Introduction générale

Le glioblastome multiforme (GBM) est une tumeur de la glie souvent diagnostiquée et agressive qui affecte le système nerveux central. Extrêmement invasif, il est résistant à tous les traitements connus, avec une survie médiane des patients de 14,6 mois¹. Les thérapies standards actuelles comprennent la résection chirurgicale, la chimiothérapie et radiotherapie².

Les impulsions de champ électrique nanoseconde de forte intensité (nsPEF) ont des durées d'impulsion de 1-300 ns et une intensité de champ électrique de 10 à 100 kV /cm³. Ils ont été proposés en tant que traitement du cancer alternatif et non systémique. Il a été démontré que ces impulsions réduisent la taille des tumeurs lorsqu'elles sont appliquées à des modèles animaux et humains^{4–6} tout en présentant la caractéristiques de stimuler une réponse immunitaire contre les cellules cancéreuses⁷.

Des études *in vitro* ont établi que le nsPEF a de nombreux effets sur les cellules, y compris : la poration de la membrane plasmique, la poration des membranes des organites⁸, la perte du potentiel de la membrane mitochondriale^{9,10}, l'extériorisation de la phosphatidylsérine¹¹, la libération du cytochrome c¹², le clivage du poly ADP ribose polymérase (PARP) ¹³, la fragmentation de l'ADN¹⁴, l'activation de caspases^{13–17} et des pics transitoires dans les concentrations de calcium intracellulaire^{18–20}. Il est suspecté que la mort cellulaire qui en résulte se produit par apoptose.

Étant donné la nécessité d'un traitement GBM efficace, notre groupe de recherche à XLIM s'intéresse à l'application de nsPEF au GBM. Mon travail de doctorat a mis l'accent sur les effets *in vitro* de nsPEF sur une lignée cellulaire de glioblastome humain (U87-MG) dans une première étape pour évaluer son aptitude comme traitement. La détermination de la manière dont le nsPEF agit au niveau sous-cellulaire, dans les cellules de glioblastome, permettra de mieux comprendre comment optimiser le dosage de nsPEF (nombre et amplitude des impulsions et fréquence d'application) et permettre des décisions rationnelles concernant l'utilisation des traitements adjuvant.

Résumé des chapitres expérimentaux

Chapitre 2 : Effets généraux du nsPEF sur les cellules U87-MG Objectifs

De nombreux effets différents du nsPEF sur les cellules ont été publiés et sont résumés dans une récente revue systématique par Napotnik *et al.*²¹. Il est toutefois difficile de comparer les effets rapportés dans les diverses études à cause de l'utilisation de systèmes d'exposition différents, ainsi que des variations de l'intensité du champ, de la durée de l'impulsion, des taux de répétition et enfin des types cellulaires employés. À ce jour, les études bioélectrique sur le glioblastome sont limitées²². Les travaux de ce chapitre visaient à caractériser les effets de notre système d'exposition au nsPEF sur la lignée cellulaire de glioblastome humain U87-MG en examinant trois des principaux effets du nsPEF : la perméabilisation membranaire, les changements de concentration de calcium intracellulaire et la perte du potentiel de la membrane mitochondriale.

Principaux résultats

Nous avons utilisé un système d'exposition à base d'électrodes pour appliquer des nsPEF aux cellules U87 et nous avons observé leurs réponses en temps réel en utilisant des techniques d'imagerie à fluorescence sur cellules vivantes.

Pour mesurer la poration de la membrane, le nsPEF a été appliqué aux cellules dans une solution d'imagerie contenant le colorant YO-PRO-1, dont la fluorescence augmente lors de son interaction avec les acides nucléiques. Ce colorant est incapable de passer à travers des membranes intactes, mais une poration de la membrane cellulaire permet son entrée dans la cellule, puis son interaction avec les acides nucléiques et une augmentation ainsi mesurable de la fluorescence. Après l'application de 100 impulsions de 10 ns de durée à 44 kV/cm et 10 Hz, nous avons observé une augmentation rapide de la fluorescence intracellulaire. La molécule YO-PRO-1 est ainsi entrée du côté anodique de la cellule avant de se répandre à travers la cellule. Nous avons trouvé que la vitesse et l'amplitude de cette réponse dépendaient du nombre d'impulsions appliquées et de la fréquence d'application.

