidence la capacité de la microscopie à force atomique à apporter de nouvelles réponses aux problématiques du vivant. Son application pour étudier l'électroperméabilisation permet d'obtenir des mesures physiques du phénomène directement sur la membrane. Malgré les difficultés rencontrées à la combinaison des deux techniques, il nous a été possible d'imager et de mesurer les effets membranaires de l'électroperméabilisation par AFM. Les mesures de force par Force Volume ont mis en avant une diminution de l'élasticité membranaire après l'application des impulsions électriques. Certaines études ayant montré le rôle de l'actine dans le maintien de l'élasticité cellulaire (Rotsch et Radmacher, 2000), l'hypothèse d'un effet des champs électriques sur le réseau d'actine a été privilégiée. La détermination des causes biologiques de cette diminution a pu être amorcée en étudiant le rôle joué par l'actine dans l'élasticité membranaire.

L'impact de l'électroperméabilisation sur l'actine a été très peu étudié. En 1992, Rols et Teissie ont montré que le cytosquelette jouait en rôle dans le retour de l'état perméable car sur des cellules où l'actine est dépolymérisée, le retour de l'état perméable a lieu beaucoup plus lentement voire est annulé (Rols et Teissie, 1992). Les travaux de ce chapitre sont en ligne directe des travaux de 1994 qui ont eux aussi montré l'implication du cytosquelette dans le phénomène de perméabilisation (Teissie et Rols, 1994), montrant que le phénomène de perméabilisation n'est pas qu'un phénomène lipidique. L'étude du cytosquelette des cellules endothéliales a montré un remaniement suite à l'application d'impulsions, participant à la perte de fonction vasculaire *in vivo* (Kanthou *et al.*, 2006). On sait également que l'actine joue un rôle important dans l'internalisation des plasmides lors d'électrotransfert car elle va se polymériser sous les agrégats d'ADN se formant à la membrane plasmique (Rosazza *et al.*, 2011). La microscopie à force atomique permet d'avoir accès à une mesure physique de la déstabilisation des filaments d'actine sur cellules vivantes au cours du temps, et peut donc ouvrir sur une caractérisation mécanique et une compréhension mécanistique de la perméabilisation.

Suite aux expériences de la partie II-B, deux hypothèses peuvent être formulées : (1) les impulsions électriques affectent directement les filaments d'actine corticale et déstabilisent leur structuration menant à une dépolymérisation ou une rupture. Cet effet pourrait intervenir dans l'état perméable de la membrane. Un des effets secondaires des champs électriques est la

libération d'ATP suite à la perméabilisation de la membrane (Delteil *et al.*, 2000) et peut expliquer un impact sur la polymérisation de l'actine qui est ATP-dépendante. (2) l'effet des impulsions sur la membrane, i.e. la déstabilisation lipidique menant à la perméabilisation, provoque la rupture de l'interaction des filaments d'actine corticale avec la membrane. Ce qui a pour effet d'annuler toute résistance au niveau de la membrane lors de l'appui de la pointe.

Les résultats obtenus ne permettent pas à eux seuls de déterminer si les impulsions électriques affectent la polymérisation de l'actine ou la connexion des filaments à la membrane. Tout d'abord des études de retour d'état perméable doivent être réalisées. Ensuite, des expériences supplémentaires de marquage de l'actine et d'observation par microscopie confocale sont nécessaires pour permettre de valider ou réfuter les deux hypothèses. Des expériences visant à déstabiliser spécifiquement l'ancrage de l'actine à la membrane (en inhibant la production des protéines d'ancrage par exemple (Rols et Teissié, 1992; Thomas, 2001) pourrait permettre de valider l'hypothèse 2. De la même façon un traitement ménagé par la latrunculine ou la cytochalasine pourrait permettre une dépolymérisation préférentielle de l'actine corticale (Fels *et al.*, 2012). Finalement une analyse des courbes de force obtenues par Force Volume en profondeur à partir de 100 nm d'indentation avec un modèle adapté (Hooke) pourrait amener des informations quant au rôle de l'actine cytoplasmique, contrairement aux 50 premiers nanomètres qui informent spécifiquement sur l'actine corticale (Figure 42).

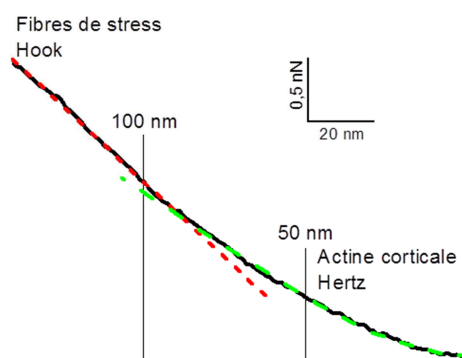


Figure 42 : Présentation des ajustements du modèle de Hooke et Hertz sur une courbe de force.

La preuve d'une déstabilisation de l'actine corticale, directe ou indirecte, pourra permettre d'apporter de nouvelles données dans l'interprétation de la perméabilisation. En effet si la déstabilisation du réseau cortical par les impulsions est directe, cela pourrait participer au phénomène de perméabilisation en libérant la membrane de contraintes structurales permettant des mouvements lipidiques. En revanche, si la déstabilisation du réseau d'actine

résulte de la déstabilisation membranaire, cela permettrait de confirmer un mouvement des phospholipides qui provoquerait ce détachement de l'actine.

Toutes ces perspectives se concentrent sur l'élasticité et donc l'analyse des courbes d'approches de spectroscopie de force. Cependant, les courbes de retrait peuvent amener de nombreuses informations, et beaucoup plus directement sur l'état membranaire. En effet, comme discuté en introduction, sur cellules mammifères il est possible de détecter des structures appelées « tether » ou nanotubes de membrane. Ces nanotubes se forment entre la pointe et un point d'interaction sur la membrane. Ils sont indicatifs de l'état membranaire et peuvent renseigner entre autre sur l'état du cytosquelette sous-jacent, en particulier de l'actine (Sun *et al.*, 2005a). L'étude de la formation de tether demande une analyse rigoureuse courbe par courbe, et nous avons pu entamer l'investigation de la réponse membranaire avant et après application des impulsions électriques. Les résultats préliminaires observés sur seulement une cellule dans chaque condition montrent une augmentation du nombre de tethers après électroperméabilisation (Figure 43-A). Ces résultats vont dans le sens des hypothèses formulées quant aux effets sur l'actine corticale. Une analyse approfondie (taille des tethers, force d'adhésion) permettra probablement d'amener de nouvelles descriptions des phénomènes membranaires suite à l'application d'impulsions électriques.

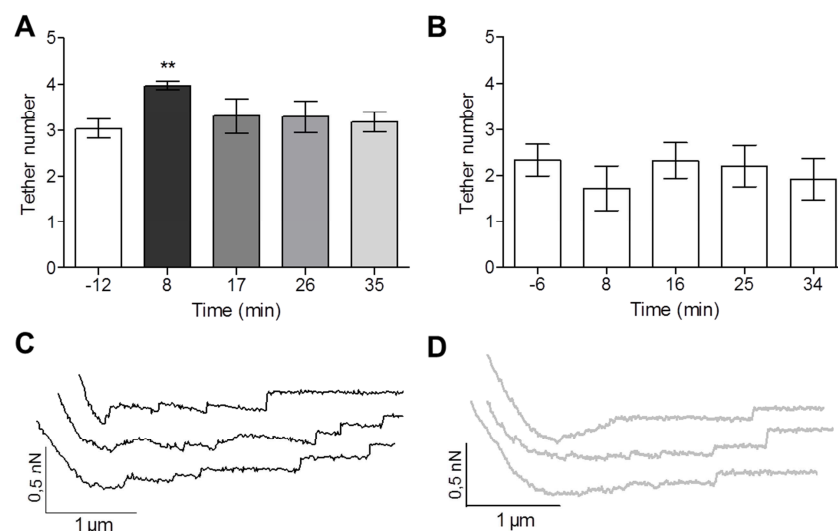


Figure 43 : Nombre de tethers au cours du temps à 30 °C dans du tampon de pulsation. A : cellule électroperméabilisée au temps $t = 0$ min, on observe une augmentation du nombre de tethers post-électroperméabilisation. B : cellule contrôle. C : exemples de courbes de force (retrait) avant électroperméabilisation. D : exemple de courbe de force (retrait) après électroperméabilisation. Moyenne et SEM, Student Unpaired t-test, $**P < 0,005$.

Les travaux présentés dans ce chapitre ont permis l'adaptation de la technologie de microscopie à force atomique pour l'étude de l'électroperméabilisation. Le mode QI s'est révélé adéquat pour imager les cellules rapidement au cours du temps, et pour obtenir des informations d'élasticité intracellulaire. Le mode Force Volume a permis la mesure de variation d'élasticité dans les 50 premiers nanomètres d'indentation et ainsi la détection des effets membranaires de l'électroporation. Les mesures nano-mécaniques obtenues par cette technologie permettent d'analyser le mécanisme d'électroperméabilisation sous un nouvel angle. Sur cellules vivantes, l'AFM a les capacités de fournir une résolution supérieure au microscope optique et proche de la microscopie électronique, mais en évitant d'avoir recours à l'utilisation de marqueurs fluorescent ou de fixateurs. Ses ressources sont nombreuses et n'ont pas toutes été utilisées dans cette étude (par exemple la reconnaissance moléculaire : Dupres *et al.*, 2007; Reeves *et al.*, 2012). L'AFM pourra amener de nouvelles connaissances sur les mécanismes de transfert de macromolécules en électroperméabilisation, en plus du mécanisme de perméabilisation lui-même.

Chapitre 3 : Effets biologiques des impulsions nanosecondes

Les travaux présentés dans ce chapitre s'intéressent aux effets des impulsions courtes et intenses : les impulsions nanosecondes ou nsPEF (pour nanosecond Pulsed Electric Field). Les nsPEF sont une classe d'impulsions électriques émergentes qui présente un fort potentiel pour la déstabilisation des structures intracellulaires. Leur description théorique tend à montrer des effets sur les organelles qui ont été confirmés par diverses observations *in vitro* et *in vivo*. Cependant la description de leurs effets sur l'enveloppe nucléaire n'est pas encore réalisée et nécessite la mise en place de nouvelles techniques de visualisation de l'état perméable des membranes.

L'effet de ces nsPEF a été étudié au cours de cette thèse sur la membrane plasmique de manière directe grâce à la technique de Patch-Clamp et sur l'enveloppe nucléaire de manière indirecte par transfert de gène. Finalement, des applicateurs adaptés à la microscopie à fluorescence ont été réalisés dans la perspective de visualiser les effets en temps réel. Ce chapitre se divise en 4 parties : une introduction présentant une synthèse bibliographique des principaux travaux réalisés à partir d'applications nanosecondes, l'étude de la formation de nanopores dans la membrane plasmique par Patch-Clamp, l'étude de l'impact des nsPEF sur le transfert de gène et finalement la conception des applicateurs adaptés à la microscopie.

I. Introduction

Cela fait maintenant plus d'une dizaine d'années que l'application des nsPEF concentre l'attention de toute la communauté scientifique travaillant sur l'électroporation. Ce type d'impulsion a commencé à être utilisé dans les années 2000 suite à la conception de générateurs permettant l'application de ces impulsions très courtes (nanoseconde) de forte intensité (au-delà du kV/cm) (Behrend M *et al.*, 2003; Chaney et Sundararajan, 2004). Par extension, la terminologie nsPEF est utilisée pour des impulsions d'une durée inférieure à 1 μ s, bien que les analyses théoriques soient réalisées pour des impulsions de quelques nanosecondes, voire quelques dizaines de nanosecondes (Deng *et al.*, 2003) tout comme les analyses *in silico* des effets des champs électriques sur bicouche lipidique (Delemotte et Tarek, 2012; Fernández *et al.*, 2012; Joshi et Hu, 2010; Kotnik et Miklavcic, 2006; Tarek, 2005; Vernier et Ziegler, 2007; Ziegler et Vernier, 2008). Ces descriptions théoriques des effets sur bicouches phospholipidiques ont rapidement mené à la conclusion que des impulsions courtes et intenses permettaient d'atteindre spécifiquement les membranes

intracellulaires en raison de leur faible diamètre et de leur temps de charge réduit (Esser *et al.*, 2010; Vernier *et al.*, 2003b). En effet, l'équation dérivée de l'équation de Laplace décrivant la perméabilisation suite à l'application d'un potentiel extérieur est la suivante (Escoffre *et al.*, 2009) :

$$\Delta\psi = f.g(\lambda).r.E.\cos\theta(M).(1-e^{-t/\tau})$$

Cette équation décrit le potentiel induit par les champs électriques, qui va s'ajouter au potentiel natif et provoquer la déstabilisation de bicouche phospholipidique. Dans le cas de membranes biologiques comme la membrane plasmique, la somme doit atteindre la valeur de 200 mV pour provoquer une perméabilisation. Cependant on peut voir qu'au-delà du facteur forme (f), de la conductivité des milieux intra et extracellulaire ($g(\lambda)$), du rayon de la cellule (r), de l'endroit où on se place sur la membrane par rapport à la normale du champ électrique ($\cos\theta(M)$), les composantes suivantes : l'intensité (E), la durée de l'impulsion (t) et le temps de charge de la membrane (τ) sont des paramètres importants de cette équation. C'est ainsi que par simple analyse de cette équation, il a été possible de prédire que les membranes des organites qui ont un rayon plus petit que celui de la cellule, et ainsi un temps de charge plus court que celui de la membrane plasmique, pourraient être déstabilisées par des intensités élevées et des impulsions courtes (Deng *et al.*, 2003; Vernier *et al.*, 2006a). Ainsi une impulsion de 15 ns pourrait permettre la déstabilisation de la membrane d'un organite d'un diamètre de 1 μm dès lors qu'une intensité suffisante est appliquée (Tekle *et al.*, 2005), alors que la membrane plasmique ne devrait pas être affectée. Les premiers travaux sur cellules ont consisté en l'application d'un très faible nombre d'impulsions (inférieur à 10), mais avec une intensité élevée (5,3 kV/cm) (Schoenbach *et al.*, 2001a). Les résultats obtenus montrent une déstabilisation des granules d'éosinophiles sans altération de la membrane plasmique et ont ainsi prouvé un effet ciblé des nsPEF sur les membranes internes. Cependant au cours des années suivantes bien d'autres effets, tant intracellulaires que directement sur la membrane plasmique, ont pu être observés, rendant ces nsPEF non plus spécifiques des organites intracellulaires, mais très versatiles. Certaines valeurs seuils ont pu être mises en évidence concernant la mortalité cellulaire, mais la diversité des voltages et durées étudiés ne permet pas encore à ce jour de définir précisément leurs effets cellulaires en fonction de leurs caractéristiques. Ceci a pour avantage de laisser le champ de recherche très ouvert mais l'inconvénient de ne donner aucune orientation vers la possible électromanipulation cellulaire qui était espérée lors de leur découverte (Schoenbach *et al.*, 2001b). Pour terminer, il est nécessaire d'ajouter que la majorité des travaux ne comparent pas leurs résultats à ceux

obtenus avec des conditions électriques plus classiques (impulsions ms et μ s, intensités faibles), et ne permettent donc pas d'évaluer la spécificité « nano » des effets.

Cette introduction décrit le contexte bibliographique des applications nsPEF en nous attachant tout d'abord aux effets membranaires et intracellulaires au niveau des membranes et enveloppes, puis ensuite aux effets plus généraux sur les mécanismes cellulaires et la viabilité, pour finalement terminer par les perspectives cliniques.

A. Effets membranaires

Les effets membranaires des champs électriques sont classiquement étudiés de manière indirecte par l'intermédiaire de molécules fluorescentes qui vont ou non passer cette barrière cellulaire. Cependant ces molécules ont en général une taille importante, qui ne permet pas leur passage de la membrane dans le cas des nsPEF lorsqu'ils sont appliqués en petit nombre (Vernier *et al.*, 2003b). C'est pourquoi il a tout d'abord été admis que les nsPEF ne permettraient pas la perméabilisation membranaire comme le font des impulsions longues (μ s, ms). Cependant, la perméabilisation a pu être détectée en utilisant des petites molécules (Silve *et al.*, 2011) ou des ions (Bowman *et al.*, 2010). Grâce à des méthodes de détection plus directes, comme le suivi de phospholipides marqués, ou le Patch-Clamp, la déstabilisation membranaire et la formation de nanopores ont pu être indirectement observées.

Dès 2003 la possibilité d'affecter la membrane a été mise en avant (Vernier *et al.*, 2003a). En 2004, les mêmes auteurs montrent que l'application d'une seule impulsion de 30 ns et 2,5 kV/cm entraîne la translocation de la phosphatidylsérine (PS) du feuillet interne de la bicouche lipidique vers le feuillet externe, impliquant un effet membranaire (Vernier *et al.*, 2004b). Cette translocation a lieu préférentiellement du côté de la cellule faisant face à l'anode dans les secondes suivant l'application de l'impulsion (Vernier *et al.*, 2006b) démontrant ainsi la dépendance du phénomène à l'orientation du champ électrique, comme c'est le cas pour l'électroperméabilisation classique (Escoffre *et al.*, 2009). Sous l'effet des champs électriques, la tête polaire des phospholipides chargés va changer d'orientation et donc amener le phospholipide entier à se réorienter (Escoffre *et al.*, 2007), mécanisme pouvant faire intervenir des ions calcium (Vernier *et al.*, 2009). Cet effet est directement corrélé au passage de lipides d'un feuillet vers l'autre provoqué directement par les champs électriques. Il est à noter que bien que la translocation de la PS soit un marqueur d'apoptose, l'observation rapide de l'effet préférentiellement à l'anode à cette échelle temporelle n'en fait pas un effet apoptotique, mais bien un effet électrique. La diffusion latérale de PS mène donc

à l'hypothèse de la formation de nanopores membranaires (d'une durée de l'ordre de la nanoseconde, et d'un diamètre de l'ordre du nanomètre), en raison de l'absence d'entrée de grosses molécules comme c'est le cas pour l'électroperméabilisation « classique » (Vernier *et al.*, 2004a). Le mécanisme de déstabilisation membranaire est similaire dans les deux cas, dans le sens où un changement de potentiel membranaire en est l'origine (Frey *et al.*, 2006; White *et al.*, 2011), mais la finalité diffère en raison de la taille des défauts membranaires. Cette translocation peut apparaître dès l'application d'impulsions de 3 ns et comme montré dans les travaux précédents, sur différents types cellulaires, rendant la formation de nanopores ubiquitaire (Roth *et al.*, 2013; Vernier *et al.*, 2006a). Les valeurs seuils de formation de ces nanopores ont été établies à 6 kV/cm pour une impulsion de 60 ns, et à 1 kV/cm pour une impulsion de 600 ns (Bowman *et al.*, 2010; Ibey *et al.*, 2009). L'augmentation du nombre d'impulsions ou de leur intensité conduit à l'ouverture de pores plus larges, pouvant mener à une perméabilisation de la membrane plasmique proche de celle observée avec des impulsions classiques plus longues (Batista *et al.*, 2010; Hair *et al.*, 2003; Pakhomov *et al.*, 2007a; Silve *et al.*, 2011). Il est à noter que la formation de ces pores plus larges pourrait être un effet secondaire des nsPEF et non leur effet direct. De la même manière, des impulsions plus nombreuses et plus intenses amènent au passage de calcium à travers la membrane plasmique (Scarlett *et al.*, 2009; Semenov *et al.*, 2013).

Cette nano-déstabilisation membranaire a aussi pu être mesurée directement par la détection des flux ioniques à travers les nanopores grâce à la technique de Patch-Clamp, comme il est discuté plus largement dans la partie II-A de ce chapitre (Pakhomov *et al.*, 2007a, 2009; Pakhomova et Pakhomov, 2010). La technique de Patch-Clamp a aussi pu permettre d'étudier les effets des nsPEF sur les canaux voltage-dépendants (Nesin et Pakhomov, 2012; Nesin *et al.*, 2012). Cet effet est secondaire, lié à l'ouverture des nanopores qui entraîne des flux d'ions provoquant une possible régulation cellulaire par l'inhibition des canaux calciques et sodiques voltage-dépendants. De plus, la régulation des canaux sodiques pourrait être un mécanisme calcium-dépendant (Nesin et Pakhomov, 2012).

Finalement, il est à prendre en compte que des phénomènes de gonflement de la cellule (« swelling ») (Nesin *et al.*, 2011; Romeo *et al.*, 2013) et la formation de « blebs » (Rassokhin et Pakhomov, 2012) sont observés après l'application de nsPEFs, comme c'est le cas pour les impulsions plus longues (Golzio *et al.*, 1998). Ce gonflement est observé par augmentation de la taille de la cellule, lié directement à une expansion de la membrane, indiquant une déstabilisation membranaire. Cependant pour les « blebs », bien que leur formation initiale

soit liée à une déstabilisation membranaire, dans le cas des nsPEF il est observé une croissance du bleb uniquement vers l'anode. Cette croissance est soumise à la polymérisation d'actine en réponse immédiate à l'application des impulsions. Ces résultats montrent les effets intracellulaires majeurs des nsPEF.

B. Effets intracellulaires

Peu d'études ont porté sur l'effet des impulsions nanosecondes sur le cytosquelette. L'actine « protège » la membrane plasmique des cellules végétales lors de l'application de nsPEF et va ainsi rendre les cellules moins sensible aux champs électriques lorsque leur actine est stabilisée (Hohenberger *et al.*, 2011). Comme discuté plus haut, elle peut également être impliquée dans la formation des blebs sur cellules animales (Rassokhin et Pakhomov, 2012).

Comme indiqué en introduction de cette partie, les nsPEF ont tout d'abord suscité un intérêt pour leur potentiel effet sélectif sur les enveloppes internes de la cellule. Ces enveloppes sont celles des organites : réticulum endoplasmique (RE), mitochondrie, mais aussi noyaux, appareil de Golgi, vacuoles et vésicules sécrétoires ou endocytiques. Les effets internes des nsPEF ont donc été étudiés grâce aux propriétés de ces enveloppes qui ont pour but la compartimentation, et donc la séquestration d'espèces moléculaires.

Il a en particulier été étudié la libération de calcium intra-cytoplasmique. En effet, dans la cellule, le calcium est contenu dans les organites, principalement le réticulum endoplasmique et la mitochondrie. C'est ainsi que plusieurs études montrent une libération de calcium intra-cytoplasmique indépendante des canaux calciques membranaires, donc directement liée à une déstabilisation des enveloppes des organites pour des impulsions inférieures à 100 ns (Vernier *et al.*, 2003b; White *et al.*, 2004). Cependant, au-delà d'une valeur seuil de 100 kV/cm, il a été observé une entrée de calcium dans la cellule liée à la déstabilisation de la membrane plasmique et non plus seulement de celle des enveloppes des organites intracellulaires (Scarlett *et al.*, 2009; Semenov *et al.*, 2013). L'activation de canaux calciques voltage-dépendants de cellules excitables a aussi été montrée (Vernier *et al.*, 2008). Finalement, des effets sur les vésicules et les vacuoles ont été observés (Batista *et al.*, 2010; Schoenbach *et al.*, 2001a; Tekle *et al.*, 2005), démontrant la capacité des impulsions nanoseconde très courtes et relativement intenses à déstabiliser les bicouches phospholipidiques intracellulaires.

De la même façon des effets spécifiques sur la perméabilisation de la mitochondrie ont été mis en évidence avec des impulsions de 4 ns et 600 ns, liée à une diminution du potentiel transmembranaire mitochondrial (Batista Napotnik *et al.*, 2012; Beebe *et al.*, 2012). Ces

résultats pointent la possibilité de déstabiliser une enveloppe complexe, étant donné que pour la mitochondrie cette enveloppe est composée de deux bicouches et qu'il est montré par Batista *et al.* que la membrane interne est affectée dès 4 ns. Ajoutons que dans le cas d'impulsions « longues » de plusieurs centaines de nanosecondes, des effets apoptotiques sont observés, ne permettant pas dans ce cas de définir si la perméabilisation de la membrane interne mitochondriale est un effet primaire des nsPEF ou secondaire lié au processus apoptotique (Beebe *et al.*, 2003a; Hall *et al.*, 2007). L'étude de Beebe *et al.* en 2012 amène une autre dimension à l'effet des nsPEF, ajoutant la durée des fronts de montée et de descente des impulsions comme un paramètre déterminant pour le ciblage des organites, les temps les plus courts permettant toujours de cibler préférentiellement les membranes internes.

Le dernier organite d'intérêt majeur pour la cellule est le noyau. Néanmoins, la structure de l'enveloppe nucléaire reste plus complexe, non seulement car c'est une double membrane comme la mitochondrie, mais aussi en raison de la continuité d'une de ces membranes avec le réticulum endoplasmique, de la présence des pores nucléaires, et finalement du matériel génomique contenu dans le noyau. En effet, la chromatine et les télomères interagissent avec l'enveloppe nucléaire pour la compartimentation de l'ADN. Des effets sur l'enveloppe nucléaire ont été rapportés indirectement par la capacité à augmenter les taux d'expression plasmidique suite à l'électrotransfection (Beebe *et al.*, 2003b, 2004). Néanmoins, ces résultats se sont révélés être des artefacts et la partie II-B s'intéresse à cette problématique. Des effets sur le matériel génétique ont également été reportés, en particulier des coupures de l'ADN (Stacey *et al.*, 2003), le détachement conséquent des télomères fixés à l'enveloppe nucléaire (Stacey *et al.*, 2011a), et aussi un potentiel changement de condensation de la chromatine (Chen *et al.*, 2004). Des changements dans la conductivité du nucléoplasme ont pu être détectés (Garner *et al.*, 2007). Cependant aucune expérience ne démontre réellement la déstabilisation de l'enveloppe nucléaire elle-même et ceci peut être expliqué tout d'abord par la taille du noyau, qui est bien supérieure à celle des autres organites intracellulaires et pourrait ainsi prévenir tout effet des nsPEF sur l'enveloppe nucléaire, ensuite par la complexité de cette enveloppe, et finalement par la limitation technique de la détection de cette éventuelle déstabilisation, discuté partie II-B.

C. Effet sur la viabilité cellulaire

Tout impact sur les membranes externes ou internes de la cellule peut profondément affecter son fonctionnement et dès lors provoquer la mort cellulaire. C'est pourquoi un grand

nombre d'études se sont intéressées aux effets létaux des nsPEF et à leur impact sur des mécanismes cellulaires impliqués dans la prolifération cellulaire, comme l'activation des caspases ou de la voie JNK (c-Jun N-terminal kinases). Il est à considérer que comme tout travail sur une population cellulaire, les effets sont dépendants de la phase du cycle cellulaire dans laquelle se trouve la cellule (Hall *et al.*, 2007).

En raison de leur durée très courte, les nsPEF ne transfèrent pas d'énergie à l'échantillon et ainsi les effets observés sont sûrement athermiques. Les premiers travaux s'intéressant à la survie cellulaire ont montré que pour des intensités très élevées de 300 kV/cm et des durées de 300 ns, des phénomènes apoptotiques étaient observés dans les dizaines de minutes suivant l'application des impulsions pouvant atteindre 90% de la population cellulaire. Le nombre de cellules entrant en apoptose est diminué en réduisant la durée des impulsions de 300 à 10 ns, et l'entrée en apoptose retardée dans le temps (Beebe *et al.*, 2003a).

Cette apoptose a été montrée comme caspase-dépendante (Ren et Beebe, 2011; Ren *et al.*, 2012) et mitochondrie-dépendante en raison de la libération du cytochrome C. L'application de ce type d'impulsion provoque des mécanismes dépendant de p53 mais également indépendant de cette protéine (Hall *et al.*, 2005). Finalement, l'entrée en apoptose est calcium-dépendante pour certains types cellulaires uniquement, amenant à reconsidérer l'implication des nsPEF dans l'entrée en apoptose (Beebe *et al.*, 2003b). En effet, nous avons vu dans la partie précédente (I-B), que les nsPEF peuvent déstabiliser les membranes internes et provoquer la libération intracellulaire d'importants médiateurs de signalisation cellulaire, ou second messagers comme le calcium. Cependant l'incapacité à relier systématiquement la libération de ces molécules à l'entrée en apoptose empêche de définir l'exacte implication des impulsions nanosecondes dans l'entrée en apoptose, comme par exemple la perméabilisation irréversible des organites.

L'ensemble des travaux précédemment cités a montré qu'une forte intensité provoque une entrée en apoptose. Cependant, une augmentation de la quantité de cellules entrant en apoptose a aussi été observée en utilisant de longues durées (100 et 600 ns) avec des intensités modérées (10 et 80 kV/cm) (Beebe *et al.*, 2012; Yao *et al.*, 2008). D'autre part, il a été montré que les cellules adhérentes étaient moins sensibles aux effets apoptotiques des nsPEFs que des cellules en suspension (Stacey *et al.*, 2003). Ceci démontre encore une fois la différence de la nanodéstabilisation par rapport à l'électroperméabilisation classique, pour laquelle les cellules adhérentes sont plus sensibles (Thèse J-Escoffre, (Chopinet *et al.*, 2012)).

En conclusion, un ajustement précis des paramètres électriques pourrait permettre de déstabiliser les membranes cellulaires (internes et externes) sans provoquer la mort cellulaire, en utilisant des impulsions très courtes (inférieures à 10 ns) et d'intensité modérée (quelques dizaines de kV/cm) (voir partie II-B). Néanmoins, les nsPEFs peuvent provoquer un stress comme montré par l'activation de la voie des JNK en conditions modérées (80 ns, 20 kV/cm) (Morotomi-Yano *et al.*, 2012). Une utilisation réfléchie et adaptée des nsPEFs pourrait donc ouvrir des perspectives intéressantes d'électromanipulation de la cellule.

D. Applications

Les effets intracellulaires et apoptotiques ont amené à appliquer les nsPEF avec une visée anti-tumorale pour l'éradication des tumeurs *in vivo* (Breton et Mir, 2012). Le principal atout des nsPEF en traitement anti-cancéreux réside dans l'absence d'effet Joule majeur, avec une élévation de température très modérée de 3 °C (Nuccitelli *et al.*, 2006). Diverses études ont été réalisées sur mélanomes (Chen *et al.*, 2009; Nuccitelli *et al.*, 2009, 2010, 2012) et hépatocarcinomes (Beebe *et al.*, 2011; Chen *et al.*, 2012a, 2012b). Des études *in silico* des effets sur structures multicellulaires ont permis d'établir les effets en environnement complexe (Garon *et al.*, 2007) ou pour certains types d'électrodes (Song *et al.*, 2010). Toujours en utilisant leurs capacités destructives, les nsPEFs peuvent aussi permettre la désinfection en agissant sur les bactéries comme *Escherichia coli* ou *Salmonella typhimurium* (Perni *et al.*, 2007; Žgalin *et al.*, 2012).

L'utilisation plus modérée des nsPEF peut conduire à l'activation de cellules aux fonctions spécifiques, comme les plaquettes (Hargrave et Li, 2012; Zhang *et al.*, 2008) ou les cardio-myocytes (Wang *et al.*, 2009). Il est également envisagé la combinaison des nsPEF avec des nanotubes de carbone afin de permettre la construction d'une matrice conductrice (Stacey *et al.*, 2011b).

E. Problématiques

Les travaux de cette thèse s'inscrivent dans la perspective d'étudier les effets cellulaires des champs électriques pulsés de type Bande Ultra Large, utilisés dans un contexte défense, afin de participer à la détermination de valeur seuil de nocivité suite à l'exposition à ces ondes. Les normes actuelles sont basées sur les effets thermiques et donc non applicables au cas des nsPEF où les effets sont principalement athermiques. Nous nous sommes donc concentrés sur l'étude d'une part des effets sur la membrane plasmique, et en particulier le

rôle que joue le cytosquelette dans la perméabilisation membranaire par Patch-Clamp, et d'autre part des effets sur l'enveloppe nucléaire en terme de perturbation et d'effet sur l'expression génique. Pour cette partie le transfert de gène a été utilisé comme outil de visualisation de l'éventuelle déstabilisation nucléaire. Finalement, une dernière partie s'est intéressée au développement d'applicateurs adaptés à la microscopie à fluorescence dans l'objectif de pouvoir étudier en temps réel l'impacts des nsPEF sur les structures intracellulaires.

II. Effets sur la membrane plasmique

Ce travail est le résultat d'une collaboration avec Dr. A. Pakhomov, Old Dominion University, Norfolk, VA, USA.

Les effets membranaires des nsPEFs n'ont été que très peu étudiés en raison de l'impossibilité de mesurer l'entrée des molécules indicatrices de perméabilisation classique telles que l'iodure de propidium (Beebe *et al.*, 2003b; Pakhomov *et al.*, 2007a; Vernier *et al.*, 2003b, 2004a). Cependant, les simulations numériques et autres analyses *in silico* ont montré la formation de nanopores membranaires avec une durée de vie très courte, pouvant expliquer l'impossibilité de détection par les techniques classiquement utilisées (Breton *et al.*, 2012; Kramar *et al.*, 2012; Levine et Vernier, 2010). En 2007, Pakhomov *et al.* ont montré grâce à la technique de Patch-Clamp en mode « whole cell » la possibilité de mesurer des flux d'ions à travers la membrane plasmique suite à l'application d'un ou plusieurs nsPEF de 60 ns et de 12 kV/cm. Ces travaux montrent une diminution de la résistance membranaire pouvant durer plusieurs minutes dès l'application d'un seul nsPEF. Cette diminution est accompagnée par la diminution du potentiel membranaire et a pu être observée sur divers types cellulaires (Pakhomov *et al.*, 2007b). Ces changements des caractéristiques membranaires conduisent à la conclusion que des pores d'une taille inférieure à 1,4 nm (diamètre du propidium) sont formés suite à l'application de nsPEF, permettant le passage d'ions tels que le Tl⁺ (Bowman *et al.*, 2010), en induisant la diminution de résistance membranaire (Pakhomov *et al.*, 2009).

La technique de Patch-Clamp est ainsi la plus sensible et la plus directe pour la mesure de la formation des nanopores, que ce soit sur une échelle temporelle, ou une échelle spatiale.

A. Détection des nanopores par Patch-Clamp et problématique

La technique de Patch-Clamp « whole cell » consiste en la mesure de courant à travers la membrane plasmique d'une cellule. Afin de pouvoir pratiquer cette mesure, la membrane plasmique est rompue par aspiration à l'intérieur d'une micro-pipette mise au contact avec la membrane, provoquant ainsi la dialyse du cytosol avec le tampon de la pipette. Deux électrodes sont présentes dans le système : une se trouvant dans la pipette, et la deuxième dans le milieu extracellulaire. Une tension augmentant par palier est appliquée sur ces électrodes, et le courant résultant est mesuré (Figure 44). Par convention le courant est déterminé par le flux de cations passant à travers la membrane. Pour des valeurs négatives de courant est donc mesuré le passage d'ions vers l'intérieur de la cellule, et pour les valeurs positives vers l'extérieur de la cellule. Les courbes obtenues sont appelées courbes I/U car elles représentent le courant en fonction de la tension appliquée.

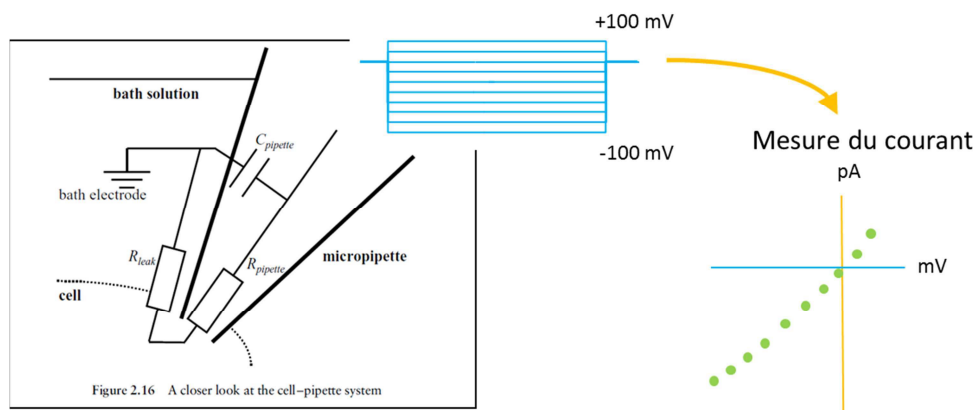


Figure 44 : Principe du Patch-Clamp en mode « whole cell » et schéma électrique. La membrane plasmique est aspirée et rompue à l'intérieur de la micropipette. Une tension croissante est appliquée entre les deux électrodes présentes dans le milieu (extérieur de la cellule) et dans la micropipette. Le courant mesuré traduit le passage d'ions positifs entre les deux électrodes. Ions entrant pour les valeurs négatives de courant, ions sortant pour les valeurs positives et résultat en courbe I/U. Adapté de Areles Molleman, 2002.

Les mesures de courant lors de l'application d'un ou plusieurs nsPEF montrent la modification transitoire des courants entrant, dit rectification du courant entrant (« inward rectification ») pour les voltages négatifs, comme présenté Figure 45. Ce phénomène est directement corrélé à la présence de nanopores qui vont laisser passer préférentiellement les ions positifs de l'extérieur vers l'intérieur de la cellule.

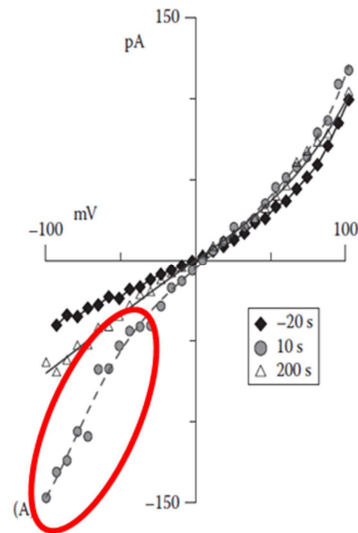


Figure 45 : L'application d'un nsPEF de 600 ns 1,6 kV/cm à $t = 0$ s provoque la formation de pores modifiant les courants entrants (entourés en rouge), se refermant progressivement (retour du courant initial à 200 s). Les mesures sont effectuées sur cellules GH3 présentant des canaux ioniques, d'où la présence de courant sortant pour les voltages positifs. Composition des tampons identique à l'extérieur et l'intérieur de la pipette (mM) : 150 K-acetate, 1 MgCl₂, 5 HEPES; pH 7,4. Adapté de Pakhomov et Pakhomova, 2010.

Cette augmentation du courant entrant voltage-dépendant a pu être obtenue sur différents types cellulaires avec ou sans canaux ioniques et avec différents tampons, symétriques ou non (Nesin *et al.*, 2011; Pakhomov *et al.*, 2009; Pakhomova et Pakhomov, 2010). Cette propriété intrinsèque spécifique et universelle des nanopores en fait donc leur signature (Pakhomova et Pakhomov, 2010). Elle traduit un comportement asymétrique au niveau fonctionnel comme mesuré ici par Patch-Clamp, montrant de manière indirecte mais fiable le passage préférentiel des ions positifs vers l'intérieur de la cellule. Cependant, des études sur membranes synthétiques ont montré que la forme de nanopores de cette taille est asymétrique (Siwy et Fuliński, 2002). Il est donc devenu possible de corrélérer cette asymétrie fonctionnelle à une asymétrie structurale, et de proposer le modèle ci-dessous (Figure 46). Dans ce modèle, l'asymétrie des nanopores est considérée comme induite par le cytosquelette. En effet certains composants du cytosquelette, en particulier l'actine corticale, interagissent avec la membrane via des interactions directes avec les phospholipides ou un ancrage via des protéines transmembranaires (Lodish H *et al.*, 2000). Ces interactions provoqueraient l'ouverture de pores en forme d'entonnoir car elles empêcheraient la diffusion des lipides de la couche interne de la membrane. En Figure 46-F, le modèle interprète la formation de pores plus larges permettant le passage de propidium, tels que ceux pouvant être provoqués par l'application d'impulsions longues ou de plus de 20 nsPEF (Pakhomova et Pakhomov, 2010).

Ces pores plus larges résulteraient d'une déstabilisation des interactions du cytosquelette avec la membrane, permettant alors le passage d'ions dans les deux sens (vers l'intérieur et vers l'extérieur) et de taille plus importante.

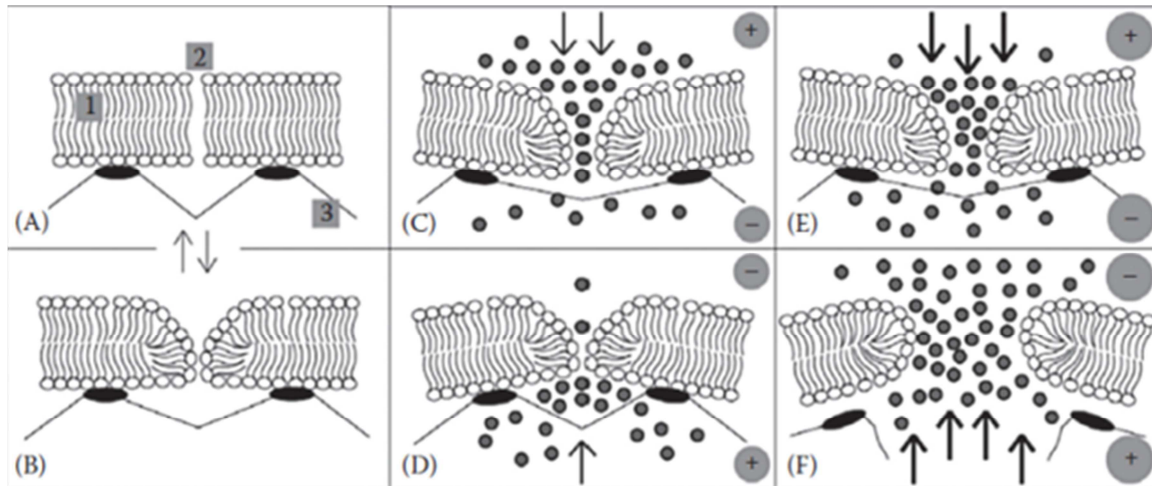


Figure 46 : Structure et état hypothétique d'un nanopore. (A, B) Un défaut membranaire va être rempli par des molécules d' H_2O , et les phospholipides vont aligner leur tête polaire face à ces molécules pour former un pore. La charge négative de ces têtes polaires explique la sélectivité des pores pour les cations. La colonne d'eau permet les fluctuations thermales de la forme et du diamètre du pore sans provoquer sa fermeture. Sur la face intracellulaire de la bicouche phospholipidique, les fluctuations moléculaires sont limitées par les interactions avec le cytosquelette, provoquant une forme conique en entonnoir du pore. (C, D) Cette forme facilite l'entrée de cations mais restreint le flux sortant, provoquant une rectification du courant entrant (Figure 45). (E) Un courant entrant prolongé pousse les bordures du pore afin d'augmenter le flux, ce qui peut expliquer la dépendance au voltage et au courant des nanopores. (F) Pour de fortes forces extérieures, la pression des cations peut détacher la membrane du cytosquelette, provoquant la rupture du nanopore en un pore plus large, ne rectifiant pas le courant entrant, perméable à l'iodure de propidium. Adapté de Pakhomova et pakhomov 2010.

Les travaux réalisés dans l'équipe du docteur A. Pakhomov au Frank Reidy Bioelectrics Center, ODU Norfolk, VA avaient pour objectif de confirmer ou réfuter l'hypothèse de l'implication du cytosquelette dans l'asymétrie des nanopores. Les mesures de courant par Patch-Clamp ont été réalisées suite au traitement des cellules par des molécules inhibitrices de la polymérisation d'actine.

B. Résultats

1. *Formation des nanopores*

Pour cette étude, le même tampon était présent dans la pipette et à l'extérieur de la cellule, permettant ainsi la mesure réelle du passage de l'ion Cs^+ à travers la membrane (voir Matériel et Méthode pour la composition exacte du tampon). Le protocole électrique utilisé

consistait à augmenter la tension de -100mV à 40 mV par palier de 10 mV par seconde sur 15 secondes. Les mesures étaient effectuées sur la même cellule avant et après l'application d'une impulsion de 60 ns à 4,4 kV/cm grâce aux micro-électrodes de tungstène (Figure 50, intensité déterminée grâce aux simulations 3D du champ résultant entre les électrodes). Les mesures 20 s après l'application du nsPEF sont présentées car ce temps suffit à déterminer l'asymétrie ou non des nanopores. Les cellules utilisées sont des cellules CHO-K1 ne présentant aucun canal ionique, ce qui a permis de ne mesurer que les rectifications induites par les nanopores (Gamper *et al.*, 2005). L'application du nsPEF a été effectuée sur des cellules en configuration « whole cell » et des expériences contrôle ont été faites pour s'affranchir de toute mesure artéfactuelle liée à la présence des micro-électrodes risquant de modifier les mesures de courants. De la même façon, toute perte anormale du signal gigaohmique a entraîné l'élimination du set de données mesuré.

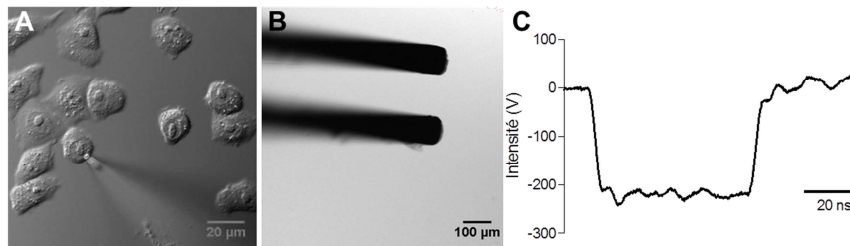


Figure 47 : A : Cellule et pipette en configuration « whole cell ». B : électrodes de tungstène servant à l'application du nsPEF. C : Profil d'impulsion en sortie de générateur résultant après calcul à 4,4 kV/cm.

On peut observer que, comme pour les cellules contrôle (Figure 48-A), la présence des électrodes de tungstène dans le tampon ne provoque pas de changement de courant artéfactuel sur les courbes I/U (Figure 48-B). Après l'application d'un nsPEF, les mesures de courant ont permis de retrouver la rectification de courant décrite précédemment (Figure 48Figure 51-B).

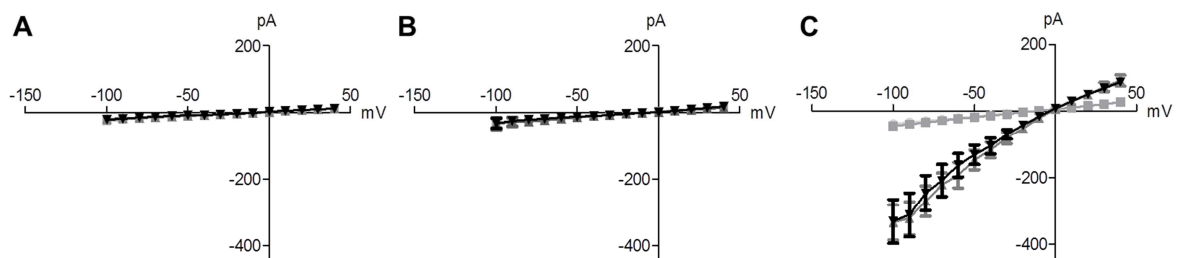


Figure 48 : Mesures de courant sur cellules contrôle (A), cellules exposées aux électrodes sans application du nsPEF (B), ou cellules soumises à l'application d'un nsPEF (C). ■ : 20 s avant le nsPEF, ■ : respectivement 10 et 20 s après l'application du nsPEF. Moyenne et SEM.

2. Effet des drogues dépolymérisant l'actine

Nous avons vérifié tout d'abord l'efficacité des molécules inhibant la polymérisation de l'actine : la Latrunculine A (0,1 μ M pendant 1 heure) et la Cytochalasine D (1 μ M pendant 1 heure). La Figure 49 montre des cellules contrôle CHO-K1 exprimant une actine couplée à la molécule mApple fluorescente. L'addition de Latrunculine provoque la dépolymérisation de l'actine dont le marquage est plus diffus et concentré autour du noyau de par la forme ronde adoptée par les cellules qui ne peuvent plus adhérer pleinement au support. Les cellules traitées par la cytochalasine D présentent également une forte affectation morphologique et l'actine se trouve localisée en un point dans le cytoplasme. En effet, bien qu'imparfaitement décrit, les modes d'action de ces deux drogues ne semblent pas être exactement les mêmes (Coué *et al.*, 1987; Lin *et al.*, 1980; Spector *et al.*, 1983). Il était donc intéressant de comparer leurs effets sur la formation des nanopores.

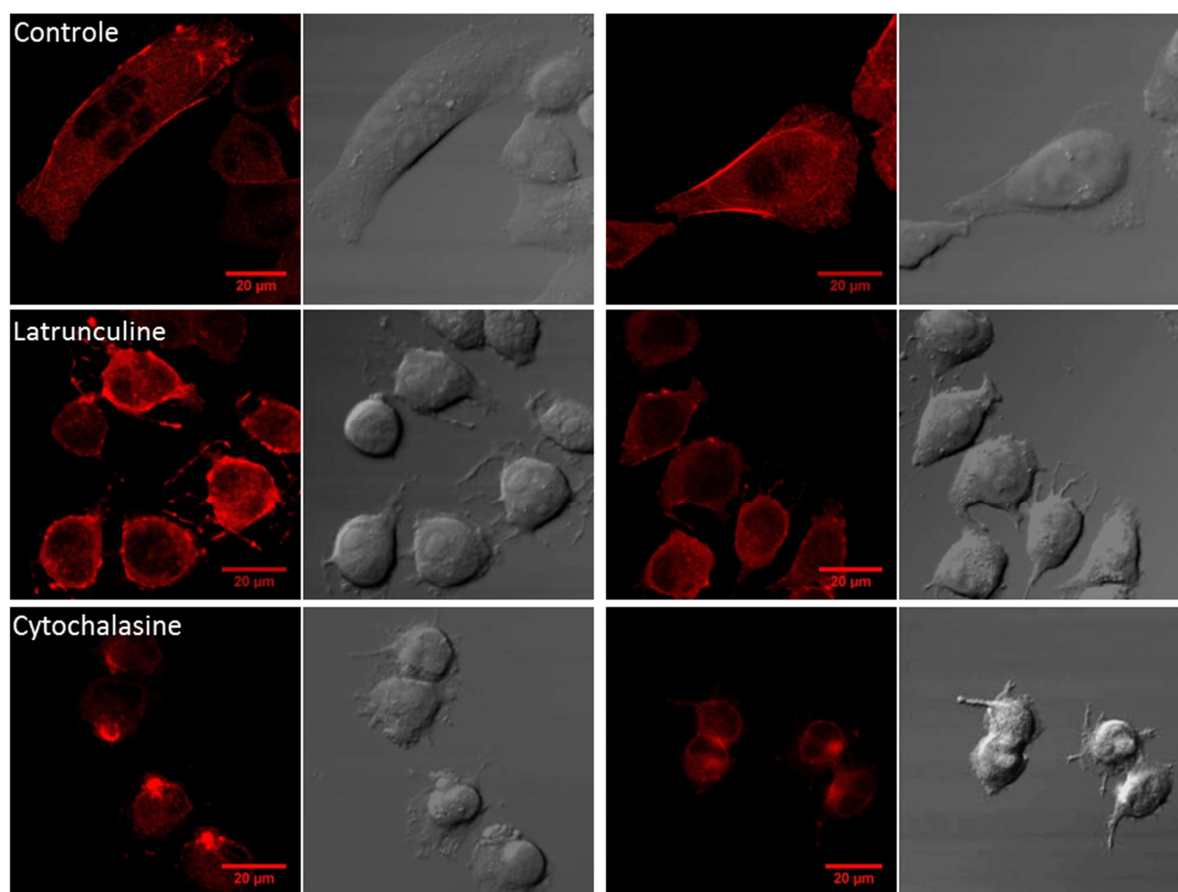


Figure 49 : Effet de la Latrunculine A et Cytochalasine D sur la polymérisation de l'actine et la morphologie cellulaire.

