



Potentiel des nanoparticules conductrices à amplifier le champ électrique local pour l'optimisation de l'électroporation et ses applications médicales

Amina Ghorbel

► To cite this version:

Amina Ghorbel. Potentiel des nanoparticules conductrices à amplifier le champ électrique local pour l'optimisation de l'électroporation et ses applications médicales. Cancer. Université Paris-Saclay, 2020. Français. NNT : 2020UPASQ006 . tel-03282679

HAL Id: tel-03282679

<https://theses.hal.science/tel-03282679>

Submitted on 9 Jul 2021

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.

Potentiel des nanoparticules conductrices à amplifier le champ électrique local pour l'optimisation de l'électroporation et ses applications médicales

Thèse de doctorat de l'université Paris-Saclay

École doctorale n°569 : Innovation thérapeutique : du fondamental à l'appliqué
(ITFA)

Spécialité de doctorat : pharmacotechnie et biopharmacie

Unité de recherche : Université Paris-Saclay, CNRS, Institut Gustave Roussy, Aspects
métaboliques et systémiques de l'oncogenèse pour de nouvelles approches thérapeutiques,
94805, Villejuif, France

Référent : Faculté de pharmacie

**Thèse présentée et soutenue à Villejuif, le 28 septembre 2020,
par**

Amina GHORBEL

Composition du Jury

François TREUSSART

Professeur, CNRS UMR 8502

Marie-Pierre ROLS

DR, CNRS UMR 5089

Yann PERCHERANCIER

CR, HDR, CNRS UMR 5218

Tomás GARCIA-SANCHEZ

Chercheur, Universitat Pompeu Fabra (UPF)

Président

Rapporteur

Rapporteur

Examineur

Lluís M MIR

DRCE, CNRS UMR 9018

Franck M ANDRE

CRCN, CNRS UMR 9018

Directeur de thèse

Co-Directeur de thèse

REMERCIEMENTS

Je voudrais tout d'abord remercier mon directeur de thèse Dr Lluís Mir, qui m'a accueillie pendant plus de 3 ans au sein de son laboratoire. Je tiens à lui exprimer ma profonde et sincère gratitude pour ses qualités d'encadrement et ses conseils éclairés qu'il m'a prodigués pour la réalisation de cette thèse. Je le remercie de m'avoir offert l'opportunité de faire plusieurs congrès et de m'avoir financée le complément de ma bourse qui m'a permis de réaliser cette thèse.

J'adresse mes remerciements les plus respectueux aux membres du jury pour m'avoir fait l'honneur d'évaluer mes travaux et de discuter les résultats. Je remercie ainsi Dr Marie-Pierre Rols et Dr Yann Percherancier pour avoir consenti à être les rapporteurs de cette thèse ; et le Professeur François Treussart pour avoir accepté d'en être les examinateurs.

Je remercie chaleureusement le Dr Franck André, mon co-directeur de thèse, pour les nombreuses discussions scientifiques et pour m'avoir fait partager ses connaissances qui touchent à plusieurs domaines. Merci pour ta disponibilité, ton soutien permanent et ta bonne humeur à toute épreuve. Merci à Tomas, sans qui ce projet de thèse n'aurait pas vu le jour. Merci de m'avoir accompagnée au début de cette aventure. Merci pour tes conseils et démarches scientifiques.

Mes plus profonds remerciements vont à mon équipe pour leur contribution à ce travail, pour leur aide, leur soutien indéfectible et pour la bonne ambiance quotidienne. A Thai Hoa tout d'abord, avec qui cette aventure a commencé. Nous nous sommes soutenues à toutes les épreuves et nous nous sommes serrées les coudes tout au long de nos thèses. Merci d'avoir été là chaque jour et de m'avoir tant aidée aussi bien professionnellement que personnellement. Nos différences de caractères et de cultures n'ont fait que renforcer notre relation et nous ont permis de nous considérer plus que des collègues. Tu fais partie des gens qui m'ont toujours redonné l'envie d'aller jusqu'au bout dans les mauvais moments et qui m'ont aidée à persévérer. Un grand merci à Leslie, pour son extrême gentillesse, sa joie, les rires et le soutien qu'elle m'a apporté à chaque instant depuis qu'elle est arrivée. Tu es une personne en or et je suis tellement contente d'avoir partagé une année de ma thèse avec toi et surtout de t'avoir à jamais dans ma vie. Avec beaucoup de gratitude, je remercie Caterina

Merla, pour m'avoir transmis ses connaissances techniques et scientifiques en Master 2. Merci pour ton encadrement dans la bonne humeur, ta compréhension et ton encouragement à faire cette thèse. Tu resteras la plus douce et gentille des encadrants. Merci à tous les membres de l'ancienne unité UMR 8203 : Hanna, Suzan, Marie, Léna, Linda et Adeline.

Je remercie Isabelle Croquison pour son aide et sa disponibilité pour la gestion de la partie administrative. Vivre loin de ses parents n'est pas simple, toi qui m'as comprise le mieux et qui n'as pas cessé de me pousser vers l'avant plus particulièrement dans mes moments difficiles. Je te remercie du fond du cœur pour nos discussions, tes conseils et ta joie de vivre. Je remercie également Jean-Rémi Bertrand et Giorgia Urbinati pour leur expertise et leur aide dans le monde des nanoparticules, merci pour toutes les clarifications et les connaissances que vous m'avez transmises. Merci à Céline pour ta bonne humeur et tes conseils pour les voyages. Je serais ta première cliente si tu ouvres ta propre agence de voyage. Merci à toi et à tous les trajets partagés ensemble, tu étais ma collègue de galère qui attend désespérément chaque matin le bus 380.

Pendant ma thèse, j'ai pu compter sur l'expertise des membres de la plateforme de microscopie électronique. Merci à Sylvie Souquère pour ta disponibilité, ta présence et tes images qui m'ont servies tout au long de ma thèse. Merci aussi à Melanie Polrot, membre de la plateforme d'évaluation pré-clinique. Merci pour tout le temps que tu as consacré pour mes longues manip avec « la grosse machine ». Merci pour ta bonne humeur, j'ai apprécié travailler avec toi malgré la surexcitation des 55 souris.

Merci au ministère d'enseignement supérieur de la Tunisie de m'avoir accordé la chance de mener un doctorat de sciences en m'attribuant cette bourse.

Je remercie tous les membres de la nouvelle unité METSY : Tram, Alberto, Melanie, Diego, Aurore... J'adresse un remerciement tout particulier à Kenzou, Camille, Valentin et Florian, pour leur présence et pour la bonne humeur quotidienne. Vous avez rendu ma 3^{ème} année de thèse plaisante et agréable. Merci à Camille pour ton soutien et ton aide pour la mise en forme de ma thèse. Merci pour ta présence et tes conseils, tu es une personne en 'OR', gardes ça bien dans la tête. Merci à Kenzou pour nos discussions et nos échanges. Tu es élue la meilleure pâtissière du laboratoire, comme Céline, si tu montes ta propre pâtisserie je te promets que je serais ta première cliente. Merci pour tous les gâteaux algériens que tu as partagés avec nous. Tu resteras la meilleure Kenzou que j'ai pu rencontrer merci à toi. Valentin et Florian, les inséparables, restez comme vous êtes. J'ai été très chanceuse de pouvoir vous rencontrer et partager mes repas quotidiens avec vous. Merci à tous les fou-

rires, les confidences et les sorties partagées ensemble. Valou, merci pour toutes les soirées et merci de m'avoir fait connaître Chlamedia, miss Géorgie. Je te promets qu'on va revenir un jour donner à manger aux poissons de la Seine !

Je remercie également ma belle-famille pour leur soutien et leur présence. Merci Manuella et Jean-Marc d'être là pour moi et de me traiter comme votre fille. Un grand merci à Elisa, Hugo, Clément et Carine pour toutes les parties de time up et de Molki.

J'adresse un grand merci à mes amies de longue date : Teyssir, Imène, Menel et Syrine. Merci pour votre soutien indéfectible, votre présence constante et vos mots. Merci d'avoir été à mes côtés tout au long de mes études, d'être toujours disponibles et de m'avoir toujours poussée vers le haut. Merci pour tous les fou-rires et les sorties qui m'ont apporté que de la joie et qui m'ont aidé à atteindre mon but. Merci à ma sœur de cœur, Yasmine, d'avoir toujours cru en moi et de m'avoir toujours portée jusqu'au bout. Merci de s'être toujours souciée de ma carrière et de mon bonheur, et d'être si compréhensive tu es une amie en or. Je ne trouverai jamais les mots qui pourraient décrire mon amour pour toi et ma fierté de t'avoir en tant que meilleure amie. Un grand merci à mon unique frère qui m'a toujours soutenu même de l'autre bout du monde. Merci d'être si fier de moi et m'avoir encouragé dans tout ce que je fais.

Ma plus profonde gratitude va à mes deux parents. Il m'aurait été impossible d'arriver jusqu'ici sans vous et sans tout ce que vous avez fait pour moi. Merci d'avoir cru en moi et de m'avoir toujours soutenue. Merci pour toutes les bonnes valeurs que vous nous avez transmises. Je vous remercie d'être des parents si forts, attentionnés, compréhensifs et présents. Sans vous je ne suis rien. Je vous dois toute ma vie.

Enfin, je tiens à remercier la personne la plus présente dans ma vie, mon compagnon Florian. Merci d'être toujours là pour moi. Merci de m'avoir écoutée, d'être si compréhensif, de m'avoir toujours poussée à réaliser ce qui me tenait à cœur. Merci de m'avoir appris à devenir forte et à surmonter toute épreuve. Tu m'as appris énormément de choses, je te remercie du plus profond de mon cœur.

Enfin j'adresse mes sincères remerciements à toutes les personnes qui m'ont accompagnée, soutenue, aidée, encouragée tout au long de la réalisation de cette thèse.

TABLE DES MATIÈRES

TABLE DES MATIÈRES

REMERCIEMENTS	1
TABLE DES MATIÈRES.....	7
TABLE DES ABBRÉVIATIONS.....	11
TABLE DES FIGURES	13
TABLE DES ÉQUATIONS.....	15
INTRODUCTION.....	19
CHAPITRE I : LES NANOPARTICULES	19
1. Les nanoparticules	20
1.1. Terminologie et définitions.....	20
1.2. Classification des nanoparticules et leurs applications en nanomédecine	21
1.2.1. Les nanoparticules organiques : les nanoparticules d'inspiration biologiques les liposomes et les GUVs	21
1.2.2. Les principales nanoparticules à base de carbone	22
1.2.3. Autres nanoparticules inorganiques	24
1.2.3.1. Les métaux	24
1.2.3.2. Les oxydes métalliques	25
1.2.3.3. Les nanoparticules de silice.....	25
1.2.4. Les nanoparticules théranostiques.....	26
1.3. Propriétés électriques des nanoparticules inorganiques	27
1.3.1. Nanoparticules non conductrices	28
1.3.2. Nanoparticules semi-conductrices.....	28
1.3.3. Nanoparticules conductrices	29
1.4. Propriétés physico-chimiques des nanoparticules.....	29
1.4.1. Surface spécifique	29
1.4.2. Charge de surface.....	29
1.4.3. Hydrophobie et hydrophilie	31
1.4.4. Biocompatibilité.....	31
2. Nanoparticules d'or	31
2.1. Historique et définition	31
2.2. Différentes forces des particules colloïdales en suspension.....	32
2.2.1. Forces du milieu de dispersion.....	32
2.2.2. Forces inter-particulaires.....	32
2.2.3. Potentiel de sédimentation	33
2.3. Caractéristiques des dispersions colloïdales	34
2.3.1. Stabilité colloïdale.....	34
2.3.1. Dispersion en taille.....	35
2.3.2. Charge effective des nanoparticules.....	36
2.3.3. Concentration des nanoparticules.....	36
2.4. Méthodes de synthèse de nanoparticules d'or et leurs mécanismes de stabilisation	36
2.4.1. Méthode de Turkevich : Nanoparticules d'or stabilisés par effet électrostatique.....	37
2.4.2. Méthode de Brust et Schiffrin : Nanoparticules d'or stabilisées par effet stérique (par des thiols)	38
2.4.3. Autres méthodes : Perrault et Chan, sonochimie.	39
2.5. Les phénomènes électrocinétiques.....	39
2.6. Principe de base de la diffusion dynamique de la lumière	40
2.6.1. Le diamètre hydrodynamique et sa mesure	40
2.6.2. Le potentiel zêta	42