Les taux de calcium intracellulaire ont été mesurés avec les fluorochromes indicateurs de calcium FLUO-4 et Fura Red qui avaient été au préalable chargés dans des cellules U87. L'application de 100 impulsions de 10 ns de durée à 44 kV/cm et 10 Hz a engendré une augmentation rapide et reproductible de la fluorescence de l'indicateur FLUO-4, révélant une élévation des quantités de calcium intracellulaire. La réponse au calcium a continué d'augmenter tout au long de la période d'application de l'impulsion avant de se stabiliser à la fin de cette période pour régresser lentement. D'autres expériences ont montré que cette augmentation du calcium était probablement due à un afflux de calcium provenant de la solution extracellulaire plutôt que des réserves intracellulaires.

Le potentiel de la membrane mitochondriale a été mesuré avec le colorant TMRM qui s'associe aux mitochondries actives. Après l'application de 100 impulsions de 10 ns de durée à 44 kV/cm et 10 Hz, une diminution progressive du potentiel de la membrane mitochondriale ($\Delta \Psi_m$) a été observée. L'application de forces de champ moins fortes a montré que la perte de $\Delta \Psi_m$ présentait une relation dose-réponse avec l'intensité du champ. La perte du $\Delta \Psi_m$ n'était pas due à l'augmentation post-impulsion du calcium ou à l'ouverture du pore de transition de perméabilité mitochondriale (mPTP).

Discussion

L'effet obtenu dans notre système d'exposition nsPEF sur la poration de la membrane plasmique, dans les cellules U87, est en grande partie en accord avec les travaux précédemment publiés montrant que la nanoporation se produit à la suite de l'application de nsPEF, avec un effet bien plus prononcé près des électrodes.

Nos résultats suggèrent que la source de calcium était extracellulaire et non intracellulaire. Bien que ceci soit en accord avec certaines données publiées¹⁰, il est en contradiction avec d'autres qui apportent des preuves de libération de calcium à partir de stocks intracellulaires en plus de l'afflux depuis le milieu extracellulaire^{18–20,23}. Ils sont également en désaccord avec une étude qui postule que les impulsions de 10 ns libèrent plus efficacement les stocks intracellulaires que des impulsions plus longues²⁴.

L'application de 100 impulsions à 10 Hz aux cellules U87 a provoqué immédiatement une diminution progressive de $\Delta \Psi_m$ dans une relation dose-réponse avec le champ électrique appliqué. Un effet dépendant du champ électrique similaire a été décrit avec 600 ns impulsions, en utilisant une seule mesure de temps¹⁰.

En général, notre système d'exposition nsPEF a été capable de reproduire des réponses similaires de nos cellules U87 comme celles qui ont déjà été publiées. Un régime d'application de 100 impulsions de 10 ns de durée à 44 kV/cm et 10 Hz a été caractérisé pour induire des résultats reproductibles dans toutes les réponses cellulaires d'intérêt que nous avons étudiées.

Chapitre 3 : L'effet du nsPEF sur les microtubules Objectifs

Les microtubules sont une cible principale de nombreux traitements de chimiothérapie qui fonctionnent comme antimitotiques. Ces médicaments, cependant, sont administrés tout en arborant une gamme d'effets secondaires, y compris les neuropathies, l'immunosuppression, la myélosuppression et la toxicité gastro-intestinale, certains ont même été liés à une augmentation de l'expression des protéines qui mènent à la résistance tumorale²⁵. Étant donné que la croissance²⁶ et l'orientation^{27–29} des microtubules peuvent être manipulées par des champs électriques, et soutenu par des études antérieures du nsPEF sur les microtubules^{30,31}, ce chapitre vise à davantage explorer les effets du nsPEF sur le réseau de microtubules et sa dynamique de croissance. La perturbation de ce réseau de microtubules par le nsPEF pourrait potentiellement être exploitée comme un antimitotique administré localement avec des effets secondaires systémiques réduits, tout ne limitant les risques de développer une résistance.