3. Implication du cytosquelette d'actine dans l'asymétrie des nanopores

La stratégie a consisté à reproduire les mesures de courant sur les cellules traitées avec les drogues, à comparer qualitativement l'allure des courbes I/U (Figure 50), et quantitativement la conductance membranaire, correspondant à la pente des courbes (Figure 51). La conductance est l'inverse de la résistance, elle augmente donc lors de la formation des nanopores pour les valeurs négatives de courant en raison du flux entrant de cations.

L'observation des courbes I/U sur les cellules traitées (Figure 50) montre une rectification du courant entrant similaire aux cellules contrôle (Figure 48).

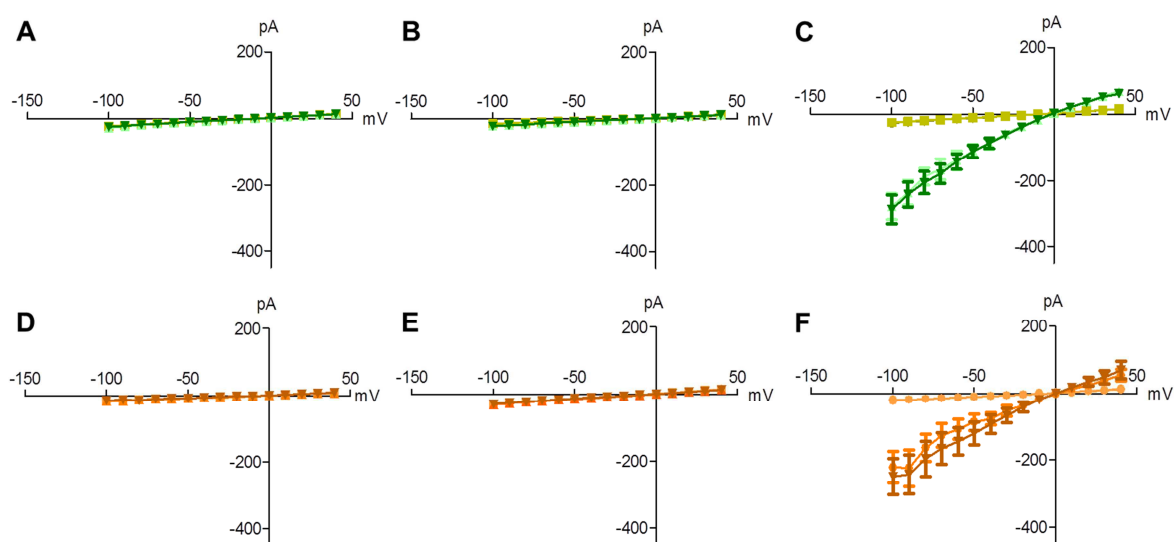


Figure 50 : Mesures de courant sur cellules contrôle (A, D), cellules exposées aux électrodes sans application du nsPEF (B, E), ou cellules soumises à l'application d'un nsPEF (C, F). (A, B, C) cellules traitées Latrunculine, (D, E, D) cellules traitées Cytochalasine. ■ : 20 s avant le nsPEF, ▼ : 10 et ▲ : 20 s après l'application du nsPEF. Moyenne et SEM.

L'analyse comparative des courbes 20 s après l'application du nsPEF lorsque les nanopores sont formés tend à montrer une variation dans la rectification du courant entrant pour les valeurs négatives de voltage. En effet les courbes I/U pour les cellules traitées par les drogues montrent une rectification moins importante qui se traduit par une entrée plus limitée de cations que pour les cellules contrôle. Cependant, pour les valeurs positives de tension, on observe que la sortie de cations est aussi diminuée, ce qui ne permet pas de conclure quant à la modification des flux d'ions sur les cellules traitées. De plus, les différences observées ne sont pas significatives étant donné le recouvrement des barres d'erreur (Figure 51).

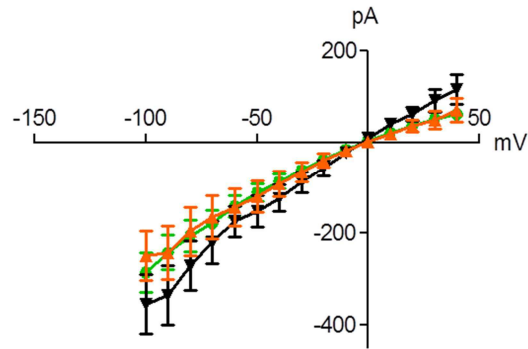


Figure 51 : Courbes du courant mesuré 20 s après l'application du nsPEFs sur des cellules contrôle (▼), traitées Latrunculine (▼) ou Cytochalasine (▼). Moyennes et SEM.

Afin d'obtenir des données quantitatives, nous avons donc calculé la conductance liée au flux entrant, mais aussi au flux sortant, étant donné que la modification de la structure du pore vers une symétrie entrainerait des flux sortant et entrant égaux. La pente des courbes pour des tensions négatives (entrant, pente 1) et positives (sortant, pente 2) a donc été mesurées (Figure 52).

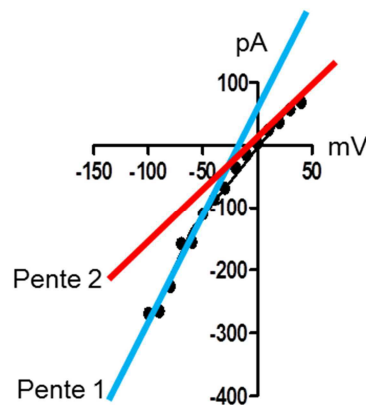


Figure 52 : Analyse des données de P-Clamp par mesure des pentes des courbes et ainsi de la conductance liée aux flux entrant et sortant d'ions.

Les cellules traitées montrent une conductance basale significativement plus faible que les cellules contrôle. Cependant l'application du nsPEF provoque la même augmentation de conductance, pour les cellules contrôle, traitées Latrunculine A ou traitées Cytochalasine D (Figure 53), que ce soit pour des voltages négatifs ou positifs.

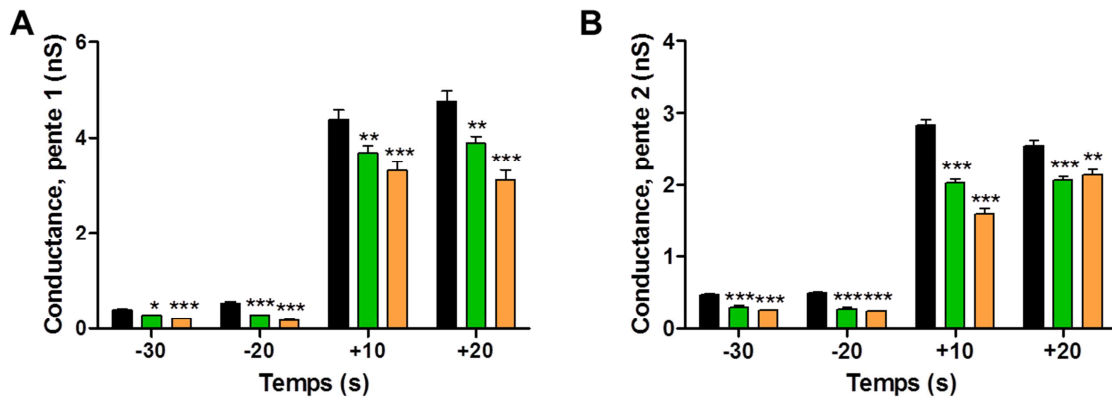


Figure 53 : Mesure de la conductance membranaire pour les voltages positifs (A, pente 1) et négatif (A, pente 2). Le nsPEF est appliqué à $t = 0$. Les cellules contrôle (noir) n'ayant pas subi de traitement montrent une augmentation de la conductance liée à la formation des nanopores après l'application du nsPEF. Les cellules traitées avec la Latrunculine A (vert) ou la Cytochalasine D (orange) montrent la même augmentation de conductance. Moyenne \pm SEM, Student unpaired t-test. Entre 10 et 15 cellules ont été mesurées par condition.

C. Conclusion

L'utilisation de drogues inhibant la polymérisation de l'actine n'a pas provoqué la formation de pores symétriques. En effet les mesures de conductance ne montrent aucun changement significatif entre les cellules non traitées et les cellules traitées soit avec la Latrunculine A soit avec la Cytochalasine D (Figure 53). L'entrée préférentielle de cations vers l'intérieur de la cellule a toujours lieu malgré la dépolymérisation de l'actine. Cette dépolymérisation, comme observée Figure 49, provoque pourtant un changement radical au niveau de la morphologie de la cellule étant donné le rôle joué par les filaments d'actine sur la structuration cellulaire et membranaire. En effet ces microfilaments vont intervenir dans l'ancrage cellulaire au support via les points focaux d'adhésion. Mais l'actine n'intervient pas seulement sous la forme de microfilament, elle va aussi constituer un réseau sous membranaire, dit réseau cortical d'actine, qui interagit fortement avec la membrane pour lui donner sa forme lisse (Lodish H *et al.*, 2000). Il était donc logique de penser que les interactions protéiques et lipidiques avec l'actine pouvaient intervenir dans la formation des nanopores en limitant la diffusion des lipides sur la couche interne de la membrane (Figure 46). L'absence de différence dans les flux d'ions à travers ces nanopores soulève de nouveau la question relative à leur possible structure conique.

Deux hypothèses se dégagent des précédentes observations qui n'impliquent pas le cytosquelette d'actine dans la forme des nanopores :

- La structure conique des nanopores est liée à d'autres contraintes que le cytosquelette, la dépolymérisation de l'actine par les drogues n'entraîne donc aucun changement dans les flux d'ions.
- Les interactions actine/membrane sont déstabilisées par les nsPEF, entraînant la même réponse sur les cellules contrôle que sur les cellules dont l'actine est dépolymérisée. Cette déstabilisation pourrait causer le phénomène de « swelling » (Hohenberger *et al.*, 2011; Romeo *et al.*, 2013).

Dans les deux cas, la forme conique est donc provoquée par un autre phénomène que l'on peut par exemple imaginer lié à la courbure de la membrane. La contrainte de courbure de la membrane pourrait provoquer la forme asymétrique en considérant que la couche externe de lipide serait plus étirée que la couche interne. En effet toutes les simulations numériques sont actuellement réalisées sur un modèle membranaire plan, mais on sait que les cellules présentent de nombreuses invaginations et évaginations induisant des courbures, et que la forme de la cellule elle-même tend à courber la membrane.

De plus il n'est pas à oublier que, si le cytosquelette interagit avec la membrane en interne, des interactions membranaires ont aussi lieu sur la couche externe. Les sucres du glygocalix vont interagir tant avec les protéines transmembranaires qu'avec les lipides, et peuvent donc aussi influencer la formation des nanopores.

III. Effet sur l'enveloppe nucléaire

Ces travaux ont été menés en collaboration avec Dr. T. Batista-Napotnik et Dr. D. Miklavcic, Universitat Ljubljana, Laboratory of Biocybernetik, Ljubljana, Slovénie.

- A. « Nanosecond electric pulses effects on gene expression », article accepté dans Journal of Membrane Biology en 2013

Sur la base de l'étude de Beebe *et al.* en 2003 (Beebe *et al.*, 2003b), nous nous sommes intéressés à mesurer la capacité des nsPEF à augmenter le taux de transfection en combinant des impulsions millisecondes (8x5 ms, 1 Hz, 400 V/cm) pour perméabiliser la membrane plasmique et des nsPEF (de 1 à 200 impulsions de 10 ns, 10 Hz, 10 kV/cm) à différents temps

après les impulsions millisecondes. Cette stratégie permettait d'étudier l'effet des nsPEFs sur la membrane plasmique lorsque les nsPEF sont appliquées directement après les millisecondes, mais aussi sur les différentes étapes du transfert de gène lorsqu'elles sont appliquées au bout de 30 min (impact sur le transport intracytoplasmique du plasmide), 2 h, 6 h (impact sur le passage de l'enveloppe nucléaire) ou 24h (impact sur l'expression). Ces expériences ont été réalisées sur cellules CHO, et l'effet des nsPEF a aussi été étudié sur cellules HCT-GFP.

Nanosecond Electric Pulse Effects on Gene Expression

Louise Chopinet · Tina Batista-Napotnik ·
Audrey Montigny · Matej Rebersek ·
Justin Teissié · Marie-Pierre Rols · Damijan Miklavčič

Received: 19 December 2012 / Accepted: 22 June 2013
© The Author(s) 2013. This article is published with open access at Springerlink.com

Abstract Gene electrotransfection using micro- or millisecond electric pulses is a well-established method for safe gene transfer. For efficient transfection, plasmid DNA has to reach the nucleus. Shorter, high-intensity nanosecond electric pulses (nsEPs) affect internal cell membranes and may contribute to an increased uptake of plasmid by the nucleus. In our study, nsEPs were applied to Chinese hamster ovary (CHO) cells after classical gene electrotransfer, using micro- or millisecond pulses with a plasmid coding the green fluorescent protein (GFP). Time gaps between classical gene electrotransfer and nsEPs were varied (0.5, 2, 6 and 24 h) and three different nsEP parameters were used: 18 ns-10 kV/cm, 10 ns-40 kV/cm and 15 ns-60 kV/cm. Results analyzed by either fluorescence microscopy or flow cytometry showed that neither the percentage of electrotransfected cells nor the amount of GFP expressed was increased by nsEP. All nsEP parameters also had no effects on GFP fluorescence intensity of human colorectal tumor cells (HCT-116) with constitutive expression of GFP. We thus conclude that nsEPs have no

major contribution to gene electrotransfer in CHO cells and no effect on constitutive GFP expression in HCT-116 cells.

Keywords Nanosecond electric pulse · Gene electrotransfection · Electroporation · Nuclear envelope · Plasmid DNA

Introduction

Electroporation is a physical method used to improve delivery of nonpermeant molecules into cells. The technique was introduced by Neumann and Rosenheck (1972), and its mechanism has been studied for decades. It is used in clinics to potentiate the effects of cytotoxic drugs for cancer treatment, a method called “electrochemotherapy” (ECT) (Mir et al. 2003). Based on the use of “medium”-lasting electric pulses (100–900 μ s at an electric field in the range of several hundreds of volts per centimeter), ECT permeabilizes the plasma membrane of tumor cells and allows anticancer drugs (such as bleomycin and cisplatin) to enter directly into the cytoplasm and eventually kill tumor cells (Kotnik et al. 2012). These medium pulses or longer ones (1–10 ms with an electric field intensity in the range of several hundred volts per centimeter) are also used for gene transfer as they not only permeabilize the membrane but also cause DNA to move toward the permeabilized cell membrane due to electric forces (electrophoresis) and to enter the cell to be expressed (Escoffre et al. 2010; Golzio et al. 2002a; Kanduser et al. 2009; Paganin-Gioanni et al. 2011; Satkauskas et al. 2002). This approach, called “gene electrotransfer,” has a main clinical application in gene therapy and DNA vaccination, and for now one clinical trial has been published (Daud et al. 2008), while several others are ongoing (Heller and Heller 2010;

L. Chopinet and T. Batista-Napotnik have contributed equally to this work.

L. Chopinet · A. Montigny · J. Teissié · M.-P. Rols (✉)
CNRS, IPBS - UMR 5089, 205 route de Narbonne,
BP 64182, 31077 Toulouse Cedex 4, France
e-mail: rols@ipbs.fr

L. Chopinet · A. Montigny · J. Teissié · M.-P. Rols
UT1, UTM, LAAS, ITAV, UPS, INSA, INP, ISAE,
Université de Toulouse, 31077 Toulouse Cedex 4, France

T. Batista-Napotnik · M. Rebersek · D. Miklavčič (✉)
Faculty of Electrical Engineering, University of Ljubljana,
Ljubljana, Slovenia
e-mail: damijan.miklavcic@fe.uni-lj.si

El-Kamary et al. 2012). Longer (millisecond) pulses have been shown to be the more efficient in gene transfer (Cemazar et al. 2009). The protocol using classical gene electrotransfection parameters (8×5 ms, 700 V/cm, 1 Hz) is efficient *in vitro* since >30 % of cells can express the gene coded by plasmid DNA (Chinese hamster ovary [CHO] and human colorectal tumor [HCT] cells) while preserving cell viability to a large extent (Chopinnet et al. 2012; Golzio et al. 2002a; this study). However, in skin tumors, this rate decreases dramatically both *ex vivo* (Chopinnet et al. 2012) and *in vivo* (Cemazar et al. 2009; Rols et al. 1998). Improvements of the method are therefore needed to allow its wider use in gene therapy.

Gene transfer can be described as a two-barrier process at the cell level irrespective of vectorization technique (viral, chemical or physical). Firstly, plasmid DNA must cross the plasma membrane; and secondly, after migration through the cytoplasm, it must cross the nuclear envelope in order to be expressed. Studies on the cell cycle have shown that gene electrotransfer efficiency is increased when the nuclear envelope is disrupted, i.e., when cells are pulsed during G_2 phase (Golzio et al. 2002b; Escoffre et al. 2010). Exposure of cells to medium and long electric pulses leads to plasma membrane permeabilization; thus, the first barrier is overcome, but the second barrier, the nuclear envelope, remains a challenge.

Deng et al. (2003) and Schoenbach et al. (2001) introduced a new class of short pulses into electroporation research, called “nanosecond electric pulses” (nsEPs, 4–600 ns), linked to technological improvements (Rebersek and Miklavcic 2011; Sundararajan 2009). These nsEPs are described as being able to disturb membranes of internal organelles under high voltage (several tens of kilovolts per centimeter). Numerical simulation as well as theory showed that nsEPs are capable of destabilizing internal cell membranes because of their charging time (Gowrishankar et al. 2011; Kotnik and Miklavcic 2006; Schoenbach et al. 2001; Tekle et al. 2005; Retelj et al. 2013). Results obtained *in vitro* revealed several effects on cell organelles such as permeabilization of intracellular granules (Schoenbach et al. 2001), endocytotic vesicles (Napotnik et al. 2010) and large endocytosed vacuoles (Tekle et al. 2005) as well as calcium release from endoplasmic reticulum (ER) (Beebe et al. 2003; for review, see Joshi and Schoenbach 2010). In this context, as nsEPs have an effect on internal organelle membranes, the point was to consider that they might have an effect on the nuclear envelope. Using nsEPs, the nuclear envelope barrier could be overcome and gene electrotransfer efficiency enhanced by allowing plasmid DNA (already present in the cell cytoplasm due to large pulses) to gain access to the nucleus. This is why over 10 years ago the following strategy began to be investigated: combination of medium or long electrical pulses to first permeabilize the plasma membrane and allow plasmid to access cytoplasm,

followed by application of nsEPs to destabilize the nuclear envelope and enhance gene expression by increasing the number of plasmids entering the nucleus (Fig. 1a). Beebe et al. (2003) described that nsEPs may have a significant effect on gene electrotransfer. In this publication, a 3.6-fold increase in gene expression (green fluorescent protein [GFP] fluorescence intensity) was measured by flow cytometry for cells exposed to classical electroporation plus one nsEP 30 min later when compared to control with only classical electroporation. The same results were reported by Beebe et al. (2004).

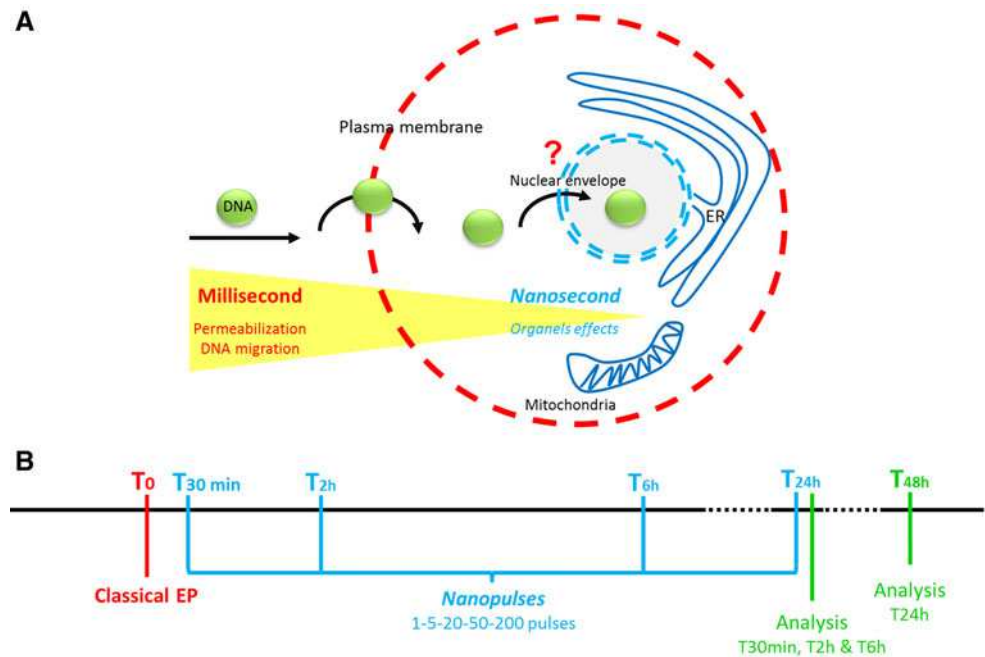
Since then, however, no other publication can be found on this subject using nsEPs. One work using one pulse of 5- μ s at 9 kV/cm showed some effects on the nucleus and permeability but not on gene transfection (Bellard and Teissié 2009). In our present study, we followed the same strategy with a new set of nsEPs using multiple pulses and different delays between classical EPs and nsEPs (Fig. 1b). We performed three sets of experiments with different electrical parameters but using the same protocol, meaning we first pulsed CHO cells in the presence of a plasmid coding the GFP with classical gene electrotransfer parameters and after different time gaps (0 and 30 min and 2, 6 and 24 h) applied 1, 5, 20, 50 or 200 nsEPs.

The first set (see Table 1) was composed of the combination of 8×5 ms, 400 V/cm, 1-Hz pulses for classical gene transfer and 18 ns, 10 kV/cm, 10 Hz for nsEPs. For the second set we used the same classical electrotransfection protocol and 10 ns, 40 kV/cm, 10 Hz for nsEPs. For the third and last set classical electrotransfection was performed with 4×200 μ s, 1.2 kV/cm, 1 Hz and 15 ns, 60 kV/cm, 10 Hz was used for nsEPs. Then, 24 h after nsEP application we analyzed transfection rate and fluorescence intensity by flow cytometry or fluorescence microscopy (depending on the lab where the experiments were performed). We also exposed human colorectal tumor cells (HCT-116), stably transfected for GFP, to all nsEP parameters and analyzed the effect these might have on gene expression. Overall, no major effects of nsEPs could be detected.

Materials and Methods

Cell Culture

CHO cells (wild-type Toronto; ATCC, Manassas, VA) were used for studying gene electrotransfection and nsEPs. Cells were grown as a monolayer culture in minimum essential Eagle medium with Earle’s salts and nonessential amino acids (EMEM; Eurobio, Les Ulis, France), supplemented with 10 % fetal bovine serum (GIBCO/Life Technologies, Grand Island, NY), L-glutamine (0.58 g/l, GIBCO/Life Technologies), 2.95 g/l tryptose-phosphate (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO), BME vitamins (Sigma-Aldrich), 3.5 g/l

Fig. 1 Biological context and experimental outline (Color figure online)**Table 1** Description of the three sets of electrical parameters used

	Classical electrotransfection parameters	nsEP parameters
Set 1	8 × 5 ms, 400 V/cm, 1 Hz	18 ns, 10 kV/cm, 10 Hz
Set 2	8 × 5 ms, 400 V/cm, 1 Hz	10 ns, 40 kV/cm, 10 Hz
Set 3	4 × 200 μs, 1.2 kV/cm, 1 Hz	15 ns, 60 kV/cm, 10 Hz

glucose (Sigma-Aldrich) and the antibiotics penicillin (100 U/ml) and streptomycin (100 μg/ml, both from GIBCO/Life Technologies) at 37 °C, 5 % CO₂ atmosphere in a humidified chamber until they reached 70 % confluence.

HCT-116 cells, which are derived from human colorectal carcinoma cells and present constitutive expression of GFP, were used for studying the effects of nsEPs on gene expression. Cells were infected with viral vectors to stably express enhanced GFP (eGFP). To that purpose, a retroviral vector, MFG-eGFP, encoding eGFP under the control of 50 long terminal repeats (LTRs), was used. 293T cells, generously provided by Genethon (Evry, France), were transiently transfected using the calcium phosphate coprecipitation protocol with pMDG encoding VSV-G protein, pGagPol encoding gag and pol and MFG-eGFP. Viruses containing supernatants were collected 36–72 h after transduction, filtered and concentrated to titers of 1 to 5 × 10⁹ colony forming units/ml. HCT-116 cells were plated in a 35-mm culture dish 24 h prior to transduction. On day 0 cells were transduced with viral vectors at a multiplicity of infection of 100:1. After transduction (48 h), cells were harvested for FACS analysis on a Becton–Dickinson FACS Calibur to select cells stably expressing

eGFP. Cells were grown as a monolayer culture in Dulbecco's modified Eagle medium with glucose, L-glutamine and sodium pyruvate (GIBCO/Life Technologies), supplemented with 10 % fetal bovine serum and the antibiotics penicillin and streptomycin at 37 °C, 5 % CO₂ atmosphere in a humidified chamber.

Gene Electrotransfection Protocols

Three different conditions were used to study nsEP effects on gene transfer, using two different electrical parameters for classical gene electrotransfection and three different electrical parameters for nsEPs as summarized in Table 1. Each experiment was repeated three times independently.

CHO cells were first exposed to electric pulses that are generally used in gene transfer electroporation (EP) protocols. Cells were incubated for 0 and 30 min and for 2, 6 and 24 h and then exposed to nsEPs (1, 5, 20, 50 and 200 pulses). Cells were trypsinized and suspended in phosphate buffer (PB; 10 mM KH₂PO₄/KH₂PO₄, 1 mM MgCl₂, 250 mM saccharose [pH 7.4]) at a concentration of 3 × 10⁶ cells/ml, and 40 μg/ml pEGFP-C1 plasmid was added. For 8 × 5 ms, 400 V, 1-Hz parameters 420 μl of cell solution was put between stainless steel, flat, parallel electrodes (1-cm gap, resulting in an electric field of 400 V/cm) and exposed to square-wave electric pulses at room temperature using a pulse generator (electrocells20; Betatech, Bordeaux, France). For 4 × 200 μs, 1 Hz, 480 V parameters, 800 μl of cell suspension was placed into an Eppendorf (Hamburg, Germany) cuvette (4 mm, resulting in an electric field of 1.2 kV/cm), and pEGFP-N1 plasmid

was added (40 $\mu\text{g}/\text{ml}$). Cells were electroporated with an electric pulse generator (GHT 1287B; Jouan, St. Herblain, France).

For 0 min incubation, cells were immediately transferred to electroporation cuvettes and pulsed with nsEPs (see “Nanosecond Electroporation” below). For longer incubation times, fetal bovine serum was added to cells after pulsing (20 % of suspension volume), and the mixture was incubated for 5 min at 37 °C to prevent cells from dying and to improve plasma membrane resealing (Delteil et al. 2000; Haberl et al. 2010). Cells were then transferred to 5 ml EMEM and incubated for 30 min or 2 h, with occasional shaking. Cells that were incubated for 6 and 24 h were seeded to a small culture flask (25 cm^2) and placed in a 5 % CO_2 incubator, allowing them to attach to the surface; later they were trypsinized, centrifuged and resuspended in 70 μl of pulsation buffer for nsEP.

Nanosecond Electroporation

Cells in EMEM were centrifuged and transferred to PB at a concentration of 3×10^6 cells/ml. Cell suspension (70 μl) was placed in electroporation cuvettes with built-in aluminum electrodes with a 1-mm gap (Eppendorf). Cells were pulsed with 1, 5, 20, 50 and 200 nsEPs. Cells pulsed only with classical EP pulses, no nsEPs, were used as a control. After applying nsEPs, fetal bovine serum was added to cells after pulsing (20 % of suspension volume) and incubated for 5 min. Finally, cells were placed in 24-well plates in 1 ml of medium and incubated for 24 h (from EP pulsing) in a CO_2 chamber.

At 24 h after nsEP pulsing, cells were analyzed by flow cytometry or fluorescence microscopy (see below). For the point where nsEPs are applied 24 h after classical parameters, GFP expression was analyzed 24 h after nsEP application.

Plasmid DNA

pEGFP-C1 or pEGFP-N1 (Clontech, Mountain View, CA), a 4.7-kb plasmid DNA encoding GFP, was amplified in *Escherichia coli* DH5 α and purified with the Maxiprep DNA Purification System or the HiSpeed Maxi kit (Qiagen, Hilden, Germany) according to the manufacturer’s protocol.

nsEP Generators

A PBG2 (Kentech Instruments Ltd, Wallingford, UK) generator was used, delivering 18- and 10-ns pulses at 10 or 40 kV/cm , respectively (sets 1 and 2) (Fig. 2). The pulse profile was recorded directly on the electrodes through a Barth attenuator (142-HMFP-10 dB; Barth, Boulder City, NV) and other attenuators that on the whole attenuate up to 60 dB (Kenaan et al. 2011) by means of an oscilloscope

(TDS5104B, 1 GHz; Tektronix, Beaverton, OR). This generator was triggered by a Betatech generator (Electrocell S20) to monitor the number of pulses and frequency.

For the third set of nsEP parameters, a custom-designed nanosecond, high-voltage electric pulse generator was used. It was designed and manufactured at the Laboratory of Biocybernetics at the Faculty of Electrical Engineering, University of Ljubljana, as a diode opening switch generator, described elsewhere (Rebersek and Miklavcic 2011). The pulses were measured at the electrodes by a LeCroy PPE 6 kV probe and the Wave Surfer 422 oscilloscope (Teledyne LeCroy, Chestnut Ridge, NY) (Fig. 2).

Permeabilization Assay

Cells were pulsed in the conditions described above (pulsing protocol one) in the presence of 0.1 mM propidium iodide (Sigma-Aldrich), incubated for 5 min at room temperature and observed under a fluorescence microscope (Leica, Wetzlar, Germany; DMRIB microscope, filter 515–560, Mirror 580, LP 590, 100 \times objective for permeabilization observation).

Gene Expression

HCT-116 cells with constitutive expression of GFP were trypsinized and suspended in PB at a concentration of 3×10^6 cells/ml. Cells were then transferred to electroporation cuvettes, and 1, 5, 20, 50 and 200 nsEPs were applied with the three set of parameters described previously. Cells were then incubated for 24 h in the same manner as CHO cells.

Flow Cytometry and Data Analysis (Sets 1 and 2)

At 24 h after EP application (for sets 1 and 2) cells were trypsinized and suspended in Dulbecco’s phosphate-

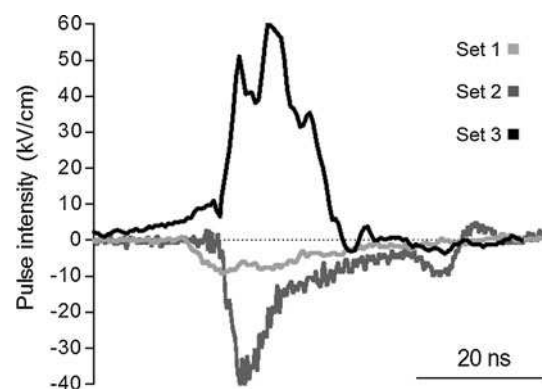


Fig. 2 nsEP profiles for the three sets described in Table 1

buffered saline without Mg and Ca (Eurobio). Cells with a 24-h time gap between EP and nsEP were trypsinized 24 h after nsEP (48 h after EP). Cells were then analyzed by flow cytometry at $\lambda_{EX} = 488$ nm and $\lambda_{EM} = 520/42$ nm BP (FacsCalibur, Becton–Dickinson). A minimum of 2,000 cells (debris excluded) were counted per sample. Data were analyzed using Excel software (Microsoft, Redmond, WA). The mean fluorescence of transfected cells was normalized to the control for figure presentation. One-way ANOVA repeated measurement was used on raw data to determine statistical differences between pulsed groups and control using GraphPad Prism Software (GraphPad Software, La Jolla, CA).

Fluorescence Microscopy (Set 3)

After 24 h, three images per Petri dish on a distinct area were recorded using an epifluorescent microscope (Leica DFC450 C): 40 \times objective, excitation wavelength 470 nm and appropriate filter set (EX470/D495/EM525), with the same image acquisition parameters (for transfection, CHO cells, exposure time 1.5 s, gain 5 \times ; for expression, HCT-116 cells, exposition time 1 s, gain, 4 \times). Images were analyzed with a Java-based image processing program (ImageJ; National Institutes of Health, Bethesda, MD); fluorescent cells were counted and the mean fluorescence of cells was determined (background fluorescence subtracted). Statistical analysis was performed using Excel and SygmaPlot (Systat Software, Chicago, IL). Statistically significant differences were tested using one-way ANOVA.

Results and Discussion

Do nsEPs Improve Plasmid DNA Nuclear Envelope Crossing?

CHO cells were pulsed in the presence of plasmid DNA with a combination of classical EP pulses and nsEP. Time gaps between classical EP and nsEP pulses (0 and 30 min, 2, 6 and 24 h) and number of nsEPs (0, 1, 5, 20, 50 and 200) were varied. We used three different sets of parameters (Table 1). At 24 h after nsEP application gene expression was determined either by flow cytometry (sets 1 and 2, Figs. 3, 4) or by fluorescence microscopy (set 3, Fig. 5). Compared to data obtained only for classical electrotransfection pulse application (0 nsEP), results show that transfection rates (% of transfected cells) in control cells (submitted only to classical EP) present a mean of 31 ± 11 % using sets 1 and 2 (Figs. 3a, 4a) and 14 ± 8 %

in set 3 (Fig. 5a). These results demonstrate that, depending on the plasmid used and the classical electrotransfer parameters chosen, the transfection rate is different, also depending on the use of millisecond pulses (sets 1 and 2) or microsecond pulses (set 3) *in vitro*, though both well within the range usually reported for these kinds of electric parameters.

No significant effects on the percentage of GFP-positive cells can be measured when cells were submitted to nsEPs immediately after the classical EP (Figs. 3a, 4a, time 0). Despite the fact that nsEPs with these electrical parameters permeabilize the plasma membrane (Fig. 6c–e), these results are consistent with the fact that plasmids can only enter the cell when classical EP is applied as no increase in transfection rate is observed when nsEPs are applied immediately after classical EP. Indeed, DNA needs electrophoretic forces to migrate toward the permeabilized plasma membrane and enter the cell (Faurie et al. 2010; Kanduser et al. 2009). This means that nsEPs do not participate in plasma membrane permeabilization in the same way that classical EP does and do not allow DNA to cross the plasma membrane. Thus, for the last set (i.e., set 3) of electrical conditions, we performed nsEP only at 30 min and 2, 6 and 24 h after classical EP.

When the nsEPs were applied at different time gaps after classical EP (0, 5, 2, 6 and 24 h), no increase in transfection rate was obtained (Figs. 3a, 4a, 5a). As no DNA was added for these points, we were expecting an increase in the number of plasmids expressed (fluorescence intensity) more than the transfection rate. When analyzing the mean fluorescence intensity of transfected cells, no statistical increase in gene expression was measured whatever the nsEP parameters (Figs. 3b, 4b, 5b).

Fluorescence intensity is directly correlated to the number of GFPs inside the cell, linked to the number of expressed gene, which means the number of plasmids inside the cell that have reached the nucleus transcriptional machinery (Cohen et al. 2009). As we know, DNA must go from the plasma membrane to the nucleus through the cytoplasm. This involves active transportation of plasmid DNA (Rosazza et al. 2011, 2012; Vaughan and Dean 2006). Here, we show that no further increase in the amount of DNA accessing the nucleus, and therefore protein expression, can be detected when 200 nsEPs are applied 2 or 6 h after classical EP (i.e., after plasmid DNA is already present inside the cell). Thus, at these times, even if there is still DNA in the cytoplasm but not yet in the nucleus, nsEPs do not have a beneficial effect on nuclear envelope crossing. The effect of endonuclease activity and further inactivation of plasmid can also be taken into account for this absence of effect. Moreover, as shown in 2009 and 2011, nsEPs are able to trigger an actin response

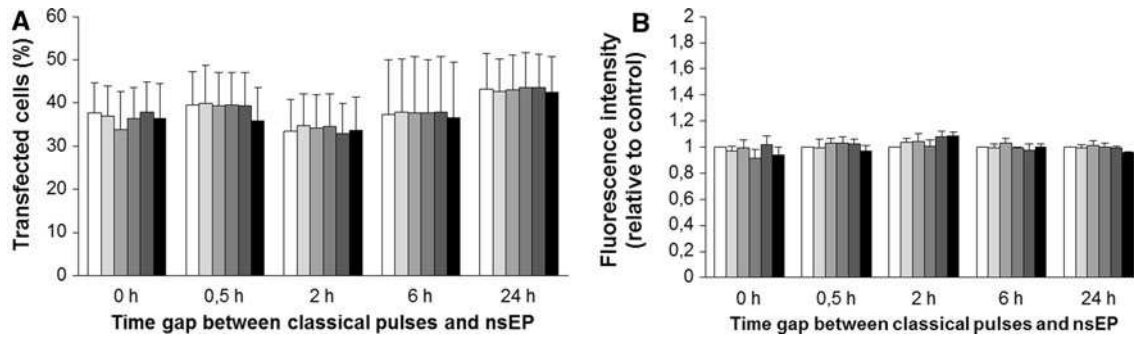


Fig. 3 Effect of nsEP on gene electrotransfection in CHO cells—set 1 parameters. *White bar* represents control and progressively *grey bars* represent 1, 5, 20 and 50 nsEP, with the *black bar* representing

200 nsEP. **a** Percentage of transfected cells. **b** Mean GFP fluorescence intensity relative to control in transfected cells. *Data* are means \pm standard errors of three independent experiments

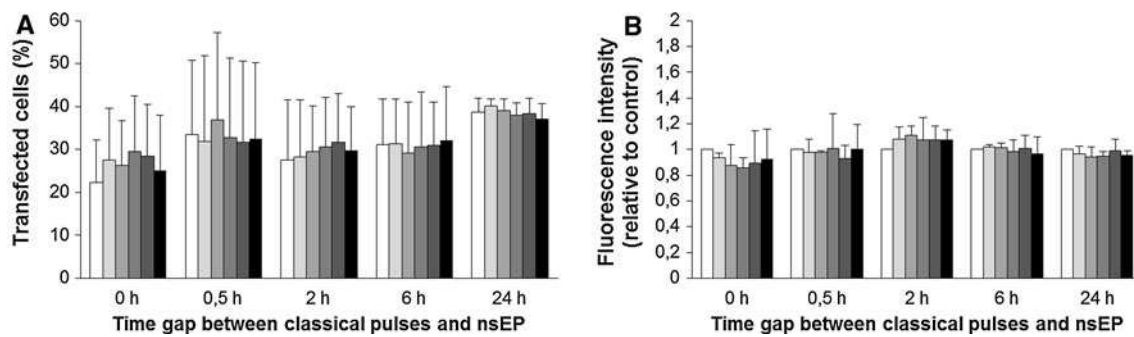


Fig. 4 Effect of nsEP on gene electrotransfection in CHO cells—set 2 parameters. *White bar* represents control and progressively *grey bars* represent 1, 5, 20 and 50 nsEP, with the *black bar* representing

200 nsEP. **a** Percentage of transfected cells. **b** Mean GFP fluorescence intensity relative to control in transfected cells. *Data* are means \pm standard errors of three independent experiments

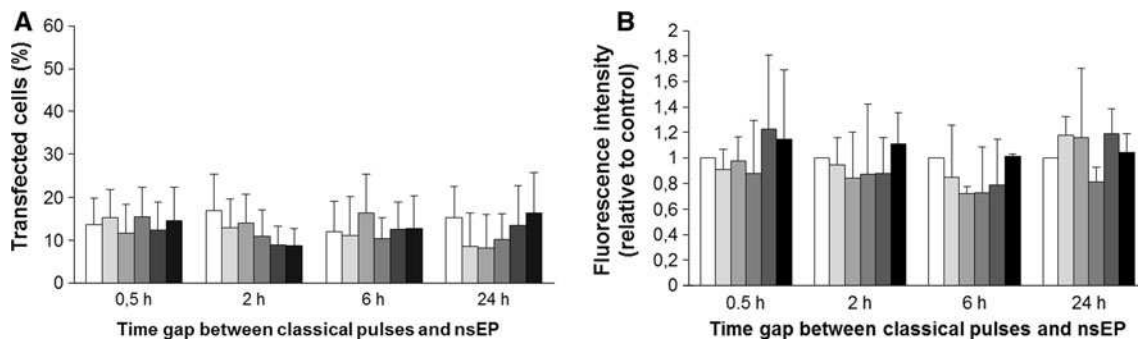


Fig. 5 Effect of nsEP on gene electrotransfection in CHO cells—set 3 parameters. *White bar* represents control and progressively *grey bars* represent 1, 5, 20 and 50 nsEP, with the *black bar* representing

200 nsEP. **a** Percentage of transfected cells. **b** Mean GFP fluorescence intensity relative to control in transfected cells. *Data* are means \pm standard errors of three independent experiments

in plant cells, so these effects on cytoskeletal components can interfere with DNA migration and thus stop its motion toward to the nucleus (Berghöfer et al. 2009; Hohenberger et al. 2011).

In contrast to the results reported by Beebe et al. (2003, 2004), we observed no increase after applying a single nsEP or up to 200 nsEPs, independently of the time after classical EP that they were applied as well as

electrical parameters. Even if the intensity in our study is lower than that in the studies by Beebe et al., we expected that applying a large number of pulses should have had an effect. In addition, nsEPs did not contribute to a better transfection rate—the percentage of transfected cells remained unchanged. Numerical simulations (Joshi et al. 2004; Kotnik and Miklavcic 2006; Retelj et al. 2013) predict that the electric parameters of cells

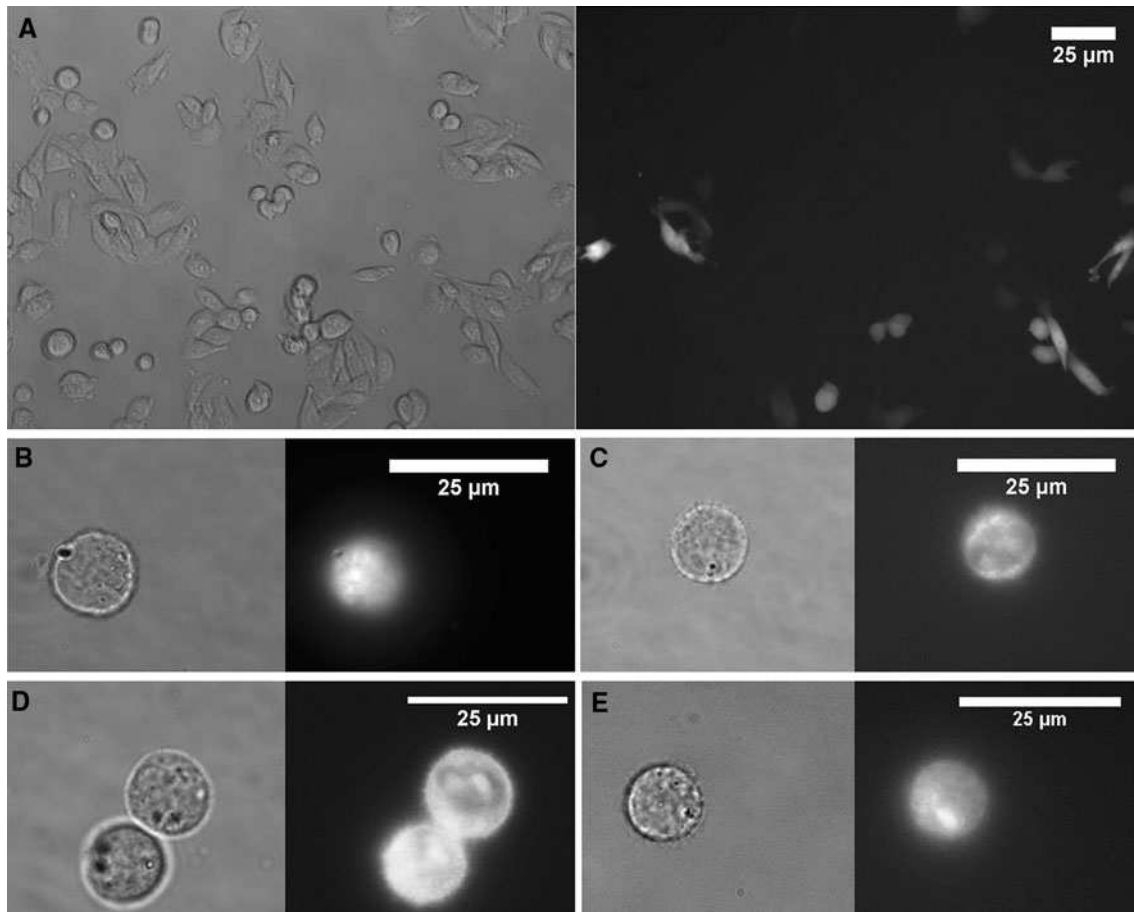


Fig. 6 Expression and permeabilization of cells. **a** CHO cells to set 1 parameters in 6-h time gap between EP and nsEP, observed 24 h after nsEP. Phase contrast image and fluorescence image of GFP expression (40× objective). **b** Permeabilization of cells observed by entry of propidium iodide, contrast phase and fluorescence image for classical

electroporation protocol only of set 1 (100× objective). **c–e** Permeabilization of cells submitted to 200 nsEP only of sets 1, 2 and 3, respectively—phase contrast image and fluorescence-associated (100× objective)

and organelles (e.g., membrane capacitance and internal conductivity) lead to differences in charging times of the membranes, organelles presenting a shorter time than the plasma membrane and thus are potentially specifically sensible to nsEP. The plasma membrane is a simple lipid bilayer, whereas the nuclear envelope consists of two lipid bilayers. The outer bilayer is connected to the ER and the inner is supported by nuclear lamina and DNA, which confer to the nuclear envelope a higher complexity than ER or mitochondria that has been shown to be destabilized by nsEP. Moreover, it has several proteins inserted in and large pore complexes that span through both bilayers (Wente and Rout 2010) that may prevent any effects of electric fields as the nuclear envelope cannot represent a simple capacitor. Nowadays, no simulations at this level of complexity are available in the

literature, and therefore, only experimental data can help us to define nsEP incidence on this structure.

Do nsEPs Affect Endogenous Expression?

HCT-116 cells with constitutive expression of GFP were pulsed using the three electrical parameters for nsEP as presented in Table 1 but without any classical pulses applied prior to nsEP. Mean GFP fluorescence was compared to nonpulsed control cells. Applying nsEP did not alter mean fluorescence compared to nonpulsed cells as measured by flow cytometry (Fig. 7a, b) or fluorescence microscopy (Fig. 7c). In all of these conditions, no effect could be measured. These results suggest that nsEP has no effect on the cell lines used in our experiments for GFP expression (CHO transient electrotransfection and HCT endogenous expression).

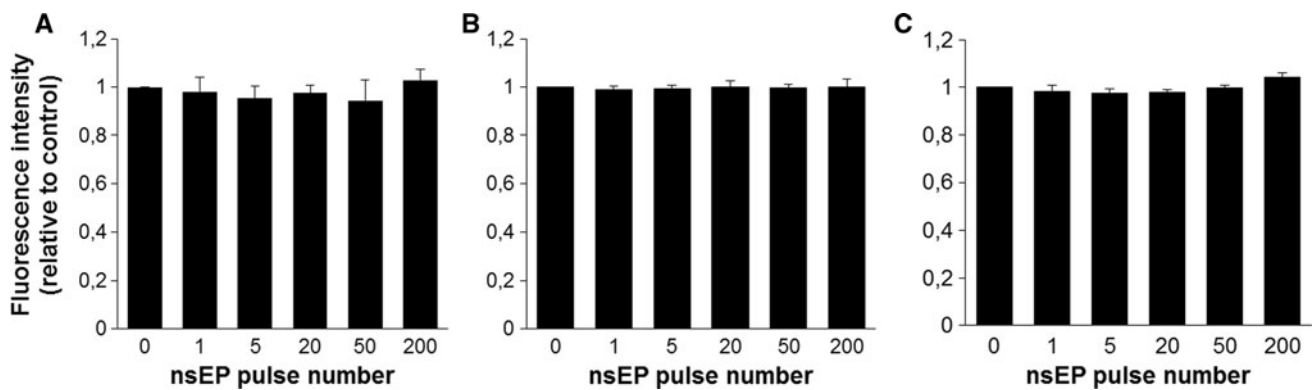


Fig. 7 Effect of nsEP on expression of GFP in HCT-116-GFP cells: mean GFP fluorescence intensity relative to control is presented. Data are means \pm standard errors of three independent experiments.

Conclusion

We can conclude that, under all conditions used in our study, nsEPs have no effect on gene expression (either for transfected or for endogenous genes) and their use, according to the present knowledge and experience, will not help in increasing gene electrotransfection efficiency. We can state that nsEPs are not “permeabilizing,” i.e., breaching the nuclear envelope or plasma membrane in the same way as classical EP does with long and medium pulses that efficiently permeabilize the plasma membrane. Other experiments performed with a lower quantity of plasmid or with a higher electric field intensity and number of pulses could perhaps help to detect an effect of nsEP on the nuclear envelope by making an increase in the number of plasmids expressed more visible.

Acknowledgments We thank Direction Générale de l’Armement for the 3-year grant to L. C. and the PROTEUS European project, which provided financial support. This research was also supported by the Slovenian Research Agency. Research was conducted in the scope of the EBAM European Associated Laboratory. This report is the result of networking efforts of COST Action TD1104 (<http://www.electroporation.net>). We thank CEA-gramat for the Kentech generator loan and the Geno-toul-imagerie-TRI platform. We thank R. Vezinet (CEA Gramat), A. Catrain (CEA Gramat) and C. Mauroy for help with the electric setup; P. Levêque (Xlim, Limoges, France) for the Barth attenuator loan; and Maša Kanduđer and Mojca Pavlin for valuable discussions on the experimental details of gene transfer experiments.

Open Access This article is distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License which permits any use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author(s) and the source are credited.