2.6.2.1.	Principe du potentiel zêta	42
2.6.2.2.	Mobilité électrophorétique (Formule de Henry).....	42
2.6.3.	Polydispersité des populations	44
2.7.	Les applications des nanoparticules d'or en médecine	44
2.7.1.	Agent de contraste pour la localisation des tumeurs	45
2.7.2.	Radio sensibilisation grâce à des nanoparticules d'or	45
2.7.3.	Thérapie par photothermie	46
2.7.4.	Vectorisation et délivrance des médicaments	46
2.8.	Chimie de surface des nanoparticules d'or	47
2.8.1.	Origine et définition	47
2.8.2.	Fonctionnalisation par des molécules de polyéthylène glycol	48
2.8.3.	Rôle du polyéthylène glycol dans la stabilisation des NPs d'or.....	49
2.9.	Interactions NPs d'or/cellules tumorales	49
2.9.1.	Prise en charge des NPs	52
2.9.2.	Toxicité des NPs d'or.....	53
CHAPITRE II : L'ELECTROPORATION.....		55
1.	<i>La membrane</i>	55
1.1.	Structure et composition de la membrane plasmique.....	55
1.2.	Les lipides et leurs rôles de barrière au sein de la membrane	56
1.3.	Les protéines et leurs rôles dans les échanges avec le milieu extracellulaire	57
1.4.	Potentiel transmembranaire de repos	57
2.	<i>Introduction à l'électroporation</i>	58
2.1.	Historique et définitions.....	58
2.2.	Le principe	58
2.3.	Le potentiel transmembranaire induit	59
2.4.	Le seuil de perméabilisation	61
3.	<i>De l'électroporation à l'électroperméabilisation</i>	62
3.1.	Théorie initiale : formation de pores.....	62
3.2.	Oxydation des lipides au cours de la phase de l'électroperméabilisation	64
3.3.	La réparation de la membrane.....	66
4.	<i>Différentes impulsions électriques</i>	68
4.1.	Les impulsions millisecondes	68
4.2.	Les impulsions microsecondes	69
5.	<i>Différents types d'électrodes et de générateurs utilisés lors de l'électroporation</i>	70
6.	<i>Applications de l'électroporation</i>	71
7.	<i>Electrochimiothérapie (ECT)</i>	72
7.1.	Principe	72
7.2.	Historique	73
7.3.	La bléomycine en électrochimiothérapie	75
7.3.1.	Origine et structure de la bléomycine	75
7.3.2.	Mécanisme de fonctionnement.....	75
8.	<i>Comparaison de l'ECT avec les autres traitements du cancer</i>	77
8.1.	La chirurgie.....	77
8.2.	La chimiothérapie	78
8.3.	La radiothérapie	78
8.4.	Immunothérapie	79
9.	<i>Avantages et limites de l'électrochimiothérapie</i>	79

PROBLÉMATIQUE ET OBJECTIFS	87
RÉSULTATS.....	91
ARTICLE 1 : ELECTROPERMEABILISATION CELLULAIRE AMELIOREE PAR DES NANOPARTICULES CONDUCTRICES.....	91
ARTICLE 2 : ACCUMULATION DES NANOPARTICULES CONDUCTRICES PAR ELECTROPHORESE POUR L'AMELIORATION DE L'ELECTROPERMEABILISATION CELLULAIRE.....	113
PARTIE 3 : LES MECANISMES IMPLIQUES DANS L'AMPLIFICATION DU CHAMP ELECTRIQUE EN PRESENCE DES NANOPARTICULES CONDUCTRICES.....	143
1. <i>La cinétique de refermeture des électropores révélée par l'entrée de la bléomycine</i>	144
2. <i>La cinétique de refermeture des électropores révélée par l'entrée de YO-PRO-1</i>	146
3. <i>Effet des impulsions répétées combinées avec l'incubation de 3h à 4°C</i>	148
4. <i>Autre tentative de rapprochement des NPs conductrices à la surface des cellules</i>	149
5. <i>Conclusion.....</i>	151
PARTIE 4 : AMPLIFICATION DU CHAMP ELECTRIQUE IN VIVO EN UTILISANT DES NANOPARTICULES CONDUCTRICES.....	153
1. <i>Matériels et méthodes.....</i>	154
2. <i>Résultats</i>	158
2.1. <i>Détermination de diamètre hydrodynamique et de la charge des PEG-GNPs et PEG-GNS 158</i>	
2.2. <i>Effet des impulsions millisecondes et microsecondes en présence de PEG-GNPs (expérience in vivo 1)</i>	158
2.3. <i>Effet des impulsions millisecondes et microsecondes en présence de GNS in vitro</i>	161
2.4. <i>Effet des impulsions millisecondes et microsecondes en présence de GNP-PEG et GNS- PEG (expérience in vivo 2).....</i>	162
3. <i>Conclusion.....</i>	163
DISCUSSION ET PERSPECTIVES	167
1. <i>Importance du contact physique entre les NPs conductrices et les membranes des cellules cancéreuses pour amplifier le champ électrique local.....</i>	168
2. <i>Importance du choix du type des NPs conductrices pour amplifier localement le champ électrique</i>	170
3. <i>Importance de la distribution des NPs d'or</i>	172
4. <i>Perspectives.....</i>	174
5. <i>Conclusion.....</i>	175
BIBLIOGRAPHIE	179

TABLE DES ABBRÉVIATIONS

Θ	Angle
σ_i	Conductivité du cytoplasme
σ_m	Conductivité de la membrane cellulaire
σ_o	Conductivité du milieu extracellulaire
$\mu sPEFs$	Impulsions microsecondes
ε	Potentiel diélectrique
$\Delta\Psi_0$	Potentiel de repos
ζ	Potentiel zêta
$\Delta\rho$	Solvant
τ_m	Temps de chargement de la membrane
η	Viscosité dynamique
A	
Ag	Argent
Au	Or
AuCl ₄	Acide chloraurique
C	
CeO ₂	Nanoparticule en cérium
Cm	Capacitance
CR	« Complete response »
Ct	Citrate
Cur	Curcumine
CTAB	Bromure de cétrimonium
D	
d	Épaisseur de membrane
DLS	Diffusion dynamique de la lumière
DLVO	Deryaguin-Landau, Vervy-Overbeek
DC-3F	Fibroblastes de poumon d'hamster chinois (cancéreuses)
E	
E	Amplitude du champ appliqué
ECT	Électrochimiothérapie
EGT	Électrogénothérapie
EPR	« Enhanced permeability and retention »
ESOP	« European Standard Operating Procedures of Electrochemotherapy »
Electropores	Pores créés par électroporation
F	
Fe ₃ O ₄	Oxyde de fer
f(ka)	Fonction de Henry
G	
g	Accélération de la pesanteur
GUVs	« Giant unilamellar vesicles »

GNS	Nanoparticules d'or sous forme d'étoiles
H	
H ₂ O ₂	Peroxyde d'hydrogène
HV	« High voltage »
I	
IRE	Électroperméabilisation irréversible
IRM	Imagerie à résonance magnétique
L	
LV	« Low voltage »
LPB	Cellules de fibrosarcome murine (cancéreuses)
M	
mPEG-thiol	Methyl ether PEG thiol
msPEFs	Impulsions millisecondes
MWCNT	Nanotube de carbone à plusieurs parois
N	
NPs	Nanoparticules
O	
•OH	Radical hydroxyle
OR	Réponse objective
P	
PDI	Indice de polydispersité
PEG	Polyéthylène glycol
PEG-GNPs	Nanoparticules d'or sphériques PEGylées
PEG-GNS	Nanoparticules d'or sous forme d'étoile PEGylées
Q	
QDs	Quantum dots
R	
R _{NP}	Rayon de la particule
ROS	Dérivé réactif de l'oxygène
S	
SWCNT	Nanotube de carbone à simple paroi
ICP-MS	Spectrométrie de masse à plasma induit
SPIONs	« Supra magnetic iron oxide nanoparticles »
T	
TiO ₂	Oxyde de titane
U	
U _E	Mobilité électrophorétique

TABLE DES FIGURES

<u>Figure 1</u> : Schéma des différents types de nanoparticules et leurs principales applications biomédicales	21
<u>Figure 2</u> : Différentes applications des NPs en nanomédecine.....	27
<u>Figure 3</u> : Schéma de la double couche ionique de d'une nanoparticule chargées négativement.....	30
<u>Figure 4</u> : Représentation schématique de la stabilisation électrostatique et stérique	35
<u>Figure 5</u> : Réduction multi-étapes du complexe $[\text{AuCl}_4]^-$ par les ions citrates	37
<u>Figure 6</u> : Le processus de nucléation des NPs d'or et l'adsorption des ions citrates.....	38
<u>Figure 7</u> : Illustration du phénomène de l'électrophorèse.	40
<u>Figure 8</u> : Représentation du diamètre hydrodynamique de la particule.	41
<u>Figure 9</u> : Schéma représentant les différentes applications médicales des nanoparticules d'or.....	45
<u>Figure 10</u> : Structure générale du PEG (avec $n \geq 4$).....	48
<u>Figure 11</u> : Structure du mPEG-thiol.....	48
<u>Figure 12</u> : Schéma de fonctionnalisation des NPs d'or par le PEG-thiol.....	49
<u>Figure 13</u> : Ciblage actif et passif des nano vecteurs.	51
<u>Figure 14</u> : Fonctionnalisation des NPs d'or	52
<u>Figure 15</u> : Représentation schématique de la membrane plasmique	55
<u>Figure 16</u> : Différentes applications de l'électroporation	59
<u>Figure 17</u> : Le potentiel transmembranaire induit	60
<u>Figure 18</u> : Variation de $\Delta\Psi_i$ observée grâce à un marqueur sensible aux potentiels transmembranaires.	61
<u>Figure 19</u> : Simulation en dynamique moléculaire de l'évolution d'une bicouche lipidique de dimyristoyl-phosphatidylcholine (DMPC).....	63
<u>Figure 20</u> : Représentation schématique de l'électroporation et l'electropermeabilisation	66
<u>Figure 21</u> : Différentes types d'électrodes utilisées dans le monde de l'électroporation.....	71
<u>Figure 22</u> : Schéma des différents effets d'impulsions électriques.....	71
<u>Figure 23</u> : Applications de l'électroporation.	72
<u>Figure 24</u> : Principe de l'électrochimiothérapie	73
<u>Figure 25</u> : Structure de la molécule de bléomycine.	75
<u>Figure 26</u> : Exemple d'un bon contrôle tumoral local chez un patient avec deux nodules tumoraux sur la jambe	82
<u>Figure 27</u> : Exemple de traitement de tumeur large sur le dos d'un patient atteint de mélanome malin	83
<u>Figure 28</u> : La cinétique de refermeture des électropores révélée par le test d'efficacité de clonage en utilisant la bléomycine, en présence et en absence de GNPs	146
<u>Figure 29</u> : La cinétique de refermeture des électropores révélée par le pourcentage de fluorescence en utilisant le YO-PRO-1	147
<u>Figure 30</u> : Efficacité de clonage en présence et en absence de GNPs.....	149
<u>Figure 31</u> : Efficacité de clonage en présence et en absence de SPIONs	150
<u>Figure 32</u> : Détermination par DLS du diamètre hydrodynamique et de la charge des NPs suspendues dans le PBS.....	158
<u>Figure 33</u> : Effet des nanoparticules conductrices PEG-GNPs sur la croissance tumorale	160
<u>Figure 34</u> : TEM d'une tumeur murine en présence de PEG-GNPs.....	160
<u>Figure 35</u> : Efficacité de clonage	162
<u>Figure 36</u> : Effet des nanoparticules conductrices PEG-GNPs et PEG-GNS sur la croissance tumorale.....	163

TABLE DES ÉQUATIONS

<u>Équation 1</u> : Vitesse de sédimentation des NPs.....	34
<u>Équation 2</u> : Équation de Henry	40
<u>Équation 3</u> : Équation de Stokes-Einstein.....	41
<u>Équation 4</u> : Équation de Schwan	60

INTRODUCTION

INTRODUCTION

Chapitre I : Les nanoparticules

Introduction : Les nanotechnologies et les nanosciences

La nanotechnologie est un concept qui s'est initié grâce à l'invention du microscope à effet tunnel puis celle du microscope à force atomique au début des années 80. Grâce à ces microscopes, les scientifiques ont pu contrôler et voir des atomes individuels, à l'échelle nanométrique, et ce qui leur a permis ainsi d'explorer l'univers de l'infiniment petit. A partir de là, l'ère de la nanotechnologie est née et a ouvert la porte à des nouvelles perspectives dans le monde de la recherche. En effet, la nanotechnologie, qui est de nos jours un domaine en pleine effervescence, est une science qui a pour but de construire, atome par atome, des édifices de plus en plus grands afin de former des machines minuscules, appelé donc aussi « la miniaturisation ». Elle regroupe l'ensemble des outils, techniques et procédés qui permettent de manipuler la matière à une échelle en dessous de la centaine de nanomètres, d'où la notion « nano » dans ce terme. Un nanomètre « nm » correspond un sous-multiple de mètre qui vaut un milliardième de mètre, soit $1\text{nm}=10^{-9}\text{ m}$.

La nanotechnologie est utilisée dans de multiples applications dont les plus répandues sont la nanoélectronique (par exemple : la technologie de l'information), les nanomatériaux (par exemple : l'écotechnologie et la technologie de l'énergie) et la nanobiotechnologie (c'est-à-dire tout ce qui touche à la santé). En ce qui concerne la nanotechnologie à des fins biologiques, appelée aussi nanomédecine, elle est considérée comme une discipline émergente qui a un impact considérable dans la médecine grâce aux apports de nouveaux espoirs. En effet, la nanomédecine a ouvert la porte à diverses perspectives sur des enjeux clefs via la fabrication et la manipulation de matériaux à l'échelle nanométrique. Cela a permis ainsi le développement de nouveaux outils pour le traitement, le diagnostic, la surveillance et le contrôle des systèmes biologiques. Les nanoparticules, des particules également à l'échelle nanométrique, sont les premières approches de la nanomédecine. Le cancer reste l'un des principaux domaines d'application de la nano médecine. Cette dernière a permis ainsi l'optimisation de la délivrance du médicament en ciblant les cellules cancéreuses, elle a aussi offert plusieurs voies de détection précoce et précise des tumeurs. En effet, la nanomédecine cible avec précision l'action d'un traitement pour le rendre plus

efficace tout en limitant les dommages collatéraux. D'ailleurs, durant les deux dernières décennies, la nanomédecine a été évoquée comme solution contre le cancer. Dès 1995, lors d'une étude clinique, une chimiothérapie qui était utilisée en cancérologie : la doxorubicine [1], a été encapsulée dans une vectorisation innovante : les liposomes, pour le traitement du sarcome du Kaposi [2].