Principaux résultats

Les microtubules ont été visualisés dans des cellules U87 exprimant la tubuline-RFP. Nous avons trouvé que 100 impulsions de 10 ns de durée à 44 kV/cm appliquées à 10 Hz provoquaient une diminution de la fluorescence RFP et une perte de la structure fine des microtubules, suggérant

ainsi une dépolymérisation des microtubules. La dynamique des microtubules a été suivie dans les cellules exprimant EB3-GFP. EB3 est une protéine qui se lie aux extrémités des microtubules en croissance et produit un marquage fluorescent qui ressemble à une comète. L'application de 100 impulsions à 10 Hz a provoqué une augmentation rapide et persistante de la longueur de la comète EB3 et une diminution du nombre total de comètes. Cette perturbation de la dynamique des microtubules s'est avérée indépendante du gonflement cellulaire et du calcium, deux facteurs connus pour affecter les microtubules. La microscopie à super résolution a montré une flexion des microtubules, suivie d'une dépolymérisation après exposition aux impulsions.

Discussion

Cette diminution du nombre de comètes, appuyée par la réduction globale de la fluorescence EB3-GFP, implique une diminution de la nucléation et de la polymérisation des microtubules et une augmentation du taux de catastrophe. Cela se traduirait par une diminution globale du nombre de microtubules, qui est soutenu par la réduction de la fluorescence tubuline-RFP suite à l'application d'impulsions. Une augmentation de la taille de la comète EB3 s'est révélée être due à une augmentation de la vitesse de croissance des microtubules³², ce qui suggère que, bien que nous ayons observé une diminution globale du nombre de microtubules de polymérisation, ceux qui persistent dans la polymérisation le font à un rythme plus rapide après exposition au nsPEF. L'augmentation de la vitesse de croissance peut être attribuée soit à une plus forte concentration de tubuline libre³², soit à un gonflement cellulaire³³. Ayant montré qu'aucun gonflement n'est impliqué, la vitesse de croissance accrue est probablement liée à une plus forte concentration de tubuline libre après dépolymérisation des microtubules. La flexion observée des microtubules suivie par la dépolymérisation suggère un effet direct de l'impulsion sur la stabilité des microtubules.

Chapitre 4 : Comparaison entre les indicateurs chimiques et génétiquement encodés du calcium (GECI) et leur application à la compréhension de la réponse du calcium au nsPEF Objectifs

Les indicateurs chimiques sont des outils faciles à utiliser et à ce jour ont été les seuls moyens utilisés pour détecter les changements de calcium intracellulaire post-nsPEF. Tout en exigeant initialement plus d'efforts pour préparer une lignée cellulaire transfectée, les indicateurs de calcium génétiquement encodés (GECI) fournissent une alternative aux indicateurs chimiques. Une fois que la lignée cellulaire a été établie, ils ont le potentiel d'être plus économique et plus rapide, de par leur disponibilité directement à la sortie de l'incubateur, les effets néfastes possibles causés par les incubations à température ambiante longues, qui sont nécessaires pour les indicateurs chimiques, sont ainsi évités.

Les objectifs de ce chapitre sont donc d'évaluer l'utilisation d'indicateurs de calcium génétiquement encodés dans les études de nsPEF afin de confirmer leur potentiel d'utilisation face aux indicateurs chimiques couramment utilisés et d'identifier d'autres avantages qu'ils peuvent présenter.