References

Beebe SJ, White J, Blackmore PF, Deng YP, Somers K, Schoenbach KH (2003) Diverse effects of nanosecond pulsed electric fields on cells and tissues. *DNA Cell Biol* 22:785–796

a Results 24 h after nsEP of 18 ns, 10 kV/cm, 10 Hz. **b** Results 24 h after nsEP of 10 ns, 40 kV/cm, 10 Hz. **c** Results 24 h after nsEP of 15 ns, 60 kV/cm, 10 Hz

- Beebe SJ, Blackmore PF, White J, Joshi RP, Schoenbach KH (2004) Nanosecond pulsed electric fields modulate cell function through intracellular signal transduction mechanisms. *Physiol Meas* 25(4):1077–1093
- Bellard E, Teissié J (2009) Double pulse approach of electroporation: a fluorescence analysis of the nucleus perturbation at the single cell level. *IEEE Trans Dielectr Electr Insulation* 16:1267–1272
- Berghöfer T, Eing C, Flickinger B, Hohenberger P, Wegner LH, Frey W, Nick P (2009) Nanosecond electric pulses trigger actin responses in plant cells. *Biochem Biophys Res Commun* 387(3): 590–595
- Cemazar M, Golzio M, Sersa G, Hojman P, Kranjc S, Mesojednik S, Rols MP, Teissié J (2009) Control by pulse parameters of DNA electrotransfer into solid tumors in mice. *Gene Ther* 16:635–644
- Chopinnet L, Wasungu L, Rols MP (2012) First explanations for differences in electrotransfection efficiency in vitro and in vivo using spheroid model. *Int J Pharm* 423:7–15
- Cohen RN, van der Aa MA, Macaraeg N, Lee AP, Szoka FC (2009) Quantification of plasmid DNA copies in the nucleus after lipoplex and polyplex transfection. *J Control Release* 135:166–174
- Daud AI, DeConti RC, Andrews S, Urbas P, Riker AI, Sondak VK, Munster PN, Sullivan DM, Ugen KE, Messina JL, Heller R (2008) Phase I trial of interleukin-12 plasmid electroporation in patients with metastatic melanoma. *J Clin Oncol* 26:5896–5903
- Delteil C, Teissié J, Rols MP (2000) Effect of serum on in vitro electrically mediated gene delivery and expression in mammalian cells. *Biochim Biophys Acta* 1467:362–368
- Deng JD, Schoenbach KH, Buescher ES, Hair PS, Fox PM, Beebe SJ (2003) The effects of intense submicrosecond electrical pulses on cells. *Biophys J* 84:2709–2714
- El-Kamary SS, Billington M, Deitz S, Colby E, Rhinehart H, Wu Y, Blackwelder W, Edelman R, Lee A, King A (2012) Safety and tolerability of the Easy Vax™ clinical epidermal electroporation system in healthy adults. *Mol Ther* 20(1):214–220
- Escoffre JM, Teissié J, Rols MP (2010) Gene transfer: how can the biological barriers be overcome? *J Membr Biol* 236:61–74
- Faurie C, Rebersek M, Golzio M, Kanduser M, Escoffre JM, Pavlin M, Teissié J, Miklavcic D, Rols MP (2010) Electro-mediated gene transfer and expression are controlled by the lifetime of DNA/membrane complex formation. *J Gene Med* 12:117–125
- Golzio M, Teissié J, Rols MP (2002a) Direct visualization at the single-cell level of electrically mediated gene delivery. *Proc Natl Acad Sci USA* 99:1292–1297
- Golzio M, Teissié J, Rols MP (2002b) Cell synchronization effect on mammalian cell permeabilization and gene delivery by electric field. *Biochim Biophys Acta* 1563:23–28

- Gowrishankar TR, Esser AT, Smith KC, Son RS, Weaver JC (2011) Intracellular electroporation site distributions: modeling examples for nsPEF and IRE pulse waveforms. Conference of the IEEE Engineering in Medicine and Biology Society, 2011, pp 732–735
- Haberl S, Miklavcic D, Pavlin M (2010) Effect of Mg ions on efficiency of gene electrotransfer and on cell electroporation. *Bioelectrochemistry* 79:265–271
- Heller LC, Heller R (2010) Electroporation gene therapy preclinical and clinical trials for melanoma. *Curr Gene Ther* 10(4):312–317
- Hohenberger P, Eing C, Straessner R, Durst S, Frey W, Nick P (2011) Plant actin controls membrane permeability. *Biochim Biophys Acta* 1808(9):2304–2312
- Joshi RP, Schoenbach KH (2010) Bioelectric effects of intense ultrashort pulses. *Crit Rev Biomed Eng* 38:255–304
- Joshi RP, Hu Q, Schoenbach KH (2004) Modeling studies of cell response to ultrashort, high-intensity electric fields—implications for intracellular manipulation. *IEEE Trans Plasma Sci* 32:1677–1686
- Kanduser M, Miklavcic D, Pavlin M (2009) Mechanisms involved in gene electrotransfer using high- and low-voltage pulses—an in vitro study. *Bioelectrochemistry* 74:265–271
- Kenaan M, El Amari S, Silve A, Merla C, Mir LM, Couderc V, Arnaud-Cormos D, Leveque P (2011) Characterization of a 50- Ω exposure setup for high-voltage nanosecond pulsed electric field bioexperiments. *IEEE Trans Biomed Eng* 58(1):207–214
- Kotnik T, Miklavcic D (2006) Theoretical evaluation of voltage inducement on internal membranes of biological cells exposed to electric fields. *Biophys J* 90:480–491
- Kotnik T, Kramar P, Pucihar G, Miklavcic D, Tarek M (2012) Cell membrane electroporation—part 1: the phenomenon. *IEEE Electr Insulation Mag* 28:14–23
- Mir LM, Morsli N, Garbay JR, Billard V, Robert C, Marty M (2003) Electrochemotherapy: a new treatment of solid tumors. *J Exp Clin Cancer Res* 22:145–148
- Napotnik T, Rebersek M, Kotnik T, Lebrasseur E, Cabodevila G, Miklavcic D (2010) Electroporation of endocytotic vesicles in B16 F1 mouse melanoma cells. *Med Biol Eng Comput* 48:407–413
- Neumann E, Rosenheck K (1972) Permeability changes induced by electrical impulses in vesicular membranes. *J Membr Biol* 10:279–290
- Paganin-Gioanni A, Bellard E, Escoffre JM, Rols MP, Teissié J, Golzio M (2011) Direct visualization at the single-cell level of siRNA electrotransfer into cancer cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 108:10443–10447
- Rebersek M, Miklavcic D (2011) Advantages and disadvantages of different concepts of electroporation pulse generation. *Automatika* 52:12–19
- Retelj L, Pucihar G, Miklavcic D (2013) Electroporation of intracellular liposomes using nanosecond electric pulses—a theoretical study. *IEEE Trans Biomed Eng*. doi:10.1109/TBME.2013.2262177
- Rols MP, Delteil C, Golzio M, Dumond P, Cros S, Teissie J (1998) In vivo electrically mediated protein and gene transfer in murine melanoma. *Nat Biotechnol* 16:168–171
- Rosazza C, Escoffre JM, Zumbusch A, Rols MP (2011) The actin cytoskeleton has an active role in the electrotransfer of plasmid DNA in mammalian cells. *Mol Ther* 19:913–921
- Rosazza C, Phez E, Escoffre JM, Cézanne L, Zumbusch A, Rols MP (2012) Cholesterol implications in plasmid DNA electrotransfer: evidence for the involvement of endocytotic pathways. *Int J Pharm* 423:134–143
- Satkauskas S, Bureau MF, Puc M, Mahfoudi A, Scherman D, Miklavcic D, Mir LM (2002) Mechanisms of in vivo DNA electrotransfer: respective contributions of cell electroporation and DNA electrophoresis. *Mol Ther* 5:133–140
- Schoenbach KH, Beebe SJ, Buescher ES (2001) Intracellular effect of ultrashort electrical pulses. *Bioelectromagnetics* 22:440–448
- Sundararajan R (2009) Nanosecond electroporation: another look. *Mol Biotechnol* 41:69–82
- Tekle E, Oubrahim H, Dzekunov SM, Kolb JF, Schoenbach KH, Chock PB (2005) Selective field effects on intracellular vacuoles and vesicle membranes with nanosecond electric pulses. *Biophys J* 89:274–284
- Vaughan EE, Dean DA (2006) Intracellular trafficking of plasmids during transfection is mediated by microtubules. *Mol Ther* 13(2):422–428
- Wente SR, Rout MP (2010) The nuclear pore complex and nuclear transport. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2:a000562

B. Conclusions

Ces expériences avaient pour but de déterminer un effet des nsPEF sur l'enveloppe nucléaire, en utilisant le transfert de gène comme outil de visualisation. Les résultats ne montrent aucun impact sur le transfert de gène pour toutes les conditions utilisées. Les conditions électriques appliquées ne provoquent donc pas d'effet sur les cellules. Contrairement aux résultats obtenus par Beebe *et al.* en 2003, aucune amélioration du transfert de gène n'a été observée, conduisant à la conclusion que les nsPEF ne rendent pas l'enveloppe nucléaire perméable aux plasmides dans nos conditions électriques. Concernant le fait que les nsPEF soient capables de perméabiliser la membrane plasmique mais ne produisent pas d'augmentation de la transfection, ceci peut être lié à la courte durée de ces impulsions qui ne vont pas permettre une migration électrophorétique des plasmides.

IV. Développement d'un applicateur d'impulsions nanosecondes

Ces travaux ont été réalisés en collaboration avec Dr R. Vezinet et A. Catrain, Commissariat à l'énergie atomique et aux énergies alternatives - Gramat.

L'émergence d'impulsions nanosecondes est liée à la possibilité de les appliquer de manière fiable, donc à la réalisation de générateurs permettant la formation de ces impulsions courtes avec un front de montée bref. Divers systèmes de générateur d'impulsion nanosecondes ont été mis en place (Behrend M *et al.*, 2003; Chaney et Sundararajan, 2004; Kenaan *et al.*, 2011; Kolb *et al.*, 2006; Kuthi *et al.*, 2005; Rebersek *et al.*, 2009).

Les impulsions nanosecondes nécessitent une intensité très élevée pour obtenir des effets biologiques. Le développement d'applicateurs miniaturisés a ainsi permis d'optimiser les conditions électriques, car en miniaturisant l'espace inter-électrodes il était possible d'augmenter fortement l'intensité appliquée sans nécessiter de forte intensité en sortie de générateur. Ces applicateurs sont généralement adaptés à l'observation sous microscope. Il existe des applicateurs sous forme d'électrodes de tungstène venant s'appliquer sur la cellule d'intérêt avec un espace inter-électrodes de 150 μm (Pakhomov *et al.*, 2007b, et utilisé dans la partie II de ce chapitre), ou des applicateurs sous forme de plaques présentant également un espace inter-électrode d'une centaine de microns (Arnaud-Cormos *et al.*, 2011;

Krishnaswamy *et al.*, 2007; Sun *et al.*, 2005b; Wu *et al.*, 2013). Finalement, des systèmes de microfluidique ont récemment été mis en place (Dalmay *et al.*, 2012).

Nous nécessitions un applicateur capable d’être monté sur un microscope inversé afin de réaliser des observations en temps réel des effets des nsPEF sur le noyau. En nous inspirant des travaux de Sun *et al.* (Sun *et al.*, 2005b), l’applicateur suivant a été réalisé (Figure 54-A) au CEA-Gramat. Ce système placé sur le porte-objet permettra l’acquisition d’images en microscopie lumière blanche ou fluorescence (Figure 54-B).

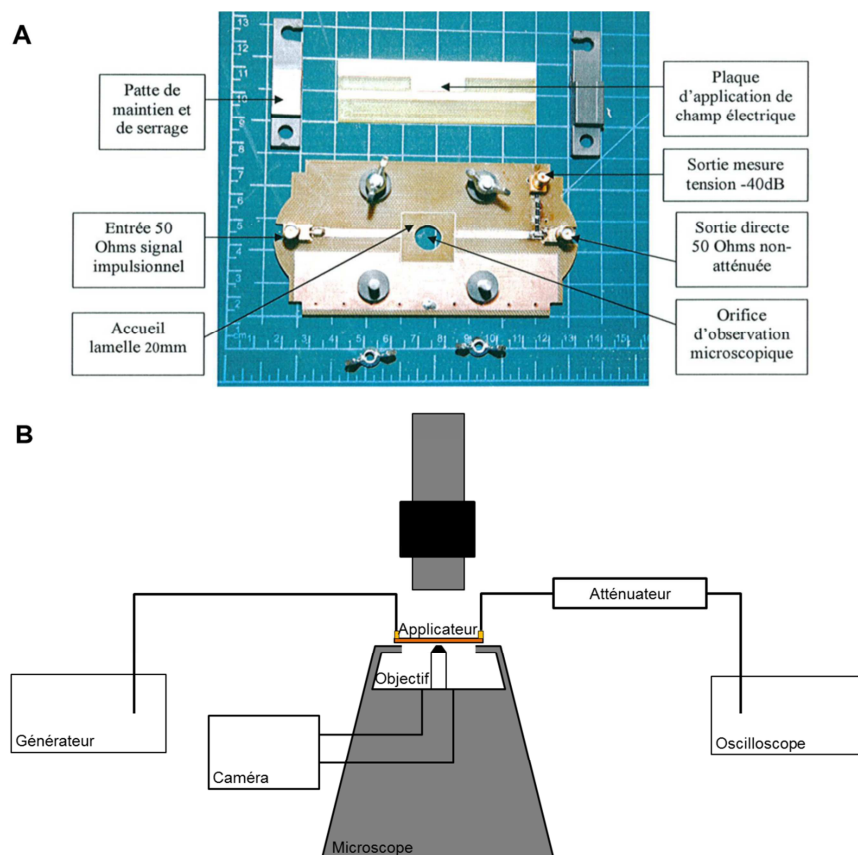


Figure 54 : Applicateur nsPEF. A : Présentation de la partie support et transmission. La plaque d’application représente les électrodes. B : schéma simplifié du montage sur microscope inversé.

Il permettra l’application d’impulsions courtes de manière fiable sur des électrodes en or d’une épaisseur de 50 μm avec largeur variable afin d’ajuster l’intensité et le volume. Ces électrodes sont réalisées sur lame de verre et placées en vis-à-vis d’une lamelle pour permette des acquisitions à fort grossissement en fluorescence. Le protocole réalisé pour la fabrication des électrodes a été élaboré à partir de la publication de Sun *et al.* 2005 (Sun *et al.*, 2005b). Trois largeurs d’électrodes ont été fabriquées : 2, 1 et 0,5 mm selon le protocole ci-dessous

(Figure 55-A), sur du verre de 1 mm d'épaisseur sur la plateforme Renatech du LAAS-CNRS. Les masques ont été réalisés suivant le même motif initial (Figure 55-B).

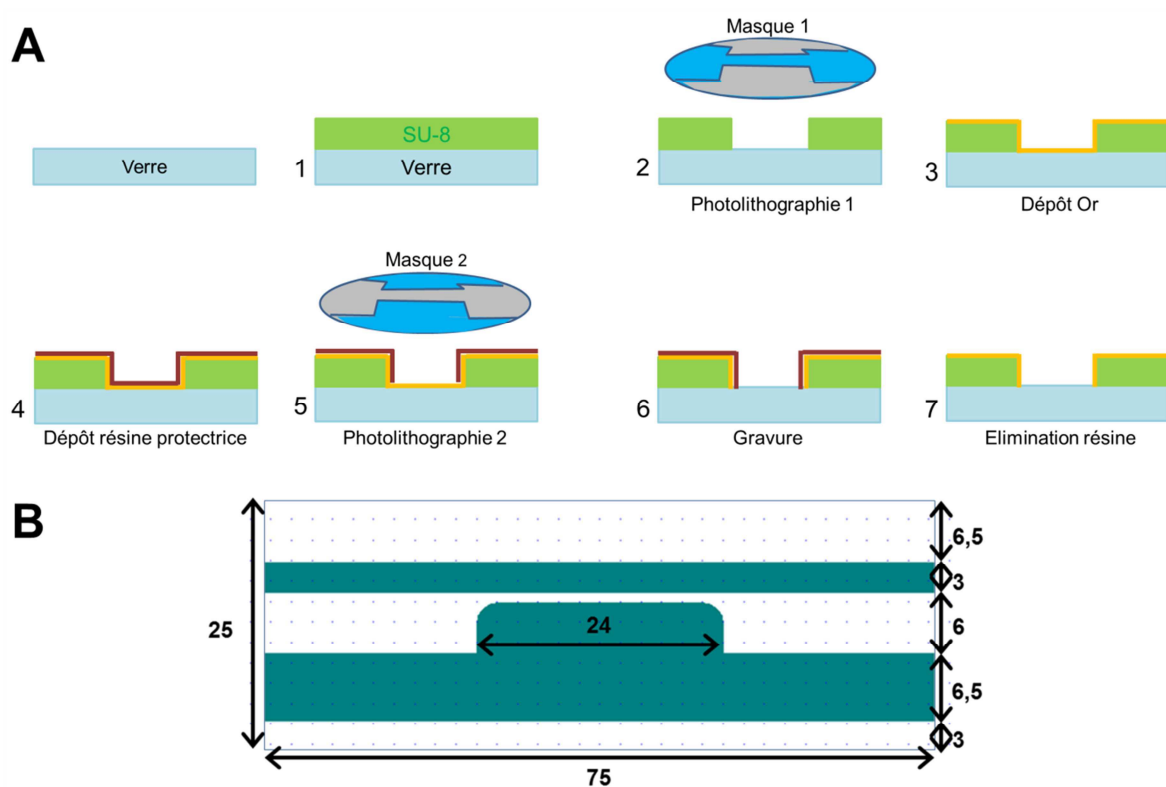


Figure 55 : Fabrication des électrodes. A : processus de fabrication par photolithographie et gravure. B : Plan des masques pour photolithographie.

La fabrication des électrodes par photolithographie et dépôt d'or en salle blanche au LAAS-CNRS est en cours. Après caractérisation de leur épaisseur au profilomètre et caractérisation de la transmission des champs électriques au niveau de l'échantillon dans l'air, l'eau et le tampon de pulsation, l'applicateur pourra être validé sur échantillon cellulaire. Cette étape de validation consistera en la visualisation de la perméabilisation membranaire suite à l'application de nsPEF comme décrit dans l'article précédent par entrée de PI. Par la suite des expériences de marquage du noyau (ADN, enveloppe nucléaire) pourront être menées afin de déterminer l'impact des nsPEF directement sur cette structure intracellulaire.

V. Discussion et perspectives

Les nsPEF se présentaient lors des premiers travaux réalisés pour les étudier comme les seules impulsions permettant d'accéder spécifiquement aux structures intracellulaires. Au

terme d'années d'études, il ressort clairement que même si les enveloppes intracellulaires arrivent à être perméabilisées, la membrane plasmique l'est aussi. L'enveloppe nucléaire, barrière majeure dans le cas de l'électrotransfert de plasmide, ne montre pas de sensibilité à ce type d'impulsion dans nos conditions.

Il a pourtant été montré que ces impulsions particulières pouvaient perméabiliser les enveloppes des organelles (mitochondrie, vacuoles, RE). Cependant la visualisation de la perméabilisation du noyau reste difficile car mis à part l'ADN, peu de composants peuvent signaler la perméabilisation de l'enveloppe, comme le Ca^{2+} peut révéler la perméabilisation du RE ou des mitochondries. Nous nous sommes proposés dans cette étude d'utiliser le transfert de gène comme outil de visualisation de la potentielle perméabilisation de l'enveloppe nucléaire, mais aussi comme une approche permettant d'augmenter l'efficacité de la méthode pour l'utilisation en thérapie.

En connaissance des effets des champs électriques sur la membrane en matière de gène (Golzio *et al.*, 2002a), il était légitime de penser que si les nsPEF pouvaient perméabiliser les enveloppes intracellulaires, alors le même type de mécanismes observé sur la membrane plasmique pouvait avoir lieu sur l'enveloppe nucléaire. Sur la base de l'article de Beebe *et al.* en 2003, nous avons voulu reproduire leurs résultats avec des conditions plus modérées permises par nos générateurs. Les effets intracellulaires des nsPEF sur l'enveloppe nucléaire ont montré que les nsPEF ne provoquaient pas d'augmentation d'expression de transgène, ni de défaut dans l'expression de gène dans nos conditions. Cependant les conditions électriques employées dans l'article de Beebe *et al.* 2003 permettant une augmentation de transfert étaient extrêmes (150 kV/cm), et nous n'avons pu les reproduire dans cette étude. L'utilisation d'intensités plus élevées ou d'un nombre d'impulsions plus important pourrait conduire à des résultats différents et ces études doivent être à présent réalisés.

Les raisons probables de l'absence d'augmentation de l'expression génique suite à l'application de nsPEF sont nombreuses. Il est à prendre en compte la complexité de l'enveloppe nucléaire comparée à celle de l'enveloppe des mitochondries et du RE. Cette membrane est déjà perméable du fait de la présence des complexes de pores nucléaires. Ces structures rendent donc l'enveloppe nucléaire moins capacitive que l'est la membrane plasmique, et peuvent donc limiter tout effet des champs électriques en laissant passer les lignes de champs au travers du noyau. D'autre part, même si l'enveloppe nucléaire est sensible aux impulsions électriques, le réseau de lamina sous l'enveloppe nucléaire peut empêcher la perméabilisation effective de l'enveloppe interne. Finalement, la taille du noyau

est beaucoup plus importante (en matière de diamètre) que celle des autres organelles qui ont pu être déstabilisés. Le diamètre du noyau, dans le cas de cellules en suspension est très proche de celui de la cellule. Les champs électriques auront donc le même effet que sur la membrane étant donné que si l'enveloppe nucléaire présente une résistance, le temps de charge sera donc similaire vis-à-vis de la durée des impulsions. Pour terminer, il est à prendre en compte que les plasmides sont des macromolécules qui nécessitent une perméabilisation de la membrane pour rentrer dans la cellule, mais dont l'internalisation dans le cytoplasme serait permise par des processus d'endocytose. Ainsi, l'entrée dans le noyau à travers l'enveloppe nucléaire suite à sa déstabilisation est elle-même peu probable. La différence de réactivité de l'enveloppe nucléaire aux nsPEF pourrait donc être définie par trois paramètres (Figure 56):

- le rayon du noyau, qui est plus proche de celui de la cellule que de celui du RE ou des mitochondries, influence le temps de charge de la membrane qui sera plus long que quelques nanosecondes dans le cas où l'enveloppe nucléaire peut être chargée.
- le fait que ce soit une double bicouche. Cependant, le RE et les mitochondries sont aussi délimités par des doubles bicouches, mais dans le cas du noyau la couche interne est en contact avec la lamina et va donc être moins « libre ».
- la présence des pores nucléaires, qui bien qu'exerçant une sélectivité d'entrée et de sortie des macromolécules, forment des « portes » d'environ 40 nm de large et rompent ainsi la continuité membranaire empêchant de présenter l'enveloppe nucléaire comme un condensateur. Cependant chaque zone de membrane entre pores nucléaires pourrait représenter un condensateur.

D'importantes reconsidérations vis-à-vis des études théoriques et des modélisations sont à faire. En effet l'enveloppe nucléaire ne peut se comparer aux autres membranes biologiques de par sa complexité et son temps de charge. Des modélisations prenant en compte la structure de l'enveloppe apporteraient des réponses.

Au vu des résultats de ce chapitre, le transfert de gène peut donc se révéler comme mauvais rapporteur de l'éventuelle déstabilisation nucléaire. Des solutions doivent être trouvées pour mettre en évidence la perméabilisation du noyau. Des expériences basées sur l'imagerie sont prometteuses afin de faire des observations en temps réels. La réalisation de l'applicateur nsPEF adapté à la microscopie à fluorescence permettra de continuer à se pencher sur les questions en utilisant des méthodologies adaptées telle que le marquage de l'ADN ou de composants de l'enveloppe nucléaire, des NPC ou encore de la lamina. Des

expériences visant à mettre en évidence des dommages à l'ADN sont aussi envisagées en parallèle d'essai de viabilité cellulaire afin de mettre en évidence des effets sur le matériel génétique.

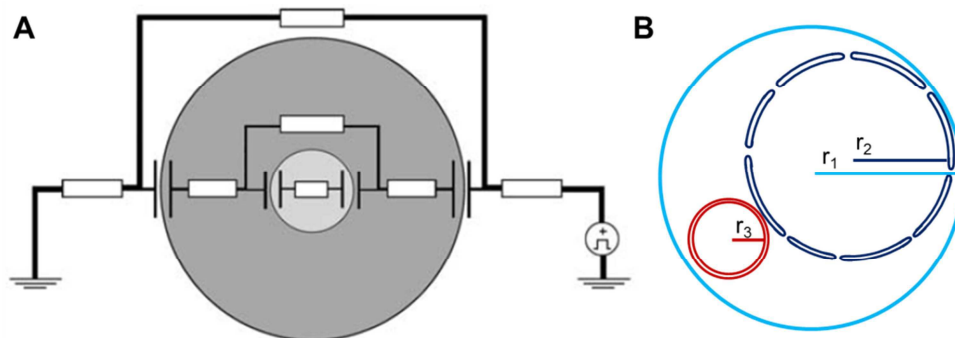


Figure 56 : Représentation électrique des membranes biologiques. A : les membranes biologiques sont des condensateurs qui vont ainsi se charger durant l'application de champs électriques. L'enveloppe des organelles est aussi considérée comme telle au vu des résultats obtenus, en particulier de libération de calcium intracytoplasmique. Adapté de Tekle *et al.* 2005. B : l'enveloppe nucléaire est une structure plus complexe que celle des autres organelles de par la présence des pores nucléaires, et de sa connexion avec la lamina. De plus son rayon est plus important que ceux des organelles et les considérations théoriques sur le temps de charge ne s'appliquent sûrement pas dans son cas.

L'étude de l'effet de ces impulsions sur la membrane n'en est qu'à ses débuts. La première partie du chapitre s'est intéressée à déterminer l'implication du cytosquelette d'actine dans la formation des nanopores provoquée par les nsPEF par Patch-Clamp. Il a été montré que la structure asymétrique de ces nanopores n'était pas affectée par l'ancrage du cytosquelette d'actine à la membrane. Ces résultats tendent à montrer que le cytosquelette d'actine peut être déstabilisé par les nsPEFs, et ainsi que la perméabilisation membranaire serait basée sur les mêmes mécanismes pour les impulsions courtes et longues.

Pour terminer, bien que les nsPEF ne montrent aucun effet bénéfique à l'électrotransfert de gène, aucun effet néfaste n'a pu être observé sur les cellules avec nos paramètres électriques. Les taux de transfection sont similaires dans toutes les conditions, indiquant que les mécanismes de transcription et traduction ne sont pas affectés par l'application des nsPEF même 24h après l'électrotransfection classique. Des études plus poussées des effets des nsPEF sur l'ADN (en particulier l'étude d'éventuelles cassures) et sur la viabilité doivent être réalisées, ainsi que l'effet d'un plus grand nombre de pulses (plus de 1000 à haute fréquence) pour confirmer l'innocuité de ces impulsions avec nos paramètres électriques.

Conclusion générale et perspectives

L'électroperméabilisation est une technique ayant montré son efficacité dans de nombreux domaines (conservation en agro-alimentaire, désinfection, extraction de protéines, transfert de molécules...). Au niveau thérapeutique, en chimiothérapie, elle favorise l'accès des molécules actives au cytoplasme des cellules et potentialise leur effet cytotoxique. Son mécanisme est basé sur la perméabilisation transitoire de la membrane plasmique qui, révélée par l'entrée de petites molécules, s'initie aux pôles de la cellule faisant face aux électrodes. L'application de cette technique au transfert de macromolécules d'ADN est prometteuse pour le développement d'une méthode de vectorisation en thérapie génique et vaccination par ADN. Cependant à l'heure actuelle l'efficacité de la technique *in vivo* peut encore être améliorée concernant le transfert en tissu tumoral qui présente de faibles taux de transfection (Cemazar *et al.*, 2009a). Cette optimisation ne peut se passer d'une compréhension du mécanisme de transfert de gènes au niveau cellulaire afin de lever les verrous biologiques et technologiques. Au cours de cette thèse, trois verrous biologiques à l'électrotransfert de gène ont été étudiés : le passage par le plasmide portant le gène des cellules environnant la cellule cible, les mécanismes de perméabilisation membranaire, et le passage de l'enveloppe nucléaire. Des technologies innovantes de visualisation et de mesure ont été utilisées pour l'étude du transfert de gènes (AFM, Patch-Clamp...) et les effets des conditions électriques émergentes (champs électriques pulsés nanoseconde) sur le vivant ont été évalués.

La validation du modèle sphéroïde pour l'étude de la barrière cellulaire a révélé que ce modèle reproduit les conditions *in vivo* (Figure 57). Il permet aujourd'hui de prédire les résultats sur le petit animal et doit servir à optimiser les conditions électriques avant l'utilisation du petit animal. Les travaux réalisés sur ce modèle par microscopie confocale révèlent un problème de diffusion de l'ADN entre les cellules de la structure multicellulaire tri-dimensionnelle, qui ne passe pas les premières couches de cellules, et reste donc en surface du sphéroïde. De plus, nous avons montré que l'état perméable de la membrane, probablement lié à la proximité des cellules voisines, se maintient plus longtemps. Cela conduit à la mort cellulaire de l'ensemble des cellules des couches externes du sphéroïde et à quelques cas de fusion. D'autres informations cruciales seront amenées par la réalisation de coupes qui permettront de visualiser les cellules du cœur du sphéroïde et l'étude des cellules dans cet environnement complexe.

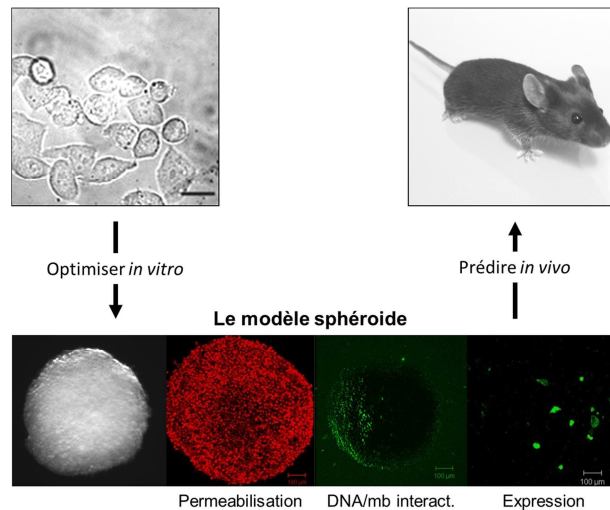


Figure 57 : Le modèle sphéroïde reproduit les résultats obtenus *in vivo*, et permet une compréhension des barrières rencontrées par le plasmide sur une structure multicellulaire. Bien que toutes les cellules soient perméabilisées seulement celles en surface du sphéroïde sont en contact avec l'ADN plasmidique lors de l'électrotransfert, et la majorité de ces cellules ne récupèrent pas leur intégrité membranaire, menant à un très faible taux de transfection.

Après avoir étudié les effets de l'électroperméabilisation sur un modèle multicellulaire, nous avons souhaité obtenir des mesures à l'échelle de la cellule unique afin d'étudier la deuxième barrière au transfert de gène : la membrane plasmique. Pour cette étude, l'AFM est un outil de choix, car elle permet de travailler en conditions physiologiques, sur une cellule unique et vivante. L'utilisation de la microscopie à force atomique a d'une part montré l'utilité de cette technique pour visualiser, et surtout mesurer directement les effets de la perméabilisation sur cellules vivantes sans marquage. D'autre part, elle a permis de mettre en évidence des effets globaux sur l'ensemble de la cellule et non localisés aux pôles faisant face aux électrodes ou la perméabilisation est initiée, comme il avait été montré par l'intermédiaire de l'entrée de PI. L'intérêt de l'AFM est de pouvoir réaliser des images topographiques et des mesures nano-mécaniques sur cellules vivantes à haute résolution (120 nm dans notre cas). Cette technique nous a permis d'observer la déstabilisation membranaire au cours du temps suite à l'application des champs électriques de transfert de gène et de mesurer une diminution d'élasticité membranaire suite à sa perméabilisation de l'ordre de 15 kPa (Figure 58). Les premières hypothèses sur la cause de cette diminution globale d'élasticité s'orientent vers une déstabilisation du réseau d'actine corticale, mise en évidence par des mesures d'élasticité sur cellules traitées par la Latrunculine. Les informations recueillies grâce à l'AFM amènent une nouvelle vision nano-mécanique de l'électroperméabilisation et permettent la mesure d'effets internes qui n'ont pas encore été mis en évidence par d'autres techniques.

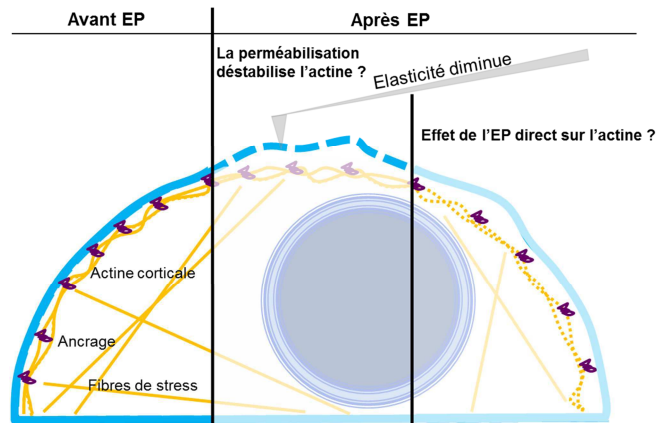


Figure 58 : L'AFM permet de donner une dimension nanomécanique au phénomène d'électropéabilisation en montrant une diminution d'élasticité plus longue que la perméabilisation membranaire visualisée par entrée de PI. Cette diminution peut être liée à une déstabilisation de l'actine corticale mais il reste à déterminer si c'est un effet secondaire de la perméabilisation membranaire ou un effet direct des champs électriques.

Finalement, l'effet des impulsions électriques nanosecondes émergentes a été étudié sur la membrane plasmique, mais aussi sur la dernière barrière rencontrée par le plasmide : l'enveloppe nucléaire. Ces études ont révélé que le cytosquelette d'actine n'était pas impliqué dans la formation des nanopores membranaires asymétriques, et que les impulsions nanosecondes ne permettaient pas d'augmenter le nombre de plasmides ayant accès à la machinerie de transcription dans le noyau. Afin d'aller plus loin dans l'investigation des effets des impulsions nanosecondes sur le noyau et son enveloppe, des applicateurs adaptés à la microscopie à fluorescence ont été développés. Leur utilisation permettra une caractérisation fine de l'impact de ses impulsions courtes sur les cellules vivantes (Figure 59).

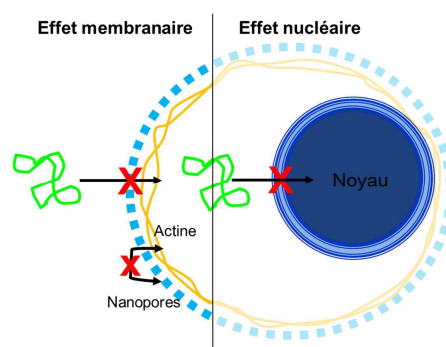


Figure 59 : Les impulsions nanosecondes provoquent la formation, indépendante de l'actine, de nanopores membranaires asymétriques qui ne vont pas participer au passage de la membrane plasmique par les plasmides. Ces impulsions ne provoquent pas non plus d'augmentation d'efficacité de transfection, i.e. du nombre de plasmide atteignant la machinerie de transcription.

Dans l'ensemble, ces travaux montrent une importante différence de sensibilité des cellules aux impulsions électriques selon qu'elles soient isolées en suspension, adhérentes ou organisées en 3D. Nous avons pu voir que les impulsions millisecondes de transfert de gène utilisées avaient des effets sur les composants intracellulaires, en particulier le cytosquelette d'actine grâce à la technologie AFM. Concernant les impulsions nanosecondes, nous avons vu qu'elles perméabilisaient la membrane plasmique aux ions, voire même à l'iodure de propidium. Cependant, cette perméabilisation n'apporte aucun bénéfice au franchissement de la membrane par les plasmides. De la même façon, les impulsions nanosecondes ne déstabilisent pas l'enveloppe nucléaire, n'affectent pas les mécanismes de transport du plasmide au noyau, et n'influencent ainsi pas le nombre de protéines exprimées par la cellule. Finalement, bien que l'actine corticale semble être affectée par les impulsions millisecondes, l'actine ne semble pas être impliquée dans la formation des nanopores produits par les nsPEF.

Si ces résultats ne permettent pas d'ouvrir de nouvelles perspectives thérapeutiques concernant l'efficacité de l'électrotransfert d'ADN, ils ont l'intérêt de mettre en avant l'innocuité de ce type d'impulsions proches de celles utilisées dans le cadre de la défense.

Ces protocoles, modèles, et outils ont été mis en place et sont aujourd'hui validés et disponibles pour une investigation poussée des effets des champs électriques sur le vivant. Les perspectives de cette thèse consistent à leur utilisation combinée :

- Le modèle sphéroïde peut être imagé et mesuré par AFM au niveau de la cellule unique dans les conditions décrites dans le chapitre 2, mais il sera aussi possible d'obtenir des informations sur l'élasticité du sphéroïde entier en utilisant des pointes AFM sphériques.
- L'effet des impulsions nanosecondes au niveau intracellulaire peut être observé grâce aux applicateurs développés. Ces applicateurs peuvent aussi être adaptés au modèle sphéroïde en développant de nouvelles électrodes, et ainsi observer l'impact de la structure 3D sur l'effet des impulsions nanosecondes.
- De la même façon, les impulsions nanosecondes (nécessitant un autre type d'applicateur comme par exemple les électrodes utilisées dans la partie Patch-Clamp du chapitre 3) pourraient être appliquées sur la platine de l'AFM et l'effet de ces impulsions ainsi étudié au niveau topographique et nano-mécanique. Il est aussi envisageable d'utiliser des cellules fixées après l'application des nanopulses comme ce protocole a été validé (Chopin et al., 2013c).

- Finalement, pour continuer à rechercher d'éventuels effets sur l'enveloppe nucléaire, il est possible d'extraire des noyaux de cellules et de les exposer aux impulsions et d'étudier les noyaux par AFM, comme validé récemment (Chopin *et al.*, 2013a).

En conclusion ces travaux ont apporté de nouveaux éléments dans la compréhension du mécanisme d'électroporation et des barrières au transfert de gène. En considérant les différentes techniques, modèles et composants cellulaires observés ainsi que les questions biologiques posées, il est possible de construire le tableau suivant résumant d'une part les réponses données dans ce manuscrit, et les questions qui restent encore à être étudiées.

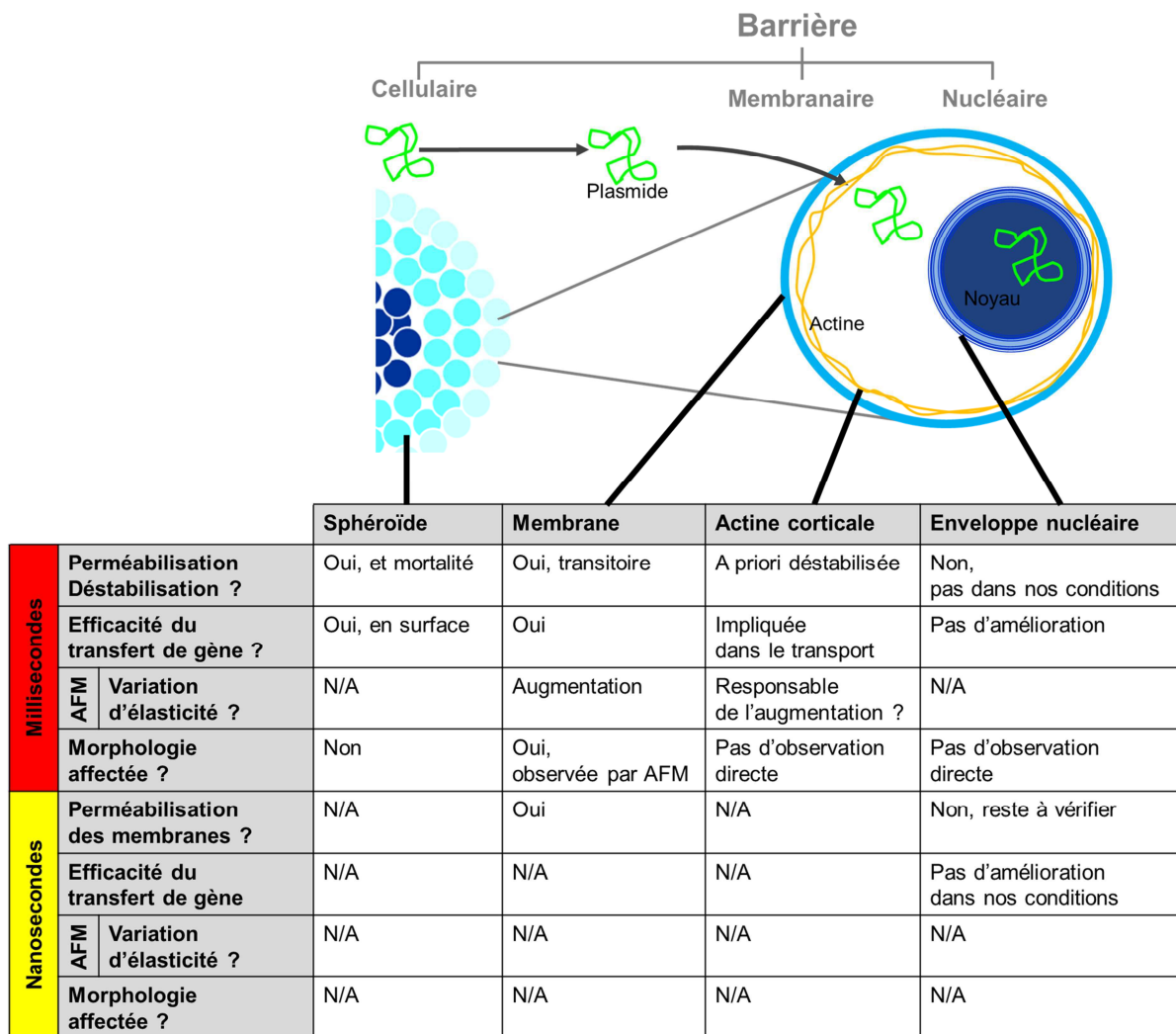


Figure 60 : Résumé des principales questions et résultats obtenus au cours de cette thèse, ainsi que celles nécessitant encore une réponse.

Matériel et Méthodes

I. Culture cellulaire

Les cellules CHO (Chinese Hamster Ovary), Wild Type Toronto, proviennent de l'American Type Culture Collection. La composition de leur milieu de culture est la suivante : Minimum Essential Medium Eagle avec sels de Earle et acides aminés non-essentiels (EMEM; Eurobio, Les Ulis, France), supplémenté avec 10% de sérum de veau fœtal (Gibco/Life Technologies, Grand Island, NY, USA), 0.58 g/l L-glutamine (Gibco/Life Technologies Grand Island, NY, USA), 2.95 g/l tryptose-phosphate (Sigma-Aldrich, Saint-Louis, MO, USA), BME vitamines (B6891 Sigma-Aldrich, Saint-Louis, MO, USA), 3.5 g/l glucose (G8644 Sigma-Aldrich, Saint-Louis, MO, USA), et un mélange pénicilline (100 U/ml; Gibco/Life Technologies Grand Island, NY, USA) et streptomycine (100 µg/mL, Gibco/Life Technologies Grand Island, NY, USA). Elles sont diluées au 1/20 tous les 3 jours et utilisées jusqu'au trentième passage. Au-delà, une nouvelle ampoule à faible passage est décongelée. Les cellules HCT116 et HCT-116 GFP sont cultivées de la même façon dans un milieu Dubelco modified eagle's medium (DMEM, Eurobio, Les Ulis, France) sans pyruvate, supplémenté avec 10% de sérum de veau fœtal (Gibco/Life Technologies, Grand Island, NY, USA) et un mélange pénicilline (100 U/ml; Gibco/Life Technologies Grand Island, NY, USA) et streptomycine (100 µg/mL, Gibco/Life Technologie Grand Island, NY, USA s). Pour les expériences de Patch-Clamp des cellules CHO-K1 ont été utilisées (American Type Culture Collection), cultivées dans du milieu Ham's F12K additionnée de 10% sérum de veau fœtal et 1% de mélange streptomycine/penicilline.

II. Composés généraux

Trypsine-EDTA 10X à 250 UI/mg (Eurobio, Les Ulis, France) ; tampon Dubelco's Phosphate Buffered Saline sans Ca²⁺ ni Mg²⁺ (Eurobio Les Ulis, France). Iodure de Propidium, (P4170 Sigma-Aldrich, Saint-Louis, MO, USA, λ_{max} excitation = 493 nm, λ_{max} émission = 617nm). Paraformaldéhyde (158127 Sigma-Aldrich, Saint-Louis, MO, USA). Sucrose (S9378 Sigma-Aldrich, Saint-Louis, MO, USA). Latrunculine B (L5288 Sigma-Aldrich, Saint-Louis, MO, USA), latrunculine A (L5163 Sigma-Aldrich, Saint-Louis, MO, USA), cytochalasine D (C8273, Sigma-Aldrich, Saint-Louis, MO, USA).

Composition du tampon d'électropulsion : 8.1 mM K₂HPO₄, 1.9 mM KH₂PO₄, 1 mM MgCl₂/6H₂O, 250mM Saccharose, pH 7,4, 1.2-1.4 .m-1, 300-350 mO.kg-1. (P3786, P5655, M8266, S9378 Sigma-Aldrich, Saint-Louis, MO, USA).

Plasmide rapporteur : pEGFP-C1, 4.7 kb, codant la enhanced Green Fluorescent Protein (eGFP, λ_{max} excitation = 488nm, λ_{max} émission = 516nm) sous le contrôle du promoteur CMV, Clontech (Palo Alto, CA), purifié à l'aide de Maxiprep-QIAGEN selon les recommandations de Qiagen (Courtaboeuf, France) à partir d'une souche E.Coli DH5 α transformée.

III. Analyse des données

Les images de fluorescence ont toutes été traitées grâce au logiciel ImageJ. Les histogrammes ont tous été faits avec le logiciel GraphPad Prism 5, ainsi que les calculs statistiques, sauf les fréquences de distribution de module d'Young qui sont réalisés grâce au logiciel OriginPro 8. Tous les éventuels calculs intermédiaires ont été réalisés avec Microsoft Excel 2010.

IV. Chapitre 1 – Sphéroïdes

A. Microscopie et cytométrie

Le microscope confocale utilisé pour l'ensemble des expériences est un microscope Zeiss LSM 510, objectif 10x, laser argon 488 nm et filtre BP 505-550 nm pour la mesure de l'émission de la GFP, et du TOTO-1 ; et Laser Helium-Neon 543 nm et filtre LP 585 nm pour l'observation du PI. Le cytomètre utilisé pour ces expériences est un cytomètre BD-FacsScan BD bioscience, Laser Argon 488 nm et filtre BP 585 \pm 42 nm pour l'observation du PI, et filtre BP 520 \pm 42 nm pour la GFP.

B. Formation

Principe de la goutte suspendue (Timmins and Nielsen, 2007) : une boîte 24 puits est préparée, 500 μ L d'un mélange agar 4% - milieu de culture (50/50 v/v) sont coulés dans chaque puits, puis recouverts de 500 μ L de milieu de culture. 500 cellules sontensemencées par goutte de 20 μ L de milieu de culture sur le couvercle renversé d'une boîte 24 puits (1

goutte par puits) (jour 0). Les cellules se regroupant par sédimentation, les contacts cellule/cellule sont favorisés au détriment des contacts cellules/matrice. Au jour 4, les puits sont vidés de leur milieu et les gouttes projetées dans le puits en tapant la boîte à plat sur la paillasse. Les petits sphéroïdes sont recouverts de 500 µL de milieu frais. Pour toutes les expériences, les sphéroïdes sont utilisés au jour 6.

C. Électroperméabilisation

Les impulsions électriques à vagues carrées sont délivrées par un générateur Jouan (St Herblain, France) grâce à des électrodes planes et parallèles en acier inoxydable espacées de 4 mm. Les impulsions sont visualisées à l'aide d'un oscilloscope (Meteix). Pour les impulsions unipolaires, 10 impulsions de 5 ms sont appliquées à une fréquence de 1 Hz. Dans le cas d'impulsions bipolaires, un inverseur de polarité manuel est utilisé. 5 impulsions de 5ms sont délivrées dans une polarité, suivies de 5 dans l'autre, à une fréquence de 1 Hz.

Cellules en suspension : 500000 cellules sont centrifugées à 0.7 rcf (centrifugeuse Centrifuge Eppendorf 5415 D) pendant 3 minutes puis resuspendues dans 100 µL de tampon de pulsation contenant 0,1 mM de PI pour la perméabilisation, ou 1µg de plasmides peGFP-C1 pour la transfection. La suspension est ensuite placée entre des électrodes dans une chambre de pulsation, et le champ électrique est appliqué. Pour la perméabilisation, les cellules sont incubées pendant 5 minutes à température ambiante après l'application du champ électrique puis diluées dans 300 µL de tampon PBS pour déterminer le taux de perméabilisation par cytométrie en flux. Pour la transfection, la suspension est placée dans 1,5 mL de milieu de culture cellulaire dans une boîte de Pétri (Ø 35 mm) à 37°C en présence de 5% CO₂ pendant 24 heures avant l'analyse par cytométrie en flux de l'expression de GFP ou l'analyse de la viabilité cellulaire.

Sphéroïdes : le sphéroïde âgé de 6 jours est tout d'abord lavé dans 1 mL de PBS puis placé dans 1 mL de tampon de pulsation. 100 µL de tampon de pulsation contenant 0,1 mM de PI (perméabilisation) ou 10 µg de plasmides peGFP-C1 (transfection) sont placés entre les électrodes. Le sphéroïde est prélevé dans un minimum de tampon et ajouté entre les électrodes dans une chambre de pulsation et les impulsions sont appliquées. Pour l'étude de la perméabilisation, le sphéroïde est incubé pendant 5 minutes à température ambiante avant d'être prélevé et de suivre le protocole de dissociation pour l'analyse par cytométrie en flux ou d'être observé au confocal. Pour l'étude de la transfection le sphéroïde récupéré et remis dans son puits contenant du milieu frais (500 µL) et placé à 37°C en présence de 5% CO₂

pendant 24 heures avant l'analyse par microscopie confocale ou cytométrie en flux de l'expression de GFP.

D. Analyse quantitative

Les cellules perméables ou transfectées sont comptées par cytométrie en flux. Dissociation des sphéroïdes : 3 sphéroïdes sont incubés dans 100 µL de trypsine 1X pendant 10 minutes (sphéroïdes de 600 µm environ) puis dissociés mécaniquement à la pipette (p200). L'échantillon est repris dans 300 µL de PBS puis placé dans la glace.

E. Interaction ADN/membrane

L'ADN est marqué au TOTO-1 extemporanément avec un ratio TOTO/pb de 1/10. Une fois le TOTO-1 ajouté à l'ADN, le mélange est incubé pendant 1 heure à 4°C dans l'obscurité. L'application des impulsions électriques se fait dans les mêmes conditions que décrites précédemment pour les cellules en suspension comme pour les sphéroïdes en utilisant l'ADN marqué. Tout de suite après l'application des impulsions, les cellules ou le sphéroïde sont récupérés et observés au microscope confocal.

F. Viabilité

Cellules en suspension : la viabilité cellulaire est estimée en mesurant la quantité relative de cellules vivantes 24h après l'application du champ électrique. Les cellules sont lavées 3 fois au PBS afin d'éliminer toutes les cellules mortes. Les cellules vivantes adhérentes sont colorées au cristal violet 0.1% pendant 20 minutes puis lysées à l'acide acétique 10% pendant 10 minutes. Le lysat est dilué au 40ème avant lecture de la densité optique au spectrophotomètre (Pharmacia Biotech, Novaspec) à 595 nm. Le contrôle n'ayant pas subi d'électroperméabilisation sert de référence, on considère que sa valeur de DO correspond à 100 % de viabilité cellulaire la coloration étant directement proportionnelle au nombre de cellules vivantes.