En 2005, l'Abraxane a été préconisé pour le traitement du cancer du sein. Sa formulation est basée sur l'encapsulation de paclitaxel, une molécule anticancéreuse, au sein d'une matrice protéique (albumine) [3], [4]. Depuis ce temps, divers essais cliniques basés sur la vectorisation des nanoparticules ont été approuvés ou encore en évaluation clinique pour lutter contre de multiples types de cancers [5]–[7].

1. Les nanoparticules

1.1. Terminologie et définitions

Les nanoparticules ont attiré l'attention d'un grand nombre de chercheurs de plusieurs disciplines au cours des dix dernières années. Le terme nanoparticule est devenu fréquemment utilisé au début des années 1990 en même temps que les concepts connexes de particules « nanométriques ». Jusque-là, les termes plus généraux « submicron » et « particules ultrafines » étaient employés. Les nanoparticules (NPs) sont les principaux systèmes utilisés comme agents diagnostiques et thérapeutiques [8]–[11] ou théranostiques à haute spécificité moléculaire [12]–[15]. En raison de leur taille (1–100 nm), les NPs ont un rapport surface / volume important, qui leur permet d'absorber de grandes quantités de médicaments [16] et de les diffuser facilement dans la circulation sanguine ou dans les cellules [17]. Leurs plus grandes surfaces leur confèrent des caractéristiques uniques, car elles améliorent leurs propriétés magnétiques, optiques et catalytiques, en augmentant aussi leur utilisation pharmacologique potentielle. Outre leur composition, les propriétés des NP dépendent de leur taille et de leur forme [18]. En effet, afin d'obtenir des NP monodisperses et de faciliter leur internalisation par les cellules, il est nécessaire de contrôler leur taille et leur forme et minimiser aussi leur agrégation [19]. De plus, les NPs peuvent être modifiées ou fabriquées avec deux ou plusieurs matériaux pour améliorer leurs propriétés physiques et chimiques. En ce qui concerne leurs compositions chimiques, les NPs peuvent être divisées en trois principaux groupes (Figure 1) : les nanoparticules organiques (liposomes et polymères), les nanoparticules inorganiques (métaux, oxydes métalliques, céramiques et

points quantiques) et les nanoparticules à base de carbone. Les NP utilisées en nano médecine sont les suivantes [16].

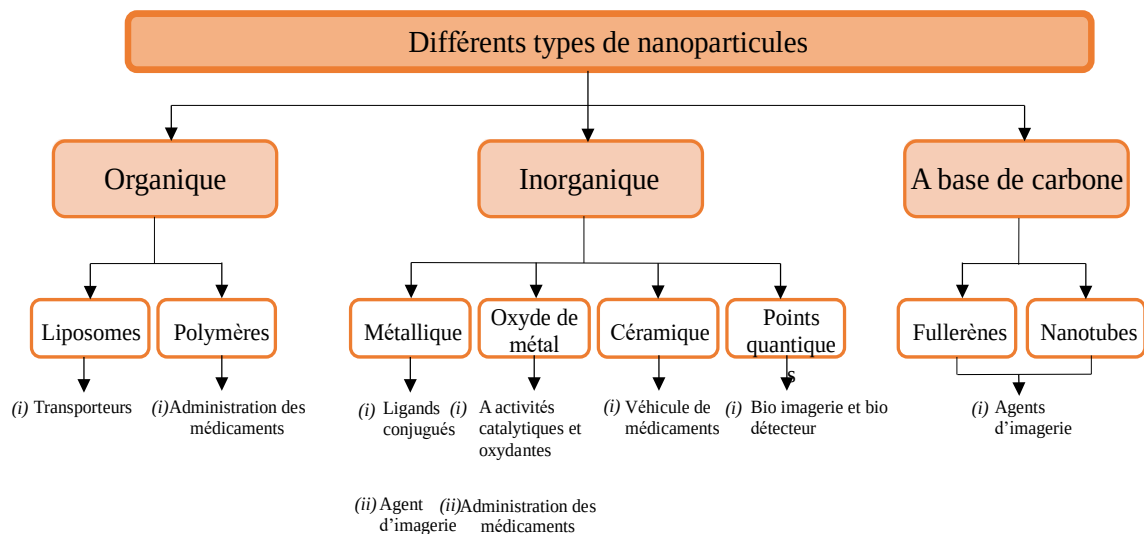


Figure 1 : Schéma des différents types de nanoparticules et leurs principales applications biomédicales. Source : référence [16].

1.2. Classification des nanoparticules et leurs applications en nanomédecine

1.2.1. Les nanoparticules organiques : les nanoparticules d'inspiration biologiques les liposomes et les GUVs

Les liposomes sont des vésicules sphériques artificielles formées d'une simple à plusieurs bicouches lipidiques concentriques, emprisonnant entre elles une substance aqueuse. La préparation de ces vésicules se fait à partir de diverses molécules amphiphiles dont les plus couramment utilisées sont les phospholipides. En effet, la composition des liposomes est faite de sorte qu'elle soit similaire à celle des membranes biologiques afin d'améliorer l'efficacité et la protection de différents médicaments [20]. Lorsque les molécules amphiphiles sont mises en présence d'une solution aqueuse, les molécules s'organisent de façon à minimiser l'interaction entre les chaînes hydrocarbonées et l'eau. En effet, le liposome se caractérise souvent par une bicouche lipidique où les têtes polaires sont au contact avec l'eau et les queues apolaires sont au centre de la bicouche. Grâce à leurs petites tailles et leurs biocompatibilités, les liposomes sont utilisés essentiellement pour la vectorisation de médicaments d'où le terme « nano vecteur » [21]–[23]. Ces médicaments, selon leur composition chimique, peuvent être encapsulés dans le liposomes, soit par

insertion au niveau de la bicouche lipidique, soit à l'interface de la bicouche/phase aqueuse, soit séquestrée au niveau de la phase aqueuse du liposome [23]. Une fois le liposome interagit avec la membrane plasmique, le principe actif est libéré au sein de la cellule. Par exemple, Sharma et al [24] ont montré que l'encapsulation de l'acide N-Phosphonacetyl-L-aspartate, qui est une molécule inhibitrice de la croissance tumorale ovarienne, dans des liposomes chargés négativement potentialise, *in vivo*, l'effet anti-tumoral de la molécule anti-cancéreuse jusqu'à 500 fois comparativement à la molécule délivrée seule. Cette différence est due au fait que l'internalisation de cette molécule anti-cancéreuse par les cellules tumorales est très limitée, en raison de son élimination rapide. Par ailleurs, la transfection des acides nucléiques via l'encapsulation liposomique a été étudiée en comparant différents types de lipides cationiques [25]. Cependant, il est important de tenir en compte que l'efficacité de ces nano vecteurs dépend de paramètres critiques tel que la technique de stérilisation des lipides, leur stabilité, la méthode d'encapsulation [23]. De plus, en raison de leur taille entre 400 nm et 2.5µm, les liposomes peuvent être rapidement opsonisés et éliminés. C'est pour cela que la majorité des études utilisent des liposomes stabilisés à leur surface par des polymères [26]. Les liposomes sont principalement utilisés pour l'administration de chimiothérapie dans le traitement du cancer [27]–[29] et on les trouve également dans les industries alimentaires [30] et cosmétiques [31].

Les GUVs pour giant unilamellar vesicles, sont considérés comme des liposomes géants composés d'une simple couche bi-lipidique. Ils ont été exploités dans but de d'étudier la fonction et la structure de la membrane et également les propriétés chimiques et mécaniques de la double couche lipidique. En raison de leur large diamètre (20-150µm) et leur faible courbure, les GUVs ont la capacité d'être visualisés individuellement à l'aide d'un microscope optique, confocal ou à fluorescence, d'où leur utilisation dans de nombreuses recherches physico-chimiques [32], [33].

1.2.2. Les principales nanoparticules à base de carbone

Le carbone est un élément chimique non métallique essentiel à la vie. En fonction de la configuration des orbitales et des liaisons entre les atomes de carbone, ce dernier peut être classifié sous différentes structures cristallographiques. En effet, ces structures cristallographiques particulières issues d'un même élément chimique, le carbone, sont appelées allotropes du carbone. Ainsi, le carbone peut être présent sous forme d'allotropes naturels (diamant, graphite), sous forme d'allotropes synthétiques (les fullerènes, les

nanotubes et le Graphène) ou sous forme de carbone amorphe [34]. Seuls les nanotubes de carbones ont été testées durant cette thèse.

Les nanotubes de carbone ont été découverts dans les années 1950-1960 par Iijima Sumio [35]. Ce sont des molécules hexagonales constituées de feuilles enroulées d'atomes de carbone monocouche (graphène). Ils peuvent être à simple paroi (SWCNT) d'un diamètre inférieur à 1 nanomètre (nm) [35] ou à plusieurs parois (MWCNT) [36], constitués de plusieurs couches de nanotubes interconnectés, avec des diamètres atteignant plus de 100 nm. L'arrangement de ces cycles carbonés définit la chiralité du nanotube. Les variations de cette chiralité influent sur les propriétés électroniques des nanotubes, leur conférant ainsi un caractère métallique ou semi-conducteur [37]. Cette propriété électronique est déterminée en fonction du diamètre et de l'hélicité du tube et en particulier des orientations chirales de ces nanotubes de carbones [38].

Grâce à leurs propriétés mécaniques, électriques et thermiques, les nanotubes de carbone suscitent un intérêt considérable non seulement en science des matériaux [39]–[42] mais également en nanomédecine. L'intérêt particulier des nanotubes de carbone (spécifiquement ceux à simple paroi) consiste en leur capacité à absorber fortement la lumière dans la région du proche infrarouge, ce qui les rend utiles pour induire la mort cellulaire une fois au sein de la cellule, en réponse à une irradiation qui cause une augmentation locale de la température. Par exemple, Shi Kam et al [43] ont montré *in vitro* que les nanotubes exposés à une radiation infrarouge (ici, à 808nm-1.4W/cm²) pendant 2 min induit une élévation de chaleur qui monte jusqu'à 75°C. De plus, les mêmes chercheurs ont montré *in vivo* la possibilité d'induire la mort cellulaire par irradiation des nanotubes qui ciblent les récepteurs des folates surexprimés sur les cellules cancéreuses. Par ailleurs, en raison de leur grande surface, les nanotubes de carbone sont facilement fonctionnalisés ce qui fait d'eux des bons vecteurs d'agents thérapeutiques. Par exemple, Bhirde et al [44] ont montré que les SWNT-cisplatine-EGF (facteur de croissance épidermique) permettent de tuer *in vivo* les cellules cancéreuses exprimant l'EGFR (récepteur du facteur de croissance épidermique) tandis que les SWNT sans EGF sont éliminées de la région tumorale en 20 min. Ils ont ainsi montré une régression des tumeurs entre 25 et 50% assurée par l'entrée du cisplatine. Sahoo et al [45] ont confirmé ce résultat en montrant la capacité de MWNT fonctionnalisées avec la camptothécine à induire la mort cellulaire des cellules cancéreuses humaines du sein et de la peau. Par ailleurs, les nanotubes de carbone sont aussi considérés comme des agents antioxydants. Par exemple, leur rôle antioxydant a été utilisé dans les crèmes solaires anti-

âges afin de minimiser les effets des ROS (dérivé réactif de l'oxygène) sur la peau provoqués par les UV solaires [46]. D'une manière générale, les nanotubes de carbone présentent un grand potentiel en nanomédecine [47]–[49].

1.2.3. Autres nanoparticules inorganiques

1.2.3.1. *Les métaux*

Les nanoparticules métalliques sont des matériaux de taille nanométrique dont les dimensions (longueur, largeur, épaisseur) se situent dans la plage de taille de 1-100 nm. Ces nanomatériaux peuvent être synthétisés et modifiés avec divers groupes fonctionnels chimiques qui leur permettent de se lier avec des anticorps, des oligonucléotides et des médicaments. Ce qui offre ainsi un large éventail d'applications dans le domaine thérapeutique. Il s'agit notamment des métaux précieux (par exemple : or et platine) et des métaux magnétiques (par exemple oxydes de fer). Parmi ceux-ci, les nanoparticules d'or ont été particulièrement étudiées durant cette thèse et seront discutées en détail dans la partie I-2.