Principaux résultats

Nous avons examiné d'abord l'effet spatio-temporel de 100 impulsions de 10 ns appliquées à 10 Hz sur deux types différents de GECI (GCaMP5-G qui est lié à la membrane et GCaMP6-S qui est cytosolique) et deux indicateurs chimiques couramment utilisés : FLUO-4 et Fura Red. Pour tous les indicateurs, un changement de fluorescence a pu être observé dans la première seconde de l'application d'impulsions et à l'exception de GCaMP5-G, qui a pris plus de temps, la fluorescence maximale a été atteinte à la fin de la durée d'application de nsPEF (10 secondes). Alors que les trois indicateurs cytosoliques (FLUO-4, Fura Red et GCaMP6-S) indiquent une augmentation globale et uniforme du calcium intracellulaire, la GCaMP5-G, liée à la membrane, a montré une augmentation polaire de la fluorescence, ce qui rappelle nos observations antérieures avec YO-PRO-1, avant de se propager comme une onde à travers la cellule. Des essais supplémentaires avec un indicateur synthétique lié à la membrane (FFP-18) ont également révélé la présence d'une telle onde de propagation.

Nous avons appliqué un nombre croissant d'impulsions à différentes fréquences aux cellules exprimant GCaMP5-G pour détecter un éventuel seuil d'occurrence des ondes et mieux

comprendre la relation dose-réponse entre le nsPEF et les changements de calcium intracellulaire. Nous avons constaté que l'élévation du nombre d'impulsions augmente la quantité totale de changement de fluorescence et que le temps nécessaire pour atteindre la fluorescence maximale dépend de la fréquence d'application. 10 impulsions appliquées à 100 Hz ont été caractérisées comme le seuil nécessaire pour provoquer une onde. La vitesse de l'onde dépendait de la fréquence d'application des impulsions avec des fréquences plus élevées donnant une onde plus rapide. La vague s'est révélée indépendante de l'IP3 qui provoque la libération de calcium induite par le calcium lui-même.

Discussion

L'effet du nsPEF sur les taux de calcium intracellulaire a été largement étudié et rapporté, cependant, aucune étude publiée à ce sujet dans le domaine des nsPEF n'a utilisé des outils de type GECIs. Nous avons comparé la réponse nsPEF en utilisant trois indicateurs de calcium synthétiques disponibles dans le commerce, dont deux sont couramment employés, et deux formes de la GECI GCaMP dans le but d'évaluer la pertinence des GECIs dans les études nsPEF et d'identifier les avantages qu'ils avaient par rapport aux indicateurs synthétiques.

Tous les indicateurs utilisés ont montré une augmentation des taux de calcium intracellulaire après application de nsPEF. GCaMP5-G et FFP-18 sont uniques parmi les indicateurs étudiés en ce sens qu'ils sont membranaires tandis que les autres naviguent libres dans le cytosol. Cette différence peut expliquer l'observation d'une onde de calcium. Comme tous les indicateurs de calcium sont essentiellement des tampons de calcium, ils auront un effet perturbateur sur le signal de calcium sous-jacent. Il a été démontré par des expériences de modélisation que les tampons mobiles de calcium tandis que les tampons immobiles, tels que GCaMP5-G et FFP-18, auront quant à eux peu d'effet³⁴. Ceci a également été vérifié expérimentalement^{35,36} et peut être expliqué par le tampon mobile contribuant à l'équilibre de diffusion, en liant le calcium dans une région et en la libérant dans une autre³⁷. En général, il est convenu que des ondes de calcium ne se produisent pas suite aux nsPEF^{19,38}. Il s'agit de la première étude à étudier la réponse du calcium induite par nsPEF avec un indicateur lié à la membrane et suggère qu'une onde peut se produire, mais qu'elle peut avoir été précédemment masquée par l'usage d'indicateurs mobiles.