Sphéroïdes : la viabilité cellulaire suite à l'électrotransfection sur les sphéroïdes est évaluée en mesurant leur capacité à croître. La surface des sphéroïdes est mesurée après prise de vue au microscope classique toutes les 24 heures, grâce à la fonction « analyse particules » appliquée sur la mesure de l'aire (Set measurement : Area) du logiciel imageJ.

Taux de mortalité : le sphéroïde soumis au protocole d'électrotransfection est remis dans son puits à 37°C, 5% CO₂ pendant 30 minutes. Il est ensuite placé directement dans 100 µL

d'une solution de PI à 0,1 mM pendant 5 minutes, puis récupéré et placé dans une chambre d'observation dans le but d'être observé au microscope confocal.

G. Analyse qualitative

Les sphéroïdes sont placés dans 300 μL de PBS sur un support Lab-Tech ou au sein de CoverWell imaging Chambers (Sigma-Aldrich) afin de pouvoir être visionnés à l'aide d'un microscope confocal. Des prises de vue sont réalisées dans différents plans en z et sur chaque face du sphéroïde. Une seule face est représentée dans les figures.

V. Chapitre 2 - AFM

A. Appareillage

L'appareil Nanowizard 3 (JPK instrument, Berlin, Germany) a été utilisé pour l'ensemble des expériences. Cet AFM est couplé à un microscope inversé à fluorescence Zeiss AxioVert Observer D1.m, (Carl Zeiss). Une caméra Jenoptik ProfRes MF-Cool (Jenoptik, Jena, Germany). Source fluorescence Kublen HXP 120 C. Les leviers utilisés sont des MLCT (Bruker, Camarillo, CA USA). Le levier C présentant une constante de raideur fabricant de 0,04 N/m est utilisé (entre 0.028 to 0.042 $\text{N}\cdot\text{m}^{-1}$ mesurés). Avant de faire des mesures sur échantillon, pour chaque expérience, le levier est calibré selon la méthode du bruit thermique dans du PBS. Les données de calibration (constante de raideur et sensibilité) sont enregistrées et utilisées pour toutes les analyses. Paramètres utilisés pour les images rapides en mode Quantitative Imaging TM : Z-length : 5 μm ; force : 4 nN ; Vitesse : 166 $\mu\text{m}/\text{s}$ ou 1000 $\mu\text{m}/\text{s}$. Paramètres utilisés pour les mesures de force en mode Force Volume : Z-length : 5 μm ; force : 4 nN ; Vitesse : 24.98 $\mu\text{m}/\text{s}$.

B. Déroulement de l'expérience et application des champs électriques

Les champs électriques appliqués correspondent aux paramètres utilisés pour le transfert de gène : 8x5ms, 400 V/cm, 1 Hz sont (générateur Jouan, CNRS, France). Ils sont appliqués grâce à des électrodes cylindriques espacées de 7 mm posées sur le fond du support de culture des cellules.

4. Cellules fixées

125000 cellules sontensemencées dans des boites de Pétri (75 mm) contenant 2 lamelles 24x75mm 48h avant l'expérience. Une lamelle est lavée 2 fois par 1 mL de PBS. L'application des impulsions se fait à température ambiante dans 1 mL de tampon de pulsation. Ce dernier est retiré immédiatement après l'application des impulsions et remplacé par 1 mL d'une solution de fixation (PFA 4%, Sucrose 1%) puis la lamelle est placée à 4°C pendant 30 minutes. Ce mélange est retiré 2 minutes après l'application des impulsions et remplacé par la solution de fixation de la même façon que précédemment. Suite à la fixation, la lamelle est lavée entre 4 et 6 fois par 1 mL de PBS, puis placée sur le porte-objet du microscope inversé avant d'être recouverte de PBS pour les mesures par AFM.

5. Cellules vivantes

75000 cellules sontensemencées dans des boites de Petri 35 mm 24h avant l'expérience. L'application des impulsions a lieu sur la platine chauffante (JPK PetriDishHeater) qui, selon les expériences, est réglée à 30 ou 37 °C. Un premier set de mesure est systématiquement réalisé dans du milieu de culture HEPES (CM1MEM466U composition identique que le milieu de culture utilisé dans l'incubateur, mais le MEM est remplacé par un MEM-HEPES pour conserver un pH constant) avant l'application des impulsions. Le milieu est retiré et les cellules sont rincées deux fois par 1 mL de PBS, puis immergées dans 1 mL de tampon de pulsation. Les électrodes sont alors placées en vis-à-vis de l'objectif du microscope inversé pour que la cellule étudiée soit au centre de l'espace inter-électrodes. Un temps variant de 1 ou à 3 minutes est nécessaire pour l'équilibration thermique du levier avant la reprise des mesures. Le même protocole est appliqué pour les cellules traitées 1 heures par 0,1 µM de latrunculine B.

C. Perméabilité

La perméabilité membranaire suite à l'application des impulsions est mesurée indirectement par entrée d'iodure de propidium dans les cellules grâce un microscope à fluorescence (Leica DMRIB microscope, filtres : BP 480/40, Mirror 505, BP 527/30, objectif 40x). 3 zones sont définie dans les boite des pétri et les impulsions y sont appliquées. Les cellules sont ensuite incubées à 37 °C ou 30 °C dans du milieu de culture ou du tampon de pulsation et 0,1mM d'iodure de propidium sont ajoutés à différents temps après les impulsions pour déterminer la perméabilité membranaire au cours du temps (ou

« resealing »). Après 5 minutes supplémentaires d'incubation nécessaires à l'entrée du PI dans la cellule, 3 images aléatoires des cellules sont acquises par zone de pulsation (Leica DMRIB microscope, filtres : BP 480/40, Mirror 505, BP 527/30, objectif 40x). Le nombre de cellules total et fluorescente est ensuite compté à l'aide du logiciel imageJ, et le pourcentage de cellules ayant intégré le PI rend compte de la perméabilité membranaire.

D. Viabilité

Après l'application des impulsions, les cellules sont remises dans un incubateur 37°C 5% CO₂ pendant 24h, le tampon de pulsation remplacé par du milieu de culture. Plusieurs acquisitions en contraste de phase sont acquises dans la zone de pulsation (objectif 10x, Microscope Leica DMRIB). La densité cellulaire est alors mesurée par comptage du nombre de cellule par plan et rend compte de la viabilité cellulaire. Les données sont reportées dans le logiciel GrahPadPrism 5 pour réaliser graphes et test statistiques.

E. Analyse des données

6. *Imagerie*

Les images de hauteurs sont analysées grâce au logiciel JPK-DataProcessing. Un « flatten » d'ordre 1 est appliqué et les échelles de hauteurs ajustées.

7. *Elasticité*

Le logiciel OpenFovea version 152a a été utilisé pour traiter toutes les données de spectroscopie de force. Les paramètres suivant ont été appliqués : type de pointe : cone ; demi angle d'ouverture de la pointe : 0,62 rad ; coefficient poisson : 0,5 ; méthode d'ajustement : raw. Des sections de 50 nm d'indentation à partir du point de contact ont été ajustées par le modèle d'Hertz :

$$F = ((2.E.\tan\alpha)/(\pi.(1-\nu^2))).\delta^2$$

Où F est la force, α le demi-angle d'ouverture de la pointe, ν coefficient de poisson, δ l'indentation, d'où E, module de Young, a pu être extrait, rendant compte des valeurs d'élasticité en Pascal. Ce logiciel a permis d'extraire soit la liste de toutes les valeurs d'élasticité sur les zones mesurées soit des cartes d'élasticité représentant la distribution de ces valeurs pour la zone concernée. Afin de déterminer la valeur moyenne d'élasticité de la zone, la fréquence de distribution des modules de Young est calculée et ajustée par une

gaussienne grâce au logiciel Origin8Pro. Le maximum de cette gaussienne et son écart à 50% de hauteur sont reportés comme valeur moyenne et écart type. Ces valeurs moyennes et écarts types sont reportés dans le logiciel GraphPad Prism 5 (graphe groupé avec entrée de la valeur de l'écart type et du nombre de valeur initial N) afin de produire des histogrammes et d'effectuer les tests statistiques.

VI.Chapitre 3 - Nanosecondes

A. Patch-Clamp

Les pipettes sont étirées à partir de capillaires de borrosilicate (BF150-86-10, Sutter, Novato, CA) avec un appareil Flaming/Brown P-97 puller (Sutter) pour l'obtention d'une résistance de 1,5 ohms. Une lamelle sur laquelle ont étéensemencées les cellules CHO-K1 24h auparavant est placée dans la chambre porte objet (Warner Instruments, Hamden, CT) montée sur un microscope confocal inversé Olympus IX71 FV300. Les images sont acquises avec un objectif 40x. Les données de Patch-Clamp sont enregistrées avec un appareil MultiClamp 700B amplifieur, Digidata 1322A A-D converteur, et le logiciel pCLAMP10.

Les impulsions nanosecondes sont appliquées avec une ligne de transmission délivrant des impulsions de 60 ns comme décrit dans (Bowman *et al.*, 2010). Rapidement : les impulsions sont produites par un générateur type Blumlein construit à partir de 2 câbles coaxiaux (Kolb *et al.*, 2006) et connecté avec une résistance 100 Ohm. L'application de l'impulsions est déclenchée par le logiciel pClamp et délivrée entre des électrodes de tungsten de 100 μm espacée de 150 μm . Le profil d'impulsions est enregistré grâce à un oscilloscope 5-GHz TDS 3052(Tektronix, Beaverton, OR). L'intensité exacte des impulsions entre les électrodes a été déterminée par des simulations 3D par finite element Maxwell equations solver Amaze 3D (FieldPrecision, Albuquerque, NM). Ces simulations conduisent à une intensité résultante de 22-24kV/cm par kV envoyé (Pakhomov *et al.*, 2007b).

La composition du tampon présent dans le milieu extracellulaire et dans la pipette est la suivante : KCl 5mM, K-gluconate 135 mM, MgCl₂ 4 mM, K-EGTA 5mM, HEPES 10 mM,, avec un de 7,2 et une osmolarité de 300 mOsm. L'osmolarité et le pH sont vérifiés quotidiennement.

Les cellules sont traitées avec soit la Latrunculine A 0,1 μM ou la Cytochalasine D 1 μM 1 heure avant l'expérience. Le milieu de culture est retiré, les cellules sont rincées une fois

dans le tampon décrit plus haut, puis placée sur la platine du microscope dans du tampon frais. La cellule d'intérêt est Patchée puis le protocole de mesure est appliqué comme décrit dans le texte. Les électrodes sont abaissées lorsque les mesures avant impulsions sont terminées, le nsPEF appliqué (ou non pour les cellules contrôle), et elles sont retirées avant la reprise des mesures. Les courbes U/I obtenues au cours du temps sont tracées et les pentes sont calculées.

L'efficacité des drogues a été vérifiée sur cellules CHO-K1 transfectée de manière stable par un gène codant l'actine-mApple (excitation : 566 nm, émission : 583 nm). Les images de fluorescence avant et après traitement aux drogues sont obtenues grâce au microscope confocal inversé Olympus IX71 FV300, objectif 40x.

B. Transfert de gène

1) *Appareillage*

- Premier montage utilisé à Ljubljana pour des impulsions de 15 ns, 60 kV/cm (Figure 61).

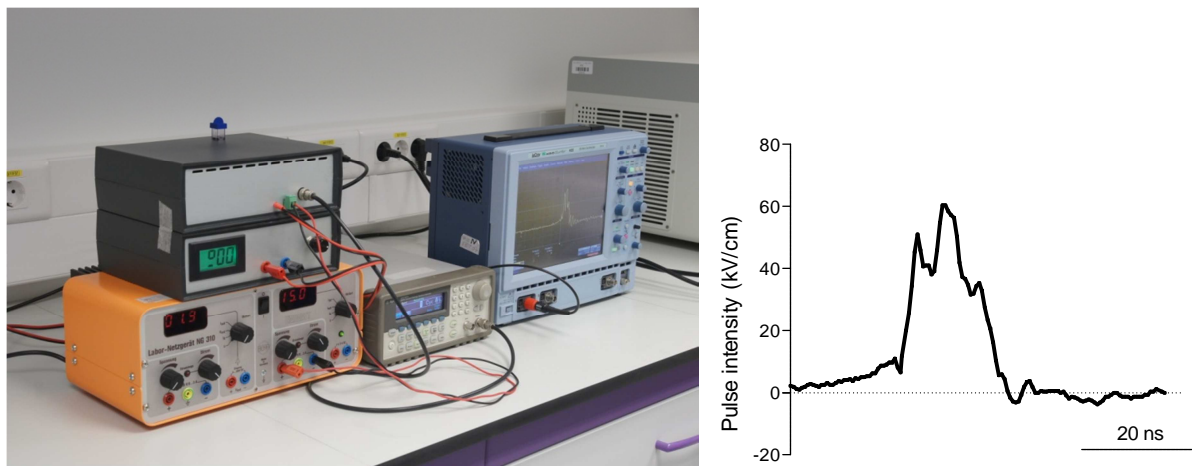


Figure 61 : Générateur et applicateur. Crédit photo : University of Ljubljana, Faculty of Electrical Engineering. Profil d'impulsion mesuré aux électrodes correspondant.

- Deuxième et troisièmes montage pour application de 18 ns à 10kV/cm et 10ns à 40 kV/cm (Figure 64 à Figure 66).

Un générateur PBG2 (Kentech instrument Ltd, UK) délivrant des impulsions avec une décroissance exponentielle a été utilisé (Figure 2). Les profils d'impulsion sont enregistrés via une sonde Barth (142-HMFP-10dB, Barth, Boulder City, NE, USA) relié à un oscilloscope Tektronix (TDS5104B, 1 GHz, Tektronix, Beaverton, OR, USA). Ce générateur est déclenché

par un générateur Betatech (Électrocell S20, Betatech, Bordeaux, France) pour contrôler le nombre d'impulsion et leur fréquence.

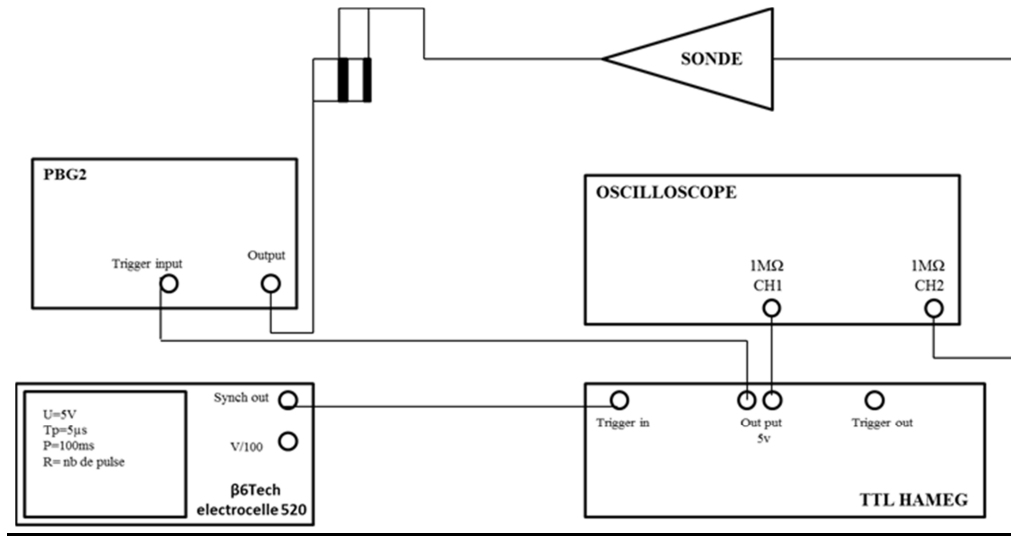


Figure 62 : Schéma du montage.



Figure 63 : générateur PBG2.

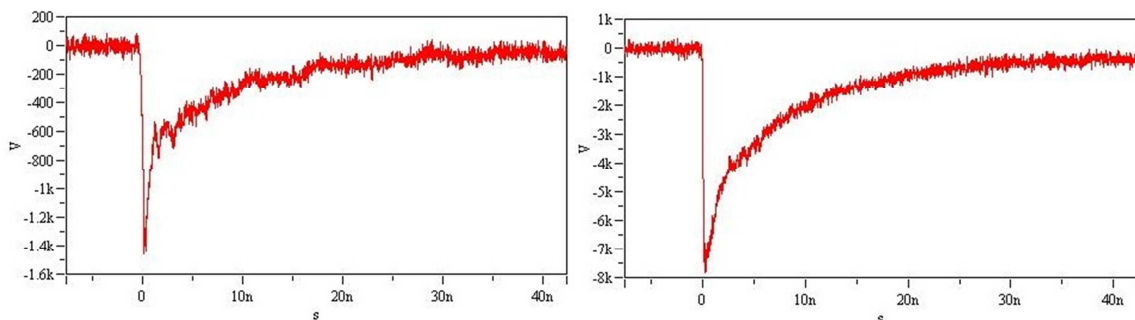


Figure 64 : Profil d'impulsion en sortie de générateur pour la tension minimale à gauche, maximale à droite.

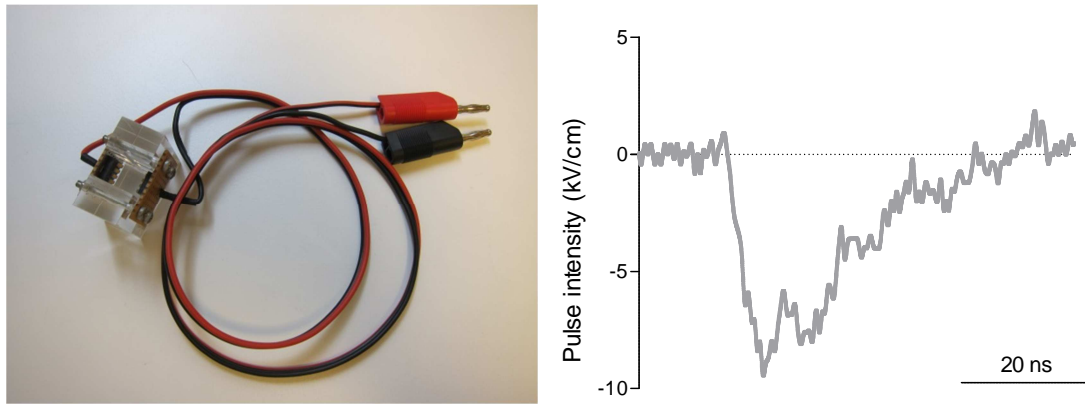


Figure 65 : applicateur pour l'application des impulsions de 18ns à 10 kV/cm et profil d'impulsion mesuré aux électrodes correspondant.

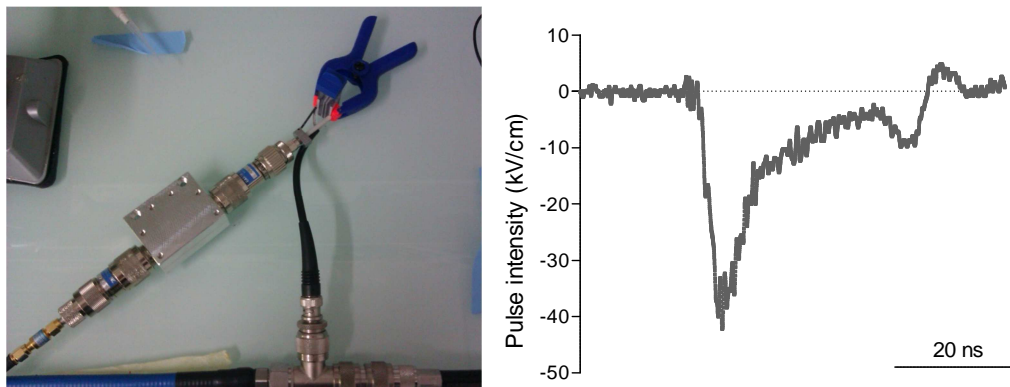


Figure 66 : montage pour l'application des impulsions de 10ns à 40 kV/cm et profil d'impulsion mesuré aux électrodes correspondant.

1. Transfert de gène

Les cellules CHO sont tout d'abord soumises à des impulsions de transfert de gène dites « classique » puis incubées pendant 0, 30 min, 2 h, 6 h, ou 24 h. Elles sont ensuite resuspendues et exposées aux nanopulses. Toutes les impulsions ont été appliquées dans des cuvettes en aluminium d'un 1 mm (Eppendorf, Hamburg, Germany).

2. Électroporation classique

Les cellules sont trypsinées et resuspendues dans le tampon de pulsation à une concentration de 3×10^6 cells/ml en présence de 40 $\mu\text{g/ml}$ de plasmide pEGFP-C1. 70 μl de cette suspension sont placées dans entre des électrodes planes en acier inoxydable espacées de 1 cm. 8x5 ms, 400 V/cm, 1 Hz à température ambiante sont appliquées (générateur Betatech, électrocellS20, Bordeaux, France). Pour le temps d'incubation 0 min, les cellules sont immédiatement transférées dans une cuvette d'électroporation en aluminium espacée de 1 mm

pour l'application des pulses nanosecondes (voir protocole d'application des pulses nanosecondes). Pour les temps d'incubation plus long, 20% volume de sérum de veau foetal est ajouté aux cellules et elles sont incubées pendant 5 min à 37°C (Delteil, Teissié & Rols, 2000; Haberl, Miklavcic & Pavlin, 2010). Les cellules sont ensuite transférées dans 5 ml de milieu de culture dans un tube 15 ml pour les points à 30min et 2h (agités régulièrement), ou dans une flasque de culture pour les points 6h et 24h, et placée à 37 °C, 5% CO₂ avant l'application des impulsions nanosecondes.

3. Applications nanopulse

Les cellules sont soit centrifugées pour les points à 30 et 2H, soit trypsinées pour les points à 6h et 24H. Elles sont ensuite resuspendues dans du tampon de pulsation à une concentration de 3×10^6 cells/ml. 70 µl de cette suspension est placée dans une cuvette (usage unique pour chaque point). 1, 5, 20, 50 and 200 nsPEF (4 ns, 60 kV/cm, 10 Hz) sont ensuite appliquées. Les cellules sont ensuite récupérées et placées dans un puits d'une plaque 24 puits et incubées pendant 24 à 37 °C, 5% CO₂.

4. Expression de gène sur cellules HCT116-GFP

Les cellules HCT-116-GFP sont trypsinées et resuspendues dans du tampon de pulsation à une concentration de 3×10^6 cells/ml. Elles subissent le protocole décrit dans la section « application nanopulses ».

5. Cytométrie en flux et analyse des données

24h après l'application des nanopulses, les cellules sont trypsinées et resuspendues dans du tampon phosphate et analysée par cytométrie en flux pour l'expression de la GFP ($\lambda_{EX}=488$ nm and $\lambda_{EM}=520/42$ nm BP (FacsCalibur, Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ USA). 2000 cellules sont comptées par point et analysées pour leur expression de GFP (pourcentage et intensité de fluorescence).

6. Perméabilisation

Les cellules sont électroperméabilisées selon le protocole désiré en présence de 0,1 mM d'iodure de propidium et observées par microscopie à fluorescence après 5 minutes d'incubation (Leica DMRIB microscope, filtres : BP 480/40, Mirror 505, BP 527/30, objectif 40x).

C. Micro-électrodes

La plaque de transmission de champ a été réalisée au CEA-Gramat par usinage et soudure des composants électriques. Les électrodes en or ont été réalisées au LAAS-CNRS suivant le protocole de Sun *et al.* 2005.

Bibliographie

Alberts B, Johnson A, and Lewis J (2002). *Molecular Biology of the Cell*. (New York: Garland Science),.

Andre, F.M., and Mir, L.M. (2010). Nucleic acids electrotransfer in vivo: mechanisms and practical aspects. *Curr. Gene Ther.* *10*, 267–280.

André, F.M., Gehl, J., Sersa, G., Préat, V., Hojman, P., Eriksen, J., Golzio, M., Cemazar, M., Pavselj, N., Rols, M.-P., *et al.* (2008). Efficiency of high- and low-voltage pulse combinations for gene electrotransfer in muscle, liver, tumor, and skin. *Hum. Gene Ther.* *19*, 1261–1271.

Areles Molleman (2002). *Patch Clamping. An Introductory Guide to Patch Clamp Electrophysiology*.

Arena, C.B., Szot, C.S., Garcia, P.A., Rylander, M.N., and Davalos, R.V. (2012). A three-dimensional in vitro tumor platform for modeling therapeutic irreversible electroporation. *Biophys. J.* *103*, 2033–2042.

Arnaud-Cormos, D., Leveque, P., Wu, Y.-H., Sanders, J.M., Gundersen, M.A., and Vernier, P.T. (2011). Microchamber setup characterization for nanosecond pulsed electric field exposure. *IEEE Trans. Biomed. Eng.* *58*, 1656–1662.

Al-Awqati, Q. (1999). One hundred years of membrane permeability: does Overton still rule? *Nat. Cell Biol.* *1*, E201–202.

Bandekar, A., Karve, S., Chang, M.-Y., Mu, Q., Rotolo, J., and Sofou, S. (2012). Antitumor efficacy following the intracellular and interstitial release of liposomal doxorubicin. *Biomaterials* *33*, 4345–4352.

Bartoletti, D.C., Harrison, G.I., and Weaver, J.C. (1989). The number of molecules taken up by electroporated cells: quantitative determination. *Febs Lett.* *256*, 4–10.

Batista, Rebersek, Kotnik, Lebrasseur, Cabodevila, and Miklavcic (2010). Electroporation of endocytotic vesicles in B16 F1 mouse melanoma cells. *Med Biol Eng Comput* *48*, 407–413.

Batista Napotnik, T., Wu, Y.-H., Gundersen, M.A., Miklavčič, D., and Vernier, P.T. (2012). Nanosecond electric pulses cause mitochondrial membrane permeabilization in Jurkat cells. *Bioelectromagnetics* *33*, 257–264.

Batrakova, E.V., Gendelman, H.E., and Kabanov, A.V. (2011). Cell-mediated drug delivery. *Expert Opin. Drug Deliv.* *8*, 415–433.

Beebe, S.J., Fox, P.M., Rec, L.J., Willis, E.L.K., and Schoenbach, K.H. (2003a). Nanosecond, high-intensity pulsed electric fields induce apoptosis in human cells. *Faseb J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* *17*, 1493–1495.

Beebe, S.J., White, J., Blackmore, P.F., Deng, Y., Somers, K., and Schoenbach, K.H. (2003b). Diverse effects of nanosecond pulsed electric fields on cells and tissues. *Dna Cell Biol.* *22*, 785–796.

- Beebe, S.J., Blackmore, P.F., White, J., Joshi, R.P., and Schoenbach, K.H. (2004). Nanosecond pulsed electric fields modulate cell function through intracellular signal transduction mechanisms. *Physiol. Meas.* *25*, 1077–1093.
- Beebe, S.J., Chen, X., Liu, J.A., and Schoenbach, K.H. (2011). Nanosecond pulsed electric field ablation of hepatocellular carcinoma. *Conf. Proc. Annu. Int. Conf. Ieee Eng. Med. Biol. Soc. Ieee Eng. Med. Biol. Soc. Conf. 2011*, 6861–6865.
- Beebe, S.J., Chen, Y.-J., Sain, N.M., Schoenbach, K.H., and Xiao, S. (2012). Transient features in nanosecond pulsed electric fields differentially modulate mitochondria and viability. *Plos One* *7*, e51349.
- Behrend M, Kuthi A, Gu X, Vernier PT, Marcu L, Craft CM, and GUndersen MA (2003). Pulse Generators for Pulsed Electric Field Exposure of Biological Cells and Tissues. *Ieee Trans. Dielectr. Electr. Insul.* *10*.
- Bellard, E., and Teissie, J. (2009). Double Pulse Approach of Electropulsation: A Fluorescence Analysis of the Nucleus Perturbation at the Single Cell Level. *Ieee Trans. Dielectr. Electr. Insul.* *16*, 1267–1272.
- Bellard, E., Markelc, B., Pelofy, S., Le Guerroué, F., Sersa, G., Teissié, J., Cemazar, M., and Golzio, M. (2012). Intravital microscopy at the single vessel level brings new insights of vascular modification mechanisms induced by electropermeabilization. *J. Control. Release Off. J. Control. Release Soc.* *163*, 396–403.
- Berk, A., Matsudaira, P., Kaiser, C.A., and Darnell, J. (2005). *Biologie moléculaire de la cellule (De Boeck Supérieur)*.
- Bettan, M., Ivanov, M.A., Mir, L.M., Boissière, F., Delaere, P., and Scherman, D. (2000). Efficient DNA electrotransfer into tumors. *Bioelectrochemistry Amst. Neth.* *52*, 83–90.
- Billotet C., and Jouanneau J. (2008). Tumor-stroma interactions. *Bull. Cancer (Paris)* *95*, 51–56.
- Binnig, Quate, and Gerber (1986). Atomic force microscope. *Phys. Rev. Lett.* *56*, 930–933.
- Binnig, G., Rohrer, H., Gerber, C., and Weibel, E. (1982). Tunneling through a controllable vacuum gap. *Appl Phys Lett* *40*.
- Bohdanowicz, M., and Grinstein, S. (2013). Role of phospholipids in endocytosis, phagocytosis, and macropinocytosis. *Physiol. Rev.* *93*, 69–106.
- Bowman, A.M., Nesin, O.M., Pakhomova, O.N., and Pakhomov, A.G. (2010). Analysis of plasma membrane integrity by fluorescent detection of Tl(+) uptake. *J. Membr. Biol.* *236*, 15–26.
- Breton, and Mir (2012). Microsecond and Nanosecond Electric Pulses in Cancer Treatments. *Bioelectromagnetics* *33*, 106–123.
- Breton, M., Delemotte, L., Silve, A., Mir, L.M., and Tarek, M. (2012). Transport of siRNA through lipid membranes driven by nanosecond electric pulses: an experimental and computational study. *J. Am. Chem. Soc.* *134*, 13938–13941.

- Bruns, T., Schickinger, S., Wittig, R., and Schneckenburger, H. (2012). Preparation strategy and illumination of three-dimensional cell cultures in light sheet-based fluorescence microscopy. *J. Biomed. Opt.* *17*, 101518.
- Burgués, J.P., Gómez, L., Pontones, J.L., Vera, C.D., Jiménez-Cruz, J.F., and Ozonas, M. (2007). A chemosensitivity test for superficial bladder cancer based on three-dimensional culture of tumour spheroids. *Eur. Urol.* *51*, 962–969; discussion 969–970.
- Burke, B., and Stewart, C.L. (2013). The nuclear lamins: flexibility in function. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *14*, 13–24.
- Butt, H.J., Wolff, E.K., Gould, S.A., Dixon Northern, B., Peterson, C.M., and Hansma, P.K. (1990). Imaging cells with the atomic force microscope. *J. Struct. Biol.* *105*, 54–61.
- Canatella, P.J., Black, M.M., Bonnicksen, D.M., McKenna, C., and Prausnitz, M.R. (2004). Tissue electroporation: quantification and analysis of heterogeneous transport in multicellular environments. *Biophys. J.* *86*, 3260–3268.
- Cao, Y., and Li, H. (2011). Dynamics of protein folding and cofactor binding monitored by single-molecule force spectroscopy. *Biophys. J.* *101*, 2009–2017.
- Carl, P., and Schillers, H. (2008). Elasticity measurement of living cells with an atomic force microscope: data acquisition and processing. *Pflügers Arch. - Eur. J. Physiol.* *457*, 551–559.
- Cemazar, M., Golzio, M., Sersa, G., Hojman, P., Kranjc, S., Mesojednik, S., Rols, M.-P., and Teissie, J. (2009a). Control by pulse parameters of DNA electrotransfer into solid tumors in mice. *Gene Ther.* *16*, 635–644.
- Cemazar, M., Golzio, M., Sersa, G., Hojman, P., Kranjc, S., Mesojednik, S., Rols, M.P., and Teissie, J. (2009b). Control by pulse parameters of DNA electrotransfer into solid tumors in mice. *Gene Ther.* *16*, 635–644.
- Cemazar, M., Golzio, M., Sersa, G., Escoffre, J.-M., Coer, A., Vidic, S., and Teissie, J. (2012). Hyaluronidase and collagenase increase the transfection efficiency of gene electrotransfer in various murine tumors. *Hum. Gene Ther.* *23*, 128–137.
- Cepurniene, K., Ruzgys, P., Treinys, R., Satkauskiene, I., and Satkauskas, S. (2010). Influence of plasmid concentration on DNA electrotransfer in vitro using high-voltage and low-voltage pulses. *J. Membr. Biol.* *236*, 81–85.
- Chabot, S., Orio, J., Schmeer, M., Schleef, M., Golzio, M., and Teissie, J. (2013). Minicircle DNA electrotransfer for efficient tissue-targeted gene delivery. *Gene Ther.* *20*, 62–68.
- Chaney, and Sundararajan (2004). Simple MOSFET-Based High-Voltage Nanosecond Pulse Circuit. *Ieee Trans. Plasma Sci.* *32*.
- Chang, D.C., and Reese, T.S. (1990). Changes in membrane structure induced by electroporation as revealed by rapid-freezing electron microscopy. *Biophys. J.* *58*, 1–12.
- 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. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *317*, 421–427.

- 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 Res.* *19*, 361–371.
- Chen, X., Zhuang, J., Kolb, J.F., Schoenbach, K.H., and Beebe, S.J. (2012a). Long term survival of mice with hepatocellular carcinoma after pulse power ablation with nanosecond pulsed electric fields. *Technol. Cancer Res. Treat.* *11*, 83–93.
- Chen, X.-H., Beebe, S.J., and Zheng, S.-S. (2012b). Tumor ablation with nanosecond pulsed electric fields. *Hepatobiliary Pancreat. Dis. Int. Hbpd Int* *11*, 122–124.
- Chenuet, S., Derouazi, M., Hacker, D., and Wurm, F. (2009). DNA delivery by microinjection for the generation of recombinant mammalian cell lines. *Methods Mol. Biol. Clifton Nj* *518*, 99–112.
- Chernysh, A.M., Kozlova, E.K., Moroz, V.V., Borshagovskaya, P.Y., Bliznuk, U.A., and Rysaeva, R.M. (2009). Erythrocyte membrane surface after calibrated electroporation: visualization by atomic force microscopy. *Bull. Exp. Biol. Med.* *148*, 455–460.
- Chitcholtan, K., Sykes, P.H., and Evans, J.J. (2012). The resistance of intracellular mediators to doxorubicin and cisplatin are distinct in 3D and 2D endometrial cancer. *J. Transl. Med.* *10*, 38.
- Chopinnet, L., Wasungu, L., and Rols, M.-P. (2012). First explanations for differences in electrotransfection efficiency in vitro and in vivo using spheroid model. *Int. J. Pharm.* *423*, 7–15.
- Chopinnet, L., Formosa, C., Rols, M.P., Duval, R.E., and Dague, E. (2013a). Imaging living cells surface and quantifying its properties at high resolution using AFM in QITM mode. *Micron*.
- Chopinnet, L., Roduit, C., Rols, M.-P., and Dague, E. (2013b). Destabilization induced by electropermeabilization analyzed by atomic force microscopy. *Biochim. Biophys. Acta Bba - Biomembr.* *1828*, 2223–2229.
- Cohen, R.N., van der Aa, M.A.E.M., Macaraeg, N., Lee, A.P., and Szoka, F.C., Jr (2009). Quantification of plasmid DNA copies in the nucleus after lipoplex and polyplex transfection. *J. Control. Release Off. J. Control. Release Soc.* *135*, 166–174.
- Cole, A.J., Yang, V.C., and David, A.E. (2011). Cancer theranostics: the rise of targeted magnetic nanoparticles. *Trends Biotechnol.* *29*, 323–332.
- Corovic, S., Lackovic, I., Sustaric, P., Sustar, T., Rodic, T., and Miklavcic, D. (2013). Modeling of electric field distribution in tissues during electroporation. *Biomed. Eng. Online* *12*, 16.
- Correa de Sampaio, P., Auslaender, D., Krubasik, D., Failla, A.V., Skepper, J.N., Murphy, G., and English, W.R. (2012). A heterogeneous in vitro three dimensional model of tumour-stroma interactions regulating sprouting angiogenesis. *Plos One* *7*, e30753.
- Coué, M., Brenner, S.L., Spector, I., and Korn, E.D. (1987). Inhibition of actin polymerization by latrunculin A. *Febs Lett.* *213*, 316–318.

- Coustets, M., Al-Karablieh, N., Thomsen, C., and Teissié, J. (2013). Flow Process for Electroextraction of Total Proteins from Microalgae. *J. Membr. Biol.*
- Dalmay, C., De Menorval, M.A., Français, O., Mir, L.M., and Le Pioufle, B. (2012). A microfluidic device with removable packaging for the real time visualisation of intracellular effects of nanosecond electrical pulses on adherent cells. *Lab. Chip* 12, 4709–4715.
- Daud, A.I., DeConti, R.C., Andrews, S., Urbas, P., Riker, A.I., Sondak, V.K., Munster, P.N., Sullivan, D.M., Ugen, K.E., Messina, J.L., *et al.* (2008). Phase I trial of interleukin-12 plasmid electroporation in patients with metastatic melanoma. *J Clin Oncol* 26, 5896–5903.
- Delemotte, L., and Tarek, M. (2012). Molecular dynamics simulations of lipid membrane electroporation. *J. Membr. Biol.* 245, 531–543.
- Delteil, C., Teissié, J., and Rols, M.P. (2000). Effect of serum on in vitro electrically mediated gene delivery and expression in mammalian cells. *Biochim. Biophys. Acta* 1467, 362–368.
- Deng, J., Schoenbach, K.H., Buescher, E.S., Hair, P.S., Fox, P.M., and Beebe, S.J. (2003). The effects of intense submicrosecond electrical pulses on cells. *Biophys. J.* 84, 2709–2714.
- Doherty, G.J., and McMahon, H.T. (2009). Mechanisms of endocytosis. *Annu. Rev. Biochem.* 78, 857–902.
- Dona, M., Sandri, M., Rossini, K., Dell’Aica, I., Podhorska-Okolow, M., and Carraro, U. (2003). Functional in vivo gene transfer into the myofibers of adult skeletal muscle. *Biochem Biophys Res Commun* 312, 1132–1138.
- Dongari-Bagtzoglou, A., and Kashleva, H. (2006). Development of a highly reproducible three-dimensional organotypic model of the oral mucosa. *Nat. Protoc.* 1, 2012–2018.
- Dufau, I., Frongia, C., Sicard, F., Dedieu, L., Cordelier, P., Ausseil, F., Ducommun, B., and Valette, A. (2012). Multicellular tumor spheroid model to evaluate spatio-temporal dynamics effect of chemotherapeutics: application to the gemcitabine/CHK1 inhibitor combination in pancreatic cancer. *Bmc Cancer* 12, 15.
- Dupres, V., Verbelen, C., and Dufrêne, Y.F. (2007). Probing molecular recognition sites on biosurfaces using AFM. *Biomaterials* 28, 2393–2402.
- El-Kirat-Chatel, S., and Dufrêne, Y.F. (2012). Nanoscale Imaging of the Candida–Macrophage Interaction Using Correlated Fluorescence–Atomic Force Microscopy. *ACS Nano* 6, 10792–10799.
- Emerson, R.J., 4th, and Camesano, T.A. (2006). On the importance of precise calibration techniques for an atomic force microscope. *Ultramicroscopy* 106, 413–422.
- Escande-Géraud, M.L., Rols, M.P., Dupont, M.A., Gas, N., and Teissié, J. (1988). Reversible plasma membrane ultrastructural changes correlated with electropermeabilization in Chinese hamster ovary cells. *Biochim. Biophys. Acta Bba - Biomembr.* 939, 247–259.
- Escoffre, J.-M., and Rols, M.-P. (2012). Electrochemotherapy: Progress and Prospects. *Curr. Pharm. Des.*

- Escoffre, J.-M., Dean, D.S., Hubert, M., Rols, M.-P., and Favard, C. (2007). Membrane perturbation by an external electric field: a mechanism to permit molecular uptake. *Eur. Biophys. J. Ebj* 36, 973–983.
- Escoffre, J.-M., Portet, T., Wasungu, L., Teissié, J., Dean, D., and Rols, M.-P. (2009). What is (still not) known of the mechanism by which electroporation mediates gene transfer and expression in cells and tissues. *Mol. Biotechnol.* 41, 286–295.
- Escoffre, J.-M., Portet, T., Favard, C., Teissié, J., Dean, D.S., and Rols, M.-P. (2011). Electromediated formation of DNA complexes with cell membranes and its consequences for gene delivery. *Biochim. Biophys. Acta* 1808, 1538–1543.
- Escoffre, J.-M., Nikolova, B., Mallet, L., Henri, J., Favard, C., Golzio, M., Teissie, J., Tsoneva, I., and Rols, M.-P. (2012). New insights in the gene electrotransfer process: evidence for the involvement of the plasmid DNA topology. *Curr. Gene Ther.* 12, 417–422.
- Escoffre, J.-M., Zeghimi, A., Novell, A., and Bouakaz, A. (2013). In-vivo gene delivery by sonoporation: recent progress and prospects. *Curr. Gene Ther.* 13, 2–14.
- Espenel, C., Giocondi, M.-C., Seantier, B., Dosset, P., Milhiet, P.-E., and Le Grimellec, C. (2008). Temperature-dependent imaging of living cells by AFM. *Ultramicroscopy* 108, 1174–1180.
- Esser, A.T., Smith, K.C., Gowrishankar, T.R., Vasilkoski, Z., and Weaver, J.C. (2010). Mechanisms for the intracellular manipulation of organelles by conventional electroporation. *Biophys. J.* 98, 2506–2514.
- Faurie, C., Golzio, M., Moller, P., Teissie, J., and Rols, M.P. (2003). Cell and animal imaging of electrically mediated gene transfer. *Dna Cell Biol* 22, 777–783.
- Faurie, C., Phez, E., Golzio, M., Vossen, C., Lesbordes, J.C., Delteil, C., Teissie, J., and Rols, M.P. (2004). Effect of electric field vectoriality on electrically mediated gene delivery in mammalian cells. *Biochim Biophys Acta* 1665, 92–100.
- Faurie, C., Rebersek, M., Golzio, M., Kanduser, M., Escoffre, J.-M., Pavlin, M., Teissie, J., Miklavcic, D., and Rols, M.-P. (2010). Electro-mediated gene transfer and expression are controlled by the life-time of DNA/membrane complex formation. *J. Gene Med.* 12, 117–125.
- Favard, C., Dean, D.S., and Rols, M.P. (2007). Electrotransfer as a non viral method of gene delivery. *Curr Gene Ther* 7, 67–77.
- Fehlauer, F., Muench, M., Smid, E.J., Slotman, B., Richter, E., Van der Valk, P., and Sminia, P. (2006). Combined modality therapy of gemcitabine and irradiation on human glioma spheroids derived from cell lines and biopsy tissue. *Oncol. Rep.* 15, 97–105.
- Fels, J., Jeggle, P., Kusche-Vihrog, K., and Oberleithner, H. (2012). Cortical actin nanodynamics determines nitric oxide release in vascular endothelium. *Plos One* 7, e41520.
- Fernández, M.L., Risk, M., Reigada, R., and Vernier, P.T. (2012). Size-controlled nanopores in lipid membranes with stabilizing electric fields. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 423, 325–330.

- Finaz, C., Lefevre, A., and Teissié, J. (1984). Electrofusion. A new, highly efficient technique for generating somatic cell hybrids. *Exp. Cell Res.* *150*, 477–482.
- Formosa, C., Grare, M., Jauvert, E., Coutable, A., Regnouf-de-Vains, J.B., Mourer, M., Duval, R.E., and Dague, E. (2012). Nanoscale analysis of the effects of antibiotics and CX1 on a *Pseudomonas aeruginosa* multidrug-resistant strain. *Sci. Reports* *2*, 575.
- Franz, C.M., Taubenberger, A., Puech, P.-H., and Muller, D.J. (2007). Studying integrin-mediated cell adhesion at the single-molecule level using AFM force spectroscopy. *Sci. Signal Transduct. Knowl. Environ.* *2007*, pl5.
- 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. *Biophys. J.* *90*, 3608–3615.
- Freyer, J.P., and Sutherland, R.M. (1980). Selective dissociation and characterization of cells from different regions of multicell tumor spheroids. *Cancer Res* *40*, 3956–3965.
- Friedrich, J., Ebner, R., and Kunz-Schughart, L.A. (2007). Experimental anti-tumor therapy in 3-D: spheroids--old hat or new challenge? *Int. J. Radiat. Biol.* *83*, 849–871.
- Friedrich, J., Seidel, C., Ebner, R., and Kunz-Schughart, L.A. (2009). Spheroid-based drug screen: considerations and practical approach. *Nat. Protoc.* *4*, 309–324.
- Friedrichs, J., Legate, K.R., Schubert, R., Bharadwaj, M., Werner, C., Müller, D.J., and Benoit, M. (2013). A practical guide to quantify cell adhesion using single-cell force spectroscopy. *Methods*.
- Gaboriaud, F., Gee, M.L., Strugnell, R., and Duval, J.F.L. (2008). Coupled electrostatic, hydrodynamic, and mechanical properties of bacterial interfaces in aqueous media. *Langmuir Acs J. Surfaces Colloids* *24*, 10988–10995.
- Gabriel, B., and Teissié, J. (1997). Direct observation in the millisecond time range of fluorescent molecule asymmetrical interaction with the electroporabilized cell membrane. *Biophys. J.* *73*, 2630–2637.
- Gamper, N., Stockand, J.D., and Shapiro, M.S. (2005). The use of Chinese hamster ovary (CHO) cells in the study of ion channels. *J. Pharmacol. Toxicol. Methods* *51*, 177–185.
- Gardlík, R., Pálffy, R., Hodosy, J., Lukács, J., Turna, J., and Celec, P. (2005). Vectors and delivery systems in gene therapy. *Med. Sci. Monit. Int. Med. J. Exp. Clin. Res.* *11*, RA110–121.
- 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. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *362*, 139–144.
- 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. *Int. J. Cancer J. Int. Cancer* *121*, 675–682.

- Gass, G.V., and Chernomordik, L.V. (1990). Reversible large-scale deformations in the membranes of electrically-treated cells: electroinduced bleb formation. *Biochim. Biophys. Acta* *1023*, 1–11.
- Gehl, J. (2008). Electroporation for drug and gene delivery in the clinic: doctors go electric. *Methods Mol. Biol. Clifton Nj* *423*, 351–359.
- Gehl, J., Sorensen, T.H., Nielsen, K., Raskmark, P., Nielsen, S.L., Skovsgaard, T., and Mir, L.M. (1999). In vivo electroporation of skeletal muscle: threshold, efficacy and relation to electric field distribution. *Biochim. Biophys. Acta* *1428*, 233–240.
- Gibot, L., and Rols, M.-P. (2013). Progress and Prospects: The use of 3D spheroid model as a relevant way to study and optimize DNA electrotransfer. *Curr. Gene Ther.* *13*.
- Gibot, L., Wasungu, L., Teissié, J., and Rols, M.-P. (2013). Antitumor drug delivery in multicellular spheroids by electroporation. *J. Control. Release Off. J. Control. Release Soc.* *167*, 138–147.
- Gilbert, R., Jaroszeski, M.J., Heller, L., and Heller, R. (2002). Electric field enhanced plasmid delivery to liver hepatocellular carcinomas. *Technol. Cancer Res. Treat.* *1*, 355–364.
- Gil-Cardesa, M.L., Villaverde, M.S., Fiszman, G.L., Altamirano, N.A., Cwirenbaum, R.A., Glikin, G.C., and Finocchiaro, L.M. Suicide gene therapy on spontaneous canine melanoma: correlations between in vivo tumors and their derived multicell spheroids in vitro. *Gene Ther* *17*, 26–36.
- Ginn, S.L., Alexander, I.E., Edelstein, M.L., Abedi, M.R., and Wixon, J. (2013). Gene therapy clinical trials worldwide to 2012 - an update. *J. Gene Med.* *15*, 65–77.
- Glover, D.J., Leyton, D.L., Moseley, G.W., and Jans, D.A. (2010). The efficiency of nuclear plasmid DNA delivery is a critical determinant of transgene expression at the single cell level. *J. Gene Med.* *12*, 77–85.
- Golzio, M., and Teissié, J. (2010). Direct assay of electroporation in a 2D pseudo tissue. *Phys. Chem. Chem. Phys. Pccp* *12*, 14670–14672.
- Golzio, M., Mora, M.P., Raynaud, C., Delteil, C., Teissié, J., and Rols, M.P. (1998). Control by osmotic pressure of voltage-induced permeabilization and gene transfer in mammalian cells. *Biophys. J.* *74*, 3015–3022.
- Golzio, M., Teissié, J., and Rols, M.P. (2001). Control by membrane order of voltage-induced permeabilization, loading and gene transfer in mammalian cells. *Bioelectrochemistry Amst. Neth.* *53*, 25–34.
- Golzio, M., Teissié, J., and Rols, M.P. (2002a). Direct visualization at the single-cell level of electrically mediated gene delivery. *Proc Natl Acad Sci U S A* *99*, 1292–1297.
- Golzio, M., Teissié, J., and Rols, M.-P. (2002b). Cell synchronization effect on mammalian cell permeabilization and gene delivery by electric field. *Biochim. Biophys. Acta* *1563*, 23–28.

- Golzio, M., Rols, M.P., and Teissié, J. (2004). In vitro and in vivo electric field-mediated permeabilization, gene transfer, and expression. *Methods San Diego Calif* 33, 126–135.
- Goodman, T.T., Olive, P.L., and Pun, S.H. (2007). Increased nanoparticle penetration in collagenase-treated multicellular spheroids. *Int J Nanomedicine* 2, 265–274.
- Goodman, T.T., Chen, J., Matveev, K., and Pun, S.H. (2008). Spatio-temporal modeling of nanoparticle delivery to multicellular tumor spheroids. *Biotechnol. Bioeng.* 101, 388–399.
- Gowrishankar, T.R., and Weaver, J.C. (2003). An approach to electrical modeling of single and multiple cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 100, 3203–3208.
- Griffiths, L., Binley, K., Iqbal, S., Kan, O., Maxwell, P., Ratcliffe, P., Lewis, C., Harris, A., Kingsman, S., and Naylor, S. (2000). The macrophage - a novel system to deliver gene therapy to pathological hypoxia. *Gene Ther.* 7, 255–262.
- Grill, J., Lamfers, M.L., van Beusechem, V.W., Dirven, C.M., Pherai, D.S., Kater, M., Van der Valk, P., Vogels, R., Vandertop, W.P., Pinedo, H.M., *et al.* (2002). The organotypic multicellular spheroid is a relevant three-dimensional model to study adenovirus replication and penetration in human tumors in vitro. *Mol Ther* 6, 609–614.
- Le Grimellec, C., Lesniewska, E., Giocondi, M.C., Finot, E., Vié, V., and Goudonnet, J.P. (1998). Imaging of the surface of living cells by low-force contact-mode atomic force microscopy. *Biophys. J.* 75, 695–703.
- Grosel, A., Sersa, G., Kranjc, S., and Cemazar, M. (2006). Electrogene therapy with p53 of murine sarcomas alone or combined with electrochemotherapy using cisplatin. *Dna Cell Biol* 25, 674–683.
- Guiet, R., Van Goethem, E., Cougoule, C., Balor, S., Valette, A., Al Saati, T., Lowell, C.A., Le Cabec, V., and Maridonneau-Parini, I. (2011). The process of macrophage migration promotes matrix metalloproteinase-independent invasion by tumor cells. *J. Immunol. Baltim. Md* 1950 187, 3806–3814.
- Guo, S., Donate, A., Basu, G., Lundberg, C., Heller, L., and Heller, R. (2011). Electro-gene transfer to skin using a noninvasive multielectrode array. *J. Control. Release Off. J. Control. Release Soc.* 151, 256–262.
- Gusbeth, C., Frey, W., Volkmann, H., Schwartz, T., and Bluhm, H. (2009). Pulsed electric field treatment for bacteria reduction and its impact on hospital wastewater. *Chemosphere* 75, 228–233.
- Hacein-Bey-Abina, S., Von Kalle, C., Schmidt, M., McCormack, M.P., Wulffraat, N., Leboulch, P., Lim, A., Osborne, C.S., Pawliuk, R., Morillon, E., *et al.* (2003). LMO2-associated clonal T cell proliferation in two patients after gene therapy for SCID-X1. *Science* 302, 415–419.
- Hair, P.S., Schoenbach, K.H., and Buescher, E.S. (2003). Sub-microsecond, intense pulsed electric field applications to cells show specificity of effects. *Bioelectrochemistry Amst. Neth.* 61, 65–72.