Les nanoparticules de platine ont été utilisées surtout comme catalyseurs de certaines réactions chimiques comme par exemple pour limiter la nocivité des gaz d'échappement [50], [51]. D'une manière générale, cette activité catalytique, présente dans de nombreuses NPs métalliques, provient en partie de l'importance du rapport surface/volume de la nanoparticule (cf I-2.3.1). Autrement-dit, plus la nanoparticule est petite plus son rôle catalytique ou autre est important. Par ailleurs, pour lutter/ améliorer les conditions de traitement contre le cancer, ces nanoparticules ont été employées en radiothérapie (plus spécifiquement en hadronthérapie). Par exemple, Porcel et al [52] ont montré la capacité des NPs de platine à induire des dommages à l'ADN et ceci en les combinant à des radiations par des particules subatomiques de haute énergie, appelées hadrons, d'où la nomination d'hadronthérapie. Durant cette dernière, les hadrons se distinguent par : leur ciblage très précis et leur forte énergie en fin de parcours. Ces chercheurs ont montré que la combinaison de l'hadronthérapie (ici, hadron $C_6^{+}/$ ayant une énergie de l'ordre 276 MeV amu^{-1}) avec les NPs de platine induisent la rupture des deux brins d'ADN. Ils expliquent que cette rupture est due à un effet indirect des NPs de platine. En effet, une fois ces NPs sont proches de l'ADN et irradiées, une émission d'électrons va contribuer à l'ionisation des molécules d'eau créant ainsi des ROS à proximité de l'ADN causant par conséquent la mort cellulaire. Ils ont

également montré que cet effet est quasiment 2 fois meilleur dans le cas des NPs de platine par comparaison avec celles d'autres atomes métalliques (utilisées avec la même concentration). Par ailleurs, Asharani et al [53] ont montré que l'entrée des NPs de platine de taille 5-8nm (par simple diffusion) dans les cellules induit des dommages sur l'ADN et provoque l'apoptose de la cellule. De plus, Manikandan et al [54] ont souligné le rôle des NPs de platine pour le traitement des cellules cancéreuses neuro 2A par photothérapie. Ils ont ainsi montré que les NPs de platine, lorsqu'elles sont exposées à un laser infrarouge (ici, à 1064nm) sont capables d'augmenter la température de 9 degrés ce qui permet ainsi de tuer les cellules cancéreuses et ceci via l'activation des enzymes apoptotiques (caspases 8 et 9) à haute température (45°C). Ces chercheurs ont démontré que l'effet cytotoxique de ces NPs dépend de leur taille. Par exemple, 5 différentes tailles de NPs de 1-21 nm ont été étudiées et ont montré une cytotoxicité cellulaire à l'exception des NPs de taille de 5-6 nm.

1.2.3.2. Les oxydes métalliques

Les nanoparticules oxydes métalliques sont des nanomatériaux où les métaux sont présents sous forme oxydée. Ces NPs présentent des propriétés catalytiques, antioxydantes, optiques et biocompatibles, qui les rendent adaptées à diverses applications biomédicales. Les NPs testées dans le cadre de cette thèse sont les NPs d'oxyde de fer (Fe_3O_4).

Les nanoparticules d'oxyde de fer ont été largement utilisées en clinique comme agents de contraste pour l'imagerie médicale: notamment en imagerie à résonance magnétique (IRM) [55], [56] [57], [58]. Les nanoparticules d'oxydes de fer, ayant des propriétés magnétiques provenant du fer, favorisent l'obtention d'une bonne qualité d'image dans des régions difficiles à visualiser. Par ailleurs, ces NPs ont été employées comme systèmes d'administration de médicaments magnétiquement ciblée pour le traitement du cancer [59]–[63]. En combinant ces deux propriétés à la fois, diagnostiques et thérapeutiques, ces NPs sont considérées parmi les NPs théranostiques les plus utilisées pour le traitement du cancer [64]–[66] (cf I-1.2.4).

1.2.3.3. Les nanoparticules de silice

Les NPs de silice (silicium oxydé SiO_2) possèdent une propriété unique qui est déterminée par la présence des pores, d'où le terme de NPs de silice mésoporeuse. En effet, en raison de leur forme précisément ajustable et de leur structure mésoporeuse, ces NPs ont été étudiées

pour l'administration et la libération intracellulaire ciblée des principes actifs dans diverses applications biomédicales [67]–[69]. Par exemple, Mortera et al [70] ont montré que l'administration de la cystéine à partir des NPs de silice est 400 fois plus efficace que l'administration de la cystéine seule dans les cellules cancéreuses cervicales. Chen et al [71] ont montré *in vitro* que le relargage des principes actifs à partir des NPs de silice peut être contrôlé et maîtrisé en définissant la taille des pores de ces NPs. Ces chercheurs ont montré la cinétique de relargage de la cefradine (un antibiotique) à travers les pores des NPs de silice (ayant un diamètre de 60nm) en fonction du temps. Ils ont trouvé qu'en utilisant des pores de 1 nm, 74% de la cefradine est relarguée au sein de la cellule au bout de 20 min, suivie d'un plateau au bout de 10h. De plus, ces NPs sont connues pour leur stabilité, biocompatibilité et leur facilité à être fonctionnalisées. Elles ont déjà été utilisées dans divers produits à usage courant, cosmétique [72] et alimentaire [73]. Par exemple, Yang et al [74] ont étudié la toxicité de 4 différents additifs alimentaires dans des NPs de silice dioxydes (E551) sur des cellules gastriques. Ils ont confirmé que l'effet des additives sur la viabilité des cellules gastriques, est essentiellement dépendant de la dose des ceux-ci, tout en gardant la même concentration et le temps d'exposition des cellules aux NPs de silice. Ils ont montré *in vivo* qu'en utilisant une concentration inférieure à 100µg/ml pour les 4 additives, aucune mortalité cellulaire n'a été observée. Au-dessus de cette concentration, un arrêt de cycle cellulaire et une inhibition de croissance ont été observés.

1.2.4. Les nanoparticules théranostiques

Comme cela a été discuté, les nanoparticules offrent un champ d'application infinie. Le monde des nanoparticules est extrêmement étendu en raison de la diversité de la composition et des types des NPs. De plus, le fait de pouvoir les stabiliser et les fonctionnaliser (ciblage actif) et ceci par une panoplie de molécules à disposition, ne fait qu'enrichir la diversité des NPs. Les applications des NPs discutées précédemment sont résumées dans la Figure 2. En fonction de leur composition chimique et leurs propriétés électroniques, les NPs peuvent être employées pour le diagnostic ou pour la thérapie. Cependant, ces NPs peuvent être d'avantage modulées de sorte à les rendre à la fois thérapeutiques et diagnostiques : on parle alors de NPs théranostiques. D'une manière générale, ces nanoparticules théranostiques peuvent être conçues de plusieurs manières. Cela peut être fait en conjuguant (ou en chargeant) des agents thérapeutiques (des médicaments anticancéreux et des

photosensibilisateurs) à des nanoparticules d'imagerie existantes telles que les QDs, les NPs d'oxyde de fer, les nanodiamants etc.

En raison de leurs propriétés magnétiques, les NPs d'oxydes de fer sont considérées les NPs théranostiques les plus utilisées en nano médecine. Santhosh et al [75] soulignent les différents types de fonctionnalisation possibles à la surface des NPs d'oxydes de fer séquestrant des agents anticancéreux pour assurer une efficacité thérapeutique et également leur importance en tant qu'agent de contraste. Par exemple, Gautier et al [65] décrivent la capacité de manipuler ces NPs par un champ magnétique externe pour assurer une efficacité thérapeutique. En effet, la doxorubicine a été séquestrée dans un liposome, et ce dernier a été encapsulé par des NPs d'oxyde de fer. Ces chercheurs ont montré un relargage de la doxorubicine qui est 4 fois meilleur par comparaison avec le cas sans champs magnétiques. Ceci a été expliqué par le fait que quand les NPs d'oxyde de fer sont excitées par le champ magnétique, elles vont vibrer et vont par conséquence perturber les liposomes qui vont à leur tour relarguer le médicament. Ils ont aussi souligné que le taux de relargage du médicament est fortement dépendant de la chaleur, autrement-dit de l'irradiation magnétique. Pour finir, les NPs théranostiques suscitent un grand intérêt depuis quelques années et ouvrent des perspectives prometteuses dans le domaine de la thérapie guidée par imagerie dans divers traitements.

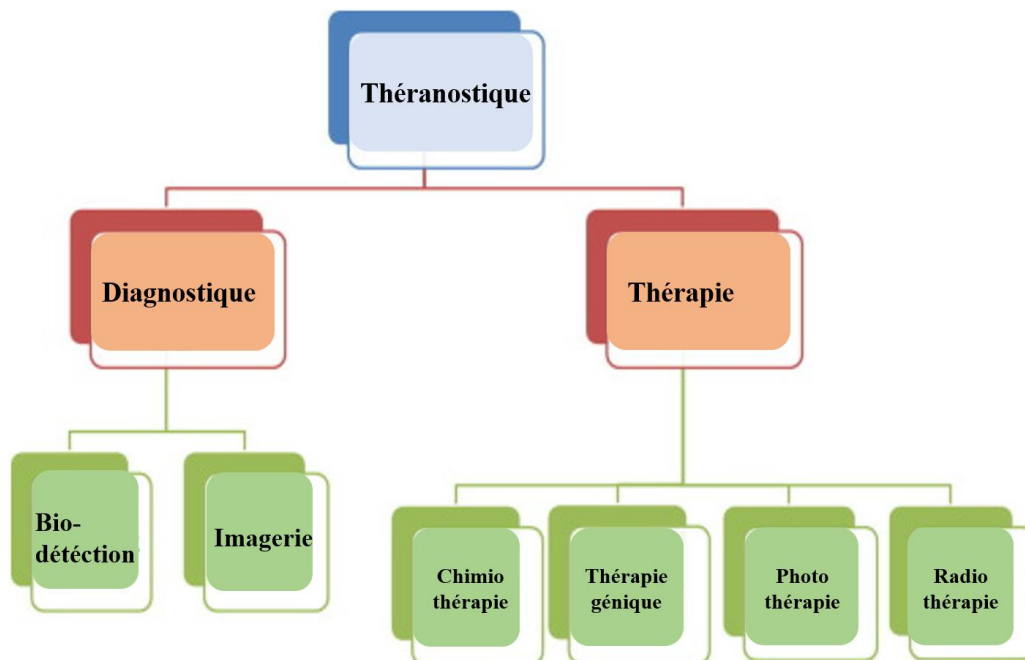


Figure 2 : Différentes applications des NPs en nanomédecine [76]

1.3. Propriétés électriques des nanoparticules inorganiques

Les propriétés électriques des matériaux sont décrites par la théorie des bandes. Cette théorie est une modélisation de valeurs d'énergies qui décrit le comportement d'un électron à l'intérieur d'un solide. Comme le nom l'indique, cette théorie conduit à parler des bandes d'énergies que sont les bandes de valence et les bandes de conduction, présentées respectivement dans une échelle d'énergie croissante. Ces deux bandes sont séparées par une bande d'énergie, dite interdite ou gap, qui est responsable du transfert des électrons de la bande de valence à la bande de conduction, dans un solide soumis à une énergie externe (champ électromagnétique). Selon la valeur de la bande interdite, on distingue les matériaux non-conducteurs, semi-conducteurs et conducteurs.

1.3.1. Nanoparticules non conductrices

Un matériel non-conducteur, dit aussi matériel diélectrique, est un composant qui ne possède pas d'électrons libres de se déplacer, empêchant ainsi la conduction de l'électricité. En effet, la valeur de la bande d'énergie est tellement grande que les électrons ne peuvent pas se déplacer de la bande de valence à la bande de conduction ce qui explique ainsi le non-déplacement des électrons dans un solide isolant et d'où la nomination de NPs non-conductrices dans le cas des nanomatériaux. Parmi celles discutées dans la section précédente, les NPs organiques et les NPs de silice sont considérées comme des NPs non-conductrices.

1.3.2. Nanoparticules semi-conductrices

Les NPs semi-conductrices, comme leur nom l'indique, conduisent partiellement l'électricité. Ces NPs semi-conductrices se caractérisent par la présence d'une bande d'énergie suffisamment petite pour que les électrons de la bande valence puissent facilement rejoindre la bande de conduction. En effet si on apporte de l'énergie (supérieure à l'énergie du gap) aux électrons, ces derniers sont capables de se déplacer dans la bande de conduction et peuvent circuler dans le matériau. Les NPs d'oxydes métalliques, tel que l'oxyde de titane (d'où son rôle important en tant que photocatalyseur), l'oxyde de fer, les quantum dots (d'où leur rôle en tant que biocapteurs) et les NPs à base de carbone sont considérées comme des NPs semi-conductrices. Néanmoins, la propriété semi-conductrice et conductrice des NPs à base de carbone dépend de la forme du maillage, de l'orientation chirale du cristal et également de la taille de ces NPs.

1.3.3. Nanoparticules conductrices

Un matériel conducteur est un composant qui possède des électrons libres de se déplacer et qui contribuent à la conduction d'un courant électrique. Dans ce cas, la bande de valence et la bande de conduction se chevauchent d'où la circulation des électrons à l'intérieur du solide. La majorité des NPs métalliques sont considérées comme des conducteurs d'électrons, notamment, les NPs d'or, d'argent, et de platine. Durant ce projet, nous étions intéressés par les nanoparticules conductrices (plus spécifiquement par les NPs d'or) pour améliorer le champ électrique local au cours de l'électroporation des cellules.

1.4. Propriétés physico-chimiques des nanoparticules

1.4.1. Surface spécifique

La surface des NPs constitue la première interaction entre les NPs et la membrane cellulaire ; plus précisément entre le groupement constituant la surface de la particule et les phospholipides ou protéines membranaires. Ceci fait en sorte que le choix de la surface de la nanoparticule est important dans la détermination des propriétés des NPs. En outre, certaines études utilisant différents types de NPs ont montré que la surface est également un facteur critique dans la présentation des composants toxiques (poumon et autres réponses inflammatoires induites par l'épithélium) chez les rongeurs [77]. Par ailleurs, il est important de savoir qu'en diminuant la taille des nanoparticules, la surface de la particule augmente (cf. I-2.3.1), ce qui entraîne ainsi une augmentation des capacités d'oxydation et d'endommagement de l'ADN provoqués par ces NPs, une fois présentes dans le noyau des cellules [78]. Ces effets sont plus importants que dans le cas des NPs plus grandes avec la même concentration massique [79].