Alors que les indicateurs chimiques sont faciles à utiliser, avec des protocoles standards, il y a des avantages à utiliser des GECIs pour étudier les réponses de calcium au nsPEF. Alors que les indicateurs chimiques sont plutôt cytosoliques, les GECIs peuvent être exprimés dans des emplacements subcellulaires spécifiques. Dans cette partie, nous avons exploité l'avantage de leur expression membranaire pour démontrer l'afflux de calcium extracellulaire. La capacité de marquer d'autres emplacements dans la cellule autorise une étude plus détaillée de la réponse au nsPEF. Par exemple, en utilisant un GECI exprimé dans le réticulum endoplasmique, on pourrait résoudre la question d'une perte éventuelle de calcium provenant des stocks intracellulaires après exposition au nsPEF. Les cellules exprimant constitutivement un GECI, une fois établies, sont également des outils immédiatement utilisables à la sortie de l'incubateur, ce qui augmente le débit expérimental et évitent les effets négatifs des incubations à température ambiante. Comme inconvénient, le temps nécessaire pour générer la lignée cellulaire stable peut être long et la procédure doit être répétée pour chaque lignée cellulaire différente d'étude.

Conclusion générale

Le GBM est une maladie dévastatrice affectant les patients mais aussi leur entourage, la recherche de nouveaux traitements plus efficace est un impératif. Le nsPEF est une stratégie clinique prometteuse dans le traitement des cancers de la peau avec des effets secondaires minimes, et désormais de nombreuses recherches s'orientent dans leur application à d'autres types de tumeur. Cette thèse fournit la première description détaillée des effets *in vitro* de nsPEF sur une lignée cellulaire de glioblastome humain (U87-MG) dans le but de fournir des données préliminaires pour appuyer de futures études *in vivo* et des essais éventuels en clinique.

Nous avons d'abord cherché à caractériser trois réponses au nsPEF : (i) la poration de la membrane plasmique, (ii) l'augmentation des niveaux de calcium intracellulaire et (iii) la perte de potentiel de la membrane mitochondriale. Ces réponses ont été comparées avec celles observées et bien documentées dans d'autres types cellulaires et avec d'autres systèmes de délivrance de nsPEF. Nous avons ensuite étudié l'effet moins bien connu de nsPEF sur le réseau de microtubules en utilisant des sondes et des techniques d'imagerie innovantes dans le domaine du

bioélectromagnétisme. Enfin, nous avons évalué l'applicabilité de GCaMP, un type d'indicateur de calcium génétiquement encodé, aux études de nsPEF et nous l'avons comparé à divers indicateurs de calcium chimiques disponibles dans le commerce et couramment utilisés.

Nos résultats mesurant l'entrée de YO-PRO-1, suite à l'application d'un nombre répété d'impulsions, corroborent l'hypothèse largement répandue selon laquelle la nanoporation se produit suite à l'action du nsPEF et que l'effet est plus prononcé à proximité des électrodes.

Nous avons utilisé plusieurs indicateurs de fluorescence pour montrer l'occurrence d'une augmentation rapide de calcium intracellulaire après l'application de nsPEF, avec pour source le calcium extracellulaire. À ce jour, il n'existe pas de travaux publiés sur l'utilisation des GECIs dans la recherche nsPEF. Nous avons montré qu'ils peuvent être des outils utiles avec plusieurs avantages par rapport aux indicateurs chimiques couramment utilisés. L'un des principaux avantages est de pouvoir avoir une expression sous-cellulaire définie de l'indicateur. Des niveaux persistants et élevés de calcium intracellulaire, comme ceux que nous observons après action du nsPEF, sont susceptibles d'avoir un effet négatif important sur la cellule. Nous pouvons citer notamment la modulation de la transcription des gènes, la phosphorylation ou la déphosphorylation des protéines altérant les voies de signalisation, l'échec mitochondrial en raison de l'épuisement métabolique et enfin la perturbation du cytosquelette.

Alors que le travail présenté dans cette thèse montre une perte de potentiel de la membrane mitochondriale après l'application de nsPEF, il n'en identifie pas la cause mécaniste. Les explications possibles incluent : la nanoporation de la membrane mitochondriale, bien que la perte progressive du potentiel semble être en désaccord avec cette hypothèse; l'ouverture d'un canal à travers la membrane mitochondriale, bien qu'il soit peu probable que le mPTP soit impliqué; la libération de protéines pro-apoptotiques des microtubules pendant la dépolymérisation ; ou bien l'épuisement métabolique pourrait également être un candidat, cependant, il semble peu probable dans ce cas d'être lié à l'augmentation des niveaux de calcium.