- Hall, E.H., Schoenbach, K.H., and Beebe, S.J. (2005). Nanosecond pulsed electric fields (nsPEF) induce direct electric field effects and biological effects on human colon carcinoma cells. *Dna Cell Biol.* *24*, 283–291.
- Hall, E.H., Schoenbach, K.H., and Beebe, S.J. (2007). Nanosecond pulsed electric fields induce apoptosis in p53-wildtype and p53-null HCT116 colon carcinoma cells. *Apoptosis Int. J. Program. Cell Death* *12*, 1721–1731.
- Han, M., Bae, Y., Nishiyama, N., Miyata, K., Oba, M., and Kataoka, K. (2007). Transfection study using multicellular tumor spheroids for screening non-viral polymeric gene vectors with low cytotoxicity and high transfection efficiencies. *J. Control. Release Off. J. Control. Release Soc.* *121*, 38–48.
- Hargrave, B., and Li, F. (2012). Nanosecond pulse electric field activation of platelet-rich plasma reduces myocardial infarct size and improves left ventricular mechanical function in the rabbit heart. *J. Extra. Corpor. Technol.* *44*, 198–204.
- Harrisson, S., Nicolas, J., Maksimenko, A., Trung Bui, D., Mouglin, J., and Couvreur, P. (2013). Nanoparticles with in vivo anticancer activity from polymer produrg amphiphiles prepared by living radical polymerization. *Angew. Chem.* *52*, 1678–1682.
- Heinz, W.F., and Hoh, J.H. (1999). Spatially resolved force spectroscopy of biological surfaces using the atomic force microscope. *Trends Biotechnol.* *17*, 143–150.
- Henderson, E., Haydon, P.G., and Sakaguchi, D.S. (1992). Actin filament dynamics in living glial cells imaged by atomic force microscopy. *Science* *257*, 1944–1946.
- Henshaw, J.W., Zaharoff, D.A., Mossop, B.J., and Yuan, F. (2007). Electric field-mediated transport of plasmid DNA in tumor interstitium in vivo. *Bioelectrochemistry* *71*, 233–242.
- Hetzer, M.W. (2010). The nuclear envelope. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* *2*, a000539.
- Hibino, M., Itoh, H., and Kinoshita, K., Jr (1993). Time courses of cell electroporation as revealed by submicrosecond imaging of transmembrane potential. *Biophys. J.* *64*, 1789–1800.
- Hohenberger, P., Eing, C., Straessner, R., Durst, S., Frey, W., and Nick, P. (2011). Plant actin controls membrane permeability. *Biochim. Biophys. Acta* *1808*, 2304–2312.
- Hojman, P., Zibert, J.R., Gissel, H., Eriksen, J., and Gehl, J. (2007). Gene expression profiles in skeletal muscle after gene electrotransfer. *Bmc Mol. Biol.* *8*, 56.
- Hutter, J.L., and Bechhoefer, J. (1993). Calibration of atomic-force microscope tips. *Rev. Sci. Instrum.* *64*, 1868–1873.
- Hüttinger, C., Hirschberger, J., Jahnke, A., Köstlin, R., Brill, T., Plank, C., Küchenhoff, H., Krieger, S., and Schillinger, U. (2008). Neoadjuvant gene delivery of feline granulocyte-macrophage colony-stimulating factor using magnetofection for the treatment of feline fibrosarcomas: a phase I trial. *J. Gene Med.* *10*, 655–667.
- Ibey, B.L., Xiao, S., Schoenbach, K.H., Murphy, M.R., and Pakhomov, A.G. (2009). Plasma membrane permeabilization by 60- and 600-ns electric pulses is determined by the absorbed dose. *Bioelectromagnetics* *30*, 92–99.

INSTRUCTION N° 302143/DEF/SGA/DFP/PER/5 (2003). relative à la protection des personnes contre les effets des champs électromagnétiques émis par les équipements ou installations relevant du ministère de la défense. DIRECTION DE LA FONCTION MILITAIRE ET DU PERSONNEL CIVIL.

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. *Phys. Med. Biol.* *54*, 5949–5963.

Jahn, R. (2004). Principles of Exocytosis and Membrane Fusion. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* *1014*, 170–178.

Jia, L.-T., Chen, S.-Y., and Yang, A.-G. (2012). Cancer gene therapy targeting cellular apoptosis machinery. *Cancer Treat. Rev.* *38*, 868–876.

Joshi, R.P., and Hu, Q. (2010). Analysis of cell membrane permeabilization mechanics and pore shape due to ultrashort electrical pulsing. *Med. Biol. Eng. Comput.* *48*, 837–844.

Julien, D.C., Behnke, S., Wang, G., Murdoch, G.K., and Hill, R.A. (2011). Utilization of monoclonal antibody-targeted nanomaterials in the treatment of cancer. *MAbs* *3*, 467–478.

Kakorin, S., and Neumann, E. (2002). Ionic conductivity of electroporated lipid bilayer membranes. *Bioelectrochemistry Amst. Neth.* *56*, 163–166.

Kanthou, C., Kranjc, S., Sersa, G., Tozer, G., Zupanic, A., and Cemazar, M. (2006). The endothelial cytoskeleton as a target of electroporation-based therapies. *Mol. Cancer Ther.* *5*, 3145–3152.

Kasas, S., and Dietler, G. (2008). Probing nanomechanical properties from biomolecules to living cells. *Pflügers Arch. Eur. J. Physiol.* *456*, 13–27.

Kelm, J.M., Timmins, N.E., Brown, C.J., Fussenegger, M., and Nielsen, L.K. (2003). Method for generation of homogeneous multicellular tumor spheroids applicable to a wide variety of cell types. *Biotechnol Bioeng* *83*, 173–180.

Kenaan, M., El Amari, S., Silve, A., Merla, C., Mir, L.M., Couderc, V., Arnaud-Cormos, D., and Leveque, P. (2011). Characterization of a 50- Ω exposure setup for high-voltage nanosecond pulsed electric field bioexperiments. *IEEE Trans. Biomed. Eng.* *58*, 207–214.

Khaitan, D., Chandna, S., Arya, M.B., and Dwarakanath, B.S. (2006). Differential mechanisms of radiosensitization by 2-deoxy-D-glucose in the monolayers and multicellular spheroids of a human glioma cell line. *Cancer Biol. Ther.* *5*, 1142–1151.

Kim, T.-H., Mount, C.W., Gombotz, W.R., and Pun, S.H. (2010). The delivery of doxorubicin to 3-D multicellular spheroids and tumors in a murine xenograft model using tumor-penetrating triblock polymeric micelles. *Biomaterials* *31*, 7386–7397.

Kinosita, K., Jr, and Tsong, T.T. (1977). Hemolysis of human erythrocytes by transient electric field. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *74*, 1923–1927.

- Klenchin, V.A., Sukharev, S.I., Serov, S.M., Chernomordik, L.V., and Chizmadzhev YuA (1991). Electrically induced DNA uptake by cells is a fast process involving DNA electrophoresis. *Biophys. J.* *60*, 804–811.
- Kolb, J.F., Kono, S., and Schoenbach, K.H. (2006). Nanosecond pulsed electric field generators for the study of subcellular effects. *Bioelectromagnetics* *27*, 172–187.
- Koronkiewicz, S., and Kalinowski, S. (2004). Influence of cholesterol on electroporation of bilayer lipid membranes: chronopotentiometric studies. *Biochim. Biophys. Acta* *1661*, 196–203.
- Kostarelos, K., Emfietzoglou, D., Papakostas, A., Yang, W.-H., Ballangrud, A., and Sgouros, G. (2004). Binding and interstitial penetration of liposomes within avascular tumor spheroids. *Int. J. Cancer J. Int. Cancer* *112*, 713–721.
- Kotnik, T., and Miklavcic, D. (2006). Theoretical evaluation of voltage inducement on internal membranes of biological cells exposed to electric fields. *Biophys. J.* *90*, 480–491.
- Kramar, P., Miklavcic, D., and Lebar, A.M. (2007). Determination of the lipid bilayer breakdown voltage by means of linear rising signal. *Bioelectrochemistry Amst. Neth.* *70*, 23–27.
- Kramar, P., Delemotte, L., Maček Lebar, A., Kotulska, M., Tarek, M., and Miklavčič, D. (2012). Molecular-level characterization of lipid membrane electroporation using linearly rising current. *J. Membr. Biol.* *245*, 651–659.
- Krishnaswamy, P., Kuthi, A., Meng-Tse Chen, Shih-Jui Chen, Vernier, P.T., and Gundersen, M.A. (2007). Compact high voltage subnanosecond pulsed power delivery system for biological applications. In *Pulsed Power Conference, 2007 16th IEEE International*, pp. 476–480.
- Kurata, K., Matsushita, M., Yoshii, T., Fukunaga, T., and Takamatsu, H. (2012). Effect of irreversible electroporation on three-dimensional cell culture model. *Conf. Proc. Annu. Int. Conf. Ieee Eng. Med. Biol. Soc. Ieee Eng. Med. Biol. Soc. Conf. 2012*, 179–182.
- Kuthi, A., Gabrielsson, P., Behrend, M.R., Vernier, P.T., and Gundersen, M.A. (2005). Nanosecond Pulse Generator Using Fast Recovery Diodes for Cell Electromanipulation. *Ieee Trans. Plasma Sci.* *33*, 1192–1197.
- Kuznetsov, Y.G., Malkin, A.J., and McPherson, A. (1997). Atomic force microscopy studies of living cells: visualization of motility, division, aggregation, transformation, and apoptosis. *J. Struct. Biol.* *120*, 180–191.
- Kuznetsova, T.G., Starodubtseva, M.N., Yegorenkov, N.I., Chizhik, S.A., and Zhdanov, R.I. (2007). Atomic force microscopy probing of cell elasticity. *Micron Oxf. Engl.* *1993* *38*, 824–833.
- Laib, A.M., Bartol, A., Alajati, A., Korff, T., Weber, H., and Augustin, H.G. (2009). Spheroid-based human endothelial cell microvessel formation in vivo. *Nat. Protoc.* *4*, 1202–1215.

- Lam, A.P., and Dean, D.A. (2010). Progress and prospects: nuclear import of nonviral vectors. *Gene Ther.* 17, 439–447.
- Levine, Z.A., and Vernier, P.T. (2010). Life cycle of an electropore: field-dependent and field-independent steps in pore creation and annihilation. *J. Membr. Biol.* 236, 27–36.
- Li, C.-L., Tian, T., Nan, K.-J., Zhao, N., Guo, Y.-H., Cui, J., Wang, J., and Zhang, W.-G. (2008). Survival advantages of multicellular spheroids vs. monolayers of HepG2 cells in vitro. *Oncol. Rep.* 20, 1465–1471.
- Li, L.H., Sen, A., Murphy, S.P., Jahreis, G.P., Fuji, H., and Hui, S.W. (1999). Apoptosis induced by DNA uptake limits transfection efficiency. *Exp Cell Res* 253, 541–550.
- Lin, D.C., Tobin, K.D., Grumet, M., and Lin, S. (1980). Cytochalasins inhibit nuclei-induced actin polymerization by blocking filament elongation. *J. Cell Biol.* 84, 455–460.
- Lobjois, V., Frongia, C., Jozan, S., Truchet, I., and Valette, A. (2009). Cell cycle and apoptotic effects of SAHA are regulated by the cellular microenvironment in HCT116 multicellular tumour spheroids. *Eur J Cancer* 45, 2402–2411.
- Lodish H, Berk A, and Zipursky SL (2000). The Actin Cytoskeleton. In *Molecular Cell Biology.*, (New York: W. H. Freeman),.
- 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 (Mosc.)* 27, 1222–1228.
- Machida, S., Watanabe-Nakayama, T., Harada, I., Afrin, R., Nakayama, T., and Ikai, A. (2010). Direct manipulation of intracellular stress fibres using a hook-shaped AFM probe. *Nanotechnology* 21, 385102.
- Madani, S.Y., Naderi, N., Dissanayake, O., Tan, A., and Seifalian, A.M. (2011). A new era of cancer treatment: carbon nanotubes as drug delivery tools. *Int. J. Nanomedicine* 6, 2963–2979.
- Madsen, S.J., Sun, C.H., Tromberg, B.J., Cristini, V., De Magalhaes, N., and Hirschberg, H. (2006). Multicell tumor spheroids in photodynamic therapy. *Lasers Surg Med* 38, 555–564.
- Marjanovic, I., Haberl, S., Miklavcic, D., Kanduser, M., and Pavlin, M. (2010a). Analysis and comparison of electrical pulse parameters for gene electrotransfer of two different cell lines. *J. Membr. Biol.* 236, 97–105.
- Marjanovic, I., Haberl, S., Miklavcic, D., Kanduser, M., and Pavlin, M. (2010b). Analysis and comparison of electrical pulse parameters for gene electrotransfer of two different cell lines. *J. Membr. Biol.* 236, 97–105.
- Marrero, B., and Heller, R. (2012). The use of an in vitro 3D melanoma model to predict in vivo plasmid transfection using electroporation. *Biomaterials* 33, 3036–3046.
- Marrero, B., Messina, J.L., and Heller, R. (2009). Generation of a tumor spheroid in a microgravity environment as a 3D model of melanoma. *Vitro Cell Dev Biol Anim* 45, 523–534.

- Marszalek, P.E., and Dufrêne, Y.F. (2012). Stretching single polysaccharides and proteins using atomic force microscopy. *Chem. Soc. Rev.* *41*, 3523–3534.
- Mauroy, C., Portet, T., Winterhalder, M., Bellard, E., Blache, M.-C., Teissié, J., Zumbusch, A., and Rols, M.-P. (2012). Giant lipid vesicles under electric field pulses assessed by non invasive imaging. *Bioelectrochemistry Amst. Neth.* *87*, 253–259.
- Maxfield, F.R., and McGraw, T.E. (2004). Endocytic recycling. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *5*, 121–132.
- Van Meer, G., Voelker, D.R., and Feigenson, G.W. (2008). Membrane lipids: where they are and how they behave. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *9*, 112–124.
- Mehta, G., Hsiao, A.Y., Ingram, M., Luker, G.D., and Takayama, S. (2012). Opportunities and challenges for use of tumor spheroids as models to test drug delivery and efficacy. *J. Control. Release Off. J. Control. Release Soc.* *164*, 192–204.
- Mellman, I., Coukos, G., and Dranoff, G. (2011). Cancer immunotherapy comes of age. *Nature* *480*, 480–489.
- Mellor, H.R., Ferguson, D.J.P., and Callaghan, R. (2005). A model of quiescent tumour microregions for evaluating multicellular resistance to chemotherapeutic drugs. *Br. J. Cancer* *93*, 302–309.
- Mellor, H.R., Davies, L.A., Caspar, H., Pringle, C.R., Hyde, S.C., Gill, D.R., and Callaghan, R. (2006). Optimising non-viral gene delivery in a tumour spheroid model. *J. Gene Med.* *8*, 1160–1170.
- Mir, L.M. (2009). Nucleic acids electrotransfer-based gene therapy (electrogenotherapy): past, current, and future. *Mol. Biotechnol.* *43*, 167–176.
- Mir, L., Banoun, H., and Paoletti, C. (1988). introduction of definite amounts of nonpermeant molecules into living cells after electroporation: direct access to the cytosol. *Exp Cell Res* *175*, 15–25.
- Mir, L.M., Morsli, N., Garbay, J.R., Billard, V., Robert, C., and Marty, M. (2003). Electrochemotherapy: a new treatment of solid tumors. *J. Exp. Clin. Cancer Res. Cr* *22*, 145–148.
- Moiescu, M.G., Radu, M., Kovacs, E., Mir, L.M., and Savopol, T. (2013). Changes of cell electrical parameters induced by electroporation. A dielectrophoresis study. *Biochim. Biophys. Acta* *1828*, 365–372.
- Möller, C., Allen, M., Elings, V., Engel, A., and Müller, D.J. (1999). Tapping-mode atomic force microscopy produces faithful high-resolution images of protein surfaces. *Biophys. J.* *77*, 1150–1158.
- Monazzam, A., Josephsson, R., Blomqvist, C., Carlsson, J., Långström, B., and Bergström, M. (2007). Application of the multicellular tumour spheroid model to screen PET tracers for analysis of early response of chemotherapy in breast cancer. *Breast Cancer Res. Bcr* *9*, R45.

- Morotomi-Yano, K., Akiyama, H., and Yano, K. (2012). Nanosecond pulsed electric fields activate AMP-activated protein kinase: implications for calcium-mediated activation of cellular signaling. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *428*, 371–375.
- Müller, D.J., Helenius, J., Alsteens, D., and Dufrêne, Y.F. (2009). Force probing surfaces of living cells to molecular resolution. *Nat. Chem. Biol.* *5*, 383–390.
- Nakamura, K., Hanibuchi, M., Yano, S., Tanaka, Y., Fujino, I., Inoue, M., Takezawa, T., Shitara, K., Sone, S., and Hanai, N. (1999). Apoptosis induction of human lung cancer cell line in multicellular heterospheroids with humanized antiganglioside GM2 monoclonal antibody. *Cancer Res.* *59*, 5323–5330.
- Nakamura, S., Maehara, T., Watanabe, S., Ishihara, M., and Sato, M. (2013). Improvement of hydrodynamics-based gene transfer of nonviral DNA targeted to murine hepatocytes. *Biomed Res. Int.* *2013*, 928790.
- Nederman, T., Norling, B., Glimelius, B., Carlsson, J., and Brunk, U. (1984). Demonstration of an extracellular matrix in multicellular tumor spheroids. *Cancer Res.* *44*, 3090–3097.
- Nesin, V., and Pakhomov, A.G. (2012). Inhibition of voltage-gated Na⁺ current by nanosecond pulsed electric field (nsPEF) is not mediated by Na⁺ influx or Ca²⁺ signaling. *Bioelectromagnetics* n/a–n/a.
- 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. *Biochim. Biophys. Acta* *1808*, 792–801.
- Nesin, V., Bowman, A.M., Xiao, S., and Pakhomov, A.G. (2012). Cell permeabilization and inhibition of voltage-gated Ca²⁺ and Na⁺ channel currents by nanosecond pulsed electric field. *Bioelectromagnetics* *33*, 394–404.
- Neumann, E., and Rosenheck, K. (1972). Permeability changes induced by electric impulses in vesicular membranes. *J. Membr. Biol.* *10*, 279–290.
- Neumann, E., Schaefer-Ridder, M., Wang, Y., and Hofschneider, P.H. (1982). Gene transfer into mouse lymphoma cells by electroporation in high electric fields. *Embo J.* *1*, 841–845.
- 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. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *343*, 351–360.
- Nuccitelli, R., Chen, X., Pakhomov, A.G., Baldwin, W.H., Sheikh, S., Pomicter, J.L., Ren, W., Osgood, C., Swanson, R.J., Kolb, J.F., *et al.* (2009). A new pulsed electric field therapy for melanoma disrupts the tumor's blood supply and causes complete remission without recurrence. *Int. J. Cancer J. Int. Cancer* *125*, 438–445.
- 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. *Int. J. Cancer J. Int. Cancer* *127*, 1727–1736.

- Nuccitelli, R., Tran, K., Lui, K., Huynh, J., Athos, B., Kreis, M., Nuccitelli, P., and De Fabo, E.C. (2012). Non-thermal nanoelectroablation of UV-induced murine melanomas stimulates an immune response. *Pigment Cell Melanoma Res.* 25, 618–629.
- Orio, J., Coustets, M., Mauroy, C., and Teissie, J. (2012). Electric field orientation for gene delivery using high-voltage and low-voltage pulses. *J. Membr. Biol.* 245, 661–666.
- Paganin-Gioanni, A., Bellard, E., Escoffre, J.M., Rols, M.P., Teissie, J., and Golzio, M. (2011). Direct visualization at the single-cell level of siRNA electrotransfer into cancer cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 108, 10443–10447.
- Pakhomov, A.G., Shevin, R., White, J.A., Kolb, J.F., Pakhomova, O.N., Joshi, R.P., and Schoenbach, K.H. (2007a). Membrane permeabilization and cell damage by ultrashort electric field shocks. *Arch. Biochem. Biophys.* 465, 109–118.
- Pakhomov, A.G., Kolb, J.F., White, J.A., Joshi, R.P., Xiao, S., and Schoenbach, K.H. (2007b). Long-lasting plasma membrane permeabilization in mammalian cells by nanosecond pulsed electric field (nsPEF). *Bioelectromagnetics* 28, 655–663.
- 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. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 385, 181–186.
- Pakhomova, and Pakhomov (2010). Nanopores: a distinct transmembrane passageway in electroporated cells. In *Advanced Electroporation Techniques in Biology and Medicine*, (Pakhomov AG, Miklavcic D, Markov MS.), pp. 178–194.
- Pampaloni, F., Reynaud, E.G., and Stelzer, E.H.K. (2007). The third dimension bridges the gap between cell culture and live tissue. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 8, 839–845.
- Pavlin, M., Pucihar, G., and Kandušer, M. (2012). The role of electrically stimulated endocytosis in gene electrotransfer. *Bioelectrochemistry Amst. Neth.* 83, 38–45.
- Perni, S., Chalise, P.R., Shama, G., and Kong, M.G. (2007). Bacterial cells exposed to nanosecond pulsed electric fields show lethal and sublethal effects. *Int. J. Food Microbiol.* 120, 311–314.
- Phez, E., Faurie, C., Golzio, M., Teissie, J., and Rols, M.P. (2005). New insights in the visualization of membrane permeabilization and DNA/membrane interaction of cells submitted to electric pulses. *Biochim Biophys Acta* 1724, 248–254.
- Pickl, M., and Ries, C.H. (2009). Comparison of 3D and 2D tumor models reveals enhanced HER2 activation in 3D associated with an increased response to trastuzumab. *Oncogene* 28, 461–468.
- Pitard, B. (2002). Supramolecular assemblies of DNA delivery systems. *Somat. Cell Mol. Genet.* 27, 5–15.
- Portet, T., Camps i Febrer, F., Escoffre, J.-M., Favard, C., Rols, M.-P., and Dean, D.S. (2009). Visualization of membrane loss during the shrinkage of giant vesicles under electropulsation. *Biophys. J.* 96, 4109–4121.

- Portet, T., Mauroy, C., Démary, V., Houles, T., Escoffre, J.-M., Dean, D.S., and Rols, M.-P. (2012). Destabilizing giant vesicles with electric fields: an overview of current applications. *J. Membr. Biol.* *245*, 555–564.
- Prados, J., Melguizo, C., Rama, A., Ortiz, R., Boulaiz, H., Rodriguez-Serrano, F., Caba, O., Rodriguez-Herva, J.J., Ramos, J.L., and Aranega, A. (2008). Combined therapy using suicide gene and paclitaxel enhances growth inhibition of multicellular tumour spheroids of A-549 human lung cancer cells. *Int. J. Oncol.* *33*, 121–127.
- Pucihar, G., Kotnik, T., Miklavcic, D., and Teissié, J. (2008). Kinetics of transmembrane transport of small molecules into electroporated cells. *Biophys. J.* *95*, 2837–2848.
- Radmacher, M., Cleveland, J.P., Fritz, M., Hansma, H.G., and Hansma, P.K. (1994). Mapping interaction forces with the atomic force microscope. *Biophys. J.* *66*, 2159–2165.
- Raffy, S., and Teissié, J. (1999). Control of lipid membrane stability by cholesterol content. *Biophys. J.* *76*, 2072–2080.
- Ranganathan, R., Madanmohan, S., Kesavan, A., Baskar, G., Krishnamoorthy, Y.R., Santosham, R., Ponraju, D., Rayala, S.K., and Venkatraman, G. (2012). Nanomedicine: towards development of patient-friendly drug-delivery systems for oncological applications. *Int. J. Nanomedicine* *7*, 1043–1060.
- Rassokhin, M.A., and Pakhomov, A.G. (2012). Electric Field Exposure Triggers and Guides Formation of Pseudopod-Like Blebs in U937 Monocytes. *J. Membr. Biol.* *245*, 521–529.
- Rebersek, M., Faurie, C., Kanduser, M., Corović, S., Teissié, J., Rols, M.-P., and Miklavcic, D. (2007). Electroporator with automatic change of electric field direction improves gene electrotransfer in-vitro. *Biomed. Eng. Online* *6*, 25.
- Rebersek, M., Kranjc, M., Pavliha, D., Batista-Napotnik, T., Vrtacnik, D., Amon, S., and Miklavcic, D. (2009). Blumlein configuration for high-repetition-rate pulse generation of variable duration and polarity using synchronized switch control. *IEEE Trans. Biomed. Eng.* *56*, 2642–2648.
- Reeves, K.J., Hou, J., Higham, S.E., Sun, Z., Trzeciakowski, J.P., Meininger, G.A., and Brown, N.J. (2012). Selective measurement and manipulation of adhesion forces between cancer cells and bone marrow endothelial cells using atomic force microscopy. *Nanomed.*
- Ren, W., and Beebe, S.J. (2011). An apoptosis targeted stimulus with nanosecond pulsed electric fields (nsPEFs) in E4 squamous cell carcinoma. *Apoptosis Int. J. Program. Cell Death* *16*, 382–393.
- Ren, W., Sain, N.M., and Beebe, S.J. (2012). Nanosecond pulsed electric fields (nsPEFs) activate intrinsic caspase-dependent and caspase-independent cell death in Jurkat cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *421*, 808–812.
- Riske, K.A., and Dimova, R. (2006). Electric pulses induce cylindrical deformations on giant vesicles in salt solutions. *Biophys. J.* *91*, 1778–1786.
- Roduit, C., Saha, B., Alonso-Sarduy, L., Volterra, A., Dietler, G., and Kasas, S. (2012). OpenFovea: open-source AFM data processing software. *Nat. Methods* *9*, 774–775.

- Rols, M.P., and Teissié, J. (1990). Electroporation of mammalian cells. Quantitative analysis of the phenomenon. *Biophys. J.* 58, 1089–1098.
- Rols, M.P., and Teissié, J. (1992). Experimental evidence for the involvement of the cytoskeleton in mammalian cell electroporation. *Biochim. Biophys. Acta* 1111, 45–50.
- Rols, M.P., Coulet, D., and Teissie, J. (1992). Highly efficient transfection of mammalian cells by electric field pulses. Application to large volumes of cell culture by using a flow system. *Eur J Biochem* 206, 115–121.
- Rols, M.P., Femenia, P., and Teissie, J. (1995). Long-lived macropinocytosis takes place in electroporated mammalian cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 208, 26–35.
- Rols, M.P., Delteil, C., Golzio, M., Dumond, P., Cros, S., and Teissie, J. (1998). In vivo electrically mediated protein and gene transfer in murine melanoma. *Nat Biotechnol* 16, 168–171.
- Rols, M.P., Golzio, M., Gabriel, B., and Teissié, J. (2002a). Factors controlling electroporation of cell membranes. *Technol. Cancer Res. Treat.* 1, 319–328.
- Rols, M.P., Golzio, M., Gabriel, B., and Teissié, J. (2002b). Factors controlling electroporation of cell membranes. *Technol. Cancer Res. Treat.* 1, 319–328.
- Romeo, S., Wu, Y.-H., Levine, Z.A., Gundersen, M.A., and Vernier, P.T. (2013). Water influx and cell swelling after nanosecond electroporation. *Biochim. Biophys. Acta.*
- Rosazza, C., Escoffre, J.-M., Zumbusch, A., and Rols, M.-P. (2011). The Actin Cytoskeleton Has an Active Role in the Electrotransfer of Plasmid DNA in Mammalian Cells. *Mol. Ther.* 19, 913–921.
- Rosazza, C., Phez, E., Escoffre, J.-M., Cézanne, L., Zumbusch, A., and Rols, M.-P. (2012). Cholesterol implications in plasmid DNA electrotransfer: Evidence for the involvement of endocytotic pathways. *Int. J. Pharm.* 423, 134–143.
- Roth, C.C., Tolstykh, G.P., Payne, J.A., Kuipers, M.A., Thompson, G.L., Desilva, M.N., and Ibey, B.L. (2013). Nanosecond pulsed electric field thresholds for nanopore formation in neural cells. *J. Biomed. Opt.* 18, 35005.
- Rotsch, C., and Radmacher, M. (2000). Drug-induced changes of cytoskeletal structure and mechanics in fibroblasts: an atomic force microscopy study. *Biophys. J.* 78, 520–535.
- Rudhall, A.P., Antkowiak, M., Tsampoula, X., Mazilu, M., Metzger, N.K., Gunn-Moore, F., and Dholakia, K. (2012). Exploring the ultrashort pulse laser parameter space for membrane permeabilisation in mammalian cells. *Sci. Reports* 2, 858.
- 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, e1135.
- Santini, M.T., Rainaldi, G., and Indovina, P.L. (2000). Apoptosis, cell adhesion and the extracellular matrix in the three-dimensional growth of multicellular tumor spheroids. *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* 36, 75–87.

- Satkauskas, Bureau, Mahfoudi, and Mir slow accumulation of plasmids in muscle cells: supporting evidence for a mechanism of DNA uptake by receptor mediated endocytosis. *Mol. Ther.* 4, 317–323.
- Sawant, R.R., and Torchilin, V.P. (2012). Challenges in development of targeted liposomal therapeutics. *Aaps J.* 14, 303–315.
- Scarlett, S.S., White, J.A., Blackmore, P.F., Schoenbach, K.H., and Kolb, J.F. (2009). Regulation of intracellular calcium concentration by nanosecond pulsed electric fields. *Biochim. Biophys. Acta* 1788, 1168–1175.
- Schilling, S., Schmid, S., Jäger, H., Ludwig, M., Dietrich, H., Toepfl, S., Knorr, D., Neidhart, S., Schieber, A., and Carle, R. (2008). Comparative study of pulsed electric field and thermal processing of apple juice with particular consideration of juice quality and enzyme deactivation. *J. Agric. Food Chem.* 56, 4545–4554.
- Schoenbach, K.H., Beebe, S.J., and Buescher, E.S. (2001a). Intracellular effect of ultrashort electrical pulses. *Bioelectromagnetics* 22, 440–448.
- Schoenbach, K.H., Beebe, S.J., and Buescher, E.S. (2001b). Method and apparatus for intracellular electro-manipulation.
- Sel, D., Cukjati, D., Batiuskaite, D., Slivnik, T., Mir, L.M., and Miklavcic, D. (2005). Sequential finite element model of tissue electropermeabilization. *IEEE Trans. Biomed. Eng.* 52, 816–827.
- Semenov, I., Xiao, S., and Pakhomov, A.G. (2013). Primary pathways of intracellular Ca(2+) mobilization by nanosecond pulsed electric field. *Biochim. Biophys. Acta* 1828, 981–989.
- Shin, C.S., Kwak, B., Han, B., and Park, K. (2013). Development of an in Vitro 3D Tumor Model to Study Therapeutic Efficiency of an Anticancer Drug. *Mol. Pharm.*
- Shirinifard, A., Gens, J.S., Zaitlen, B.L., Popławski, N.J., Swat, M., and Glazier, J.A. (2009). 3D multi-cell simulation of tumor growth and angiogenesis. *Plos One* 4, e7190.
- Silve, A., Leray, I., and Mir, L.M. (2011). Demonstration of cell membrane permeabilization to medium-sized molecules caused by a single 10ns electric pulse. *Bioelectrochemistry Amst. Neth.*
- Siwy, Z., and Fuliński, A. (2002). Fabrication of a synthetic nanopore ion pump. *Phys. Rev. Lett.* 89, 198103.
- Skruzny, M., Brach, T., Ciuffa, R., Rybina, S., Wachsmuth, M., and Kaksonen, M. (2012). Molecular basis for coupling the plasma membrane to the actin cytoskeleton during clathrin-mediated endocytosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 109, E2533–2542.
- Smith, P.G., Burchill, S.A., Brooke, D., Coletta, P.L., and Whitehouse, A. (2005). Efficient infection and persistence of a herpesvirus saimiri-based gene delivery vector into human tumor xenografts and multicellular spheroid cultures. *Cancer Gene Ther.* 12, 248–256.

- Song, J., Joshi, R.P., and Beebe, S.J. (2010). Cellular apoptosis by nanosecond, high-intensity electric pulses: model evaluation of the pulsing threshold and extrinsic pathway. *Bioelectrochemistry Amst. Neth.* 79, 179–186.
- Spanggaard, I., Corydon, T., Hojman, P., Gissel, H., Dagnaes-Hansen, F., Jensen, T.G., and Gehl, J. (2012). Spatial distribution of transgenic protein after gene electrotransfer to porcine muscle. *Hum. Gene Ther. Methods* 23, 387–392.
- Spector, I., Shochet, N.R., Kashman, Y., and Groweiss, A. (1983). Latrunculins: novel marine toxins that disrupt microfilament organization in cultured cells. *Science* 219, 493–495.
- Stacey, M., Stickley, J., Fox, P., Statler, V., Schoenbach, K., Beebe, S.J., and Buescher, S. (2003). Differential effects in cells exposed to ultra-short, high intensity electric fields: cell survival, DNA damage, and cell cycle analysis. *Mutat. Res.* 542, 65–75.
- Stacey, M., Fox, P., Buescher, S., and Kolb, J. (2011a). Nanosecond pulsed electric field induced cytoskeleton, nuclear membrane and telomere damage adversely impact cell survival. *Bioelectrochemistry* 82, 131–134.
- Stacey, M., Osgood, C., kalluri, B.S., Cao, W., Elsayed-Ali, H., and Abdel-fattah, T. (2011b). Nanosecond pulse electrical fields used in conjunction with multi-wall carbon nanotubes as a potential tumor treatment. *Biomed. Mater.* 6, 1748–6041.
- Steitz, J., and Tüting, T. (2013). Biolistic DNA vaccination against melanoma. *Methods Mol. Biol. Clifton Nj* 940, 317–337.
- Stulen, G. (1981). Electric field effects on lipid membrane structure. *Biochim. Biophys. Acta* 640, 621–627.
- Sun, M., Graham, J.S., Hegedüs, B., Marga, F., Zhang, Y., Forgacs, G., and Grandbois, M. (2005a). Multiple membrane tethers probed by atomic force microscopy. *Biophys. J.* 89, 4320–4329.
- Sun, Y., Vernier, P.T., Behrend, M., Marcu, L., and Gundersen, M.A. (2005b). Electrode microchamber for noninvasive perturbation of mammalian cells with nanosecond pulsed electric fields. *Ieee Trans. Nanobioscience* 4, 277–283.
- Sutherland, R.M. (1988). Cell and environment interactions in tumor microregions: the multicell spheroid model. *Science* 240, 177–184.
- Sutherland, R.M., McCredie, J.A., and Inch, W.R. (1971). Growth of multicell spheroids in tissue culture as a model of nodular carcinomas. *J. Natl. Cancer Inst.* 46, 113–120.
- Takahashi, K., Mizukami, H., Saga, Y., Takei, Y., Urabe, M., Kume, A., Machida, S., Fujiwara, H., Suzuki, M., and Ozawa, K. (2013). Suppression of lymph node and lung metastases of endometrial cancer by muscle-mediated expression of soluble vascular endothelial growth factor receptor-3. *Cancer Sci.*
- Tarek, M. (2005). Membrane electroporation: a molecular dynamics simulation. *Biophys. J.* 88, 4045–4053.

- Teissie, J., and Rols, M.P. (1986). Fusion of mammalian cells in culture is obtained by creating the contact between cells after their electropermeabilization. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *140*, 258–266.
- Teissie, J., Golzio, M., and Rols, M.P. (2005). Mechanisms of cell membrane electropermeabilization: A minireview of our present (lack of?) knowledge. *Biochim. Biophys. Acta Bba - Gen. Subj.* *1724*, 270–280.
- Teissié, J., and Rols, M.P. (1993). An experimental evaluation of the critical potential difference inducing cell membrane electropermeabilization. *Biophys. J.* *65*, 409–413.
- Tekle, E., Astumian, R.D., Friauf, W.A., and Chock, P.B. (2001). Asymmetric pore distribution and loss of membrane lipid in electroporated DOPC vesicles. *Biophys. J.* *81*, 960–968.
- Tekle, E., Oubrahim, H., Dzekunov, S.M., Kolb, J.F., Schoenbach, K.H., and Chock, P.B. (2005). Selective field effects on intracellular vacuoles and vesicle membranes with nanosecond electric pulses. *Biophys. J.* *89*, 274–284.
- Thomas, G.H. (2001). Spectrin: the ghost in the machine. *Bioessays News Rev. Mol. Cell. Dev. Biol.* *23*, 152–160.
- Timmins, N.E., and Nielsen, L.K. (2007). Generation of multicellular tumor spheroids by the hanging-drop method. *Methods Mol. Med.* *140*, 141–151.
- Tokman, M., Lee, J.H., Levine, Z.A., Ho, M.-C., Colvin, M.E., and Vernier, P.T. (2013). Electric field-driven water dipoles: nanoscale architecture of electroporation. *Plos One* *8*, e61111.
- Tönsing, K., Kakorin, S., Neumann, E., Liemann, S., and Huber, R. (1997). Annexin V and vesicle membrane electroporation. *Eur. Biophys. J. Ebj* *26*, 307–318.
- Trabulo, S., Cardoso, A.L., Cardoso, A.M.S., Düzgüneş, N., Jurado, A.S., and de Lima, M.C.P. (2012). Cell-penetrating peptide-based systems for nucleic acid delivery: a biological and biophysical approach. *Methods Enzymol.* *509*, 277–300.
- Truchet, I., Jozan, S., Baron, S., Frongia, C., Balaguer, P., Richard-Foy, H., and Valette, A. (2008). Estrogen and antiestrogen-dependent regulation of breast cancer cell proliferation in multicellular spheroids: Influence of cell microenvironment. *Int. J. Oncol.* *32*, 1033–1039.
- Tsen, S.-W.D., Wu, C.-Y., Meneshian, A., Pai, S.I., Hung, C.-F., and Wu, T.-C. (2009). Femtosecond laser treatment enhances DNA transfection efficiency in vivo. *J. Biomed. Sci.* *16*, 36.
- Tsung, A.J., Kargiotis, O., Chetty, C., Lakka, S.S., Gujrati, M., Spomar, D.G., Dinh, D.H., and Rao, J.S. (2008). Downregulation of matrix metalloproteinase-2 (MMP-2) utilizing adenovirus-mediated transfer of small interfering RNA (siRNA) in a novel spinal metastatic melanoma model. *Int. J. Oncol.* *32*, 557–564.
- Tzanakakis, E.S., Waxman, D.J., Hansen, L.K., Rempel, R.P., and Hu, W.S. (2002). Long-term enhancement of cytochrome P450 2B1/2 expression in rat hepatocyte spheroids through adenovirus-mediated gene transfer. *Cell Biol. Toxicol.* *18*, 13–27.

- Valcárcel, M., Arteta, B., Jaureguibeitia, A., Lopategi, A., Martínez, I., Mendoza, L., Muruzabal, F.J., Salado, C., and Vidal-Vanaclocha, F. (2008). Three-dimensional growth as multicellular spheroid activates the proangiogenic phenotype of colorectal carcinoma cells via LFA-1-dependent VEGF: implications on hepatic micrometastasis. *J. Transl. Med.* *6*, 57.
- Valic, B., Golzio, M., Pavlin, M., Schatz, A., Faurie, C., Gabriel, B., Teissié, J., Rols, M.-P., and Miklavcic, D. (2003). Effect of electric field induced transmembrane potential on spheroidal cells: theory and experiment. *Eur. Biophys. J. Ebj* *32*, 519–528.
- Vaughan, E.E., and Dean, D.A. (2006). Intracellular trafficking of plasmids during transfection is mediated by microtubules. *Mol. Ther. J. Am. Soc. Gene Ther.* *13*, 422–428.
- Vernier, P.T., and Ziegler, M.J. (2007). Nanosecond field alignment of head group and water dipoles in electroporating phospholipid bilayers. *J. Phys. Chem. B* *111*, 12993–12996.
- Vernier, Li, Marcu, Craft, and Gundersen (2003a). Ultrashort pulsed electric fields induce membrane phospholipid translocation and caspase activation: differential sensitivities of Jurkat T lymphoblasts and rat glioma C6 cells. *Ieee Trans Dielectr Electr Insul.* *10*, 795–809.
- Vernier, P.T., Sun, Y., Marcu, L., Salemi, S., Craft, C.M., and Gundersen, M.A. (2003b). Calcium bursts induced by nanosecond electric pulses. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *310*, 286–295.
- Vernier, P.T., Sun, Y., Marcu, L., Craft, C.M., and Gundersen, M.A. (2004a). Nanoelectropulse-induced phosphatidylserine translocation. *Biophys. J.* *86*, 4040–4048.
- Vernier, P.T., Sun, Y., Marcu, L., Craft, C.M., and Gundersen, M.A. (2004b). Nanosecond pulsed electric fields perturb membrane phospholipids in T lymphoblasts. *Febs Lett.* *572*, 103–108.
- Vernier, P.T., Sun, Y., and Gundersen, M.A. (2006a). Nanoelectropulse-driven membrane perturbation and small molecule permeabilization. *Bmc Cell Biol.* *7*, 37.
- Vernier, P.T., Ziegler, M.J., Sun, Y., Chang, W.V., Gundersen, M.A., and Tieleman, D.P. (2006b). Nanopore formation and phosphatidylserine externalization in a phospholipid bilayer at high transmembrane potential. *J. Am. Chem. Soc.* *128*, 6288–6289.
- Vernier, P.T., Sun, Y., Chen, M.-T., Gundersen, M.A., and Craviso, G.L. (2008). Nanosecond electric pulse-induced calcium entry into chromaffin cells. *Bioelectrochemistry Amst. Neth.* *73*, 1–4.
- Vernier, P.T., Ziegler, M.J., and Dimova, R. (2009). Calcium binding and head group dipole angle in phosphatidylserine-phosphatidylcholine bilayers. *Langmuir Acs J. Surfaces Colloids* *25*, 1020–1027.
- Wang, R., Xu, J., Juliette, L., Castilleja, A., Love, J., Sung, S.-Y., Zhau, H.E., Goodwin, T.J., and Chung, L.W.K. (2005). Three-dimensional co-culture models to study prostate cancer growth, progression, and metastasis to bone. *Semin. Cancer Biol.* *15*, 353–364.
- Wang, S., Chen, J., Chen, M.-T., Vernier, P.T., Gundersen, M.A., and Valderrábano, M. (2009). Cardiac myocyte excitation by ultrashort high-field pulses. *Biophys. J.* *96*, 1640–1648.

- Wartenberg, M., Dönmez, F., Ling, F.C., Acker, H., Hescheler, J., and Sauer, H. (2001). Tumor-induced angiogenesis studied in confrontation cultures of multicellular tumor spheroids and embryoid bodies grown from pluripotent embryonic stem cells. *Faseb J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* *15*, 995–1005.
- Wasungu, L., Escoffre, J.-M., Valette, A., Teissie, J., and Rols, M.-P. (2009). A 3D in vitro spheroid model as a way to study the mechanisms of electroporation. *Int. J. Pharm.* *379*, 278–284.
- White, J.A., Blackmore, P.F., Schoenbach, K.H., and Beebe, S.J. (2004). Stimulation of capacitance calcium entry in HL-60 cells by nanosecond pulsed electric fields. *J. Biol. Chem.* *279*, 22964–22972.
- White, J.A., Pliquett, U., Blackmore, P.F., Joshi, R.P., Schoenbach, K.H., and Kolb, J.F. (2011). Plasma membrane charging of Jurkat cells by nanosecond pulsed electric fields. *Eur. Biophys. J. Ebj* *40*, 947–957.
- Wolf, H., Rols, M.P., Boldt, E., Neumann, E., and Teissié, J. (1994). Control by pulse parameters of electric field-mediated gene transfer in mammalian cells. *Biophys. J.* *66*, 524–531.
- Worcester, D.L., Miller, R.G., and Bryant, P.J. (1988). Atomic force microscopy of purple membranes. *J. Microsc.* *152*, 817–821.
- Wu, Y.-H., Arnaud-Cormos, D., Casciola, M., Sanders, J.M., Leveque, P., and Vernier, P.T. (2013). Moveable wire electrode microchamber for nanosecond pulsed electric-field delivery. *IEEE Trans. Biomed. Eng.* *60*, 489–496.
- Yao, C., Mi, Y., Hu, X., Li, C., Sun, C., Tang, J., and Wu, X. (2008). Experiment and mechanism research of SKOV3 cancer cell apoptosis induced by nanosecond pulsed electric field. *Conf. Proc. Annu. Int. Conf. Ieee Eng. Med. Biol. Soc. Ieee Eng. Med. Biol. Soc. Conf. 2008*, 1044–1047.
- Yokokawa, M., Takeyasu, K., and Yoshimura, S. h. (2008). Mechanical properties of plasma membrane and nuclear envelope measured by scanning probe microscope. *J. Microsc.* *232*, 82–90.
- Žgalin, M.K., Hodžić, D., Reberšek, M., and Kandušer, M. (2012). Combination of microsecond and nanosecond pulsed electric field treatments for inactivation of *Escherichia coli* in water samples. *J. Membr. Biol.* *245*, 643–650.
- 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. *Arch. Biochem. Biophys.* *471*, 240–248.
- Zhang, Y., Hong, H., and Cai, W. (2011). Tumor-targeted drug delivery with aptamers. *Curr. Med. Chem.* *18*, 4185–4194.
- Ziegler, M.J., and Vernier, P.T. (2008). Interface water dynamics and porating electric fields for phospholipid bilayers. *J. Phys. Chem. B* *112*, 13588–13596.

Annexe

Atomic Force Microscopy and pharmacology; from microbiology to cancerology

Pillet F.^{a,c}, Chopinet L.^{b,c}, Formosa C.^{a,c}, Dague E.^{a,c}

a CNRS ; LAAS ; 7 avenue du colonel Roche, F-31077 Toulouse Cedex 4, France.

b CNRS ; IPBS - UMR 5089 ; BP64182, 205 route de Narbonne, F-31077 Toulouse Cedex 4, France.

c Université de Toulouse ; UPS, INSA, INP, ISAE ; UT1, UTM, LAAS, ITAV ; F-31077 Toulouse Cedex 4, France

Abstract:

Atomic Force Microscopy has been extensively used to study biological samples. Nowadays, researchers take advantage of its ability to image living samples in their native liquid environment, to increase our fundamental knowledge on living cell surface properties at the nano-scale level. In this chapter we will focus on the literature a wide collection of results and technical improvements in AFM to evaluate the nano-scale effects of drugs on pathogenic microorganisms and cancerous cells.

Morphological modifications induced by drug treatment can be probed using AFM in the imaging modes (contact, tapping or advanced modes). Furthermore, AFM is more than an imaging technology. It is a powerful force machine, able to measure forces as little as 10 to 20 pN. In the force spectroscopy mode it is possible to follow the nanomechanical properties of a cell and to probe the mechanical modifications induced by a drug. Once again bacteria and cancerous cells will illustrate our discussion. Finally, AFM can be used to map single molecule at the cell-liquid interface. We will show how tip functionalization can help in getting a better understanding of drug mechanism of action.

1. AFM for fungal cell wall analysis, from fundamental knowledge to pharmacology	5
1.1. Morphological and mechanical studies.	5
1.1.1 Imaging fungal cells.	5
1.1.2 Nanomechanical properties of yeast	7
1.2. Molecular mapping	8
1.2.1 Molecular mapping principle	9
1.2.2 Mapping and nanomechanical properties at the single molecule level	10
1.3 Yeast pathogenicity and pharmacologic studies by AFM	12
1.3.1 Understanding yeast interactive behavior	12
1.3.2 Pharmacology studies	14
2. Atomic force microscopy in bacteriology	15
2.1 Fundamental bacteriology	15
2.1.1 Imaging bacterial morphology	15
2.1.2 Nanomechanical properties of bacteria	18
2.1.3 Probing molecules at the interface of bacteria	20
2.2 Evaluating the effects of antibacterials molecules by AFM	22
2.2.1 Nanoscale effects of antibiotics on bacteria	22
2.2.2 Antimicrobial peptides	24
2.2.3 Innovative molecules and nanotechnologies	25
3. AFM for mammal cells pharmacology's studies	28
3.1 General applications	28
3.1.1 Cell response to external stress	28
3.1.2 Drug effects and diseases studies	30
3.2 A tool for cancer-study development	32
3.2.1 Nanomechanic of cancer cell	32
3.2.2 Treatment	35
3.2.3 Futures applications	37
Conclusion	39
References	40

Introduction

Historically, imaging at high resolution is based on the optical microscope. It suffers from the limitation of the photons wavelength, roughly 200 nm. To overcome this limitation the electron microscopes were developed by Ruska and Knoll. Here the resolution is limited by the electrons wavelength, which is much lower than for visible light (100 000 times shorter). Both technologies are based on lenses which focus a photons or electrons beam on a sample. Scanning probe microscopes, work on a completely different way. The principle relies on the measure of a parameter (e.g. the tunneling current (1) or the force (2)) between a sharp tip and a surface and to keep this parameter constant while scanning in order to get a 3 dimensional image of the sample. As stated by C. Gerber, one of the Atomic Force Microscope (AFM) pioneer, and P. Lang in a 2006 paper in Nature Nanotechnology (1): the scanning probe microscopes (SPM) have opened the door of the nanoworld. SPM made possible to explore and to manipulate it. Feynman had dreamed of “the room at the bottom” (3); SPM had opened the doors (for example, Michel B. *et al.*, wrote the acronym IBM with Xe atoms (4)). Particularly, AFM has contributed to major advances in very different fields from fundamental physic and chemistry to information technologies, molecular electronic and spintronic. For now 25 years (5) AFM has emerged as a first interest characterization technology in life science. The number of research articles, published each year, in which AFM is used has increased exponentially since 1981. Figure 1 presents this evolution. It must be noticed that the increase of studies on living cells is slow. This is probably due to difficulties inherent to biology and living cells.