1.4.2. Charge de surface

La charge de surface de la NP est aussi bien un paramètre critique impliqué dans l'interaction NPs/cellule. Ce paramètre correspond à la répartition des charges sur une surface. Cette charge est généralement mesurée par le potentiel-zêta, une méthode qui sera détaillée dans la section suivante. En effet, lorsque la NP chargée électriquement (négativement ou positivement) baigne dans un électrolyte, des ions s'organisent entre eux de façon à être liés fortement à sa surface, constituant ainsi la première couche, nommée couche de Stern. Cette

couche dense correspond à la présence des charges opposées causées par l'adsorption d'ions due aux interactions électrostatiques. Une deuxième couche appelée couche diffuse (ou couche de Gouy-Chapman) se forme en aval de la couche Stern, formée principalement d'ions de la même charge que la surface de la NPs (co-ions) avec la présence de quelques ions de charges opposées (contre-ions) qui induisent la solvation des particules (création d'une couche d'eau autour de la NPs). Ainsi, cette couche diffuse, déformable et mobile, est fortement influencée par la solution ionique induisant une accumulation des contre-ions et co-ions (Figure 3). Le plan glissant ou de cisaillement est le plan qui sépare la couche de Stern et la couche diffuse lorsque les particules sont en suspension et qui nous renseigne sur le potentiel zêta. La charge résultante après cette condensation est appelée la charge effective de la nanoparticule, et elle sera mise en jeu dans les phénomènes électrocinétiques. En raison d'une interaction électrostatique favorable avec la membrane cellulaire qui est chargée négativement, les NPs positivement chargées seront plus absorbées par les cellules que les NPs neutres ou négatives. Par ailleurs, plusieurs études ont montré que malgré la répulsion électrostatique entre la membrane et les NPs chargées négativement, ces dernières peuvent être dans certains cas en contact avec des zones positivement chargées (par exemple, les protéines membranaires) permettant ainsi l'endocytose des NPs [80]–[83]. Aussi, il a été démontré que dans certains cas, la cellule peut être soumise à un stress oxydatif qui peut induire une diminution des charges négatives membranaires [84].

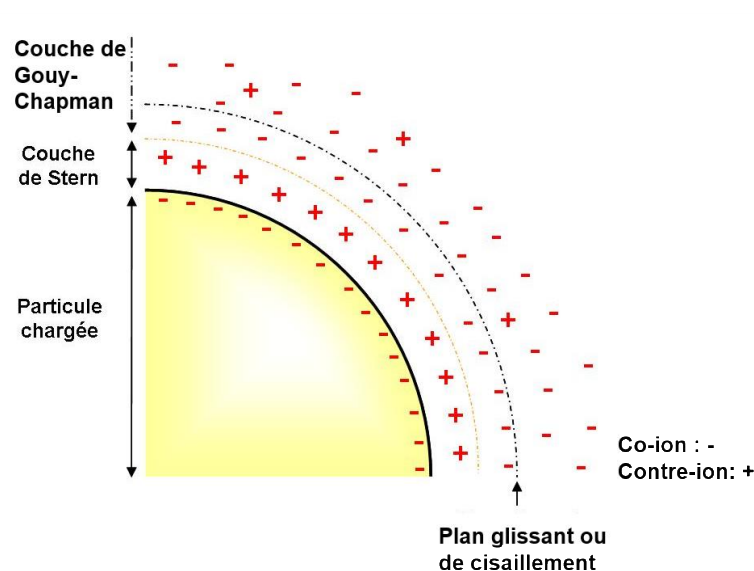


Figure 3 : Schéma de la double couche ionique d'une nanoparticule chargée négativement. Adapté depuis : <http://c.21-bal.com/buhqalteriya/49/index.html?page=11>.

1.4.3. Hydrophobie et hydrophilie

La stabilité des NPs dans un milieu aqueux vis à vis de la formation d'agrégats dépend de leur hydrophobie et hydrophilie. En effet, les NPs acquièrent le caractère hydrophobe ou hydrophile par leur fonctionnalisation respectivement avec des molécules non-polaires ou polaires. Dans le cas des NPs hydrophobes, dites aussi apolaires, elles sont plus au moins stables dans une solution aqueuse grâce aux forces répulsives réalisées entre la particule et les molécules d'eau. Contrairement à ces NPs hydrophobes, les NPs hydrophiles qui ont une grande affinité avec l'eau (qui est une molécule très polaire) et ont besoin de la solvation pour leur stabilité. En effet, cette couche d'eau créée à la surface des NPs va favoriser l'attraction des deux particules de charges opposées et la répulsion de deux particules de même charge. Par ailleurs, la stabilité des NPs et la formation d'agrégats sont fortement influencées par tout facteur impliquant la modification de ces interactions attractives et répulsives notamment, le pH, la concentration, la force ionique du milieu et également la nature ou la taille de leur surface [85].

1.4.4. Biocompatibilité

La fonctionnalisation des NPs par des polymères permet de stabiliser les NPs. En effet, la fonctionnalisation confère aux NPs non seulement le caractère hydrophobe et hydrophile mais aussi contribue à l'amélioration de leur biocompatibilité. La biocompatibilité d'une NP consiste à ce que cette dernière puisse exécuter une fonction spécifique sans avoir des effets indésirables dans un environnement biologique (comme par exemple dégradations, élimination...). Ces polymères, qui peuvent être naturels (par exemple : le chitosan [86], [87]) ou synthétiques (par exemple le polyéthylène-glycol [88], [89]), une fois greffés à la surface des NPs, leur donnent une compatibilité adaptée pour des applications en milieu biologiques. Aussi, les polymères lipidiques sont connus par leur amélioration de la biocompatibilité ainsi que leur profil pharmacocinétique [90].

2. Nanoparticules d'or

2.1. Historique et définition

L'or est un métal noble et précieux de couleur jaune d'or et chimiquement inerte. Ceci se traduit par sa forte résistance à l'oxydation et d'où sa non-dégradation avec le temps. A partir

des années 90, la communauté a commencé à s'intéresser aux NPs d'or et ont donc essayé d'étudier et de maîtriser leurs propriétés uniques ainsi que leurs différentes structures. Des propriétés particulières en font un candidat parfait pour diverses applications touchant à de nombreux domaines notamment le domaine de la santé.

2.2. Différentes forces des particules colloïdales en suspension

L'or colloïdal est une suspension des NPs d'or dans une solution. En effet, un colloïde est une suspension d'une ou plusieurs substances dispersées de façon homogène et régulière dans une autre substance formant ainsi une solution à deux phases ou phases sans nette séparation. Chacune des deux phases peut être solide, liquide ou gazeuse [91], [92]. Dans le cas de l'or, ces particules solides lorsqu'elles sont en suspension, sont soumises à différentes forces.

2.2.1. Forces du milieu de dispersion

La stabilité colloïdale dépend des interactions induites entre les différentes particules présentes en suspension. Ces interactions inter-particulaires peuvent mener à des collisions et donc à l'agrégation ou non des NPs. Divers phénomènes physiques peuvent être à l'origine de ces collisions.

Le mouvement brownien peut être le résultat relatif qui induit la diffusion des particules. En effet, ce mouvement se caractérise par le déplacement aléatoire des particules au sein du liquide. La force nécessaire pour déplacer la particule dépend de la masse et la taille de celle-ci, autrement dit, plus la particule est petite et légère plus la force maximale brownienne est importante[93][94]. Par ailleurs, ces collisions peuvent être aussi due à une force extérieure induisant ainsi un flux du milieu de dispersion qui à son tour génère un déplacement des NPs.

2.2.2. Forces inter-particulaires

Comme mentionné ci-dessous, ces différents facteurs physiques peuvent être à l'origine de différentes interactions exercées entre différentes particules présentes dans un milieu aqueux. Au sein d'une dispersion colloïdale, ces interactions inter-particulaires sont régies

par un ensemble de forces attractives et répulsives. Ces deux interactions constituent le cœur de la théorie DLVO [Deryaguin-Landau (1941), Verwey-Overbeek (1948)].

Les forces de van der Waals font partie des interactions colloïdales les plus importantes et se définissent par les forces électrostatiques attractives intermoléculaires. Ce sont des interactions dipolaires de faible intensité mais qui se produisent spontanément entre les NPs ayant des courtes distances. Ainsi, les forces van der Waals tendent à faire agréger les NPs entre elles dans une solution. En effet, une solution colloïdale est dite stable quand ces forces d'attraction n'existent pas de façon prédominante. Dans une solution colloïdale instable, les NPs se collent entre elles de façon à former des amas, dits aussi agrégats, qui précipitent au fond de la solution. Pour s'assurer que les NPs d'une suspension ne s'agrègent pas à chaque collision, il est nécessaire qu'il existe des forces qui vont contrebalancer les effets des forces de van der Waals : ce sont des forces répulsives électrostatiques. Cette répulsion électrostatique est fortement influencée par la nature de la surface des NPs. En effet, une particule porte forcément des charges qui peuvent provenir soit des ions adsorbés à la surface des NPs, formant ainsi la double couche électrique, ou par le greffage de polymères à la surface de celle-ci. En ce qui concerne les polymères qui tendent à maintenir une certaine distance entre les particules, cette partie sera plus détaillée ci-dessous (cf I-2.8). En effet, la présence de la double couche électrique, et en particulier les contre ions sont responsables des forces répulsives existantes entre des particules en dispersion. Dans une solution électrolytique, la distribution des ions loin des surfaces est homogène mais s'organise de manière hétérogène en s'approchant des surfaces. Ainsi, les contre-ions (ayant une charge opposée que la surface particulaire) ont tendance à se concentrer préférentiellement à la surface des NPs tandis que les co-ions (ayant la même charge que la surface particulaire) sont repoussés plus loin dans la suspension. Ceci contribue ainsi à l'existence d'une force répulsive entre les particules qui assure leur stabilité colloïdale en suspension tout en prévenant leur aggrégation. Cependant, cette force de répulsion est fortement sensible à la force ionique de la solution [95].

2.2.3. Potentiel de sédimentation

Dans le cas des NPs dont la masse volumique et la taille ne génèrent pas des forces gravitationnelles importantes, la stabilité colloïdale peut être maintenue d'une manière homogène. Cependant, dans le cas contraire, plus la particule croît en dimension (par exemple par aggrégation), plus elle devient lourde et donc une sédimentation est attendue. En

effet, cette sédimentation agit sur la NP par la force de gravité où la particule devient très lourde pour être suspendue dans le courant fluide suite à une vitesse du courant fluide trop lente (par exemple la vitesse du mouvement brownien). Cette vitesse de sédimentation dépend ainsi de la différence de masse volumique entre la nanoparticule et le solvant $\Delta\rho$, η la viscosité dynamique du solvant, g l'accélération de la pesanteur et le rayon de la particule R_{NP} (Équation 1). Il est également nécessaire de prendre en compte que la vitesse de sédimentation dans le cas des NPs (de petites tailles) dispersées dans un solvant peu visqueux est pratiquement négligeable puisque les mouvements browniens sont les plus importants.

$$V_g = \frac{2}{9} \times \frac{\Delta\rho g R_{NP}^2}{\eta}$$

Équation 1 : Vitesse de sédimentation des NPs.

2.3. Caractéristiques des dispersions colloïdales

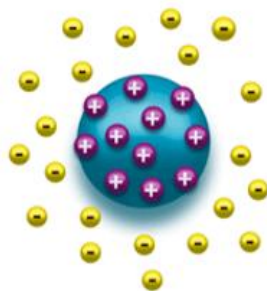
2.3.1. Stabilité colloïdale

La stabilité colloïdale est fortement influencée par la présence de toutes les particules présentes dans la dispersion. Autrement dit, cette stabilité qui se traduit par l'absence d'aggrégation, est dépendante des interactions qui ont lieu entre les NPs entre elles et des NPs avec le solvant. Pour éviter l'aggrégation des NPs d'or, la présence d'un stabilisateur dans le milieu réactionnel est indispensable. En effet, la stabilisation des suspensions colloïdales peut être présente sous trois formes : une stabilisation électrostatique, stérique ou électrostérique.

- La stabilisation électrostatique : comme expliqué ci-dessus, cette stabilisation électrostatique est essentiellement due à l'adsorption des molécules chargées à la surface des NPs induisant ainsi la répulsion des NPs de même charge. Cette stabilisation a été démontrée par la théorie DLVO; qui stipule la stabilité d'une particule dans une solution est dépendante de l'énergie d'interaction totale (forces d'attraction de Van Der Waals et forces de répulsions) (Figure 4a).
- La stabilisation stérique : elle consiste à prévenir l'aggrégation par une autre manière. Cette répulsion stérique se traduit par l'adsorption d'agent stabilisant (macromolécules, polymères) à la surface des particules colloïdales dans le but de former une couche qui diminue la réactivité de surface des NPs d'or. Cette couche protectrice empêche ainsi les particules de s'agréger (Figure 4b).

- La stabilisation électrostérique : représente la combinaison des deux mécanismes expliqués ci-dessus. En effet, cette stabilisation est maintenue lorsque le ligand absorbé est de nature organique chargée et donc il possède à la fois l'effet de charge et l'effet stérique.

a) Stabilisation électrostatique



b) Stabilisation stérique

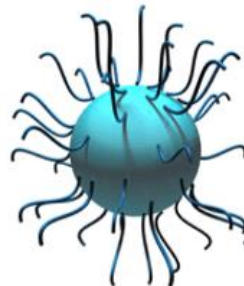


Figure 4 : Représentation schématique de la stabilisation électrostatique et stérique.