Nous avons également montré pour la première fois que le nsPEF provoque une dépolymérisation des microtubules et affecte la dynamique de croissance de ces microtubules d'une manière

indépendante du calcium et du gonflement. Une rupture massive du réseau de microtubules est un événement majeur pour la cellule et est susceptible d'avoir d'autres effets importants en aval. Parmi ceux-ci, on peut citer la libération de protéines pro-apoptotiques séquestrées par des microtubules.

Alors que le processus de validation de l'utilisation de nsPEF comme traitement pour le glioblastome sera long et incertain, cette thèse fournit un travail préliminaire pour soutenir une enquête plus approfondie.

References

- 1. Stupp, R. *et al.* Radiotherapy plus Concomitant and Adjuvant Temozolomide for Glioblastoma. *New Engl. J. Med.* **352**, 987–996 (2005).
- 2. Wilson, T. A. *et al.* Glioblastoma multiforme: State of the art and future therapeutics. *Surg. Neurol. Int.* **5**, 64 (2014).
- 3. Beebe, S. J. *et al.* Nanosecond pulsed electric fields: a new stimulus to activate intracellular signaling. *J. Biomed. Biotechnol.* **2005**, 297–300 (2005).
- 4. Beebe, S. J. *et al.* Diverse effects of nanosecond pulsed electric fields on cells and tissues. *DNA Cell Biol.* **22**, 785–96 (2003).
- 5. Beebe, S. J. et al. in Treat. Metastatic Melanoma (Morton, M. R.) (InTech, 2011).
- 6. Nuccitelli, R. *et al.* First-in-human trial of nanoelectroablation therapy for basal cell carcinoma: Proof of method. *Exp. Dermatol.* **23**, 135–137 (2014).
- 7. Nuccitelli, R. *et al.* Non-thermal Nanoelectroablation of UV-induced Murine Melanomas Stimulates an Immune Response. *Pigment cell melanoma Res.* **25**, 618–629 (2012).
- 8. Vernier, P. T. Mitochondrial membrane permeabilization with nanosecond electric pulses. in *33rd Annu. Int. Conf. IEEE Eng. Med. Biol. Soc.* **2011**, 743–5 (2011).
- 9. Napotnik, T. B. *et al.* Nanosecond electric pulses cause mitochondrial membrane permeabilization in Jurkat cells. *Bioelectromagnetics* **33**, 257–64 (2012).
- 10. Beebe, S. J. *et al.* Transient features in nanosecond pulsed electric fields differentially modulate mitochondria and viability. *PLoS One* **7**, e51349 (2012).
- 11. Vernier, P. T. *et al.* Nanoelectropulse-induced phosphatidylserine translocation. *Biophys. J.* **86**, 4040–8 (2004).
- 12. Beebe, S. J. *et al.* Nanosecond, high-intensity pulsed electric fields induce apoptosis in human cells. *FASEB J.* **17**, 1493–5 (2003).
- 13. Pakhomova, O. N. et al. Two modes of cell death caused by exposure to nanosecond

pulsed electric field. PLoS One 8, e70278 (2013).