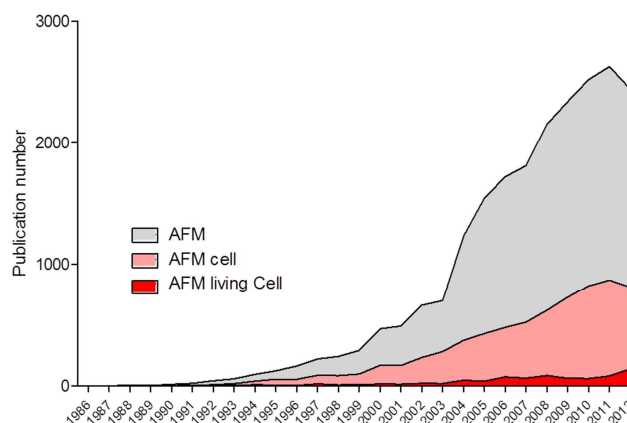


Figure 1: Evolution of the number of paper published each year, pubmed search using AFM or AFM AND Cell, or AFM AND Living AND Cell.

Physicists have developed AFM and applying it in biology is a real piece of hard interdisciplinary work. AFM makes it possible, indeed, to explore living cells in their physiological liquid environment, with a nanometric resolution. Nevertheless, the very first prerequisite is the sample (cell) immobilization. This point is an hindrance in the development of AFM in life sciences. The researchers have to deal with the paradox of a firm but not denaturing immobilization. A lot of work is achieved by drying the sample, but that unfortunately leads to dead cells. The immobilization of living cells is therefore a research area that should not be neglected.

AFM is not only an imaging technology. It is a highly sensitive force machine, able to measure forces as small as 10 to 20 pN. An AFM is therefore able to record force distance curves, which give interesting measures and properties of the living material. Nanomechanical properties and nano-adhesive properties of the samples can be measured using the AFM as a force machine. The results of such experiments create new paradigms in life science, and the interpretations in term of structure functions relationships are promising for pharmacologists. More and more articles are indeed dealing with the study of the effects of drugs on cells, as studied by AFM.

The aim of our review is to give an overview of AFM applications in biology (fungal cells, prokaryotic cells, mammal cells), with a special focus on the relevance in pharmacology. The first part is dedicated to fungal cells especially *Saccharomyces cerevisiae*, *Candida albicans* and *Aspergillus fumigatus*. The second part, deals with the bacteria. It gives an insight on the fundamental knowledge that AFM has provided on bacteria and then emphasize on studies dedicated to the study of antimicrobial (antibiotics, antimicrobial peptides, innovative molecules) effects. Finally, the third part addresses mammal cells, exposed to external stress, like drugs, but also diseases and cancer.

1. AFM for fungal cell wall analysis, from fundamental knowledge to pharmacology

Atomic Force Microscopy is a polyvalent tool that allows biological and mechanical studies of entire living microorganisms, and therefore the comprehension of molecular mechanisms. This first section introduces the AFM modes, with yeast cells as an eukaryotic model to illustrate its potentialities, and their implications in pharmacology. We will first explore morphological and mechanical studies on various yeast cells. Then, we will present molecular mapping principle on cell-wall surface and the applications of this technique for biology. Finally, we will investigate the yeast pathogenicity in cellular invasion and we will give an overview of AFM pharmacology's studies on yeast.

1.1 Morphological and mechanical studies.

Since its first development in 1986 by Binnig *et al.* (2), there has been an increasing number of AFM biological applications. An important part of publications correspond to studies of cellular inner components and their mechanism of action. For example, different studies were dedicated to the visualization of RNA polymers under crystalline or native form with AFM (6,7) or protein oligomerization (8), but also biomolecular interactions such as Protein-DNA (9–11). However, a major progress since 1995, made in AFM for biology offered the possibility to observe cells in liquid environment (12). This first part will describe the AFM potentialities for high resolution imaging and probing the global nanomechanical properties of living cells.

1.1.1 Imaging fungal cells.

As stated in the introduction, a main challenge is the gentle but firm immobilization of the biological sample required for any AFM experiment. Yeasts are round shaped cells of around 5 μm in diameter. The immobilization conditions have to maintain the yeasts in static position during AFM experiment. A solution described in the literature is to immobilize by drying the yeast (Fig. 2 A-B) (13,14). This process causes cell death and the morphological properties of dead cells are different from living yeasts. To keep cells alive, AFM in liquid condition is required. And to this end, a rigorous, but non-denaturant immobilization method has to be used. A first AFM study in liquid condition was described by Gad and Ikai in 1995 (12). The authors developed an immobilization method in agar surface to visualize living cells in native conditions; they observed bud scars for the first time by AFM. This example demonstrates the

possibility to image living yeast, and thus structures at their surface that are directly linked to yeast-growth.

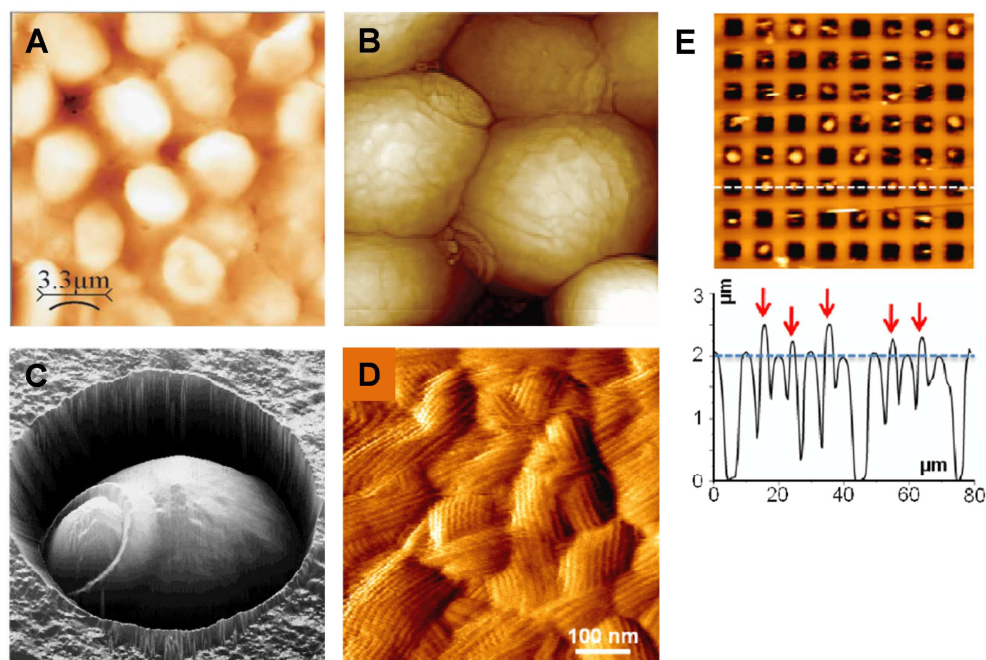


Figure 2: High resolution imaging for yeast morphology studies. (A) Deflection mode image of dried *Saccharomyces cerevisiae*. The scale bar is 3.3 μm. (B) Height image of desiccated *S. cerevisiae*. The scan size image is 10 μm x 10 μm and the height scale is 0-4 μm. (C) Three-dimensional AFM height image (6 μm x 6 μm; z-range 1 μm), in aqueous solution, showing a single *S. cerevisiae* cell protruding from a porous membrane. (D) High-resolution AFM deflection image of the *A. fumigatus* spore surface. The scale bar is 100 nm. (E) AFM height images with associated sections of single *S. cerevisiae* yeasts trapped within the patterns of a PDMS stamp functionalized by ConA. Reprinted with permission from references (13), (14), (15) and (17) respectively.

More recently, porous membranes have been used to immobilize cells in liquid condition (15). As shown in Figure 2 C, this method allows observation of bud scars on individual cells. In another study, the authors used this method to evaluate, at the nanoscale, the consequences of a defective cell wall in mutants yeasts, on the cell surface topography (16). Finally, immobilization in PDMS stamps was developed. This method allows the immobilization of cells-yeasts (Figure 2 E) but also spores of *Aspergillus fumigatus* (17). The main advantages of this method are i) the transparency of the PDMS stamp which is therefore compatible with an inverted optical microscope, ii) the directed assembly of the cells, which result in predicted patterns of cells (no time is wasted to search for a cell), iii) the high number of cells trapped in the PDMS holes. The results presented in Figure 2 D shows the ultrastructure of the surface of spores of *A. fumigatus*; similar results were obtained with spores trapped in porous membranes (18). Briefly, the spore is covered by a rodlet layer made of hydrophobins. These

proteins self-organize at the spore surface, each rod being separated from its neighbor by 10 nm. During the spore germination, this nanostructure is disrupted.

Once immobilized, AFM experiments on yeasts can be conducted in different modes. The contact mode is an imaging mode. It consists in bringing a tip into contact with the surface, and scanning horizontally this surface with a constant applied force. An example of yeast imaged in contact mode was described in 1996 by Pereira *et al.* (19). In this study, the authors observed different strains of *Saccharomyces cerevisiae*, the baker yeast, and showed that morphological aspects were different among strains. These observations revealed the high potential of contact mode to observe the morphological differences between yeasts strains. Another study performed in contact mode was dedicated to the visualization of different mutant yeasts defective in cell wall components; this study showed the involvement of cell wall architecture in the morphology of yeasts (16). Finally, Kriznik *et al.* in 2005 characterized the morphological properties of the pathogen *Candida albicans* in its filamentous form but they used the tapping mode (20).

In tapping mode, stiff cantilevers are oscillated near their resonance frequency during the scan. The changes in the amplitude of oscillation report on the surface topography. Consequently, the lateral forces between the tip and the sample are reduced, which limits damaging of the sample. (21). Several examples of tapping mode images of yeasts can be found in the literature, to demonstrate morphological changes in cell-wall of *S. cerevisiae* according to various stresses or to visualize rodlet structures on spores of *Aspergillus nidulans* (14,22,23).

1.1.2 Nanomechanical properties of yeast

In order to probe the nanomechanical properties of yeasts, such as spring constant, elasticity or turgor pressure, AFM is used in the force spectroscopy mode. In this mode the tip is continuously approached and retracted from the surface and force *versus* distance curves are recorded with spatial resolution. The approach curve, describes the sample resistance to the applied force (Fig. 3 A) (24) and can be analyzed through theoretical physical models, giving access to mechanical parameters (Fig. 3 B) (25). When the tip is retracted from the sample, adhesion forces between the sample and the tip can be recorded, resulting in the measure of adhesion interactions. This will be described in the molecular mapping part.

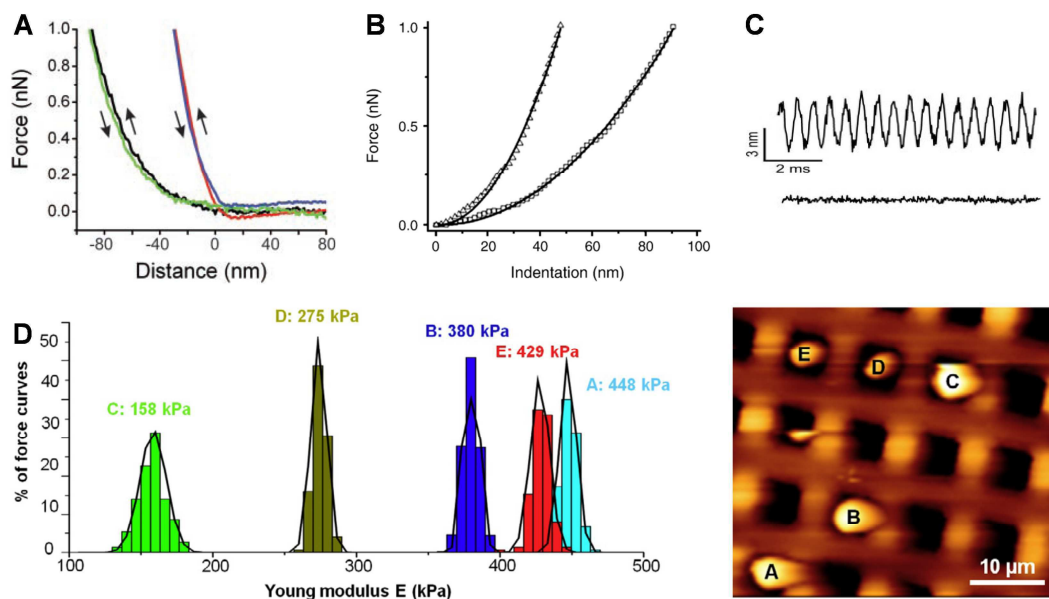


Figure 3. Nanomechanical properties of living *S. cerevisiae* yeasts. (A) Force-versus-displacement curves on the yeast cell body (black line, extension; and green line, retraction) and the bud scar (blue line, extension; and red line, retraction). Spring constants were calculated from the slope of the linear portion of the curves. (B) Force-indentation curves fitted by Hertzian model to extract a local Young modulus. The bud scar (triangles) has a modulus of 1.21 MPa, and the cell wall (circles) has a Young modulus of 0.54 MPa. (C) Representative time trace of the motion of the cell wall yeast at native condition (top) and after 1 hour of sodium azide treatment (bottom). (D) Young modulus determination on five *S. cerevisiae* yeasts. The Histogram shown the Young modulus of each yeast trapped within the patterns of a PDMS stamp (AFM height image). Reprinted with permission from references (24), (25) and (17) respectively.

To begin with, the spring constant of the sample can be deduced from an approach curve. To this end, the approach curve is fitted with the Hooke model (26). This spring constant describes the stiffness of the sample in N/m. Karreman *et al.*, have for example measured the spring constant of yeasts grown with 0.8 M manitol (27). This induces an 8 time increase of the spring constant. The same behavior has been reported for yeast mutated for the gene HSP12. The defective cells also presented a high spring constant, what has demonstrated the plasticizer role of the protein Hsp12.

However, the first nanometers of indentation, recorded on biological samples, are usually well fitted by the Hertz law (28) by analyzing the data with this law, one can extract the Young Modulus value of the sample, meaning its elasticity in Pascal. The elasticity can reflect a cell state due to growth, environmental conditions or specific phenotype. Among others, it has been used to estimate the implication of certain genes in the yeast cell wall elasticity with different defective mutants (16,27), and to evaluate the influence of some molecules such as polyelectrolyte (29) or lithium (30) on the cell wall stiffness. However, it is to be notice that living organism creates heterogeneous results. Indeed, differences can be observed on yeasts

of the same strain in the same conditions (Fig. 3D) (17). The important variations in YM reported on these five yeasts demonstrate a significant heterogeneity of cells coming from the same culture. Furthermore, YM values on the same cell are also heterogeneous, for example, the stiffness on a bud scar of *S. cerevisiae* is superior to the stiffness on another part of the cell wall, presumably due to accumulation of chitin on the bud scar (31). Similarly, Touhami *et al.* showed an increase of the stiffness in the regions of the yeast cell wall involved in the budding process (15). Thus, one must be aware that repeatability is the key point to obtain values representing the whole sample elasticity. However, the resolution given by AFM can allow measuring specific regions of interest and thus give access to mechanical description of the surface of the cell.

Moreover, other mechanical properties than cell wall changes along growth-process can be described. An original work by Pelling *et al.* showed the change in nanomechanical parameter of the cell-wall during motion of *S. cerevisiae* (Fig. 3 C) (24). For this, the tip was put into contact with the cell wall and the cantilever oscillations were measured, translating cell-wall changes during motion. The authors were able to prove that a shift of temperature from 30°C to 26°C decreased the frequency of oscillation motion of cell-wall with similar amplitude. Furthermore, exposure of the cells to a metabolic inhibitor (sodium azide) caused the periodic motion to cease. Altogether, nanomechanical measurements give new insights in the yeast cell wall organization and function.

1.2 Molecular mapping

Specific molecular interactions are the base of many biochemical processes. Recognition mechanisms involve several types of non-covalent bonds such as hydrogen bonds, Van der Waals forces, attractive/repulsive electrostatic and hydrophobic forces. The highly specific interactions between a ligand and its receptor for example, can be recorded by force spectroscopy during the retraction of the tip from the sample. To avoid the detection of non-specific events, the AFM tip can be functionalized with one of the actors of the interaction. These experiments, with functionalized AFM tips, are called Single Molecule Force Spectroscopy experiments, since they allow to measure specific interaction forces between only one molecule on the tip and one molecule at the surface of the sample. In this part, we will first describe the molecular mapping principle. Then, different applications of molecular mapping on the yeast cell surface will be discussed.

1.2.1 Molecular mapping principle

As mentioned earlier, the tip functionalization is a prerequisite to measure specific interactions. Reviews of the functionalization strategies can be found here (32–34). A schematic representation of a tip functionalized with concanavalin A (protein that interacts with carbohydrates) is illustrated in Figure 4 A (35). Adhesion forces were calculated from AFM retract force curves; an example of a retract force curve recorded during a single molecule force spectroscopy experiment is shown in Figure 4 B. The adhesion force was determined by measuring the piezo-retraction required to break the interaction between the lectin concanavalin A and the recognized carbohydrate. This process can be repeated several times, which enable, by moving the cantilever between each measurement, to obtain a map of the interactions. This indicates where the interaction is occurring, and thus how the probed molecule is distributed on the cell surface. In Figure 4 C, an adhesion map recorded with an AFM tip functionalized by concanavalin A, was obtained on a small region of a native yeast cell as indicated on the height image. Each pixel on the adhesion map represents a different force curve; the adhesion map gives therefore a global repartition of carbohydrates on the yeast-cell surface. The authors could conclude from these experiments that mannans were not uniformly distributed on the studied areas of the yeast cell wall (35).

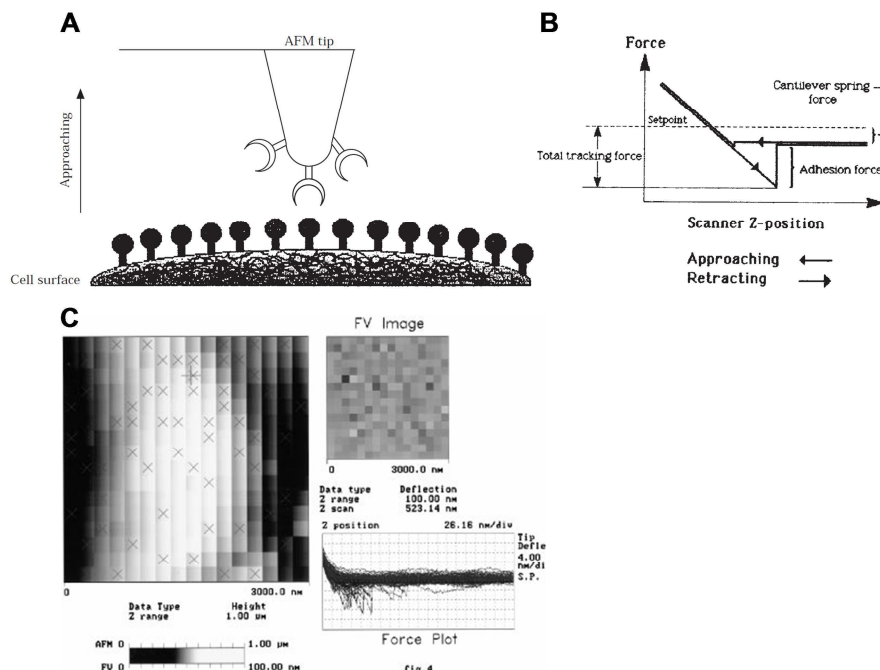


Figure 4: Molecular mapping principle. (A) Model of experimental set-up configuration of molecular mapping by AFM. (B) Theoretical AFM force curve with adhesion force measurement during piezo retraction. (C) Typical force volume data frame showing different types of data that can be collected at the same time with this mode. Upper left is a height image, upper right is a force volume image, and lower right is a force curve display window. Reprinted with permission from Gad *et al.*, 1997 (35).

1.2.2 Mapping and nanomechanical properties at the single molecule level

A recent example of molecular mapping study is the localization of Als3p on the yeast cell wall. Als3p is a protein (adhesion) involved in adhesion during host invasion. It was observed during the morphogenesis of *Candida Albicans* from yeast to hyphae. (36). This was performed with a tip functionalized by an antibody anti-Als3 (Fig. 5 A). In yeast form, adhesion maps show low rates of Als3 (Fig. 5 B). However, during the hyphae transition, the Als3 rate was increased on the germinating yeast (Fig. 5 C), and more specifically on the germ tube (Fig.5 D). These changes were accompanied by a major increase of the hydrophobicity of the cell surface and confirmed the relationship between high adhesions in hyphae form and the pathogenicity of this form. In another study, the clustering of Wsc1, a transmembrane protein involved in stress response via the cell wall integrity pathway (37), was investigated on *S. cerevisiae* (38). Molecular mapping was indirectly performed between Wsc1 modified by an His-Tag, expressed by the yeast, and a tip functionalized by Ni²⁺-nitriloacetate (NTA) groups. The authors proved that the clustering of Wsc1 was induced by stressing conditions, which suggested that this process was intimately connected to Cell Wall Integrity signaling pathway. This work confirmed that AFM was then a useful tool to understand molecular phenomena happening at the cell surface of yeast. Using the same methodology, another work demonstrated that cell wall thickness could be determined. To this end, different yeast mutants were generated, presenting increasing length of the Serine Threonine Rich (STR) region of the Wsc1 protein. This protein is anchored in the plasmic membrane and is not detectable at the cell wall surface if the STR region is too short. The cell wall thickness is thus deduced from the STR region length leading to the detection of Wsc1 at the cell wall surface (39). AFM force spectroscopy measurements can also cause molecular reorganization at the surface of yeasts. For example, Alsteens *et al.* (40) demonstrated that the formation and propagation of the adhesin Als5 nanodomains in *C. albicans* was the consequence of localized delivery of piconewton force by the AFM tip functionalized with antibodies recognizing Als5. The same process was observed on dead cells, confirming that the process was not metabolic and indeed triggered by the AFM tip. The authors suggested that the functionalized tip could stretch, unfold Als5 and promote the aggregation and self-association of Als5. This process could be involved in cellular adhesion, in response to mechanical stimuli. In another study, with a tip functionalized with concanavalin A, difference in mannoproteins elongation was investigated between the cell wall surface of *S. cerevisiae* and *S. carlsbergensis* (31). These experiments showed that only mannans chains

were stretched from the surface of *S. carlsbergensis* whereas the entire mannoproteins were stretched from *S. cerevisiae*.

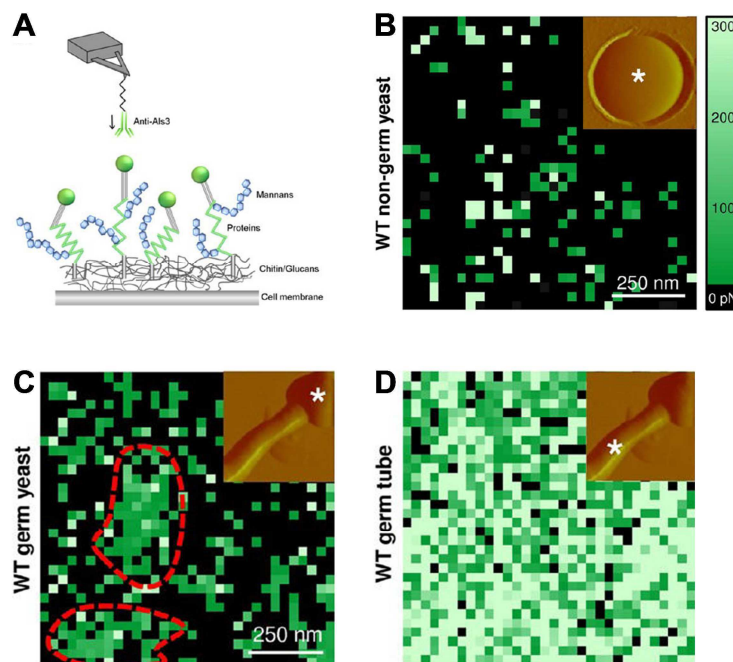


Figure 5: Single molecular mapping according to *Candida albicans* morphology. (A) Schematic representation of interactions between Als adhesins (green) and anti-Als3 antibody immobilized on AFM tip. (B) Typical adhesion force map (1 μm x 1 μm , color scale: 300 pN) to probe Als3 proteins on yeast-form cell. Adhesion force maps for Als3 mapping on germinating yeast (C) and a germ tube (D). Reprinted with permission from Beaussart *et al.*, 2012 (36).

1.3 Yeast pathogenicity and pharmacologic studies by AFM

The number of fungal and yeast species in the earth is around 611 000 (41). Among them, only 600 species are human pathogens (42), like *Aspergillus fumigatus*, *Cryptococcus neoformans*, *Histoplasma capsulatum* or *Candida albicans*. The last is one of the most common cause of hospital-acquired systemic infections, due to its adhesive and invasive properties, and its capability to form biofilms (43). In order to fight against this pathogen, AFM has been used to study its virulence mechanisms, and to understand the effects induced by antifungal treatments on its cell wall (44,45). This part will first focus on host-pathogen interactions involving *C. albicans*, studied by AFM. We will then describe the most recent studies on the effects of antifungal drugs on the cell wall of yeast.

1.3.1 Understanding yeast interactive behavior

For pathogens, adhesive properties are fundamental for host-invasion or biofilm formation. A first study by Göttinger *et al.* quantified the yeast *S. cerevisiae* adhesion to surface of silica

particles by AFM (46). The yeasts were immobilized on an AFM tip functionalized with concanavalin A, that interacts with the carbohydrates present at the surface of yeasts. Authors proved that adhesion of yeast to silica particles was very variable according to the pH solution and the roughness of silica particles.

More recently, interactions between *S. aureus* and *C. albicans* were investigated by AFM (47). These pathogens are classically found in combination during human tissue infection. To understand their relationship during infection, the authors quantified the interactions between *S. aureus* immobilized on an AFM tip, and different regions of *C. albicans*, in yeast and hyphae form including three parts, the head, the middle and the tip (Figure 6 A). Adhesion forces were quantified during piezo retraction at the initial contact (0 s) or after 60 s of bond-maturation. The results in Figure 6 B demonstrate that *S. aureus* interacted preferentially on the hyphae form (tip and middle) and hardly on the head part or on the yeast form. Furthermore, the authors made the hypothesis that the 60 s of contact were required for adhesion because an active reorganization of the hyphae cell wall was used by the yeast to promote the adhesion of *S. aureus*. These observations confirmed that during infection *S. aureus* was interacting only with the hyphae form of *C. albicans*.

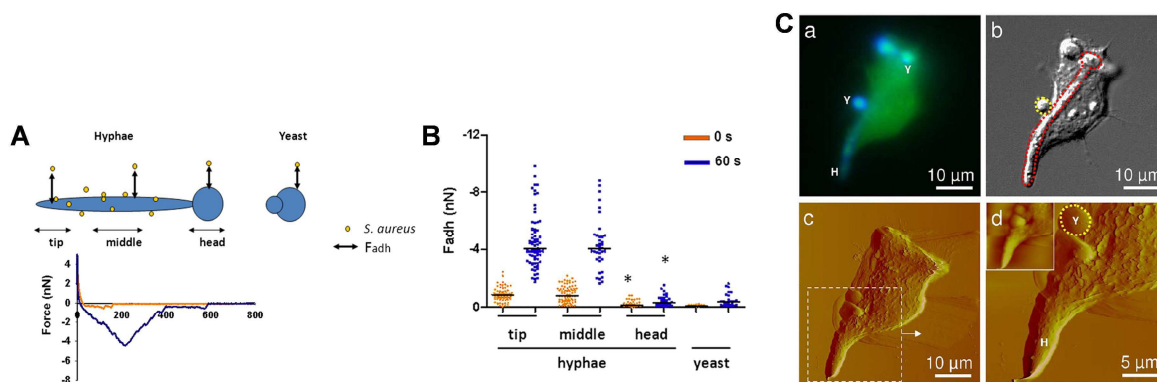


Figure 6: Yeast-cells interactions. (A) At the top, schematic representation of the different hyphal regions defined for adhesion between *Staphylococcus aureus* and *Candida albicans* hyphae. At the bottom, example of force distance curves between *S. aureus* upon initial contact (orange curve) and after 60 s bond-maturation (blue curve) with *C. albicans* hyphal tip region. (B) Vertical scatter bars adhesion forces between *S. aureus* and different *C. albicans* morphologies. (C) Imaging of a single macrophage infected by *C. albicans* visualized by fluorescence (a), DIC (b) and AFM deflection images (c,d). Labels Y and H correspond to yeast and hyphal cells. The red and yellow dashed lines in (b) indicate an internalized hyphal cell and a free yeast cell, respectively. Reprinted with permission from references (47) and (48) respectively.

A direct AFM observation of the interaction between *C. albicans* and macrophages was presented by El Kirat *et al.* (48). This study showed by differential interference contrast

(DIC), fluorescence and AFM, the main steps of macrophage infection by *C. albicans*, including initial intercellular contact, internalization of yeast cells, intracellular hyphal growth and pathogen externalization from the macrophage. An example is given in Figure 6 C, where we can see yeast internalization into the macrophage. The ability to directly visualize these biological processes demonstrates how AFM can be used to understand infection mechanisms and help in anti-fungal investigating.

1.3.2 Pharmacology studies

AFM is also a promising tool to characterize the antifungal molecules effects on the morphology and the nanomechanical properties of the yeast cell wall. However, AFM pharmacology studies concerning yeast are very limited and only few studies were performed so far. For example, the ultrastructure alteration of the cell wall of *S. cerevisiae* by the tetrapispora phaffii killer toxin (Kpkt) was characterized by AFM (49). The authors demonstrated that Kpkt caused an alteration of the cell wall with a specific β -glucanase activity. In another study, AFM was used to evaluate the cell wall roughness of *C. albicans* after lemon grass oil (LGO) treatment in vapor phase (50). The authors observed a decrease in the roughness of the cell wall. AFM was also used in another study to describe the biophysical properties associated with cell death due to flucytosine (an analog of fluorinated pyrimidine, which mainly acts on RNA and DNA) and amphotericin B (acts on cell walls by an unknown mechanism). After drug treatment, the cell wall of *C. albicans* was perforated, deformed, and shrunken (44). However, in contrary with LGO, the roughness of the cell wall was increased. In addition, a combination between drug treatment, such as allicin (organic compound harmful in yeast cell growth) and amphotericin B decreased the yeast viability and induced significant cell wall damages (burst or collapsed membranes) as shown in Figure 7 (45).

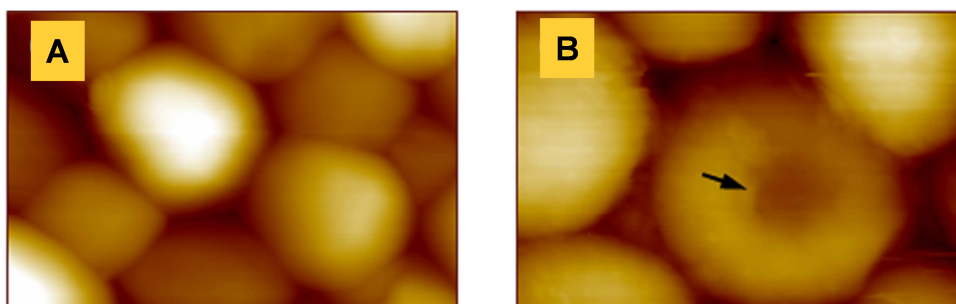


Figure 7: Anti-Fungal effect of allicin. AFM images of dried *C. albicans* untreated (A) or treated (B) 24 hours with allicin and amphotericin B. The arrow indicates a significant morphological change. Reprinted with permission from Kim *et al* (45).

These examples of antifungal drug induced cellular damages and death of pathogenic yeasts. Furthermore, they confirmed the potentiality of AFM for pharmacological studies. In addition, the AFM development during the last decades with others biological systems, such as bacterial and mammals cells, opens the way in pharmacology for microbiology and cancerology.

2. ATOMIC FORCE MICROSCOPY IN BACTERIOLOGY

Atomic Force Microscopy has proven itself to be a powerful tool for the study of microbial systems. In this section, we will explore the applications of AFM to the bacterial field. In one hand, we will give an update of the studies dedicated to the morphology and behavior of bacteria alone, or interacting with their environment. Then, in another hand, we will focus on pharmacological studies that have been performed on bacteria, with antibiotics and antimicrobial peptides, as well as with innovative molecules.

2.1 Fundamental bacteriology

Bacteria are ubiquitous on earth, and have negative side effects in many fields such as food industry or human health. They can also be used to our benefit such as in waste water treatment plans or pharmacy (production of recombinant drugs). Bacteria interact with their environment through their surface and a lot of researches are therefore focused on the microorganism's surface. In this context, Atomic Force Microscopy has become more important, and an increasing number of researchers have exploited both imaging and force measurements capabilities to explore bacterial surface in terms of structure and function.

2.1.1 Imaging bacterial morphology

One of the most common applications of AFM in microbiology is to visualize the morphology of microorganisms. AFM provides the opportunity to image single bacterial cells; it can also be used to image several cells, as it is the case in biofilms for example, where aggregates of microorganisms adhere to each other on a surface (51). Many bacteria are characterized by their shapes (coccus, bacilli or spores) and by their nanoscale ultrastructures, for example S-layers, capsular polysaccharides, flagella or fimbria. Fimbriae, also known as pili, are thin, hairlike appendages on the surface of gram-negative and gram-positive bacteria, that perform a variety of different functions such as genetic transfer via conjugation, movement across surfaces, and adherence to a variety of surfaces (52). Scanning Electron Microscopy (SEM) has long been the only tool available for the direct observation of bacterial pili; however, this technique does not allow any quantitative analysis. With the recent progress made in biological application, it is then naturally that researchers interested in bacterial pili turned to

AFM, such as for example Schäffer's team that investigated the geometric and elastic properties of the pili of different *Corynebacterium diphtheriae* strains, the etiological agent of diphtheria (53). Their measurements showed that among mean-visible contour-length of the pili, there were significant strain-specific differences that could not be correlated to the efficiency of adhesion to substrates. In another study by Touhami *et al.*, (52), the morphology of *Pseudomonas aeruginosa* pili were investigated using AFM, and the authors also studied the ability of pili to adhere to mica surfaces, highlighting the role of pili in bacterial adhesion. Finally in another study by Dufrêne's team successfully visualized self-assembled nanostructures that are formed by the pili of *Lactobacillus rhamnosus* GG (54).

Flagella differ from pili in their proteic composition. The bacterium flagella is a sophisticated molecular nanomachine composed of three substructures that provide motility, anchor the structure into the cell membrane, and a last one that acts as the rotary motor (55). Flagella contribute to the virulence of pathogenic bacteria, and AFM imaging is a powerful tool to analyze the morphology of the flagellum. Different studies report on the morphology at high resolution of flagella; Gillis *et al.* have studied the expression of flagella in relation to its function, and showed that for different strains of *Bacillus thuringiensis* exhibiting different levels of flagellation, the amount of flagella observed at the nanoscale could be correlated with the motility behavior of the strains (56). In another study conducted by Diaz *et al.*, the authors used AFM imaging to determine if the growth of flagella was oriented during the early stages of biofilms formation. The authors showed that it is indeed the case; the flagella are first oriented towards the neighboring cells, making contact and finally surrounding them. Chang *et al.* were more interested in the morphological modifications induced by pH on the flagella of *Escherichia coli*; they showed that both acidification and alkalization of the culture media was affecting the morphology of the flagella, by reducing their diameters (57).

Another nanoscopic ultrastructure that characterizes bacteria is the capsule, made of polysaccharides. Capsular polysaccharide has important functions for bacteria as for example nutrient uptake, protection against environmental stresses, adhesion to different surfaces, or survival against phagocytosis or antibiotics. This structure is therefore a virulence factor of the bacteria able to produce it, and AFM imaging has enable to study the morphology of this capsule and understand its surface characteristics. Among the studies dedicated to the capsule of bacteria (58,59), is the work conducted by Suo *et al.* in 2007 (60). The authors show that HEPES, a buffer commonly used in biological experiments and presumed to have no effects on specimens, stabilizes the capsule formation of *Escherichia coli* and *Salmonella*

typhimurium (60). An example on *S. typhimurium* is given in Figure 8 A; we can see on this amplitude image an aggregate of cells covered by capsular polysaccharide, after the cells were rinsed in HEPES buffer. Coldren *et al.* in 2009 worked on *Staphylococcus aureus* capsule and could understand, using AFM, how the capsular polysaccharide is important for bacterial adhesion to surfaces, and therefore for biofilm formation (61).

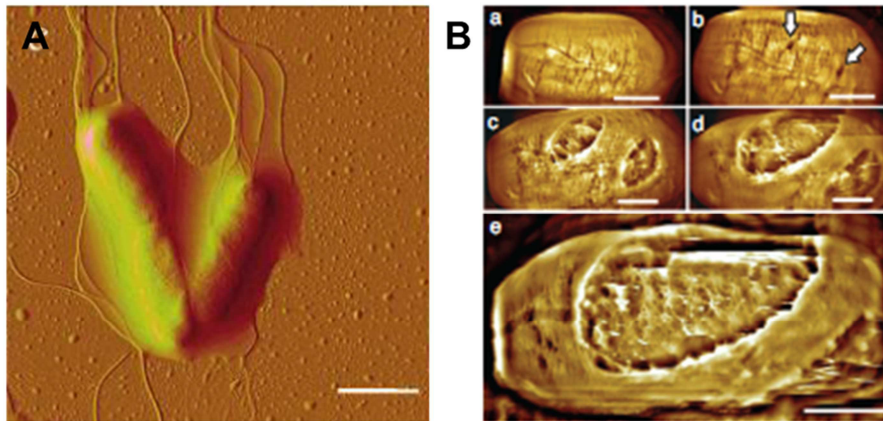


Figure 8: High resolution imaging bacteria. (A) AFM amplitude image of aggregate of three *Salmonella typhimurium* cells covered by an EPS capsule. Note that part of the EPS is confined by the flagella. Scale bar = 2 μm . (B) Series of AFM height images showing the emergence of vegetative cells of *Bacillus atropheus*. The images show 60- to 70-nm-deep apertures in the rodlet layer (indicated with arrows in b), and subsequent eroded the entire spore coat (e). Images in a-e were recorded on the same spore; elapsed germination time (in hr:min) was as follows: (a) 3:40, (b) 5:45, (c) 7:05, (d) 7:30 and (e) 7:45. Scale bar = 500 nm. Reprinted with permission from references (60) and (68) respectively.

Bacteria that do not display capsular polysaccharide can however display bacterial surface layers (S-layers). S-layers are 2D-crystalline arrays of glycoproteins; they represent the most common cell surface structures in bacteria (62). As for capsular polysaccharide, S-layers are the frontier between the cell and the environment; they therefore play several roles such as protecting the cells from environmental stresses, or for nutrient uptake. Because of the particular self-assembly of S-layers proteins, it has been a good model for AFM imaging at high-resolution. S-layers proteins can either be recrystallized on surfaces such as silicon (63) or gold surface (64), or directly studied *in vivo* as Dupres *et al.* did (62). In this study the authors imaged nanoarrays of S-layers on live *Corynebacterium glutamicum* and observed hexagonal unit cells with dimensions similar to those reported on isolated S-layers sheets. Their work also led to the discovering of a new inner layer composed of periodic nanogrooves, which could probably reflect the specificity of the *C. glutamicum* cell wall.

Bacteria can grow in bulk or form biofilms; some bacteria can also form endospores. Endospores are the disseminating agent of bacteria; their formation is triggered by conditions of limited nutrient availability and environmental stress. They are highly resistant to extreme temperatures or chemicals. The transformation of a dormant spore into a vegetative cell is an important step in the pathogenicity of the bacteria, and can be imaged using AFM imaging. A few AFM studies were dedicated to the germination of spores of *Bacillus anthracis* (65), or *Bacillus atrophaeus* (66,67). One is a technical jewel since it shows the complete high-resolution imaging structural dynamics of single spores of *Bacillus atrophaeus* (68). In this study, the authors imaged the emergence of vegetative cells (Figure 8 B) through rodlets apertures at the surface of the spore. These images are not only impressive for the phenomena they show, they also give new insights into the structure of native peptidoglycan; the fibrous network observed on figure 8 B-c on the germ cell surface seems to represent nascent peptidoglycan architecture of newly formed cell wall. The authors then found a good experimental model for investigating the genesis of the bacterial peptidoglycan structure.

2.1.2 Nanomechanical properties of bacteria

The mechanical properties of bacterial cells, such as elastic moduli, spring constant or turgor pressure, can be investigated by AFM, via nanoindentations measurements. We will focus in this paragraph on elastic properties of bacterial cells that are expressed by Young's modulus. Understanding the elasticity of cells is important for elucidating the mechanisms underlying cells growth and behavior in different conditions. It is also known that, in many living organisms, the mechanical properties of the external membrane can indicate the state of the underlying system. In this frame, many studies using nanoindentations were used to study the bacterial cell wall. For example, Francius *et al.* found that the elastic properties of bacterial cells of *E. coli* were dependent on the expression of surface appendages such as fimbriae, and also on the ionic strength of the medium they are grown in (69). Schaer-Zamaretti *et al.*, however, could distinguish between different strains of *Lactobacillus* expressing or not S-layers by probing the elastic properties of such cells (70). Gaboriaud *et al.* used nanoindentations measurements to understand the influence of a different pH on the nanomechanical properties of bacterial cells (71). But a major concern in bacteriology is to determine whether a bacterium is dead or alive. That is the question that Cerf *et al.* answered with the nanoindentations measurements; as it is shown in Figure 9 A, live cells of *E. coli* show a Young modulus of 3.0 MPa, whereas heated (dead) cells have a Young modulus increased to 6.1 MPa (72). The authors then demonstrated that dead cells with a damaged

membrane exhibit higher Young modulus values. A recent novel development in analysis of force curves generated in nanoindentations measurements allow now to extract the elastic modulus at the cell surface, but also in depths under the cell surface (73). Longo *et al.* used this new analysis development to probe the nanomechanical properties of *E. coli* cells (74). As we can see on Figure 9 B, the authors found stiffer areas at the surface of the cells, and when they go deeper into the cells, they find these stiffer areas to have a complex form, that changes during time (Figure 9 B). This could be correlated to an accumulation of complex molecules underneath the cell membrane and reorganizing in the cell cytoplasm over time.

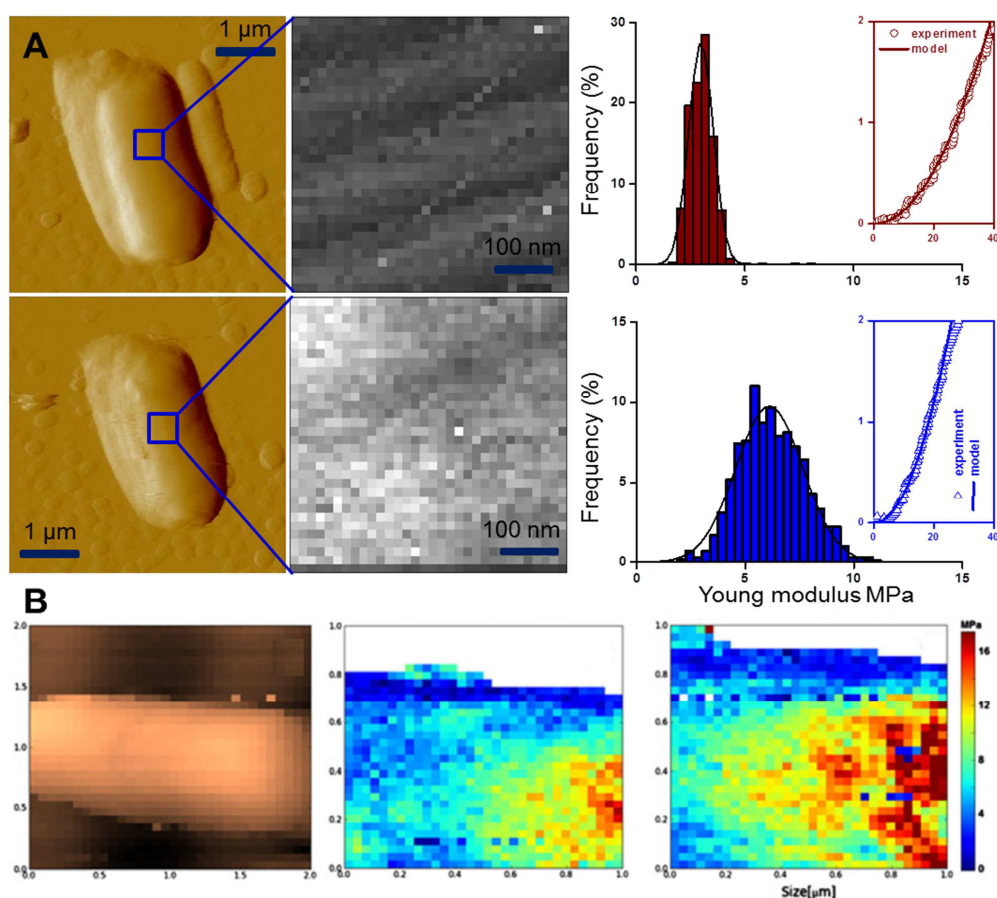


Figure 9: Nanomechanical properties of bacterial cells. (A) Nanomechanical properties of alive or dead *Escherichia coli* cells. AFM deflection images of single living *E. coli* bacterium and of the same single bacteria killed by thermal treatment (20 min, 45°C). The elasticity maps (z-range = 10MPa) correspond to the images insets. The elasticity distribution is represented by the histograms, together with a typical force curve. (B) Nanomechanical properties of living *E. coli* cells. Topography image and corresponding stiffness images of an *E. coli* cell. The images were collected over a 4-hour period without any morphological modification on the bacteria. The stiffness images show the evolution of the feature over time. Reprinted with permission from references (72) and (74) respectively.

2.1.3 Probing molecules at the interface of bacteria

Besides imaging and probing nanomechanical properties of bacteria, it is also possible with AFM to study molecules at the surface of bacteria with bare or functionalized AFM tip. Understanding how complex molecules are assembled at the surface of bacteria under physiological conditions is of fundamental importance to elucidate their functions in different processes such as cell aggregation, adhesion to substrate, or interactions with external molecules or organisms. A first example is the interactions between bacteriophages and bacteria. Dubrovin *et al.* proposed two articles where the authors investigate the interactions between bacterial cells and bacteriophages (75,76). While the first study focuses on the characterization of phages, and the effects of phages interactions with different strains of bacteria, the second study is dedicated to the investigation of the lytic cycle of the *Acinetobacter baumannii* bacteriophage AP22.

The results presented in Figure 10 A present AFM images of *A. baumannii* cells infected by AP22 bacteriophage over time. After 1 minute of interaction between bacteria and phages (Fig. 10 Aa), the phages have adsorbed on the surface of the cells; the high resolution image (Fig. 10 Ab) clearly shows phage heads. However, after 3 minutes of incubation (Fig. 10 Ac and d) the phages heads are empty, leading to the supposition that DNA release from the head takes place quite fast, and probably immediately upon phages adsorption on the cell's surface. And this phenomenon is even more visible after 6 minutes of incubation (Fig. 10 Ae and f). Also others studies dedicated to bacteria/external molecule interactions were performed (77), and among them is one focusing on the interactions of different strains of *Lactococcus lactis* with mucins (78,79). In this study, the authors, using cell probes, were able to measure the kinetic association/dissociation constants between the bacteria and the mucins.

The interactions with other microorganisms are mediated via surface molecules of bacteria. One of these molecules at the surface of gram-positive bacteria is peptidoglycan, a complex polymer made up of glycan strands of repeating disaccharides residues, cross-linked via peptide side chains. This molecule is a vital molecule for bacteria, as it is responsible for shape determination and cellular viability, and since it is a target for a lot of antibacterial treatments, it has been extensively studied. However few AFM studies report on the structure of peptidoglycan (80–82), and among them is the one of Hayhurst *et al.*, (83), in which the authors propose an architectural model for the peptidoglycan of *Bacillus subtilis*. As it is

shown in Figure 10 B, the authors claim that glycan strands form a “rope” that is coiled into a helix; this rope runs then all over the bacteria.

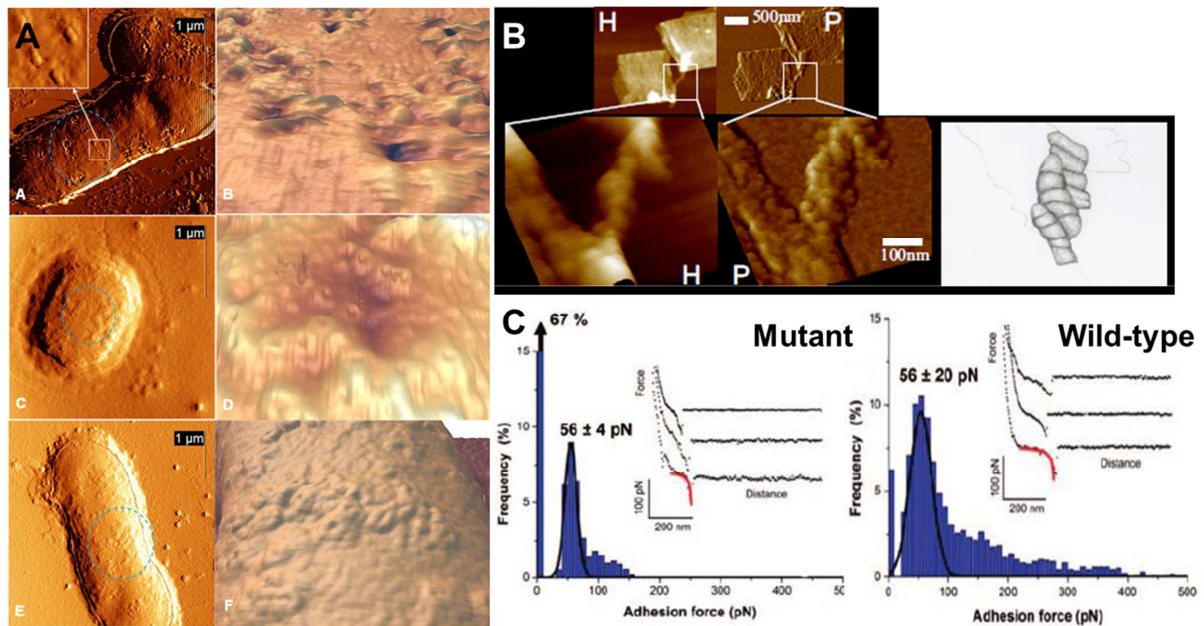


Figure 10: Mapping and interactions with molecules at the interface. (A) Bacteriophage interactions with *Acinetobacter baumannii*. AFM images of *A. baumannii* cells infected for 1-6 minutes by the bacteriophage AP22. Left row: deflection AFM images of *A. baumannii* cells incubated with bacteriophages AP22 for 1 (a), 3(c), 6 (e) minutes. Right row: zoomed-in three dimensional reconstructions of bacterial surfaces depicted on the left (the zoomed regions are indicated by dotted circles in the height images). The inset in (a) demonstrates zoomed-in region, shown by the white square. (B) *Bacillus subtilis* sacculi architectural features revealed by AFM. The images show two cylinder fragments, from a purified sacculi from gently broken cells, joined by a twisted cable. H stands for Height image and P for Phase image. (C) Detecting individual mannose-rich polysaccharides on LGG bacteria. Adhesion force histograms are shown, (n = 1024) together with representative force curves recorded in buffered solution with a Con A tip on LGG wild-type and on the mutant CMPG5413 (impaired in adherence to gut epithelium, biofilm formation, and exopolysaccharide production). Reprinted with permission from references (76), (83) and (84) respectively.