2.3.1. Dispersion en taille

Comme souligné dans la partie des NPs inorganiques, parmi de nombreux avantages, les NPs métalliques sont connues par leur rôle catalyseur et optique qui sont souvent liés à l'importance du rapport surface/volume [96]–[99]. En effet, les atomes constituant les NPs sont appelés atomes des cœurs et sont attirés et repulsés dans tous les sens au sein de la NP jusqu'à atteindre un état d'équilibre. Au sein de ce système cristallin, une force de contraction du paramètre maille, exercée par ces atomes de cœur vers l'intérieur, entraîne une diminution de la distance atome-atome. Cette force est donc proportionnelle à la contrainte de surface et donc inversement proportionnelle à la taille de la particule. Quant aux atomes de surface, sont coordonnées de façon qu'ils soient liés à moins d'atomes (très peu de voisins). Ces atomes de surface sont attirés par des atomes de cœur et d'autres atomes isolés ce qui induit une différence de densité électronique et donc une différence de réactivité chimique (liée à la structure cristallographique de la particule). Dans le cas des NPs sphériques, la surface la plus faible est obtenue par une sphère (comparativement à une particule allongée ayant le même nombre d'atomes). Par conséquent, la proportion d'atomes de surfaces augmente par rapport aux atomes de volume, à mesure que la taille des particules diminue. Autrement dit, la diminution de la taille des NPs entraîne une augmentation des atomes de surface [98]. Diverses propriétés physiques (optiques, électroniques...) et chimiques (catalytiques) dépendantes de la taille des NPs sont mentionnées dans la littérature [100]–[102].

2.3.2. Charge effective des nanoparticules

La charge effective des nanoparticules obtenues par condensation des ions sur les surfaces des NPs est mesurée par le potentiel zêta (qui va être discuté un peu plus loin). Ce potentiel nous renseigne sur la stabilité colloïdale. En effet, cette charge globale nous indique sur le potentiel des forces de répulsion existantes entre les particules ce qui permet ainsi de prédire la stabilité à long terme de la suspension. Cette charge effective des nanoparticules est primordiale dans les phénomènes électrocinétiques lorsque les suspensions colloïdales sont soumises à un champ électrique externe (cf I-2.5).

2.3.3. Concentration des nanoparticules

La concentration d'une dispersion colloïdale est représentée par la concentration massique C_m qui correspond à une simple fraction de la masse de matériau qui constitue les nanoparticules utilisées au cours de la synthèse par unité de volume final. Cette concentration des NPs peut intervenir dans la stabilité colloïdale en impactant la structure de la double couche électrique qui dépend de la force ionique du milieu (qui est liée à la nature et à la concentration des ions). A titre d'exemple, l'augmentation de concentration d'un électrolyte de charge opposée à la charge de surface des particules a pour effet de réduire l'intensité des forces répulsives électrostatiques et favorise ainsi l'agrégation des NPs. De plus, il est nécessaire de savoir que la toxicité des NPs d'or dépend de leurs tailles, leurs charges et leurs états d'aggrégations [103] et aussi de leurs concentrations [104] (cf I-2.9).

2.4. Méthodes de synthèse de nanoparticules d'or et leurs mécanismes de stabilisation

Dans cette partie, nous allons décrire les différentes méthodes de synthèse des NPs d'or, en détaillant les méthodes les plus exploitées dans la littérature qui sont : la méthode de Turkevich et celle de Brust- Schiffrin. Cependant, pour le cas des NPs d'or utilisées durant cette étude, ces dernières n'étaient pas synthétisées dans le laboratoire hôte mais plutôt commercialisées de sigma-Aldrich.

2.4.1. Méthode de Turkevich : Nanoparticules d'or stabilisés par effet électrostatique

Cette méthode a été mise au point en 1951 par Turkevich et al [105] mais a été revue par G. Frens en 1971 [106]. Elle a pour but de synthétiser des NPs d'or relativement mono disperses (de l'ordre de 10 à 20 nm) sous forme sphérique et en suspension dans l'eau à partir de d'acide chloraurique $[\text{AuCl}_4]^-$ - et d'une solution de citrate de sodium. Cette méthode se déroule en deux étapes ; en premier temps un sel précurseur d'Au (III) solubilisé dans l'eau sous forme d'un complexe $[\text{AuCl}_4]^-$ - est porté à ébullition et en deuxième temps une solution de sodium de citrate est ajoutée. En effet, afin d'avoir le réseau cristallin constituant l'or, une réaction d'oxydoréduction se déroule en multi-étapes pour réduire le complexe $[\text{AuCl}_4]^-$ - et former le métal neutre Au (0) à l'aide des ions citrates (Ct). Après un échange de ligands, l'or est réduit en Au (II) et puis en Au (I) et le citrate se transforme en dicarboxylate d'acétone, ce qui joue le rôle de catalyseur dans la formation de l'or. Une réaction de dismutation est alors réalisée pour former l'Au (0) et le complexe initial $[\text{AuCl}_4]^-$ (Figure 5).

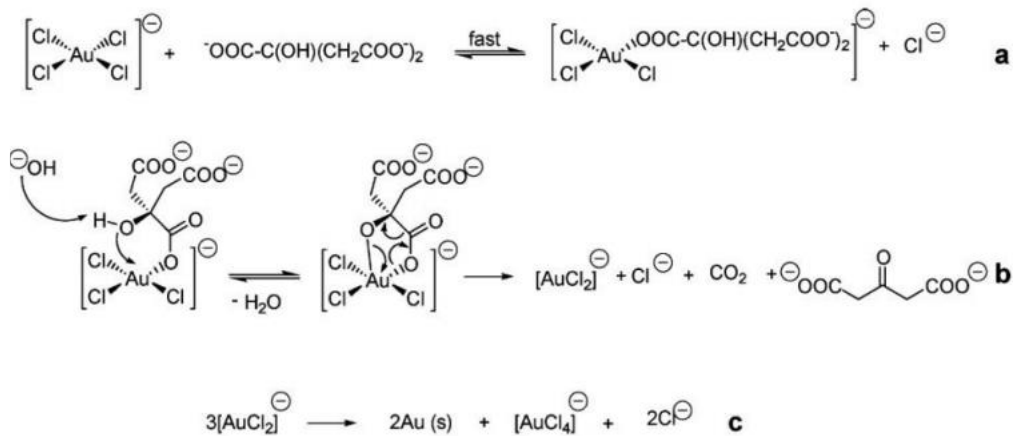


Figure 5 : Réduction multi-étapes du complexe $[\text{AuCl}_4]^-$ par les ions citrates [107] : **a)** échange de ligand, **b)** décarboxylation puis **c)** dismutation.

Ensuite, la nucléation et la croissance cristalline [107], qui se déroule sur des germes (induite par la présence d'un solide qui peut être un cristal ou une impureté), se réalise jusqu'à ce que la réduction de l'or ionique soit totale (Figure 6a).

Le citrate (acide tricarboxyliques) adsorbé à la surface des NPs joue un rôle prépondérant dans la stabilité colloïdale des particules. En effet, ces NPs ayant des groupement tricarboxylates à leur surface induisent des charges négatives ce qui leur permettent de se repousser mutuellement par les forces répulsives électrostatiques. Ceci empêche ainsi leur

agrégation et favorise leur stabilisation à pH basique, neutre ou faiblement acide (Figure 6b). Le citrate donc joue à la fois le rôle du réducteur et de stabilisateur.

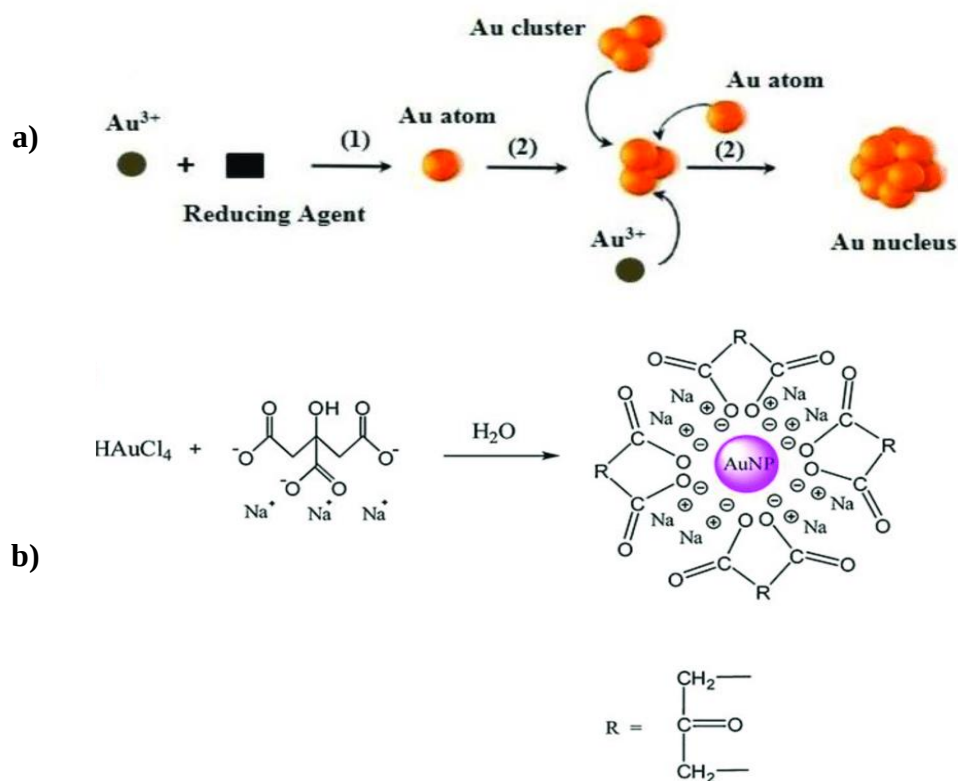


Figure 6 : Le processus de nucléation des NPs d'or et l'adsorption des ions citrates : **a)** Processus de nucléation pour la synthèse des NPs d'or. **b)** Structure des ions citrates adsorbés en surface des NPs d'or [106].

2.4.2. Méthode de Brust et Schiffrin : Nanoparticules d'or stabilisées par effet stérique (par des thiols)

Cette méthode, mise au point en 1994 par Brust et Schiffrin [108], contrairement à la méthode Turkevich, permet la synthèse des NPs d'or en milieu organique. Cette méthode consiste à mélanger l'acide chloraurique avec le bromure de tétraoctylammonium dans une solution de toluène et de borohydrure de sodium. Durant cette synthèse, le bromure de tétraoctylammonium va jouer le rôle de stabilisateur et de catalyseur de transfert de phase tandis que le borohydrure de sodium va agir comme agent réducteur du Au (III) en Au (0) en présence du bromure de tétraoctylammonium. Suivant cette méthode, le bromure de tétraoctylammonium ne présente pas une forte liaison à la surface de l'or ce qui n'empêche pas les NPs de s'agréger et de se précipiter. La fonctionnalisation de ces NPs avec des polymères thiolés permet donc de prévenir l'agrégation en obtention des solutions colloïdales plus au moins stables. Le diamètre moyen des NPs formées à partir de cette méthode est de l'ordre de 1 à 5 nm.

2.4.3. Autres méthodes : Perrault et Chan, sonochimie.

La synthèse des NPs d'or a été décrite longtemps après par d'autres scientifiques. En 2009, Perrault et Chan, décrivent un complément de la méthode de Turkevich qui permet de former des NPs mono disperses mais de tailles plus grandes (de l'ordre 50 à 200 nm). En vue de la taille des NPs utilisées durant la thèse qui est de 40 nm, ces NPs ont été synthétisées par la méthode Perrault et Chan. En effet, cette méthode revue consiste à réduire l'acide chloraurique par l'hydroquinone dans une solution aqueuse contenant des NPs d'or de petites tailles [108]. La sonochimie est une méthode qui consiste à obtenir des nanofils d'or de 30 à 50 nm à partir de la réduction de l'acide chloraurique par des radicaux d'hydroxyle, générées par des ultrasons dans une solution aqueuse avec du glucose.

2.5. Les phénomènes électrocinétiques

Comme souligné précédemment, dans un liquide, les NPs se caractérisent par la présence d'une double couche électrique à leur surface. Ces charges électriques influencent le comportement des NPs en présence d'un champ électrique. Ce comportement, défini par le terme électrocinétique, se traduit ainsi par le mouvement de la NP chargée sous l'effet du champ électrique. Ces effets peuvent contribuer à diverses applications qui sont à l'origine de l'utilisation des NPs dans les systèmes biologiques.

L'électrophorèse est un phénomène couramment utilisé pour la séparation des cellules et des macromolécules (ADN, Protéines). Ce phénomène a été décrit vers la fin des années 30 par le biochimiste Arne Tiselius à partir de la séparation de mélanges protéiques [109]. Le principe de l'électrophorèse est fondé sur le déplacement des particules chargées sous l'influence d'un champ électrique. Plus précisément, lorsqu'un champ électrique est appliqué dans un liquide, les particules chargées au sein du liquide sont attirées vers l'électrode de charge opposée (Figure 7). Les particules chargées subissent les forces visqueuses du liquide qui tentent de s'opposer à ce mouvement. Ces forces visqueuses sont définies par le mouvement des contre-ions de la double couche qui se déplacent dans le sens opposé du champ électrique et ralentissent donc le mouvement électrophorétique des NPs. Une fois l'équilibre entre ces forces opposées est atteint, les particules se déplacent avec une vitesse constante.