- 14. Hall, E. H. *et al.* Nanosecond pulsed electric fields induce apoptosis in p53-wildtype and p53-null HCT116 colon carcinoma cells. *Apoptosis* **12**, 1721–31 (2007).
- 15. Beebe, S. J. *et al.* Nanosecond pulsed electric field (nsPEF) effects on cells and tissues: apoptosis induction and tumor growth inhibition. *IEEE Trans. Plasma Sci.* **30**, 286–292 (2002).
- 16. Vernier, P. T. *et al.* 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 (2003).
- 17. Ren, W. *et al.* Nanosecond pulsed electric fields (nsPEFs) activate intrinsic caspasedependent and caspase-independent cell death in Jurkat cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **421**, 808–12 (2012).
- 18. Semenov, I. *et al.* Primary pathways of intracellular Ca(2+) mobilization by nanosecond pulsed electric field. *Biochim. Biophys. Acta* **1828**, 981–9 (2013).
- 19. Vernier, P. T. et al. Calcium bursts induced by nanosecond electric pulses. Biochem. Biophys. Res. Commun. **310**, 286–295 (2003).
- 20. White, J. A. *et al.* Stimulation of capacitative calcium entry in HL-60 cells by nanosecond pulsed electric fields. *J. Biol. Chem.* **279**, 22964–72 (2004).
- 21. Batista Napotnik, T. *et al.* Effects of high voltage nanosecond electric pulses on eucaryotic cells (in vitro): A systematic review. *Bioelectrochemistry* **110**, 1–12 (2016).
- 22. Yin, D. *et al.* Cutaneous papilloma and squamous cell carcinoma therapy utilizing nanosecond pulsed electric fields (nsPEF). *PLoS One* **7**, e43891 (2012).
- 23. Beier, H. T. *et al.* Resolving the spatial kinetics of electric pulse-induced ion release. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **423**, 863–6 (2012).
- 24. Semenov, I. *et al.* Recruitment of the intracellular Ca2+ by ultrashort electric stimuli: the impact of pulse duration. *Cell Calcium* **54**, 145–50 (2013).
- 25. Stanton, R. *et al.* Drugs that target dynamic microtubules: A new molecular prospective. *Med. Res. Rev.* **31**, 443–481 (2012).
- 26. Kirson, E. D. *et al.* Disruption of Cancer Cell Replication by Alternating Electric Fields. *Cancer Res.* **64**, 3288–3295 (2004).
- 27. Kim, T. *et al.* Active alignment of microtubules with electric fields. *Nano Lett.* **7**, 211–7 (2007).
- 28. Stracke, R. *et al.* Analysis of the migration behaviour of single microtubules in electric fields. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **293**, 602–609 (2002).
- 29. Böhm, K. J. et al. Movement and Alignment of Microtubules in Electric Fields and

Electric-Dipole-Moment Estimates. Electromagn. Biol. Med. 24, 319–330 (2005).

- 30. Kühn, S. *et al.* Nanosecond electric pulses affect a plant-specific kinesin at the plasma membrane. *J. Membr. Biol.* **246**, 927–38 (2013).
- 31. Thompson, G. L. *et al.* Calcium influx affects intracellular transport and membrane repair following nanosecond pulsed electric field exposure. *J. Biomed. Opt.* **19**, 055005 (2014).
- 32. Bieling, P. *et al.* Reconstitution of a microtubule plus-end tracking system in vitro. *Nature* **450**, 1100–5 (2007).
- 33. Jensen, B. *et al.* Osmotic stress induces rapid cytoskeletal reorganization in human retinal pigment epithelial cells in a manner dependent on the microtubule plus end tracking proteins EB1 and EB3. *Acta Physiol.* **198**, (2010).
- 34. Tsai, J.-C. *et al.* Are buffers boring? Uniqueness and asymptotical stability of traveling wave fronts in the buffered bistable system. *J. Math. Biol.* **54**, 513–53 (2007).
- 35. Nuccitelli, R. *et al.* The Sperm-Induced Ca2+ Wave Following Fertilization of the Xenopus Egg Requires the Production of Ins(1,4,5)P3. *Dev. Biol.* **158**, 200–212 (1993).
- 36. Alonso, M. T. *et al.* Fura-2 antagonises calcium-induced calcium release. *Cell Biochem. Biophys.* **33**, 27–35 (2003).
- 37. Oheim, M. *et al.* New red-fluorescent calcium indicators for optogenetics, photoactivation and multi-color imaging. *Biochim. Biophys. Acta* **1843**, 2284–306 (2014).
- 38. Semenov, I. *et al.* Diffuse, non-polar electropermeabilization and reduced propidium uptake distinguish the effect of nanosecond electric pulses. *Biochim. Biophys. Acta* **1848**, 2118–25 (2015).