For gram-negative bacteria, the molecules that can be found on their surface are polysaccharides and lipopolysaccharides (LPS). Francius *et al.* in 2008 studied the localization and conformation of single polysaccharides at the surface of live *Lactobacillus rhamnosus* GG using functionalized AFM tips (84). Using concanavaline A, a lectin that interacts with carbohydrates, he could pull off the surface individual mannose. As we can see on Figure 10C, on a mutant strain impaired in adherence to epithelium, there is a dramatic decrease in adhesion frequency compared to the native strain. Therefore, this technique of Single-Molecule Force Spectroscopy can be used to understand which molecules interacts with, in this case, the gut epithelium. Another study by Strauss *et al.*, studied the role of LPS

O-antigen on the adhesion of *E. coli* cells, using also AFM, with bare AFM tips (85), but there were also works performed on the coat proteins of spores of *Bacillus* (86,87), and on the adhesins at the surface of living mycobacteria (88).

2.2 Evaluating the effects of antibacterials molecules by AFM

Understanding the nanoscale behavior of bacteria under physiological conditions, or their interactions with other organisms in their native state is a first point; we need to know the “enemy” to efficiently fight against them. However, the common way to fight against bacteria is to use antibacterials. Among them, there are the antibiotics, used at home or in hospitals to treat infectious diseases, but there are also other kind of antibacterials, less used or under development, such as antibacterial peptides, and innovative molecules, that should be known about. This section will focus on how AFM techniques (imaging, force spectroscopy, single molecule force spectroscopy) can help understanding the nanoscale effects of antibiotics, or understanding the mechanism of action of new molecules not yet fully characterized.

2.2.1 Nanoscale effects of antibiotics on bacteria

Antibiotics have in most cases a well described mechanism of action on bacteria (89). However, the effects on bacterial surface at the nanoscale are poorly understood, and for this purpose, the AFM technique is particularly well suited, since it allows imaging and probing nanomechanical properties on single living cells. Among antibiotics investigated by AFM, examples are β -lactams (90,91), aminoglycosides and their derivate molecules (92) and fluoroquinolones (93). The results presented in Figure 11 A shows morphology modification of *Pseudomonas aeruginosa* treated by ticarcillin (β -lactams) and tobramycin (aminoglycoside) (90). As we can see, ticarcillin causes an elongation of the cells, whereas tobramycin alters the surface of the cell. But antibiotics cause also modifications of the cell wall nanomechanical properties, such as elasticity and spring constant. Francius *et al.* probed on living *Staphylococcus aureus* cells the effects of lysostaphin, an enzyme that cleaves the peptidoglycan, over time (94). The authors found that the lysostaphin treatment caused a decrease in the elasticity of the cell wall with the time of treatment, as we can read on the forces curves, along with a decrease of the spring constant of the cells (Fig. 11 B). These modifications could only be probed with force spectroscopy, and give precious information on the nanomechanical properties modification that antibiotics cause on bacterial cells.

Other authors were interested in vancomycin, a glycopeptide antibiotic, used in last chance in hospitals. This molecule binds with high affinity and specificity to the terminal D-Ala-D-Ala

peptidoglycan precursors, leading eventually to cell lysis. In the study of Gilbert *et al.*, AFM tips were functionalized with vancomycin, and used to perform single molecule force spectroscopy experiments on *Lactococcus lactis* during the course of division (95). The results obtained (Fig. 11 C) show that the D-Ala-D-Ala residues are located on the division septum of the cell, which suggest that the newly formed peptidoglycan is inserted in this region during the division process. This study demonstrates that AFM with antibiotic-modified AFM tip is a valuable tool to explore the dynamics of antibiotic-ligand interactions; it also gave new insights on the assembly process of peptidoglycan in gram-positive bacteria. Antimycobacterials have also been a subject of interest, and AFM investigations have been performed on *Mycobacterium JLS* (96) and *Mycobacterium bovis* BCG (97).

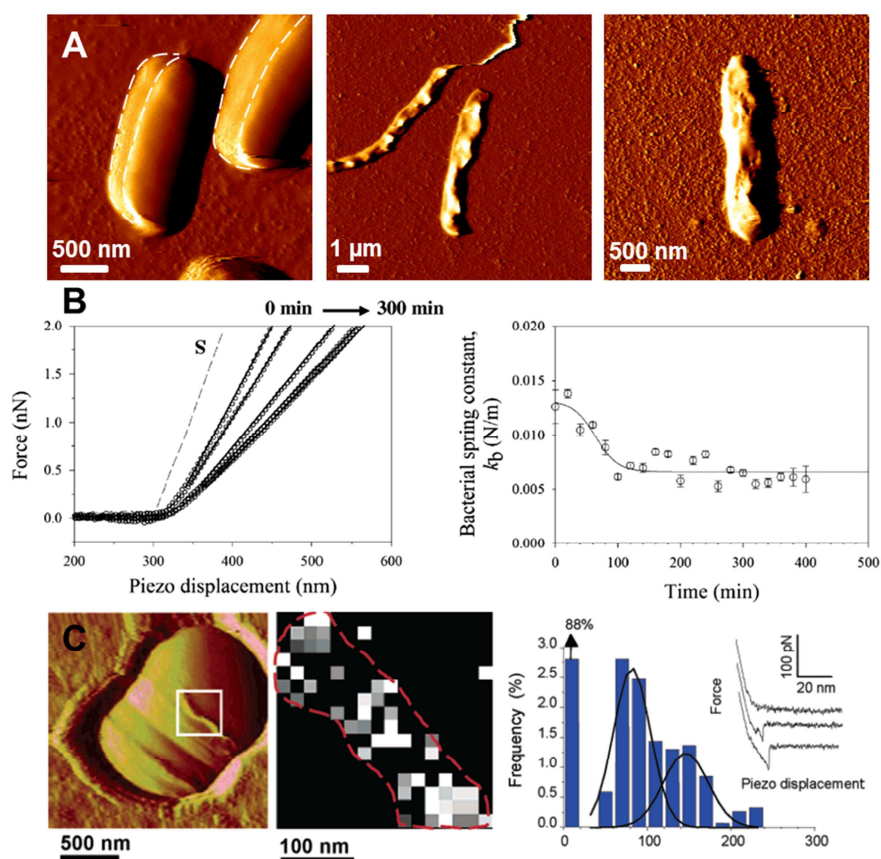


Figure 11: Effects of antibiotics on bacteria. (A) Effects of ticarcillin and tobramycin on *Pseudomonas aeruginosa*. Vertical deflection images of native live cells of *Pseudomonas aeruginosa* (left image) treated by ticarcillin (middle image) and tobramycin (right image). (B) Effects of lysostaphin on the nanomechanical properties of *Staphylococcus aureus* cells. Left graph shows representative force-versus-displacement curves recorded on the polymer support (dashed line, S) and on a single cell prior to (0 min) and after (20, 60, 100, and 300 min) incubation with lysostaphin at 16 g/ml. Open symbols are the raw data, while the solid lines show the theoretical fit (Hooke's law) used to extract the bacterial spring constant. Right graph shows the evolution of the bacterial spring constant as a function of incubation time. Each data point represents the mean and standard deviation of 1024 measurements obtained at different locations in the same cell. (C) Imaging individual D-Ala-

D-Ala sites on living *Lactococcus lactis*. The AFM image shows a single wild-type *Lactococcus lactis* cell during the course of the division process. The cell is located at the center of the image and trapped into a porous polymer membrane for noninvasive, in-situ imaging. The middle image represents the affinity map (gray scale: 100 pN), together with the adhesion force histogram (n = 1536), and representative force curves recorded with a vancomycin tip on the septum region (highlighted by the white box in the AFM image), using constant retraction speed (1000 nm/s) and interaction time (500 ms). Reprinted with permission from references (90), (94) and (95) respectively.

2.2.2 Antimicrobial peptides

However, bacteria becoming more and more resistant to antibiotics, new approaches have to be developed to find new ways of killing bacteria. Antimicrobial peptides have been developed for several years, but for now, their mechanism of action is not fully understood and need further studies. To this aim AFM can be used to evaluate the effects of such molecules at the nanoscale, helping to the understanding on how these peptides interact with the bacterial cell wall. The most famous of antimicrobial peptide is colistin; this peptide is efficient against gram-negative bacteria, such as *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* or *Klebsiella pneumoniae*, bacterial strains that are the cause of many cases of nosocomial infections. Very few AFM studies were dedicated to the study of the effects of colistin on gram-negative bacteria (98–100); the main conclusions coming from these reports are that treated bacteria have an increased cell wall elasticity and spring constant, along with a decrease in the adhesive properties of the cells. These conclusions are consistent with the hypothesis that colistin acts as a detergent on the bacterial cell wall and removes the LPS from the surface. In fact, in these studies, results are also presented with colistin-resistant bacteria, that have cell wall structural differences compared to susceptible strains.

Research in the antimicrobial peptide field is actually emerging and many papers treat of the evaluation of the effects of various original peptides with AFM. The peptides studied have diverse origins; for example PGLa peptide comes from frog skin and its secretion and has been showed to remove the outer membrane of *E. coli* while decreasing the surface stiffness (101). Meincken *et al.* compared the effects of three different peptides, melittin from the honeybee *Apis mellifera*, magainin and PGLa from frogs skin (102) on *E. coli*. While these peptides are close in terms of amino sequence, the authors could make the difference between the effects caused by each one of them on bacteria, thanks to AFM. Finally Li *et al.* evaluated the effects of sushi peptides S3 on *E. coli* cells (103). The results presented in Figure 12 show that after 1 hour of treatment, bacteria are severely damaged and large amounts of cytoplasmic fluids are exuded. This indicates drastic permeabilization of the inner membrane, which would be the second step of the S3 mechanism of action. The first one is a damaging of

the outer membrane; the second is the initiation of the permeabilization of the outer membrane, and finally the release of the cytoplasmic fluid from the bacteria. Therefore, the authors, thanks to AFM, could get a better understanding of the mechanism of action of a novel and still unknown antimicrobial peptide.

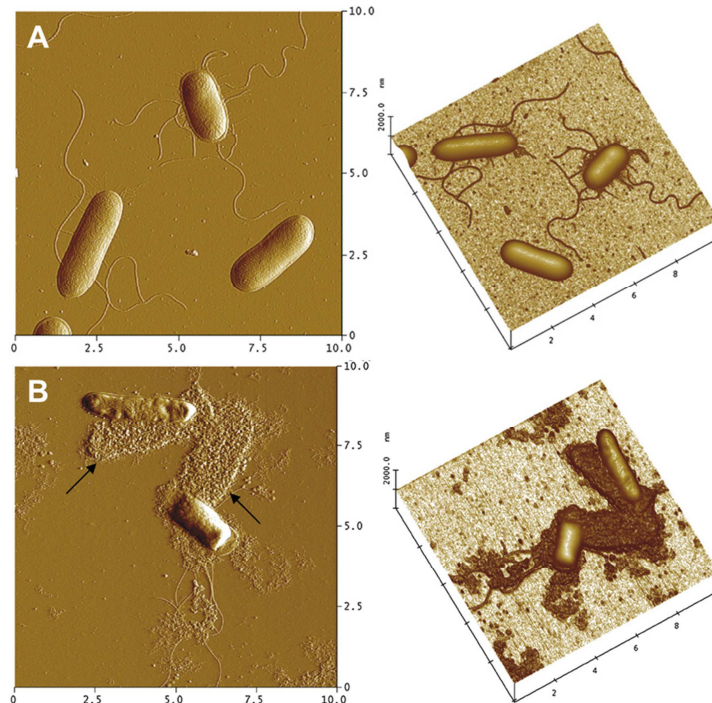


Figure 12: Effects of sushi peptides (S3) on *Escherichia coli* cells. (A) Vertical deflection images of untreated *E. coli* cells, and 3D reconstruction based on the height data. (B) Vertical deflection image of *E. coli* cells treated with 5 μM S3 peptide for 1h and 3D reconstruction based on the height data. Arrows indicate the outlines of lysed cells. Note that bacteria are severely damaged, with cell debris as well as large amount of exuded cytoplasmic fluid from bacteria. Reprinted with permission from references (103).

And since antimicrobial peptides are supposed to have a detergent-like action on the membranes of bacteria, many studies focused on characterizing the effects of peptides on phospholipidic layers that mimic these membranes. Roes *et al.* used reconstituted monolayers of LPS from *Salmonella enterica* to study the effects of polymyxin B; Francius *et al.* observed the interactions between supported bilayers of DOPC/DPPC and surfactins (104). As a last example, Arseneault *et al.* made DPPG mono- and bilayers to understand the interactions with lactoferricin B, an antimicrobial peptide obtained from the pepsin cleavage of lactoferrin (105).

2.2.3 Innovative molecules and nanotechnologies

Whereas antimicrobial peptides have a mechanism of action different from antibiotics, still resistances to colistin, for example, have started to emerge. The research must therefore explore new possibilities for finding new antibacterial molecules that are different from both

antibiotics and peptides, in order to avoid development of resistances. A new approach developed is the one of nanoparticles. Metallic nanoparticles are promising antibacterial agents since they are chemically stable, resistant to heat and have a long life. Currently a broad variety of metals and their compounds are used in microbiology research for their potential antimicrobial activity. There are already a few studies reporting on AFM investigations of the effects of nanoparticles on bacteria (106–108), and one of them is dedicated to copper iodide nanoparticles (109). In this study, the authors have synthesized and evaluated the effects of this novel kind of nanoparticles on different bacterial strains, including multidrug resistant ones. The results presented in Figure 13 A show that for *E. coli* (K12) cells treated with the nanoparticles, the membrane is totally disrupted compared to the native cells. In addition, the authors were also able to prove that copper iodide nanoparticles caused the generation of reactive oxygen species, therefore damaging the DNA of the bacterial cells.

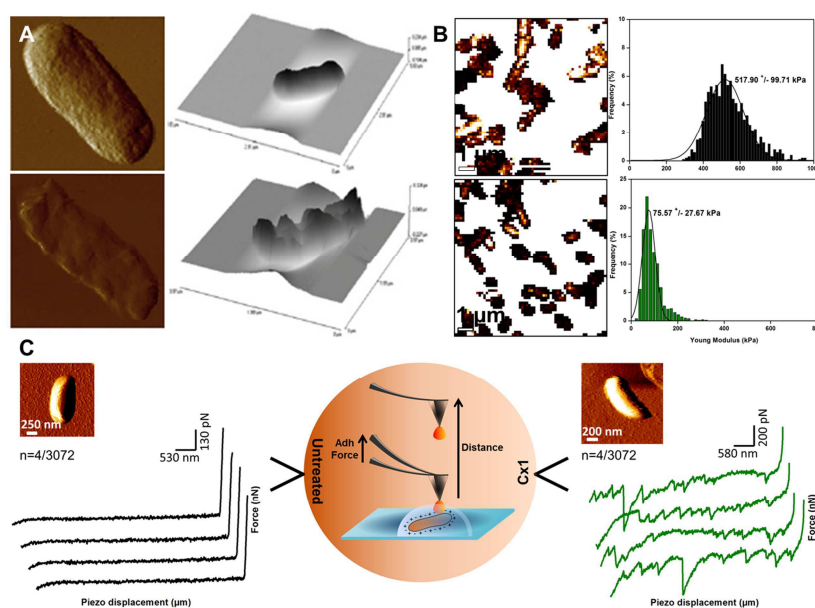


Figure 13: Effects of innovative antibacterial molecules on bacteria. (A) Antibacterial activity of copper iodide nanoparticles. Vertical deflection AFM images control K12 *E. coli* cell (top image), and copper iodide nanoparticles treated K12 *E. coli* (bottom image). Corresponding 3D images are shown beside each pictures. (B) Antibacterial effects of calixarene Cx1 on the elasticity of *Pseudomonas aeruginosa* multidrug resistant. Elasticity map (z-range = 1.5 MPa) of several cells of untreated *P. aeruginosa*, together with distribution of young modulus values (top images), and of cells treated with Cx1 (bottom images). (C) Effects of Cx1 on the architecture of the cell wall of *Pseudomonas aeruginosa* multidrug resistant. Schematic representation of the force curves (retract segment) obtained with ConcanavalinA functionalized AFM tips on untreated *P. aeruginosa* cells (left curves) and Cx1 treated cells (right curves). The 4 force curves (n) presented by conditions were chosen out of 3072 curves recorded on 3 different bacteria coming from 3 independent cultures. Reprinted with permission from refs (109) and (111) respectively.

Another new approach developed in the recent years is the one of calixarene molecules. An example of such molecule is the para-guanidinoethylcalix[4]arene (Cx1), that has been proven to be efficient on both gram-negative and gram-positive bacteria (110). However the mechanism of action of this molecule was still unclear, and AFM techniques were used to get a better understanding of this molecule interaction with the cell wall of bacteria (111). The results presented in Figure 13 B show that on a multidrug resistant strain of *Pseudomonas aeruginosa*, Cx1 causes a dramatic decrease of the cell wall elasticity, from 517 to 75 kPa. This information shows that Cx1 is efficient on such a bacterial strain, and that its action destabilizes the cell wall of the gram-negative bacteria. To go further into the mechanism of actions, the authors probed the cell wall of treated and untreated bacteria with an AFM tip functionalized with concanavaline A, a lectin that binds to sugars. These single molecule force spectroscopy experiments revealed that the lectin could unfold a molecule only on Cx1 treated cells (Fig. 13 C). This molecule could possibly be the peptidoglycan, which would be accessible because of the destabilization of the outer membrane caused by the interaction with Cx1. Research is still going on in this field, and new calixaneric molecules are under development (112–114).

Along with nanoparticles and calixarene, there are also approaches that involves carbon nanotubes which have been proven to be efficient against *Escherichia coli* and *Bacillus subtilis* (115), and chitosans, that were investigated using AFM on *Bacillus cereus*, *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* (116,117).

To conclude, we show in this section that Atomic Force Microscopy opens new perspectives for characterizing bacterial species, and understanding the molecular and nanomechanical processes underlying their behavior in physiological conditions. We have also seen that AFM techniques are very useful to study the nanoscale effects of antibiotics that have a known mechanism of action. However, since bacteria are becoming more and more resistant to the antibiotics, new approaches involving innovative molecules are developed and once again, AFM can be used to get a better understanding of the mechanism of action of these new molecules, with the hope that they will be used to treat nosocomial infections caused by multidrug-resistant bacteria.

3. AFM FOR MAMMAL CELLS PHARMACOLOGY'S STUDIES

This part focuses on the insights that Atomic Force Microscopy can give in the field of pharmacology for mammal's cells, from the general understanding of therapeutics treatment to special cases of diseases, with a whole part concerning cancer study. Most of the studies in this field are performed on cells lines or patient isolated cells *in vitro*, but recent progress have made possible to study entire biopsies, thus enlarging the use of AFM.

3.1 General applications

The use of atomic force microscopy for pharmacology's studies on mammalian cells have been led by 2 types of research field: 1) the understanding of cell response to an external stress (infection, injury) characterized by immune and differentiation or gene expression response; 2) the investigation of drug effect on cells, from internalization efficiency to affectation of cellular processes and active effect on pathogens. The following section will be then divided in 2 parts related to these concerns.

3.1.1 Cell response to external stress

In the complex context of multicellular organisms, the cell response to an external stress is of interest to accurately target the dysfunction in case of disease. For example, the study of keratinocyte reaction to surfactant by AFM can help in the understanding of chemical stresses on the skin, showing that despite a morphological effect, no differences in stiffness are measured at non cytotoxic doses of sodium lauryl sulphate (118). But AFM can also help in immune response characterization. Immune response is based on first, the detection of pathogen and then, their elimination. On one hand, lymphocytes B are involved in the humoral immune response, and recognize molecular component in extra cellular fluids that directly inform of the pathogen presence in the organism. These cells are responsible for antibody production. Their activation is a complex mechanism that appeared to change their nanomechanics. Wang *et al.* have shown, using AFM, that activation of B cells by pokeweed mitogen (PWM) or *Staphylococcus aureus* Cowan I (SAC) induces the clustering of B cell receptors at the cell surface, responsible for cytoplasm biochemical activation cascade and improvement of cell adhesion to antigen. This clustering is visible by topographic analysis such as roughness and particle (cluster) size (Fig. 14-A). Cell adhesion capacities have also been evaluated by force spectroscopy (119). On the other hand, Lymphocyte T cells are responsible for cell-mediated immune response. To achieve their goals, these cells need to reach the site of infection (inflammation site), and then to cross endothelial barriers, which involves cell-cell adhesion, namely lymphocyte T - vascular endothelial cell adhesion. This

crossing implies a change in adhesion protein expression pattern, like integrin and selectin, by endothelial cells. Zhang *et al.* have investigated the adhesion dynamics of the T-cell - endothelial interaction by force spectroscopy study between a functionalized tip where a lymphocyte cell is attached and endothelial cell on the substrate (120). The adhesion forces have been measured and discriminated using antibodies against major adhesion proteins expressed by endothelial cells (Fig. 14-B). These experiments lead to the conclusion that these proteins are the ones involved in lymphocyte B adhesion to endothelial cell. This inflammatory process involves also the increase of temperature, and thus heat stress. HSP60 protein (heat shock protein) production by endothelial cells has been studied by single molecule force spectroscopy and revealed the presence of this protein at the membrane surface of heat stressed cells and its possible implication in atherosclerosis (121). Finally, macrophages phagocytosis plays an important role in the elimination of pathogens and dead cells following immune response (122).

As another stress that an organism is subjected to, injury is one of the most common one. In the process of maintaining blood vessel integrity, platelet activation is the first and key process. Topographical analysis of platelets activation has shown cytoskeleton reorganization at a resolution of 50 nm. A redistribution of the platelets granula and vesicles towards the lamellipodia of the cell have also been observed; this phenomenon leading to increase plasma membrane surface thus improving aggregation (Fig. 14 C) (123).

We can see through these different examples that most of cellular responses involving different gene expression pattern are linked to cell membrane reorganization and changes in nanomechanical properties of the cell. These processes are observed for other mechanisms like cell differentiation or pathway activation. Han *et al.*, in 2011 have validated the IGF-II (insulin-like growth factor) autocrine signaling pathway as a suitable target for the detection of muscle differentiation using AFM. They have been able to discriminate differentiated cells from others by the detection of IGF-II at the cell surface thanks to anti-mouse IGF-II antibody immobilized on the AFM tip (124). Using the same concept, Qiu *et al.* have characterized quantitatively the TRA-1-81 (un-differentiation marker) expression level on Human Embryonic stem cells surface to capture the “turn-on” signal and understand the mechanism of their early differentiation (125). Another way to discriminate differentiated cell can be to measure their elasticity, as it is the case for the change from osteoblast (stiff) to osteocytes (soft) (126). This stiffness is directly correlated to the capacity to adhere to substrate, and is accurate to test the biocompatibility of implant materials (127).

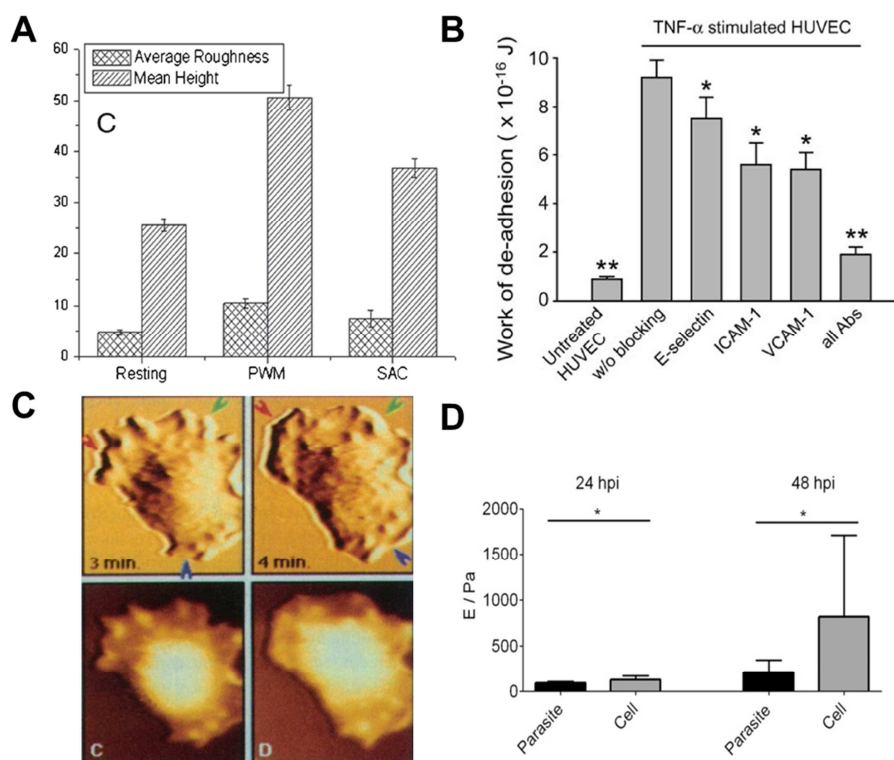


Figure 14: AFM in pharmacology. (A) The average roughness and mean height particles of surface nanostructure of resting and B lymphocytes after their activation by pokeweed mitogen (PWM) or *Staphylococcus aureus* Cowan I (SAC). Mean \pm SD. (B) Lymphocyte T activation and consequent adhesion to jurkat cells (w/o), and diminution of adhesion when using neutralizing antibodies against adhesive protein (selectin, ICAM-1, VCAM-1). The error bar is standard error with $N > 15$ in each case. * $P < 0.05$ compared with the TNF- α -stimulated HUVEC. ** $P < 0.05$ compared with any other groups. (C) AFM imaging of platelet activation along time, height image (z-range 0-1.9 μm) and corrugation images (z-range 0-280 nm). (D) Increase in stiffness of human hepatoma cells infected by *Plasmodium Flaciparum*. ($P < 0.05$). Reprinted with permission from references (119,120,123,143).

3.1.2 Drug effects and disease studies

Drug effect investigation can be done by the three classical measurements: adhesion force, elasticity or imaging, as for example this study about the effects of an anti-malaria compound on leukemic cells (128) or hormonal effects that have been widely studied and well documented by Hillebrand *et al.* (129). i) Single molecule force spectroscopy has resolved at the molecular resolution the dynamics of AMPAR neuron receptors trafficking under NMDA stimulation (130). ii) Effects of asthma drugs (aminophylline) on red blood cell elasticity have been correlated to their reduced capacity to transport oxygen in capillaries by increasing their stiffness and thus reverse the drug purpose (131). iii) These elasticity changes are linked to a

change in cell shape too. Imaging of cells leads to the understanding of molecule side effect, as for example chlorpromazine. Li *et al.* have shown that this schizophrenia drug affects endothelial cell morphologically (132). HgCl₂ toxic effects have been also characterized by imaging cells in contact with the molecule (133). Finally imaging can also be used to study the mechanism of drug internalization, as for example the study of the direct DNA insertion thanks to the AFM tip for nanomedicine (134).

We will now focus on the special case of cardio-vascular affections. Indeed, cardiac cells (cardiomyocytes) present the distinctive feature of being contractile, and AFM is nevertheless technically of interest to study them, as shown by Liu *et al.* This group has measured cell contractility with or without incubating them with Ibutilide, a classical drug used to treat arrhythmia, and started to determine its cellular target and mechanism of action (135). The last development allows synchronizing AFM measurements with the contractility of the cells, providing the possibility to detect specific events (136). The evaluation of recovery after infarct by elasticity measurements showed that stroma cell-derived factor 1 α (SDF-1 α) increases the elasticity of peri-infarct mice tissue border zone and stiffening the scar, thus conducting to a better resistance to ventricular remodeling and infarct expansion (137). The importance of the protein Ephrin B1 in the lateral membrane of cardiomyocytes has also been assessed by AFM. The deletion of Ephrin B1 makes the cardiomyocytes stiffer and progressively leads to the cardiac tissue disorganization. This protein is essential for the stability of cardiac tissue architecture cohesion (138). Nevertheless, beyond the whole cell study, AFM can be run on organelles like mitochondria, which dysfunction is known to be implicated in the pathology of myocardial infarction. The release of cytochrome C by mitochondria was correlated to its swelling by fluorescence microscopy, thus not quantitatively. Lee *et al.* have shown that mitochondria indeed swell during apoptosis; the authors also gave quantitative morphological analysis of rat heart mitochondria ischemic or not in native conditions. Furthermore, AFM allows them to detect nano-mechanical surface properties changes of ischemic cell mitochondria that are linked to their swelling (139).

Vascular diseases are also subjected to investigation by AFM. The inner part of blood vessel is responsible for blood pressure regulation through different mechanism like the release of vasoactive substance namely nitric oxide. The release of nitric oxide by the inner endothelial cells have been shown to be correlated with (and maybe regulated by) cell cortex stiffness changes (140). Artherosclerosis lesions are affecting arterial cells stiffness too, specifically in branches and curved region of blood vessel, where endothelial cells appear to be stiffer than

others endothelial cells (141). This may be related to oxidized low-density lipoproteins (ox-LDL) cell exposure (142).

Furthermore, AFM can give answers to the questions raised by the pathogen infection process. For example the plasmodium falciparum liver infection can be characterized by an increase in stiffness associated to a cell response to infection (and not the presence of the microorganism itself) (Fig. 14 D), and may further enhance the understanding of this clinically silent step (143).

3.2 A tool for cancer-study development

Considered as the disease of the 20's century, cancer remains one of the most complicated and unsolved disease, meaning that no recovery treatment exists and only the eradication of tumor cells shows consistent results. In the following section accent will be put on the progress AFM allows for understanding this disease and the consequent medical applications that emerge with this nano-mechanical tool.

3.2.1 Nanomechanic of cancer cell

In 1999, Lekka *et al.* have for the first time compared the elasticity of cancerous cells versus “normal” ones (144). They studied human epithelial bladder cells lines and show that cancerous cells present a lowest young modulus value than normal cells (Fig. 15 A). This article was part of a set investigating several cancer types : prostate cancer cells (145), breast cancer cells (146) or cervical ones (147), all showing a decrease in stiffness for cancer cells, except in the case of leukemic cells where cell stiffness increase leading to leukostasis (Fig. 15 B) (148). In 2007, the same observations were published on cells directly taken from the body (pleural) fluids of patients with suspected lung, breast and pancreas cancer (149), validating the decrease of elasticity as a characteristic of cancerous cells, *in vitro* and *in vivo* (Fig. 15 C). These observations lead the authors to wonder why there was this particular change in elasticity and so to investigate the mechanics of the cancer cells. Rapidly the idea of the involvement of cytoskeleton in this measured softness was pointed out (150) and studied (151). Moreover, the changes in elasticity of melanoma cell lines have shown that the decrease in stiffness was directly correlated to the metastatic potential of the cells (152), the stiffness being the lowest for melanoma B16-F10 cells that produce a large number of foci, and the highest with a reduce number of foci (Fig. 16 A). The same relation has been shown for esophageal cells lines in different phases of premalignancy (153).

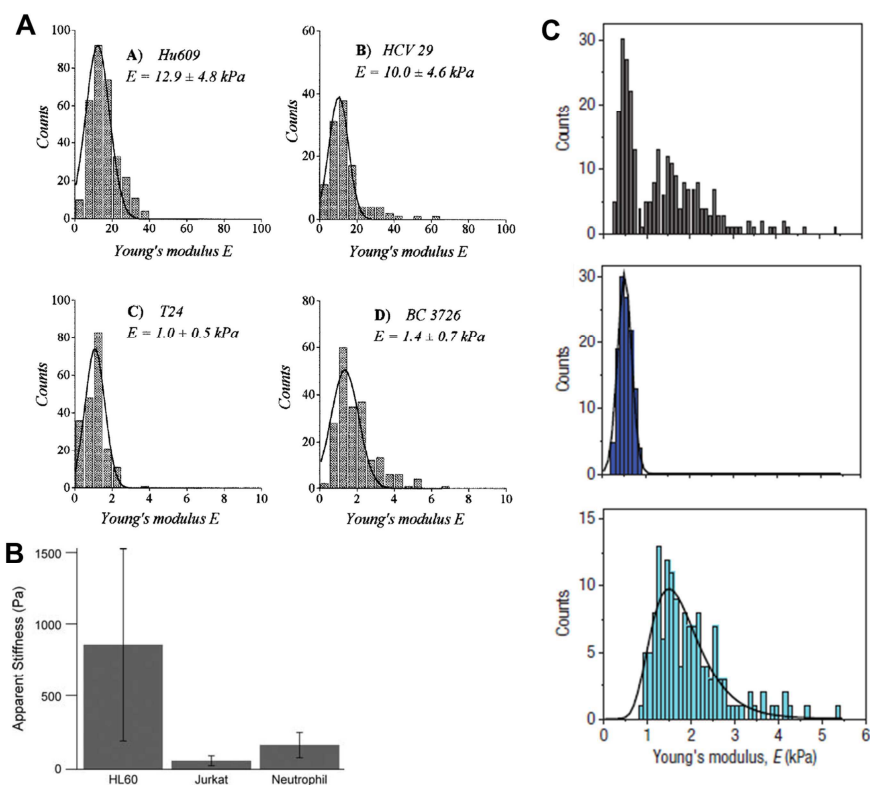


Figure 15: Cancer cell characteristics. (A) Elasticity of bladder cells lines, non-malignant ureter cells (HU609), non-malignant bladder urothelium (HCV29), bladder transitional cell carcinoma (T24), HCV29 cells transfected with v-ras oncogene (BC3726). (B) Increase in cell elasticity of leukemic cells (HL60) leading to leukostasis. (C) Elasticity of cancer cells collected from patients with suspected metastatic cancer from seven different clinical samples. Grey: measurement for all cells together. Dark blue: cancer cells. Light blue: normal cells. Reprinted with permission from references (144,148,149).

All together, these data demonstrate that the nanomechanical properties of cancerous cells are linked to their condition, which enable them to change their elastic properties (deformability) in order to cross the cells barriers to create metastasis in the organism (leave the primary site, pass into circulation, stop at a secondary site and migrate again across the vascular barrier). Beyond this metastatic state, cancerous cells must be able to sense their environment to efficiently invade the right targeted-tissue. Firstly, the young modulus of cancer cells was shown to change when cultured on different substrates, indicating a perception of their environment, and yet different capacities depending on their “function” (144). For example elasticity of breast cancer cells decreases on fibronectin (154), which is related to the cancerous nature of the cells as shown on prostate cancer cells versus non-cancerous cells cultured on collagen (Fig. 16 B) (155). The extra cellular matrix is thus of importance in

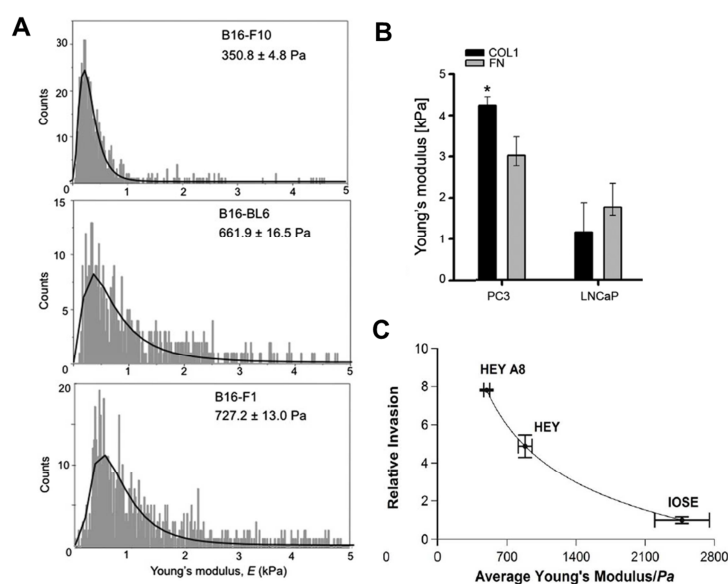


Figure 16: Relation between stiffness and metastatic state. (A) Young's modulus distribution of murine melanoma cell of decreasing metastatic potential (B16-F10, B16-BL6 and B16-F1 cells). (B) Substrate related elasticity of PC3 and LNCaP cell when culture on collagen (COL1) or fibronectin (FN). (C) Invasion versus average stiffness for ovarian surface epithelial cells (IOSE), and ovarian cancer (HEY and HEY A8 cells are HEY A8 cells that are more tumorigenic). Reprinted with permission from (152,155,159).

cancer cell phenotypes (156–158). Secondly, stiffness has been correlated to the capacity of invasion too as shown in Figure 16 C on ovarian cancer cells (159) or prostate cancer cells (160). These invasive properties were also determined by the cells ability to adhere differently to the substrate depending on its nature (155,160). Therefore, it was shown that the rigidity of the substrate influences the invasive cell response as the invasive mechanism implies the degradation of extracellular matrix: cells are then able to sense their environment and choose where to invade (161). Likewise, during their invasion process, cancer cells can adhere to other cells, and this can be measured by direct cell-cell interactions for example between prostate metastatic cells known to form bone metastases and bone cells (162). Reeves *et al.* have demonstrated the ability of prostate cancer cells fixed on the AFM tip to form contact with bone marrow endothelial cells fixed on the substrate (163). By blocking extracellular part of trans-membrane protein such as integrin and selectin using specific antibodies, they observed a decrease in adhesion events between the two cell types. This result has demonstrated that cell-cell interaction in invasive process is performed through these specific proteins (Fig. 17 A). Following the same idea, N-cadherin levels (calcium adhesion transmembrane proteins, that are characteristic of various cancers and involved in cell adhesive properties) have been measured on cancer and normal bladder cell surface with an antibody fixed on the AFM tip (164). Results showed an enhanced level of the protein in

cancer cells accompanied by higher unbinding forces, meaning that N-cadherin protein is more stable in cancerous cells (Fig. 17 B). Furthermore, the presence of cell referenced as good secondary site for metastasis may enhance the invasion capacities of the cancer cells, as shown by Jin *et al.* on breast cancer cells that change their shape and make specialized migration structures in presence of the bone morphogenetic protein 2 (Fig. 17 C) (165).

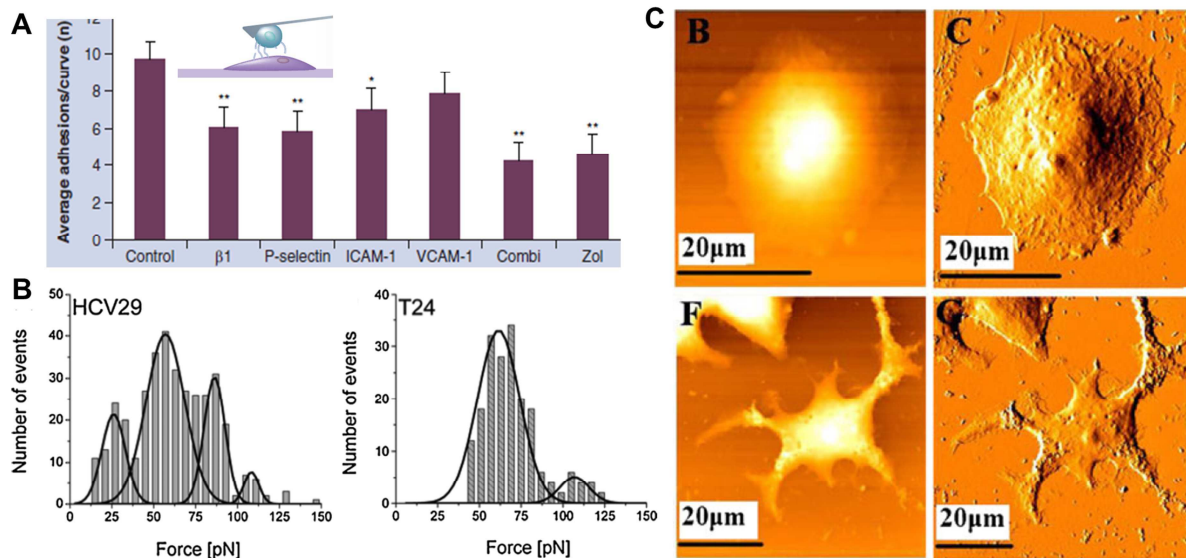


Figure 17: Direct link between cancerous cell elasticity and their interaction with environment. (A) Effect of antibodies against specific cell adhesion molecule and zoledronic acid on tumor–endothelial cell adhesive interactions, control: normal binding between the two type of cell. (B) Distribution of the unbinding force for N-cadherin–GC4 complex in non-malignant HCV29 cells and malignant T24 bladder cells. (C) Morphological changes of MCF-7 cells treated without (B, C) or with (F, G) 30 $\mu\text{g/L}$ BMP2 for 24 h. Reprinted with permission from references (163–165).

Cancerous cell changes in gene expression are directly related to the alteration of their function. The data presented above shows that morphological and force spectroscopy investigation help in resolving and understanding cancer cell mechanism and behavior.

3.2.2 Treatment

After the determination of cancer cell characteristics and its subsequent link to their behavior, the treatment of patient by eradication of tumor is a second challenge for scientists. We will describe in this section the benefice of AFM for treatment efficiency and mode of action studies.

The first step regarding the efficiency of a therapeutic agent is the targeting of the cancer cells and its delivery. Indeed, most of the current chemical does not specifically affect the cancerous cells and thus need to be addressed. AFM can help in determining this targeting by the study of nanocarriers: nanoparticle interaction with melanoma cells (166) or

nanoliposomes containing the well-known cisplatin drug intra cellular delivery in ovarian cancer cells (167). These nanoliposomes have been shown to be well internalized in the cytoplasm in the size range of 100-300 nm (Fig. 18 A). Discrimination of chemical groups adhesion specificity to enhance the targeting of cancerous cell by these nanocarriers can be measured directly on cells by functionalizing the AFM tip with the molecule (168). The functionalization with these type of carriers can also be achieved through antibodies, for example against MUC-1, a cell surface marker for prostate, breast, and lung cancer (169). Some antibodies are able, not only to target the cancer cells, but also to provoke apoptosis of the cell. This is the case of antibodies against epidermal growth factor receptor HER2, namely Trastuzumab and Pertuzumab, which inhibit the dimerization of HER2 with other epidermal growth factor (170). This method has also been used to study two cells interaction and helped to solve Zoledronic acid role on prostate cancer that reduced the adhesive interactions between cancer cells and bone marrow endothelial cells (163).

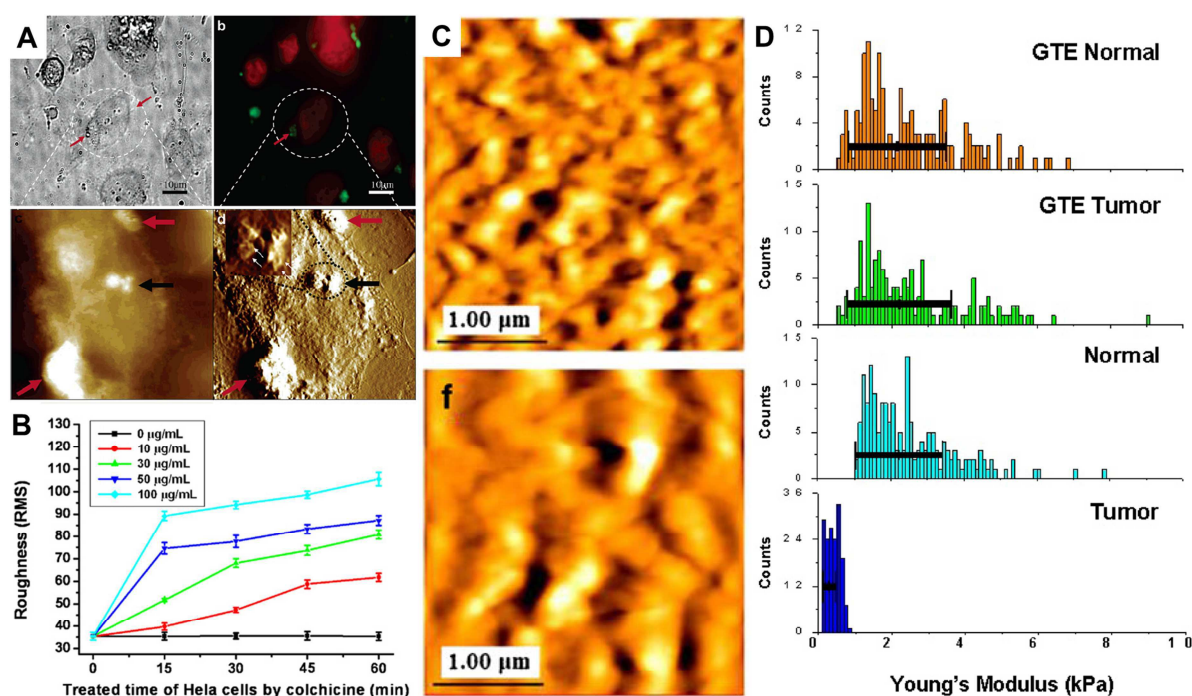


Figure 18: Cancer treatment effects. (A) Internalization of small liposomes containing cisplatin in human ovarian cancer cell line (A2780) after 1h incubation, top left: contrast phase image, top right: fluorescence images nucleus in red and liposomes in green, bottom left: height image, bottom right: error image. Black arrow: pointing at liposomes on cell surface, red arrows: in the cytoplasm. (B) Root-mean-square roughness variation of cell Hela cell membrane along time depending on colchicine dose. (C) AFM topography data of control MCF-7 cells (top) and MCF-7 cells treated with 40 μM alterporriol L (bottom). (D) Young's modulus of patient lung metastatic tumor and normal mesothelial cells before (ctrl) and after treatment with Green Tea Extract (GTE) for 24 h. Reprinted with permission from references (167,174,178,183).

As stated in the previous section, interaction with their environment is of importance for cancerous cells. It is one of the effect of immune system on cancer cells, as shown by Braet *et al* that demonstrated that natural killer cells affect the adhesion to substrate properties of colon carcinoma cells (171). As membrane is the interface with cell's environment, it is one of the key actors that scientist look at when investigating anti-cancer treatment effects. Imaging cell surface after treating them with new drugs gives access to the way that drugs affect the cell and can help improving it. Some ex-vivo studies performed on lipid bilayers helped in defining the mechanism of action of anti-cancer compounds by imaging breast cancer cell native membrane rafts (172) or Latarcin2a peptide lytic activity on model membranes (173). Several drug have been studied by imaging membrane on the complete cell: Colchicine on different organs carcinoma cells (dose dependent increase in roughness, Figure 18B) (174), Celecoxib on human colorectal cells (175), Paclitaxel on carcinoma cells (176,177), Alterporiol on breast cancer cells (dose dependent increase in membrane particule size, Fig. 18 C) (178), lithium unexpected effect on carcinoma cells (179) and curcumin anti-cancer effect on liver cells (180). Membrane is also the site where interactions with the environment occur, and the drug Celastrol affecting the invading capacity of endothelial cell in angiogenesis has been shown to reduce adhesion/affinity to fibronectin protein (181). Ones must not forget that some drugs are affecting inner cell's components, like the bacterial protein Azurin that stabilize the p53 protein and thus enable apoptosis. The molecular details of this interaction have been assessed by AFM (182).

Of course the elasticity of the cell stays a good parameter to judge on the efficiency of a therapeutic molecule, as for example green tea extract that restores selectively the elasticity of cancerous cells thus confirming its anti-cancer non-destructive activity (Fig. 18 D) (183). However, depending on the effect or the cell, elasticity can show a different tendency. For example, elasticity can reflect the apoptotic effect of a drug, then ones must be looking at a decrease in Young modulus values as it is the case for Paclitaxel (176), and an increase in elasticity can label the resistance of tumor cells to an apoptotic agent like for the TRAIL (TNF-related apoptosis inducing ligand) (184).

3.2.3 Futures applications

We have described above the use of AFM for *in vitro* analysis of cancer cells, their properties, and their response to treatment. However the AFM can also be used as a diagnosis tool. *In vitro*, the discrimination between cancerous cells and healthy ones can be achieved by several

assays. First, imaging cells can give answers to the question “are these cells cancerous?”. The down-regulation of tumor suppressor protein as the matrix associated region protein SMAR1 has been studied by roughness measurement at the surface of cancer cells, and an increase in roughness was shown on cancer cells allowing the differentiation between cancer cell and healthy ones (185). Secondly, adhesion measurements can inform on the glycosylation state of the cell, directly correlated to their cancer state (186). As previously mentioned, the elasticity of the cell is a reliable measurement that undoubtedly makes the difference between cancer and non-cancer cells. Cross *et al.* have been the first to study cells from patients and thus gave the first diagnosis on lung, breast, pancreas cells (Fig. 14 C) (149), and later adenocarcinoma (187). The last improvements are turned to biopsies (Fig. 19) (164,188,189) and allow the correlation between cancer phenotypes and stiffness. These studies open up the use of AFM for bio-medical application of interest for clinical applications, and recent advances in force-curve analysis may help to finely tune these features (190,191).

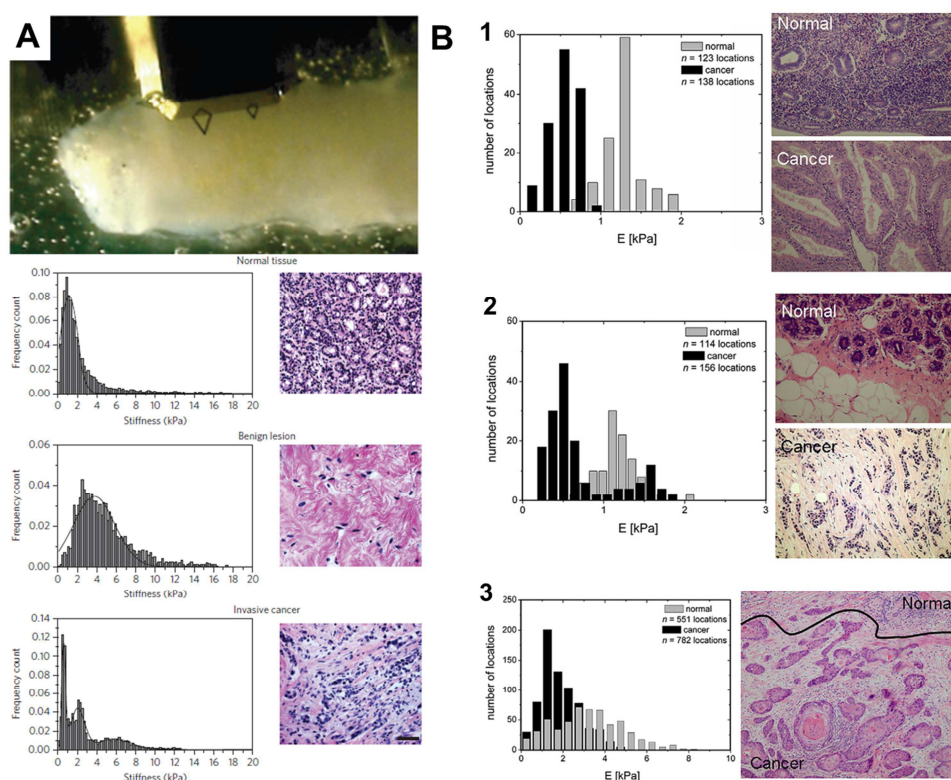


Figure 19: Detection of cancerous cell from patient. (A) Top view of an oriented, immobilized biopsy with the cantilever positioned for AFM measurement. Scale bar, 500 μm . Elasticity of human breast tissue at different step of malignancy. (B) Stiffness distributions in tissues sections accompanied by the corresponding histological staining. (1) Nonneoplastic endometrium (gray columns) and well differentiated endometrioid carcinoma (black columns) of the uterine corpus. (2) Nonneoplastic breast tissue (gray columns) and infiltrating ductal carcinoma (black columns). (3) Vulvar cancer. Black columns denote cancer while gray ones, non-neoplastic parts of the tissue section separated by black line in the histological image. Reprinted with permission from references (188,189).