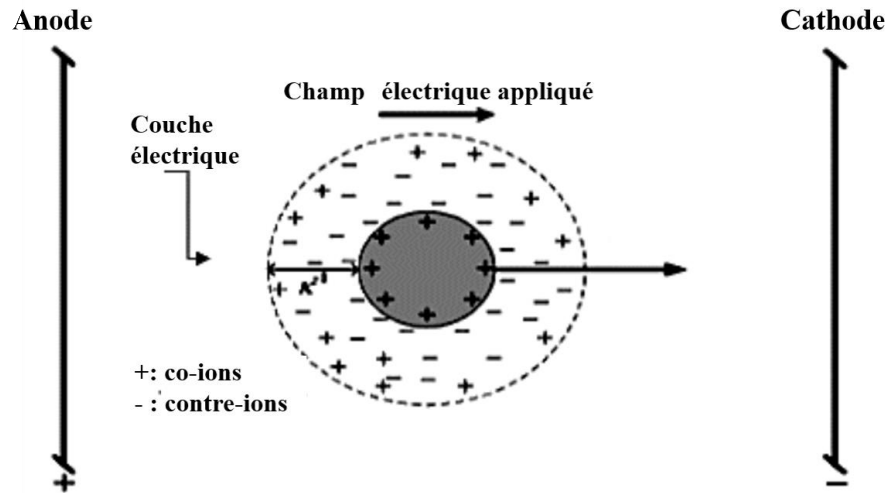


Figure 7 : Illustration du phénomène de l'électrophorèse.

La vitesse de la particule chargée dans le liquide sous l'effet du champ électrique est définie par la mobilité électrophorétique. Cette mobilité (U_E) est traduite par l'équation de Henry (Equation 2) et est dépendante de la viscosité dynamique (η) du liquide, du potentiel diélectrique (ϵ) du milieu, de l'amplitude du champ appliqué (E), du potentiel zêta (ζ) de la particule et du paramètre $f(ka)$ qui est la constante de Henry (qui nous renseigne sur l'épaisseur de la couche électrique) (appelée largeur de Debye). La partie de la mobilité électrophorétique qui est liée au potentiel zêta de la particule sera traitée plus loin dans ce chapitre.

$$U_E = \frac{2 \times \epsilon \times \zeta}{3 \eta} \times f(ka)$$

Équation 2 : Équation de Henry

2.6. Principe de base de la diffusion dynamique de la lumière

2.6.1. Le diamètre hydrodynamique et sa mesure

Le diamètre hydrodynamique, appelé aussi diamètre de Stokes est une dimension physique qui décrit le mouvement aléatoire des NPs dans un fluide, dit mouvement brownien. Le diamètre hydrodynamique nous renseigne sur le diamètre de la particule dans son environnement chimique, autrement-dit de sa couche diffuse (couche de solvation). Ce diamètre hydrodynamique (Figure 8) est extrêmement influencé par la force ionique du milieu ainsi que par la mobilité du soluté. En effet, le mouvement des NPs en suspension est

décrit par la relation de Stokes Einstein qui relie le coefficient de diffusion mesuré par diffusion dynamique de la lumière avec la taille des particules, où le D_h représente le diamètre hydrodynamique, D_t est le coefficient de diffusion transversal (mesuré par la diffusion dynamique de la lumière), k_B est la constante de Boltzmann (qui est connue), T est la température thermodynamique (qui est contrôlée) et η est la viscosité dynamique (qui est connue) (Équation 3). C'est sur ce principe physique fondamental que repose la mesure de taille des nanoparticules.

$$D_h = \frac{K_B \times T}{3\pi\eta D_t}$$

Équation 3 : Équation de Stokes-Einstein

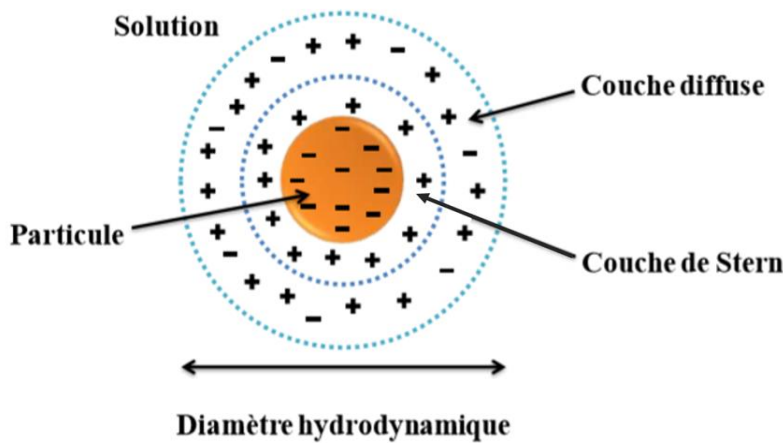


Figure 8 : Représentation du diamètre hydrodynamique de la particule.

Le diamètre hydrodynamique des suspensions colloïdales est mesuré par la technique de diffusion dynamique de la lumière (DLS). La DLS est une technique d'analyse spectroscopique qui permet d'accéder à la taille des particules dans un liquide par la mesure de leurs coefficients de diffusion, et en se reposant sur l'équation Stokes-Einstein discutée ci-dessus. Comme souligné précédemment, cette technique utilise le mouvement Brownien comme « signature » de la taille des particules en suspension. En effet, une source laser, éclaire à une longueur d'onde (typiquement 633nm) l'échantillon contenant les NPs à mesurer, présentes dans une cuvette. Une fois le laser atteint les particules en mouvement brownien, la lumière diffuse dans toutes les directions. Cette lumière diffusée au cours du temps, est collectée à un angle de diffusion connu (perpendiculaire au faisceau incident) par un détecteur à comptage de photons de haute sensibilité. Cette lumière diffusée nous

renseigne ainsi sur les fluctuations dynamiques, qui sont corrélées aux propriétés du mouvement brownien des NPs, autrement-dit, sur la taille d'une sphère qui diffuserait la lumière de la même façon que la particule.

2.6.2. Le potentiel zêta

2.6.2.1. *Principe du potentiel zêta*

Comme souligné dans la section de charge de surface des NPs, lorsque ces dernières sont immergées dans un électrolyte, une condensation d'ions a lieu au niveau de leurs surfaces induisant la formation d'une surface chargée, connue sous le nom de couche électrique de la NP (formée par la couche de Stern, immobile, et la couche diffuse, mobile). Le potentiel zêta est défini par la charge globale effective qu'une particule en suspension acquiert en présence des ions qui l'entourent. Cette valeur de potentiel nous renseigne sur la stabilité colloïdale. D'une manière générale, la stabilité d'une suspension colloïdale est déterminée par un équilibre entre les forces électrostatiques répulsives et les forces attractives de van der Waals. Vu que le potentiel zêta résulte des charges de la particule, sa valeur nous indique sur les forces de répulsion existantes entre les particules ce qui permet de prédire alors la stabilité à long terme de la suspension. En effet, le potentiel au plan de cisaillement est appelé le potentiel électrocinétique et il est plus connu sous le nom de potentiel Zêta noté ζ . Ce potentiel Zêta est mesuré au niveau du plan externe glissant de la particule (Figure 3) qui est situé à la limite de la couche diffuse (mobile) [110], [111]. Ainsi, ce potentiel mesuré au niveau du plan du cisaillement caractérise la distribution ionique et donc la charge électrique de la NP au voisinage de sa surface en fonction de son environnement.

Classiquement, les solutions des nanoparticules avec des valeurs de potentiel zêta supérieures à +25 mV ou inférieures à -25 mV sont généralement considérées comme stables [112]. Dans le cas contraire, les solutions de NPs avec une faible valeur de potentiel zêta finiront par s'agréger en raison des attractions inter-particulaires de van der Waals [113]. Il est nécessaire de mentionner que la conductivité et la force ionique du milieu et le pH sont des paramètres qui affectent le potentiel zêta [114].

2.6.2.2. *Mobilité électrophorétique (Formule de Henry)*

La mesure du potentiel zêta des NPs chargées est effectuée par un zetasizer en utilisant le procédé de diffusion de la lumière par analyse de phase, PALS. Cette mesure est

généralement indirecte vu qu'elle est estimée à partir de la mobilité électrophorétique de la nanoparticule une fois soumise à un champ électrique externe et qui repose sur l'approximation de Henry (Equation 2). En effet, le déphasage du faisceau laser incident provoqué par le mouvement des NPs, qui est induit par l'application du champ électrique à travers la suspension, est corrélé à la mobilité de la particule. Cette vitesse de déplacement est proportionnelle à leur potentiel zêta et à l'intensité du champ. Cette mobilité électrophorétique est ainsi convertie en potentiel zêta par application des théories de Hückel et de Smoluchowski [115], [116]. Comme discuté précédemment, la mobilité électrophorétique dépend d'une fonction de Henry $f(ka)$ où a représente le rayon de la NP et k^{-1} l'épaisseur de la double couche électrique (appelée aussi la longueur de Debye). Cette fonction $f(ka)$ est une fonction monotone du produit ka qui peut prendre des valeurs comprises entre 1 et 1,5 en fonction de la variation de ka allant respectivement de 0 à l'infini. En effet, pour mesurer la mobilité électrophorétique de la NP, deux cas limites doivent être considérées :

- Lorsque $ka \gg 1$, le rayon de courbure de la NP est grand par rapport à l'épaisseur de la double couche électronique : on obtient alors la relation Smoluchowski où la fonction de Henry tend vers 1.5. Dans ce cas de figure, l'épaisseur de la double couche électrique devient tellement petite qu'on peut assimiler la surface de la particule à une surface plane où le mouvement du fluide au niveau de cette couche devient similaire à un écoulement électroosmotique.
- Lorsque $ka \ll 1$, le rayon de courbure de la NP est faible par rapport à l'épaisseur de la double couche électronique : on obtient alors la relation de Huckel où la fonction de Henry tend vers 1. En effet, dans ce cas de figure, ce sont les forces de frottements visqueux qui sont dominantes et qui sont ainsi responsables des forces électriques s'exerçant sur les particules, d'où l'épaisseur importante de la double couche électrique.

Par ailleurs, ces modèles de Hückel et de Smoluchowski, ne sont applicables que lorsqu'il s'agit des NPs sphériques dispersées dans un milieu polaire, sans oublier de tenir compte de la viscosité du milieu [117], [118].

2.6.3. Polydispersité des populations

La polydispersité des population, mesurée par la DLS, est définie par la distribution en taille (diamètre hydrodynamique) des différentes NPs au sein d'une population. Cette répartition des NPs se traduit par un indice de polydispersité PDI [119] qui est mesuré par des algorithmes d'inversion (comme par exemple the cumulant expansion [120]). Cet algorithme est basé sur des modèles monomodaux qui comprennent une seule population de taille. En effet, à partir d'un diamètre hydrodynamique moyen, cet algorithme permet d'extraire une largeur de distribution des NPs. Dans ce cas, les NPs ayant un $PDI < 0.1$ sont considérées comme mono disperses. Cependant, dans le cas des NPs polydisperses, d'autres algorithmes basés sur des calculs matriciels et l'inversion de Laplace (exemple : CONTIN [121]) sont utilisés pour trouver à la fois plusieurs tailles de NPs mais aussi déterminer l'indice de polydispersité de la population. Un échantillon dont le PDI est > 0.1 est considéré comme polydisperse.

2.7. Les applications des nanoparticules d'or en médecine

L'intérêt des NPs d'or n'a pas cessé de croître durant ces dernières années en raison de leurs propriétés uniques et qui ouvrent des champs d'applications très vastes, notamment : les applications en nanomédecine.

Dans le domaine de la biologie et la thérapie, ce sont les propriétés optiques des NPs d'or et leur biocompatibilité qui comptent le plus. Grâce à ses propriétés, les NPs d'or ont été largement utilisées ces dernières années pour améliorer la thérapie ciblée et le diagnostic précoce de diverses maladies (par exemple les maladies neurologiques, cardiaques, hépatiques ou encore le cancer) [122]. Le cancer est considéré aujourd'hui par l'organisation mondiale de la santé (OMS) comme l'une des principales causes de mortalité dans le monde. Pour cela, divers domaines de recherche ont été orientés vers le dépistage et le traitement du cancer par l'utilisation des NPs d'or. Les principales applications des NPs d'or pour lutter contre cette maladie sont résumées [123], [124] dans la Figure 9.

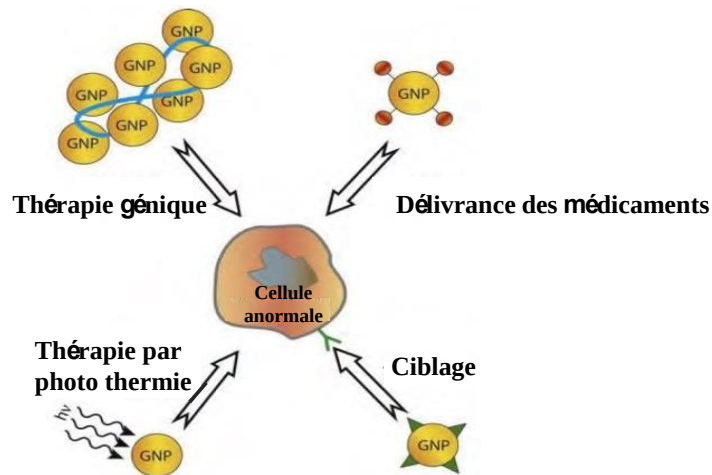


Figure 9 : Schéma représentant les différentes applications médicales des nanoparticules d'or.