Conclusion

Imaging cells at high resolution is of first importance in biology. The atomic force microscope can't now be ignored because of its advantages. AFM works in liquid, thus potentially on living cells, with a resolution close to the nanometer (depending on the application). But, as exposed in the review, AFM is more than an imaging tool. It is able to measure forces, and give access to the nanomechanical properties of cells, and, or to the localization of proteins, receptors, at the cell surface. We have reviewed the main domain of application of AFM on living cells: fungal cells, bacteria, mammal cells. However, AFM is also useful to study isolated proteins, DNA, and other biomolecules. We have shown, by reviewing the literature, that AFM experiments give an original vision of cells. It is of first interest to combine AFM analysis with other imaging techniques (MET, SEM, optical microscope, confocal microscope) to get a better understanding of the structure – function relationships. For example, by combining force measurements and transmission electronic microscope, it is possible to make a link between a stiffer structure and the underlying organelles that are present in the cell. The combination with chemical analysis like XPS or SIMS (192) also enlightens the relation between surface structures and chemical compositions.

AFM technologies are continuously improving. Among others, we should cite high speed AFM (193,194), or high speed force spectroscopies. These developments tend to increase our ability to track fast events occurring at cells surface and contribute to redefine our understanding of the living cell surface.

In this review we specially addressed the contribution of AFM in pharmacology. We exposed results obtained on fungal cells, bacteria and mammal cells exposed to drugs or encountering diseases. This particular point of view demonstrate that AFM is not providing only fundamental knowledge on cells but is now more and more contributing to studies with medical relevance.

References

1. Binnig G, Rohrer H, Gerber C, Weibel E. Tunneling through a controllable vacuum gap. *Appl. Phys. Lett.* 1982;40(2):178-180.
2. Binnig G, Quate CF, Gerber C. Atomic Force Microscope. *Phys. Rev. Lett.* 3 mars 1986;56(9):930-933.
3. Feynman RP. Feynman's Talk. California Institute of Technology (Caltech); 1959.
4. Gerber C, Lang HP. How the doors of the nanoworld were opened. *Nat. Nanotech.* 2006;1:3-5.
5. Hansma PK, Elings VB, Marti O, Bracker CE. Scanning tunneling microscopy and atomic force microscopy : application to biology and technology. *Science.* 1988;247:209-216.
6. Ng JD, Kuznetsov YG, Malkin AJ, Keith G, Giegé R, McPherson A. Visualization of RNA crystal growth by atomic force microscopy. *Nucleic Acids Res.* 1 juill 1997;25(13):2582-2588.
7. Mikamo E, Tanaka C, Kanno T, Akiyama H, Jung G, Tanaka H, *et al.* Native polysomes of *Saccharomyces cerevisiae* in liquid solution observed by atomic force microscopy. *Journal of Structural Biology.* juill 2005;151(1):106-110.
8. Buzhynskyy N, Sens P, Prima V, Sturgis JN, Scheuring S. Rows of ATP Synthase Dimers in Native Mitochondrial Inner Membranes. *Biophys J.* 15 oct 2007;93(8):2870-2876.
9. Pietrasanta LI, Thrower D, Hsieh W, Rao S, Stemmann O, Lechner J, *et al.* Probing the *Saccharomyces cerevisiae* centromeric DNA (CEN DNA)-binding factor 3 (CBF3) kinetochore complex by using atomic force microscopy. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 30 mars 1999;96(7):3757-3762.
10. Gaczynska M, Osmulski PA, Jiang Y, Lee J-K, Bermudez V, Hurwitz J. Atomic force microscopic analysis of the binding of the *Schizosaccharomyces pombe* origin recognition complex and the spOrc4 protein with origin DNA. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 28 déc 2004;101(52):17952-17957.
11. Wu Y, Siino JS, Sugiyama T, Kowalczykowski SC. The DNA Binding Preference of RAD52 and RAD59 Proteins implications for RAD52 and RAD59 protein function in homologous recombination. *J. Biol. Chem.* 29 déc 2006;281(52):40001-40009.
12. Gad M, Ikai A. Method for immobilizing microbial cells on gel surface for dynamic AFM studies. *Biophys J.* déc 1995;69(6):2226-2233.
13. De Souza Pereira R, Da Silva MIN, Cotta MA. Adhesion forces measured between a calcium blocker drug and its receptor in living cells using atomic force microscope. *FEBS Letters.* 25 sept 2003;552(2-3):155-159.
14. Adya AK, Canetta E, Walker GM. Atomic force microscopic study of the influence of physical stresses on *Saccharomyces cerevisiae* and *Schizosaccharomyces pombe*. *FEMS Yeast Research.* 2006;6(1):120-8.
15. Touhami A, Nysten B, Dufrêne YF. Nanoscale Mapping of the Elasticity of Microbial Cells by Atomic Force Microscopy. *Langmuir.* 1 mai 2003;19(11):4539-4543.

16. Dague E, Bitar R, Ranchon H, Durand F, Yken HM, François JM. An atomic force microscopy analysis of yeast mutants defective in cell wall architecture. *Yeast*. 2010;27(8):673-84.
17. Dague E, Jauvert E, Laplatine L, Viallet B, Thibault C, Ressler L. Assembly of live microorganisms on microstructured PDMS stamps by convective/capillary deposition for AFM bio-experiments. *Nanotechnology*. 30 sept 2011;22(39):395102.
18. Dague E, Alsteens D, Latgé J-P, Dufrêne YF. High-Resolution Cell Surface Dynamics of Germinating *Aspergillus fumigatus* Conidia. *Biophysical Journal*. 15 janv 2008;94(2):656-660.
19. Pereira R de S, Parizotto NA, Baranauskas V. Observation of baker's yeast strains used in biotransformation by atomic force microscopy. *Appl Biochem Biotechnol*. 1 mai 1996;59(2):135-143.
20. Kriznik A, Bouillot M, Coulon J, Gaboriaud F. Morphological specificity of yeast and filamentous *Candida albicans* forms on surface properties. *Comptes Rendus Biologies*. oct 2005;328(10-11):928-935.
21. Alsteens D, Dupres V, Yunus S, Latgé J-P, Heinisch JJ, Dufrêne YF. High-Resolution Imaging of Chemical and Biological Sites on Living Cells Using Peak Force Tapping Atomic Force Microscopy. *Langmuir*. 11 déc 2012;28(49):16738-16744.
22. Canetta E, Walker GM, Adya AK. Correlating yeast cell stress physiology to changes in the cell surface morphology: atomic force microscopic studies. *ScientificWorldJournal*. 2006;6:777-780.
23. Zhao L, Schaefer D, Xu H, Modi SJ, LaCourse WR, Marten MR. Elastic Properties of the Cell Wall of *Aspergillus nidulans* Studied with Atomic Force Microscopy. *Biotechnology Progress*. 2005;21(1):292-9.
24. Pelling AE, Sehati S, Gralla EB, Valentine JS, Gimzewski JK. Local Nanomechanical Motion of the Cell Wall of *Saccharomyces cerevisiae*. *Science*. 20 août 2004;305(5687):1147-1150.
25. Pelling AE, Sehati S, Gralla EB, Gimzewski JK. Time dependence of the frequency and amplitude of the local nanomechanical motion of yeast. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*. juin 2005;1(2):178-183.
26. Heinz WF, Hoh JH. Spatially resolved force spectroscopy of biological surfaces using the atomic force microscope. *Trends in Biotechnology*. 1 avr 1999;17(4):143-150.
27. Karreman RJ, Dague E, Gaboriaud F, Quilès F, Duval JFL, Lindsey GG. The stress response protein Hsp12p increases the flexibility of the yeast *Saccharomyces cerevisiae* cell wall. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics*. janv 2007;1774(1):131-137.
28. Hertz H. Ueber die Berührung fester elastischer Körper. *Journal für die reine und angewandte Mathematik*. 1881;1882(92):156-171.
29. Svaldo-Lanero T, Krol S, Magrassi R, Diaspro A, Rolandi R, Gliozzi A, *et al*. Morphology, mechanical properties and viability of encapsulated cells. *Ultramicroscopy*. oct 2007;107(10-11):913-921.
30. Chen P, Liu H-H, Cui R, Zhang Z-L, Pang D-W, Xie Z-X, *et al*. Visualized investigation of yeast transformation induced with Li⁺ and polyethylene glycol. *Talanta*. 19 oct 2008;77(1):262-268.

31. Alsteens D, Dupres V, Mc Evoy K, Wildling L, Gruber HJ, Dufrêne YF. Structure, cell wall elasticity and polysaccharide properties of living yeast cells, as probed by AFM. *Nanotechnology*. 24 sept 2008;19(38):384005.
32. Hinterdorfer P, Dufrêne YF. Detection and localization of single molecular recognition events using atomic force microscopy. *Nat Meth*. mai 2006;3(5):347-355.
33. Hinterdorfer P, Garcia-Parajo MF, Dufrêne YF. Single-Molecule Imaging of Cell Surfaces Using Near-Field Nanoscopy. *Acc. Chem. Res*. 20 mars 2012;45(3):327-336.
34. Dufrêne YF, Hinterdorfer P. Recent progress in AFM molecular recognition studies. *Pflugers Arch - Eur J Physiol*. 1 avr 2008;456(1):237-245.
35. Gad M. Mapping cell wall polysaccharides of living microbial cells Using atomic force microscopy. *Cell Biology International*. nov 1997;21(11):697-706.
36. Beaussart A, Alsteens D, El-Kirat-Chatel S, Lipke PN, Kucharíková S, Van Dijck P, *et al*. Single-Molecule Imaging and Functional Analysis of Als Adhesins and Mannans during *Candida albicans* Morphogenesis. *ACS Nano*. 21 déc 2012;6(12):10950-10964.
37. Levin DE. Cell Wall Integrity Signaling in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol. Mol. Biol. Rev*. 6 janv 2005;69(2):262-291.
38. Heinisch JJ, Dupres V, Wilk S, Jendretzki A, Dufrêne YF. Single-Molecule Atomic Force Microscopy Reveals Clustering of the Yeast Plasma-Membrane Sensor Wsc1. *PLoS One*. 14 juin 2010;5(6).
39. Dupres V, Dufrêne YF, Heinisch JJ. Measuring Cell Wall Thickness in Living Yeast Cells Using Single Molecular Rulers. *ACS Nano*. 28 sept 2010;4(9):5498-5504.
40. Alsteens D, Garcia MC, Lipke PN, Dufrêne YF. Force-induced formation and propagation of adhesion nanodomains in living fungal cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 30 nov 2010;107(48):20744-20749.
41. Mora C, Tittensor DP, Adl S, Simpson AGB, Worm B. How Many Species Are There on Earth and in the Ocean? *PLoS Biol*. 23 août 2011;9(8):e1001127.
42. Brown GD, Denning DW, Levitz SM. Tackling human fungal infections. *Science*. 11 mai 2012;336(6082):647.
43. Mayer FL, Wilson D, Hube B. *Candida albicans* pathogenicity mechanisms. *Virulence*. 15 févr 2013;4(2):119-128.
44. Kim KS, Kim Y-S, Han I, Kim M-H, Jung MH, Park H-K. Quantitative and Qualitative Analyses of the Cell Death Process in *Candida albicans* Treated by Antifungal Agents. *PLoS ONE*. 9 déc 2011;6(12):e28176.
45. Kim Y-S, Kim KS, Han I, Kim M-H, Jung MH, Park H-K. Quantitative and Qualitative Analysis of the Antifungal Activity of Allicin Alone and in Combination with Antifungal Drugs. *PLoS One*. 5 juin 2012;7(6).
46. Götzinger M, Weigl B, Peukert W, Sommer K. Effect of roughness on particle adhesion in aqueous solutions: A study of *Saccharomyces cerevisiae* and a silica particle. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. 15 mars 2007;55(1):44-50.

47. Ovchinnikova ES, Krom BP, Busscher HJ, Van der Mei HC. Evaluation of adhesion forces of *Staphylococcus aureus* along the length of *Candida albicans* hyphae. *BMC Microbiol.* 27 nov 2012;12:281.
48. El-Kirat-Chatel S, Dufrêne YF. Nanoscale Imaging of the *Candida*–Macrophage Interaction Using Correlated Fluorescence-Atomic Force Microscopy. *ACS Nano.* 21 déc 2012;6(12):10792–10799.
49. Comitini F, Mannazzu I, Ciani M. *Tetrapisispora phaffii* killer toxin is a highly specific β -glucanase that disrupts the integrity of the yeast cell wall. *Microbial Cell Factories.* 27 oct 2009;8(1):55.
50. Tyagi AK, Malik A. In situ SEM, TEM and AFM studies of the antimicrobial activity of lemon grass oil in liquid and vapour phase against *Candida albicans*. *Micron.* oct 2010;41(7):797–805.
51. Beech IB, Smith JR, Steele AA, Penegar I, Campbell SA. The use of atomic force microscopy for studying interactions of bacterial biofilms with surfaces. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces.* févr 2002;23(2–3):231–247.
52. Touhami A, Jericho MH, Boyd JM, Beveridge TJ. Nanoscale Characterization and Determination of Adhesion Forces of *Pseudomonas aeruginosa* Pili by Using Atomic Force Microscopy. *J. Bacteriol.* 15 janv 2006;188(2):370–377.
53. Rheinlaender J, Gräbner A, Ott L, Burkovski A, Schäffer TE. Contour and persistence length of *Corynebacterium diphtheriae* pili by atomic force microscopy. *Eur Biophys J.* 1 juin 2012;41(6):561–570.
54. Tripathi P, Dupres V, Beaussart A, Lebeer S, Claes IJJ, Vanderleyden J, *et al.* Deciphering the Nanometer-Scale Organization and Assembly of *Lactobacillus rhamnosus* GG Pili Using Atomic Force Microscopy. *Langmuir.* 31 janv 2012;28(4):2211–2216.
55. Gillis A, Dupres V, Mahillon J, Dufrêne YF. Atomic force microscopy: A powerful tool for studying bacterial swarming motility. *Micron.* déc 2012;43(12):1304–1311.
56. Gillis A, Dupres V, Delestrait G, Mahillon J, Dufrêne YF. Nanoscale imaging of *Bacillus thuringiensis* flagella using atomic force microscopy. *Nanoscale.* 16 févr 2012;4(5):1585–1591.
57. Chang K-C, Cheng S-J, Chen Y-C, Huang H-R, Liou J-W. Nanoscopic analysis on pH induced morphological changes of flagella in *Escherichia coli*. *Journal of Microbiology, Immunology and Infection.* 2012;(in press).
58. Su H-N, Chen Z-H, Liu S-B, Qiao L-P, Chen X-L, He H-L, *et al.* Characterization of Bacterial Polysaccharide Capsules and Detection in the Presence of Deliquescent Water by Atomic Force Microscopy. *Appl. Environ. Microbiol.* 5 janv 2012;78(9):3476–3479.
59. Stukalov O, Korenevsky A, Beveridge TJ, Dutcher JR. Use of Atomic Force Microscopy and Transmission Electron Microscopy for Correlative Studies of Bacterial Capsules. *Appl. Environ. Microbiol.* 9 janv 2008;74(17):5457–5465.
60. Suo Z, Yang X, Avci R, Kellerman L, Pascual DW, Fries M, *et al.* HEPES-Stabilized Encapsulation of *Salmonella typhimurium*. *Langmuir.* 1 janv 2007;23(3):1365–1374.

61. Coldren FM, Palavecino EL, Levi-Polyachenko NH, Wagner WD, Smith TL, Smith BP, *et al.* Encapsulated *Staphylococcus aureus* strains vary in adhesiveness assessed by atomic force microscopy. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*. 2009;89A(2):402-10.
62. Dupres V, Alsteens D, Pauwels K, Dufrêne YF. In Vivo Imaging of S-Layer Nanoarrays on *Corynebacterium glutamicum*. *Langmuir*. 30 juill 2009;25(17):9653-9655.
63. Tang J, Ebner A, Kraxberger B, Leitner M, Hykollari A, Kepplinger C, *et al.* Detection of metal binding sites on functional S-layer nanoarrays using single molecule force spectroscopy. *Journal of Structural Biology*. oct 2009;168(1):217-222.
64. Horejs C, Ristl R, Tscheliessnig R, Sleytr UB, Pum D. Single-molecule Force Spectroscopy Reveals the Individual Mechanical Unfolding Pathways of a Surface Layer Protein. *J. Biol. Chem.* 8 mai 2011;286(31):27416-27424.
65. Saif Zaman M, Goyal A, Prakash Dubey G, Gupta PK, Chandra H, Das TK, *et al.* Imaging and analysis of *Bacillus anthracis* spore germination. *Microscopy Research and Technique*. 2005;66(6):307-11.
66. Plomp M, Leighton TJ, Wheeler KE, Pitesky ME, Malkin AJ. *Bacillus atrophaeus* Outer Spore Coat Assembly and Ultrastructure. *Langmuir*. 1 nov 2005;21(23):10710-10716.
67. Pinzón-Arango PA, Scholl G, Nagarajan R, Mello CM, Camesano TA. Atomic force microscopy study of germination and killing of *Bacillus atrophaeus* spores. *Journal of Molecular Recognition*. 2009;22(5):373-9.
68. Plomp M, Leighton TJ, Wheeler KE, Hill HD, Malkin AJ. In vitro high-resolution structural dynamics of single germinating bacterial spores. *PNAS*. 6 mai 2007;104(23):9644-9649.
69. Francius G, Polyakov P, Merlin J, Abe Y, Ghigo J-M, Merlin C, *et al.* Bacterial Surface Appendages Strongly Impact Nanomechanical and Electrokinetic Properties of *Escherichia coli* Cells Subjected to Osmotic Stress. *PLoS ONE*. 31 mai 2011;6(5):e20066.
70. Schaer-Zammaretti P, Ubbink J. Imaging of lactic acid bacteria with AFM—elasticity and adhesion maps and their relationship to biological and structural data. *Ultramicroscopy*. oct 2003;97(1-4):199-208.
71. Gaboriaud F, Bailet S, Dague E, Jorand F. Surface Structure and Nanomechanical Properties of *Shewanella putrefaciens* Bacteria at Two pH values (4 and 10) Determined by Atomic Force Microscopy. *J. Bacteriol.* 6 janv 2005;187(11):3864-3868.
72. Cerf A, Cau J-C, Vieu C, Dague E. Nanomechanical Properties of Dead or Alive Single-Patterned Bacteria. *Langmuir*. 31 mars 2009;25(10):5731-5736.
73. Roduit C, Saha B, Alonso-Sarduy L, Volterra A, Dietler G, Kasas S. OpenFovea: open-source AFM data processing software. *Nature Methods*. 2012;9(8):774-775.
74. Longo G, Rio LM, Roduit C, Trampuz A, Bizzini A, Dietler G, *et al.* Force volume and stiffness tomography investigation on the dynamics of stiff material under bacterial membranes. *J. Mol. Recognit.* 2012;25(5):278-284.
75. Dubrovin EV, Voloshin AG, Kraevsky SV, Ignatyuk TE, Abramchuk SS, Yaminsky IV, *et al.* Atomic Force Microscopy Investigation of Phage Infection of Bacteria. *Langmuir*. 18 nov 2008;24(22):13068-13074.

76. Dubrovin EV, Popova AV, Kraevskiy SV, Ignatov SG, Ignatyuk TE, Yaminsky IV, *et al.* Atomic Force Microscopy Analysis of the *Acinetobacter baumannii* Bacteriophage AP22 Lytic Cycle. *PLoS ONE*. 11 oct 2012;7(10):e47348.
77. Verbelen C, Dufrêne YF. Direct measurement of *Mycobacterium*–fibronectin interactions. *Integr. Biol.* 30 mars 2009;1(4):296-300.
78. Dague E, Le DTL, Zanna S, Marcus P, Loubière P, Mercier-Bonin M. Probing In Vitro Interactions between *Lactococcus lactis* and Mucins Using AFM. *Langmuir*. 11 juin 2010;26(13):11010-11017.
79. Le DTL, Guérardel Y, Loubière P, Mercier-Bonin M, Dague E. Measuring Kinetic Dissociation/Association Constants Between *Lactococcus lactis* Bacteria and Mucins Using Living Cell Probes. *Biophysical Journal*. 7 déc 2011;101(11):2843-2853.
80. Firtel M, Henderson G, Sokolov I. Nanosurgery: observation of peptidoglycan strands in *Lactobacillus helveticus* cell walls. *Ultramicroscopy*. nov 2004;101(2–4):105-109.
81. Andre G, Kulakauskas S, Chapot-Chartier M-P, Navet B, Deghorain M, Bernard E, *et al.* Imaging the nanoscale organization of peptidoglycan in living *Lactococcus lactis* cells. *Nat Commun*. 2010;1:27.
82. Wheeler R, Mesnage S, Boneca IG, Hobbs JK, Foster SJ. Super-resolution microscopy reveals cell wall dynamics and peptidoglycan architecture in ovococcal bacteria. *Molecular Microbiology*. 2011;82(5):1096-109.
83. Hayhurst EJ, Kailas L, Hobbs JK, Foster SJ. Cell wall peptidoglycan architecture in *Bacillus subtilis*. *PNAS*. 23 sept 2008;105(38):14603-14608.
84. Francius G, Lebeer S, Alsteens D, Wildling L, Gruber HJ, Hols P, *et al.* Detection, Localization, and Conformational Analysis of Single Polysaccharide Molecules on Live Bacteria. *ACS Nano*. 23 sept 2008;2(9):1921-1929.
85. Strauss J, Burnham NA, Camesano TA. Atomic force microscopy study of the role of LPS O-antigen on adhesion of *E. coli*. *Journal of Molecular Recognition*. 2009;22(5):347-55.
86. Tang J, Krajcikova D, Zhu R, Ebner A, Cutting S, Gruber HJ, *et al.* Atomic force microscopy imaging and single molecule recognition force spectroscopy of coat proteins on the surface of *Bacillus subtilis* spore. *Journal of Molecular Recognition*. 2007;20(6):483-9.
87. Plomp M, Malkin AJ. Mapping of Proteomic Composition on the Surfaces of *Bacillus* Spores by Atomic Force Microscopy-Based Immunolabeling. *Langmuir*. 6 janv 2009;25(1):403-409.
88. Dupres V, Menozzi FD, Loch C, Clare BH, Abbott NL, Cuenot S, *et al.* Nanoscale mapping and functional analysis of individual adhesins on living bacteria. *Nature Methods*. 22 juin 2005;2(7):515-520.
89. Grare M. De la génèse d'une nouvelle classe d'antibactériens à base de polyphénols cycliques de type calixarène. Etudes moléculaire(s), cellulaire(s), et structurale(s) en vue de l'identification des cibles d'action: le cas du para-guanidinoéthylcalix[4]arène. Université Henri Poincaré, Nancy-I; 2009.
90. Formosa C, Grare M, Duval RE, Dague E. Nanoscale effects of antibiotics on *P. aeruginosa*. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*. janv 2012;8(1):12-16.

91. Braga PC, Ricci D. Atomic Force Microscopy: Application to Investigation of *Escherichia coli* Morphology before and after Exposure to Cefodizime. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 1 janv 1998;42(1):18-22.
92. Ouberai M, El Garch F, Bussiere A, Riou M, Alsteens D, Lins L, *et al.* The *Pseudomonas aeruginosa* membranes: A target for a new amphiphilic aminoglycoside derivative? *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*. juin 2011;1808(6):1716-1727.
93. Montero MT, Pijoan M, Merino-Montero S, Vinuesa T, Hernández-Borrell J. Interfacial Membrane Effects of Fluoroquinolones as Revealed by a Combination of Fluorescence Binding Experiments and Atomic Force Microscopy Observations. *Langmuir*. 29 juill 2006;22(18):7574-7578.
94. Francius G, Domenech O, Mingeot-Leclercq MP, Dufrêne YF. Direct Observation of *Staphylococcus aureus* Cell Wall Digestion by Lysostaphin. *Journal of Bacteriology*. 15 déc 2008;190(24):7904-7909.
95. Gilbert Y, Deghorain M, Wang L, Xu B, Pollheimer PD, Gruber HJ, *et al.* Single-Molecule Force Spectroscopy and Imaging of the Vancomycin/d-Ala-d-Ala Interaction. *Nano Lett*. 23 févr 2007;7(3):796-801.
96. Wu Y, Zhou A. In situ, real-time tracking of cell wall topography and nanomechanics of antimycobacterial drugs treated *Mycobacterium JLS* using atomic force microscopy. *Chem. Commun*. 10 nov 2009;(45):7021-7023.
97. Verbelen C, Dupres V, Menozzi FD, Raze D, Baulard AR, Hols P, *et al.* Ethambutol-induced alterations in *Mycobacterium bovis* BCG imaged by atomic force microscopy. *FEMS Microbiology Letters*. 2006;264(2):192-7.
98. Soon RL, Nation RL, Harper M, Adler B, Boyce JD, Tan C-H, *et al.* Effect of colistin exposure and growth phase on the surface properties of live *Acinetobacter baumannii* cells examined by atomic force microscopy. *International Journal of Antimicrobial Agents*. déc 2011;38(6):493-501.
99. Soon RL, Nation RL, Hartley PG, Larson I, Li J. Atomic Force Microscopy Investigation of the Morphology and Topography of Colistin-Heteroresistant *Acinetobacter baumannii* Strains as a Function of Growth Phase and in Response to Colistin Treatment. *Antimicrob Agents Chemother*. déc 2009;53(12):4979-4986.
100. Mortensen NP, Fowlkes JD, Sullivan CJ, Allison DP, Larsen NB, Molin S, *et al.* Effects of Colistin on Surface Ultrastructure and Nanomechanics of *Pseudomonas aeruginosa* Cells. *Langmuir*. 19 févr 2009;25(6):3728-3733.
101. Junior A da S, Teschke O. Dynamics of the Antimicrobial Peptide PGLa Action on *Escherichia coli* Monitored by Atomic Force Microscopy. *World J Microbiol Biotechnol*. 1 oct 2005;21(6-7):1103-1110.
102. Meincken M, Holroyd DL, Rautenbach M. Atomic Force Microscopy Study of the Effect of Antimicrobial Peptides on the Cell Envelope of *Escherichia coli*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. oct 2005;49(10):4085-4092.
103. Li A, Lee PY, Ho B, Ding JL, Lim CT. Atomic force microscopy study of the antimicrobial action of Sushi peptides on Gram negative bacteria. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*. mars 2007;1768(3):411-418.

104. Francius G, Dufour S, Deleu M, Paquot M, Mingeot-Leclercq M-P, Dufrêne YF. Nanoscale membrane activity of surfactins: Influence of geometry, charge and hydrophobicity. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*. oct 2008;1778(10):2058-2068.
105. Arseneault M, Bédard S, Boulet-Audet M, Pézolet M. Study of the Interaction of Lactoferricin B with Phospholipid Monolayers and Bilayers. *Langmuir*. 2 mars 2010;26(5):3468-3478.
106. Flores CY, Diaz C, Rubert A, Benítez GA, Moreno MS, Fernández Lorenzo de Mele MA, *et al.* Spontaneous adsorption of silver nanoparticles on Ti/TiO₂ surfaces. Antibacterial effect on *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Colloid and Interface Science*. 15 oct 2010;350(2):402-408.
107. Gopinath V, MubarakAli D, Priyadarshini S, Priyadharsshini NM, Thajuddin N, Velusamy P. Biosynthesis of silver nanoparticles from *Tribulus terrestris* and its antimicrobial activity: A novel biological approach. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. 1 août 2012;96:69-74.
108. Suresh AK, Pelletier DA, Wang W, Moon J-W, Gu B, Mortensen NP, *et al.* Silver Nanocrystallites: Biofabrication using *Shewanella oneidensis*, and an Evaluation of Their Comparative Toxicity on Gram-negative and Gram-positive Bacteria. *Environ. Sci. Technol.* 1 juill 2010;44(13):5210-5215.
109. Pramanik A, Laha D, Bhattacharya D, Pramanik P, Karmakar P. A novel study of antibacterial activity of copper iodide nanoparticle mediated by DNA and membrane damage. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. 1 août 2012;96(0):50-55.
110. Grare M, Mourer M, Fontanay S, Regnouf-de-Vains J-B, Finance C, Duval RE. In vitro activity of para-guanidinoethylcalix[4]arene against susceptible and antibiotic-resistant Gram-negative and Gram-positive bacteria. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 1 sept 2007;60(3):575-581.
111. Formosa C, Grare M, Jauvert E, Coutable A, Regnouf-de-Vains JB, Mourer M, *et al.* Nanoscale analysis of the effects of antibiotics and CX1 on a *Pseudomonas aeruginosa* multidrug-resistant strain. *Sci. Rep.* [Internet]. 14 août 2012;2. Disponible sur: <http://dx.doi.org/10.1038/srep00575>
112. Mourer M, Duval RE, Finance C, Regnouf-de-Vains J-B. Functional organisation and gain of activity: The case of the antibacterial tetra-para-guanidinoethyl-calix[4]arene. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*. 1 juin 2006;16(11):2960-2963.
113. Mourer M, Massimba Dibama H, Constant P, Daffé M, Regnouf-de-Vains J-B. Antimycobacterial activities of some cationic and anionic calix[4]arene derivatives. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*. 15 mars 2012;20(6):2035-2041.
114. Patel MB, Modi NR, Raval JP, Menon SK. Calix[4]arene based 1,3,4-oxadiazole and thiadiazole derivatives: Design, synthesis, and biological evaluation. *Org. Biomol. Chem.* 9 févr 2012;10(9):1785-1794.
115. Liu S, Ng AK, Xu R, Wei J, Tan CM, Yang Y, *et al.* Antibacterial action of dispersed single-walled carbon nanotubes on *Escherichia coli* and *Bacillus subtilis* investigated by atomic force microscopy. *Nanoscale*. 1 déc 2010;2(12):2744-2750.
116. Eaton P, Fernandes JC, Pereira E, Pintado ME, Xavier Malcata F. Atomic force microscopy study of the antibacterial effects of chitosans on *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. *Ultramicroscopy*. sept 2008;108(10):1128-1134.

117. Fernandes JC, Eaton P, Gomes AM, Pintado ME, Xavier Malcata F. Study of the antibacterial effects of chitosans on *Bacillus cereus* (and its spores) by atomic force microscopy imaging and nanoindentation. *Ultramicroscopy*. juill 2009;109(8):854-860.
118. Kobiela T, Lelen-Kaminska K, Stepulak M, Lekka M, Malejczyk M, Arct J, *et al.* The influence of surfactants and hydrolyzed proteins on keratinocytes viability and elasticity. *Skin Res Technol*. févr 2013;19(1):e200-208.
119. Wang Q, Wang M, Li S, Xing X, Liu X, Dong S, *et al.* AFM detection of mitogen-induced morphological changes in human B lymphocyte. *Scanning*. févr 2012;34(1):60-67.
120. Zhang X, Wojcikiewicz EP, Moy VT. Dynamic adhesion of T lymphocytes to endothelial cells revealed by atomic force microscopy. *Exp. Biol. Med.* (Maywood). sept 2006;231(8):1306-1312.
121. Pfister G, Stroh CM, Perschinka H, Kind M, Knoflach M, Hinterdorfer P, *et al.* Detection of HSP60 on the membrane surface of stressed human endothelial cells by atomic force and confocal microscopy. *J. Cell. Sci.* 15 avr 2005;118(Pt 8):1587-1594.
122. Beckmann M, Kolb HA, Lang F. Atomic force microscopy of peritoneal macrophages after particle phagocytosis. *J. Membr. Biol.* juin 1994;140(3):197-204.
123. Fritz M, Radmacher M, Gaub HE. Granula motion and membrane spreading during activation of human platelets imaged by atomic force microscopy. *Biophys. J.* mai 1994;66(5):1328-1334.
124. Han S-W, Mieda S, Nakamura C, Kihara T, Nakamura N, Miyake J. Successive detection of insulin-like growth factor-II bound to receptors on a living cell surface using an AFM. *J. Mol. Recognit.* févr 2011;24(1):17-22.
125. Qiu D, Xiang J, Li Z, Krishnamoorthy A, Chen L, Wang R. Profiling TRA-1-81 antigen distribution on a human embryonic stem cell. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2 mai 2008;369(2):735-740.
126. Sugawara Y, Ando R, Kamioka H, Ishihara Y, Murshid SA, Hashimoto K, *et al.* The alteration of a mechanical property of bone cells during the process of changing from osteoblasts to osteocytes. *Bone*. juill 2008;43(1):19-24.
127. Domke, Dannöhl, Parak, Müller, Aicher, Radmacher. Substrate dependent differences in morphology and elasticity of living osteoblasts investigated by atomic force microscopy. *Colloids Surf B Biointerfaces*. 30 déc 2000;19(4):367-379.
128. Cai X, Gao S, Cai J, Wu Y, Deng H. Artesunate induced morphological and mechanical changes of Jurkat cell studied by AFM. *Scanning*. avr 2009;31(2):83-89.
129. Hillebrand U, Hausberg M, Lang D, Stock C, Riethmüller C, Callies C, *et al.* How steroid hormones act on the endothelium--insights by atomic force microscopy. *Pflugers Arch.* avr 2008;456(1):51-60.
130. Yersin A, Hirling H, Kasas S, Roduit C, Kulangara K, Dietler G, *et al.* Elastic properties of the cell surface and trafficking of single AMPA receptors in living hippocampal neurons. *Biophys. J.* 15 juin 2007;92(12):4482-4489.
131. Zuk A, Targosz-Korecka M, Szymonski M. Effect of selected drugs used in asthma treatment on morphology and elastic properties of red blood cells. *Int J Nanomedicine*. 2011;6:249-257.

132. Li Y, Zhang J, Zhang B. Atomic force microscopy study on chlorpromazine-induced morphological changes of living HeLa cells In Vitro. *Scanning*. déc 2009;31(6):259-265.
133. Lasalvia M, Perna G, Mezzenga E, Migliorini E, Lazzarino M, L'abbate N, *et al.* Atomic force microscopy investigation of morphological changes in living keratinocytes treated with HgCl₂ at not cytotoxic doses. *J Microsc*. juill 2011;243(1):40-46.
134. Afrin R, Zohora US, Uehara H, Watanabe-Nakayama T, Ikai A. Atomic force microscopy for cellular level manipulation: imaging intracellular structures and DNA delivery through a membrane hole. *J. Mol. Recognit*. oct 2009;22(5):363-372.
135. Liu Y, Feng J, Shi L, Niu R, Sun Q, Liu H, *et al.* In situ mechanical analysis of cardiomyocytes at nano scales. *Nanoscale*. 7 janv 2012;4(1):99-102.
136. Saenz Cogollo JF, Tedesco M, Martinoia S, Raiteri R. A new integrated system combining atomic force microscopy and micro-electrode array for measuring the mechanical properties of living cardiac myocytes. *Biomed Microdevices*. août 2011;13(4):613-621.
137. Hiesinger W, Brukman MJ, McCormick RC, Fitzpatrick III JR, Frederick JR, Yang EC, *et al.* Myocardial tissue elastic properties determined by atomic force microscopy after stromal cell-derived factor 1 α angiogenic therapy for acute myocardial infarction in a murine model. *The Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery*. avr 2012;143(4):962-966.
138. Genet G, Guilbeau-Frugier C, Honton B, Dague E, Schneider MD, Coatrieux C, *et al.* Ephrin-B1 is a novel specific component of the lateral membrane of the cardiomyocyte and is essential for the stability of cardiac tissue architecture cohesion. *Circ. Res*. 2 mars 2012;110(5):688-700.
139. Lee G-J, Chae S-J, Jeong JH, Lee S-R, Ha S-J, Pak YK, *et al.* Characterization of mitochondria isolated from normal and ischemic hearts in rats utilizing atomic force microscopy. *Micron*. avr 2011;42(3):299-304.
140. Fels J, Jeggle P, Kusche-Vihrog K, Oberleithner H. Cortical actin nanodynamics determines nitric oxide release in vascular endothelium. *PLoS ONE*. 2012;7(7):e41520.
141. Miyazaki H, Hayashi K. Atomic force microscopic measurement of the mechanical properties of intact endothelial cells in fresh arteries. *Med Biol Eng Comput*. juill 1999;37(4):530-536.
142. Chouinard JA, Grenier G, Khalil A, Vermette P. Oxidized-LDL induce morphological changes and increase stiffness of endothelial cells. *Exp. Cell Res*. 1 oct 2008;314(16):3007-3016.
143. Eaton P, Zuzarte-Luis V, Mota MM, Santos NC, Prudêncio M. Infection by Plasmodium changes shape and stiffness of hepatic cells. *Nanomedicine*. janv 2012;8(1):17-19.
144. Lekka M, Laidler P, Gil D, Lekki J, Stachura Z, Hryniewicz AZ. Elasticity of normal and cancerous human bladder cells studied by scanning force microscopy. *Eur. Biophys. J*. 1999;28(4):312-316.
145. Faria EC, Ma N, Gazi E, Gardner P, Brown M, Clarke NW, *et al.* Measurement of elastic properties of prostate cancer cells using AFM. *Analyst*. nov 2008;133(11):1498-1500.
146. Li QS, Lee GYH, Ong CN, Lim CT. AFM indentation study of breast cancer cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun*. 3 oct 2008;374(4):609-613.

147. Iyer S, Gaikwad RM, Subba-Rao V, Woodworth CD, Sokolov I. Atomic force microscopy detects differences in the surface brush of normal and cancerous cells. *Nat Nanotechnol.* juin 2009;4(6):389-393.
148. Rosenbluth MJ, Lam WA, Fletcher DA. Force microscopy of nonadherent cells: a comparison of leukemia cell deformability. *Biophys. J.* 15 avr 2006;90(8):2994-3003.
149. Cross SE, Jin Y-S, Rao J, Gimzewski JK. Nanomechanical analysis of cells from cancer patients. *Nat Nanotechnol.* déc 2007;2(12):780-783.
150. Lekka M, Laidler P, Ignacak J, Łabedz M, Lekki J, Struszczyk H, *et al.* The effect of chitosan on stiffness and glycolytic activity of human bladder cells. *Biochim. Biophys. Acta.* 22 août 2001;1540(2):127-136.
151. Mescola A, Vella S, Scotto M, Gavazzo P, Canale C, Diaspro A, *et al.* Probing cytoskeleton organisation of neuroblastoma cells with single-cell force spectroscopy. *J. Mol. Recognit.* mai 2012;25(5):270-277.
152. Watanabe T, Kuramochi H, Takahashi A, Imai K, Katsuta N, Nakayama T, *et al.* Higher cell stiffness indicating lower metastatic potential in B16 melanoma cell variants and in (-)-epigallocatechin gallate-treated cells. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* 2 févr 2012;
153. Fuhrmann A, Staunton JR, Nandakumar V, Banyai N, Davies PCW, Ros R. AFM stiffness nanotomography of normal, metaplastic and dysplastic human esophageal cells. *Phys Biol.* févr 2011;8(1):015007.
154. Loporatti S, Vergara D, Zacheo A, Vergaro V, Maruccio G, Cingolani R, *et al.* Cytomechanical and topological investigation of MCF-7 cells by scanning force microscopy. *Nanotechnology.* 4 févr 2009;20(5):055103.
155. Docheva D, Padula D, Schieker M, Clausen-Schaumann H. Effect of collagen I and fibronectin on the adhesion, elasticity and cytoskeletal organization of prostate cancer cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 12 nov 2010;402(2):361-366.
156. Alcaraz J, Xu R, Mori H, Nelson CM, Mroue R, Spencer VA, *et al.* Laminin and biomimetic extracellular elasticity enhance functional differentiation in mammary epithelia. *EMBO J.* 5 nov 2008;27(21):2829-2838.
157. Zhao G, Cui J, Qin Q, Zhang J, Liu L, Deng S, *et al.* Mechanical stiffness of liver tissues in relation to integrin $\beta 1$ expression may influence the development of hepatic cirrhosis and hepatocellular carcinoma. *J Surg Oncol.* 1 oct 2010;102(5):482-489.
158. Lamontagne C-A, Grandbois M. PKC-induced stiffening of hyaluronan/CD44 linkage; local force measurements on glioma cells. *Exp. Cell Res.* 15 janv 2008;314(2):227-236.
159. Xu W, Mezencev R, Kim B, Wang L, McDonald J, Sulchek T. Cell stiffness is a biomarker of the metastatic potential of ovarian cancer cells. *PLoS ONE.* 2012;7(10):e46609.
160. Bastatas L, Martinez-Marin D, Matthews J, Hashem J, Lee YJ, Sennoune S, *et al.* AFM nano-mechanics and calcium dynamics of prostate cancer cells with distinct metastatic potential. *Biochim. Biophys. Acta.* juill 2012;1820(7):1111-1120.

161. Parekh A, Ruppender NS, Branch KM, Sewell-Loftin MK, Lin J, Boyer PD, *et al.* Sensing and modulation of invadopodia across a wide range of rigidities. *Biophys. J.* 2 févr 2011;100(3):573-582.
162. Puech P-H, Poole K, Knebel D, Muller DJ. A new technical approach to quantify cell-cell adhesion forces by AFM. *Ultramicroscopy.* juill 2006;106(8-9):637-644.
163. Reeves KJ, Hou J, Higham SE, Sun Z, Trzeciakowski JP, Meininger GA, *et al.* Selective measurement and manipulation of adhesion forces between cancer cells and bone marrow endothelial cells using atomic force microscopy. *Nanomedicine (Lond).* 2 déc 2012;
164. Lekka M, Gil D, Dąbroś W, Jaczevska J, Kulik AJ, Lekki J, *et al.* Characterization of N-cadherin unbinding properties in non-malignant (HCV29) and malignant (T24) bladder cells. *J. Mol. Recognit.* oct 2011;24(5):833-842.
165. Jin H, Pi J, Huang X, Huang F, Shao W, Li S, *et al.* BMP2 promotes migration and invasion of breast cancer cells via cytoskeletal reorganization and adhesion decrease: an AFM investigation. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* févr 2012;93(4):1715-1723.
166. McNamee CE, Armini S, Yamamoto S, Higashitani K. Determination of the binding of non-cross-linked and cross-linked gels to living cells by atomic force microscopy. *Langmuir.* 16 juin 2009;25(12):6977-6984.
167. Ramachandran S, Quist AP, Kumar S, Lal R. Cisplatin nanoliposomes for cancer therapy: AFM and fluorescence imaging of cisplatin encapsulation, stability, cellular uptake, and toxicity. *Langmuir.* 12 sept 2006;22(19):8156-8162.
168. McNamee CE, Aso Y, Yamamoto S, Fukumori Y, Ichikawa H, Higashitani K. Chemical groups that adhere to the surfaces of living malignant cells. *Pharm. Res.* déc 2007;24(12):2370-2380.
169. Sulchek T, Friddle R, Ratto T, Albrecht H, DeNardo S, Noy A. Single-molecule approach to understanding multivalent binding kinetics. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* avr 2009;1161:74-82.
170. Zhang X, Shi X, Xu L, Yuan J, Fang X. Atomic force microscopy study of the effect of HER 2 antibody on EGF mediated ErbB ligand-receptor interaction. *Nanomedicine.* 6 déc 2012;
171. Braet F, Vermijlen D, Bossuyt V, De Zanger R, Wisse E. Early detection of cytotoxic events between hepatic natural killer cells and colon carcinoma cells as probed with the atomic force microscope. *Ultramicroscopy.* nov 2001;89(4):265-273.
172. Corsetto PA, Cremona A, Montorfano G, Jovenitti IE, Orsini F, Arosio P, *et al.* Chemical-physical changes in cell membrane microdomains of breast cancer cells after omega-3 PUFA incorporation. *Cell Biochem. Biophys.* sept 2012;64(1):45-59.
173. Won A, Ruscito A, Ianoul A. Imaging the membrane lytic activity of bioactive peptide latarcin 2a. *Biochim. Biophys. Acta.* déc 2012;1818(12):3072-3080.
174. Wang J, Wan Z, Liu W, Li L, Ren L, Wang X, *et al.* Atomic force microscope study of tumor cell membranes following treatment with anti-cancer drugs. *Biosens Bioelectron.* 15 déc 2009;25(4):721-727.
175. Venkatesan P, Das S, Krishnan MMR, Chakraborty C, Chaudhury K, Mandal M. Effect of AEE788 and/or Celecoxib on colon cancer cell morphology using advanced microscopic techniques. *Micron.* avr 2010;41(3):247-256.

176. Kim KS, Cho CH, Park EK, Jung M-H, Yoon K-S, Park H-K. AFM-Detected Apoptotic Changes in Morphology and Biophysical Property Caused by Paclitaxel in Ishikawa and HeLa Cells. Muller DJ, éditeur. PLoS ONE. 17 janv 2012;7(1):e30066.
177. Wang X-P, Chen T-S, Sun L, Cai J-Y, Wu M-Q, Mok M. Live morphological analysis of taxol-induced cytoplasmic vacuolization [corrected] in human lung adenocarcinoma cells. Micron. déc 2008;39(8):1216-1221.
178. Huang C, Jin H, Song B, Zhu X, Zhao H, Cai J, *et al.* The cytotoxicity and anticancer mechanisms of alterporriol L, a marine bianthraquinone, against MCF-7 human breast cancer cells. Appl. Microbiol. Biotechnol. janv 2012;93(2):777-785.
179. Bai Z, Zhang H, Zhu L, Zuo W, Ye J, Feng J, *et al.* Lithium inhibits cell volume regulation by acting on chloride channels and modifies ultrastructures of the cell membrane in nasopharyngeal carcinoma cells. Eur. J. Pharmacol. 1 sept 2010;641(2-3):88-95.
180. Jiang J, Jin H, Liu L, Pi J, Yang F, Cai J. Curcumin Disturbed Cell-Cycle Distribution of HepG2 Cells via Cytoskeletal Arrangement. Scanning. 15 oct 2012;
181. Ke C, Jin H, Cai J. AFM Studied the Effect of Celastrol on β 1 Integrin-Mediated HUVEC Adhesion and Migration. Scanning. 12 déc 2012;
182. Taranta M, Bizzarri AR, Cannistraro S. Probing the interaction between p53 and the bacterial protein azurin by single molecule force spectroscopy. J. Mol. Recognit. févr 2008;21(1):63-70.
183. Cross SE, Jin Y-S, Lu Q-Y, Rao J, Gimzewski JK. Green tea extract selectively targets nanomechanics of live metastatic cancer cells. Nanotechnology. 27 mai 2011;22(21):215101.
184. Targosz-Korecka M, Biedron R, Szczygiel AM, Brzezinka G, Szczerbinski J, Zuk A. Stiffness changes of tumor HEP2 cells correlates with the inhibition and release of TRAIL-induced apoptosis pathways. J. Mol. Recognit. mai 2012;25(5):299-308.
185. Kaul-Ghanekar R, Singh S, Mamgain H, Jalota-Badhwar A, Paknikar KM, Chattopadhyay S. Tumor suppressor protein SMAR1 modulates the roughness of cell surface: combined AFM and SEM study. BMC Cancer. 2009;9:350.
186. Lekka M, Laidler P, Labeledz M, Kulik AJ, Lekki J, Zajac W, *et al.* Specific detection of glycans on a plasma membrane of living cells with atomic force microscopy. Chem. Biol. mai 2006;13(5):505-512.
187. Cross SE, Jin Y-S, Tondre J, Wong R, Rao J, Gimzewski JK. AFM-based analysis of human metastatic cancer cells. Nanotechnology. 24 sept 2008;19(38):384003.
188. Lekka M. Atomic force microscopy: A tip for diagnosing cancer. Nat Nanotechnol. nov 2012;7(11):691-692.
189. Plodinec M, Loparic M, Monnier CA, Obermann EC, Zanetti-Dallenbach R, Oertle P, *et al.* The nanomechanical signature of breast cancer. Nat Nanotechnol. nov 2012;7(11):757-765.
190. Murphy MF, Lilley F, Lalor MJ, Crosby SR, Madden G, Johnston G, *et al.* Evaluation of a nonlinear Hertzian-based model reveals prostate cancer cells respond differently to force than normal prostate cells. Microsc. Res. Tech. janv 2013;76(1):36-41.

191. Sokolov I, Kalaparthy V, Kreshchuk M, Dokukin ME. On averaging force curves over heterogeneous surfaces in atomic force microscopy. *Ultramicroscopy*. oct 2012;121:16-24.
192. Dague E, Delcorte A, Latge J-P, Dufrene YF. Combined Use of Atomic Force Microscopy, X-ray Photoelectron Spectroscopy, and Secondary Ion Mass Spectrometry for Cell Surface Analysis. *Langmuir*. 1 avr 2008;24(7):2955-2959.
193. Kodera N, Yamamoto D, Ishikawa R, Ando T. Video imaging of walking myosin V by high-speed atomic force microscopy. *Nature*. 4 nov 2010;468(7320):72-76.
194. Fantner GE, Barbero RJ, Gray DS, Belcher AM. Kinetics of antimicrobial peptide activity measured on individual bacterial cells using high-speed atomic force microscopy. *Nat Nanotechnol*. avr 2010;5(4):280-285.

Millisecond and nanosecond pulsed electric field effects on cells and tissues

Electropermeabilization is a physical technique first developed to transfer cytotoxic drugs in tumor. It consists in the transient permeabilization of the plasma membrane following electric field application. In specific electric conditions using long pulses of several milliseconds, the membrane destabilization can allow transferring plasmid DNA into the cell, thus allowing the development of gene therapy. For now, one clinical trial has been published using gene electro-transfer and several others are ongoing. However the efficiency of the technique remains low compared to other transfer methods.

This thesis gets interested in how pulsed electric fields affect cell membranes, in the concrete situation of gene transfer by electroporation. The comprehension of electro-gene transfer process need to be well understood in order to optimize it. In this context, we focus on the 3 barriers that DNA is confronted to during its transfer: first at the cell level: plasma membrane and nuclear envelope, second at the tissue level: the complexity of a multicellular environment. i) We first studied the efficiency of gene transfer on multicellular spheroid model. This work allowed the validation of this model for electro-transfection study, and the further optimization of the technique by raising some of the failures encountered in gene transfer in tissue. ii) The second part of the work has been dedicated to study plasma membrane destabilization due to electroporation by Atomic Force Microscopy. We used both innovating imaging modes and spectroscopy modes to analyze the effects on living cells, which resulted in the measurement of a decrease in elasticity, linked to side effects of electric fields on actin cytoskeleton destabilization. iii) The last part has been dedicated to the effects of nanopulses (nsEP) on both plasma membrane and the second barrier encountered by gene during its transfer, namely nuclear envelope. The effects of these very short (ns) and intense (several kV/cm) pulses have been indeed shown to affect both cell membrane and internal envelope (organelles ones). We first study their effect on membrane using patch-clamp to discriminate in the implication of actin cytoskeleton in nanopores formation. We secondly aimed to study how these nanopulses affect the special structure that is nuclear envelope during gene transfer, for validating their potential use on humans, and their possible role in optimization for gene transfer. P-clamp study revealed that actin is not involved in nanopores formation, and gene transfer one that nsEP do not affect positively transfection efficiency.

Altogether this thesis brings new insights in electropermeabilization mechanisms understanding and barriers for gene transfer in tissue. Methods, models and tools have been set and validated. They are now usable for investigating electric field effect on living organisms.