2.7.1. Agent de contraste pour la localisation des tumeurs

Grâce à leurs propriétés optiques uniques, plus particulièrement, leurs interactions avec la lumière, les NPs d'or sont détectées par diverses techniques. En effet, les NPs d'or ont la particularité d'absorber et diffuser la lumière incidente ce qui fait d'elles de bonnes candidates en tant qu'agents de contraste. En plus des interactions avec la lumière visible, les électrons des NPs d'or ont la capacité d'interagir avec les rayons X en les diffusant d'une manière efficace d'où leur utilisation en tant qu'agent de contraste également pour l'imagerie avec des rayons X [55], [125], [126]. L'imagerie aux rayons X est une technique incontournable pour le diagnostic médical et bien ancrée dans la pratique clinique. Afin d'améliorer les diagnostics des pathologies et de minimiser les effets néfastes liés à l'exposition de l'organisme à ces rayonnements ionisants puissants, l'utilisation de NPs d'or s'avère nécessaire. Ces NPs vont interagir avec le stimulus physique de sorte à le rendre plus intense, et d'où une meilleure qualité de l'imagerie.

2.7.2. Radio sensibilisation grâce à des nanoparticules d'or

La radiothérapie a été longtemps pratiquée pour lutter contre le cancer, seule ou en combinaison avec la chimiothérapie [127], [128]. En effet, la radiothérapie consiste à endommager les cellules tumorales par l'envoi de radiations ionisantes (tel que les rayons X ou des électrons ou des ions produits par des accélérateurs linéaires). Cependant, malgré que cette radiation soit appliquée localement sur les tumeurs, les cellules saines voisines sont touchées en y induisant ainsi des dommages irréversibles. La combinaison de la radiothérapie et des NPs d'or a été appliquée pour minimiser les doses rayonnantes reçues

par les patients et aussi augmenter l'efficacité des traitements par une localisation plus ciblée de la zone d'irradiation (en utilisant des NPs actives, cf section I-2.9) [129]–[131]. En effet, ces NPs d'or lorsqu'elles sont excitées par les rayons incidents vont diffuser et libérer des électrons qui vont améliorer le signal reçu, d'où une irradiation ciblée des cellules tumorales plus importante.

2.7.3. Thérapie par photothermie

Le traitement du cancer par photothermie a la même finalité que la radiothérapie, mais utilise une élévation de la température pour y parvenir. La thérapie par photothermie consiste en l'ablation des tumeurs par échauffement local provoqué par un champ extérieur (laser par exemple) qui va conduire à la destruction des cellules cancéreuses. A nouveau ces traitements entraînent des dégâts irréversibles dans les tissus sains touchés par le laser. Afin de minimiser ces effets liés à la puissance du laser, une administration ciblée des NPs d'or peut y être associée. En effet, ces NPs d'or localisées dans la zone traitée, une fois excitées par le laser, vont convertir la lumière en une énergie suffisante à augmenter la température (pic de chaleur après 100 secondes d'exposition et ça peut rester plus que 5min) de quelques degrés (plus que 45°C) induisant ainsi la destruction des cellules par hyperthermie locale [132]–[134].

2.7.4. Vectorisation et délivrance des médicaments

De nombreuses molécules à potentiel thérapeutique sont découvertes chaque jour dans le monde scientifique. Cependant, ces molécules demeurent peu efficaces lorsqu'elles sont injectées seules *in vivo* et ceci à cause de diverses contraintes aussi bien techniques que biologiques (à l'instar d'une incapacité à franchir les barrières biologiques ou aussi d'une faible endocytose...). Afin de surmonter toutes ces contraintes [135], l'utilisation des nanoparticules en tant que « nanovecteurs » pourraient améliorer l'efficacité thérapeutique de ces molécules médicamenteuses. En effet, l'idée de la vectorisation consiste à associer une molécule d'intérêt à un vecteur nanométrique qui est capable de franchir les barrières biologiques, de protéger la molécule transportée et de la délivrer sous forme active dans la cellule cible. Grâce à leur biocompatibilité, leur non-toxicité, leur rapport surface/volume important et leur facilité à être fonctionnalisées, les NPs d'or sont considérées comme de bonnes candidates pour la vectorisation et la délivrance non seulement des médicaments [136]–[138] mais aussi des acides nucléiques [139]–[141]. Afin de viser un tissu ou un type

cellulaire spécifique, le recours à la fonctionnalisation des surfaces des NPs d'or par des biomolécules spécifiques s'avère nécessaire.

2.8. Chimie de surface des nanoparticules d'or

2.8.1. Origine et définition

Le greffage des composés organiques à la surface des NPs d'or est un point clé pour leur stabilité colloïdale en milieu physiologique. Un large panel de molécules organiques est disponible dans la littérature pour la fonctionnalisation organo-métallique. Le poly(éthylène)glycol (PEG) est considéré comme le polymère le plus utilisé dans littérature et il est basé sur la liaison or-thiol. En effet, les NPs d'or sont connues pour leur chimie de surface bien adaptée à l'attachement des molécules à base de soufre, les thiols. Afin de limiter les contraintes rencontrées *in vivo* telles que l'opsonisation des NPs et leur capture par les macrophages, le greffage du PEG à la surface des NPs a été longuement étudiée [142]–[144] et remonte à plusieurs décennies [145]. En effet, synthétisé à partir de monomères d'oxyde d'éthylène, le PEG est un polymère hydrophile de masse moléculaire inférieure à 20 000 Da, flexible et biocompatible (Figure 10). Une fois greffé à la surface des NPs, les PEGs vont stabiliser les nanoparticules en empêchant les interactions avec les opsonines par répulsion stérique [146]. Ces NPs PEGylées, dites de seconde génération, présentent un caractère appelé furtif du fait qu'elles ne sont pas reconnues par les macrophages (en empêchant l'adsorption des opsonines à la surface NPs et donc leur élimination par les cellules immunitaires). Par ailleurs, il a été démontré que le PEG peut être greffé à la surface des NPs d'or sous différents poids moléculaires allant de 200 à 20 000 Da aboutissant ainsi à des NPs d'or avec une charge de surface décroissante pour des longueurs de chaîne croissantes [147]. En effet, le revêtement des NPs d'or par les chaînes de PEGs peut diminuer la charge des NPs, par rapport aux NPs d'or non PEGylées. Ceci peut être expliqué par le camouflage/masquage de la charge de la NP, suite à la présence des longues chaînes de PEG à leur surface [148]. Ainsi, les NPs PEGylées présentent un zêta-potentiel plus faible comparativement aux NPs non PEGylées et donc sont plus stables (cf I - 2.6.2). D'une manière générale, l'habillage de PEGs sur les NPs d'or permet donc d'améliorer leur stabilité colloïdale en milieu biologique et leur furtivité *in vivo* [149].

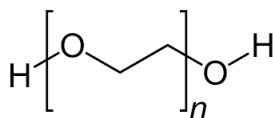


Figure 10 : Structure générale du PEG (avec $n \geq 4$).

2.8.2. Fonctionnalisation par des molécules de polyéthylène glycol

Le revêtement par le PEG peut être réalisé selon différentes approches qui dépendront du type du polymère (plus spécifiquement la nature des groupements qui occupent ses extrémités) qui va servir de ligand aux nanoparticules d'or. Par exemple, le PEG peut posséder un groupement thiol dans l'une de ses extrémités (-SH). L'autre extrémité de la molécule peut être constituée de divers groupements. Ici, le groupement méthyle est choisi de façon à rendre la molécule chimiquement inerte (Figure 11). Ce polymère, appelée ainsi le methyl ether PEG thiol (mPEG-thiol), va interagir avec les nanoparticules d'or commercialisées dans l'eau citratée afin de les stabiliser. En effet, dans une solution neutre, le citrate adsorbé à la surface de ces NPs va induire des charges négatives qui vont permettre aux NPs de se repousser mutuellement, d'où le rôle stabilisateur du citrate. Cependant, dans une solution ionique, l'adsorption de plusieurs ions à la surface des NPs permet de déstabiliser les NPs d'or citratées (via l'adsorption de plusieurs ions à la surface qui provoquent des forces de van der Waals entre les NPs) et donc une aggrégation de ces NPs est provoquée. Ainsi, le revêtement par le PEG permet de stabiliser ces NPs d'or en diminuant les forces attractives. En effet, une réaction d'échange entre le citrate et le groupement thiol [150] aboutit à une liaison électrostatique or-thiol [151] (Figure 12). Le revêtement des nanoparticules par ces polymères peut être affecté par divers facteurs tel que le pH, la force ionique et la température de la solution [152]. Outre son rôle sur la charge de ces NPs (discuté précédemment), il est nécessaire de prendre en compte que ces polymères thiolés permettent également d'ajuster d'autres caractéristiques de la nanoparticule comme par exemple sa taille (qui elle-même dépend de la longueur de ces polymères).

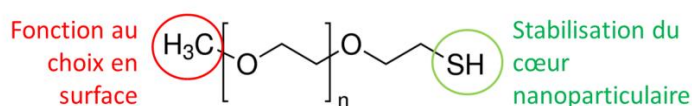


Figure 11 : Structure du mPEG-thiol.

Réaction d'échange entre le citrate et le PEG-thiol

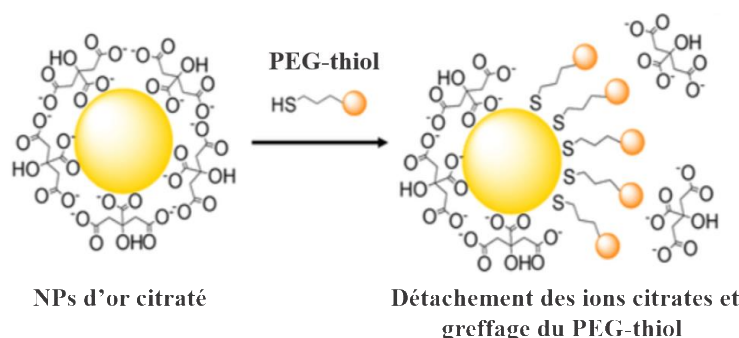


Figure 12 : Schéma de fonctionnalisation des NPs d'or par le PEG-thiol.

2.8.3. Rôle du polyéthylène glycol dans la stabilisation des NPs d'or

Comme souligné précédemment, les PEGs ont essentiellement pour rôle la protection et la stabilisation des NPs d'or. Cette protection peut être aussi bien inter-particulaires ou contre des cellules (macrophages ou autres) du système biologique. En effet, *in vitro* le revêtement de PEG va réduire l'adsorption des ions à la surface des NPs d'or en empêchant ainsi leur agrégation. De plus, *in vivo*, en diminuant l'interaction avec les protéines, la PEGylation permet de lutter contre l'internalisation des NPs par les cellules du système réticulo-endothélial et donc empêche leur élimination prématurée du système vasculaire. Ceci permet ainsi une augmentation de leur temps de circulation [122], [153], [154]. Outre sa fonction de protection de la NP, ces polymères organiques peuvent contribuer en tant qu'intermédiaire pour la fonctionnalisation avec des molécules complexes (par exemple anticorps, fluorophores...) possédant des propriétés adaptées pour une application donnée. Afin de cibler certains tissus, le recours à la post-fonctionnalisation de surface par ces biomolécules spécifiques devient intéressant.

2.9. Interactions NPs d'or/cellules tumorales

L'interaction des NPs d'or avec les cellules tumorales nécessite un ciblage de la zone tumorale. Afin de cibler certaines fonctions biologiques, l'ajout des biomolécules spécifiques à la surface des NPs d'or devient nécessaire et c'est ce qu'on appelle le ciblage actif. Cependant, les NPs peuvent agir par ciblage passif des tumeurs par l'effet EPR (pour « enhanced permeability and retention » [155]–[157]). En raison de plusieurs phénomènes, dont les plus importants sont le développement anormal des vaisseaux sanguins et l'inefficacité du drainage lymphatique dans les tissus cancéreux, les NPs ont

tendance à s'accumuler dans les tissus tumoraux. En effet, la première raison fait suite à de larges écarts entre les cellules endothéliales tumorales qui deviennent ainsi non-jointives et donc plus perméables aux petites particules, les NPs. En revanche, la seconde raison, fait en sorte d'empêcher l'évasion des particules assez grosses de la tumeur. Ces deux effets ont pour conséquence de piéger les NPs au sein des tumeurs solides (Figure 13a). La combinaison du ciblage actif et passif ne fait qu'augmenter l'efficacité du traitement thérapeutique en surmontant ainsi les contraintes des barrières biologiques (à l'instar de l'amélioration de la délivrance de molécules thérapeutiques peu sensibles ou peu solubles [158], [159]). De façon générale, la fonctionnalisation ciblée des NPs d'or, qui a pour but de vectoriser le principe actif des molécules thérapeutiques au niveau des cellules tumorales à traiter, est devenue, de nos jours, un enjeu important dans la thérapie anti-cancéreuse. En effet, les cellules cancéreuses portent à leur surface des récepteurs spécifiques. Afin de les cibler, les NPs d'or sont couplées à des ligands spécifiques de ces récepteurs leur permettant ainsi de se diriger vers les cellules tumorales plutôt que vers les cellules saines. Cependant, ce ciblage actif s'effectue par ces ligands spécifiques, ce qui va procurer à la fois la stabilité des NPs d'or et leur ciblage actif vers les cellules cancéreuses. Si ces NPs sont recouvertes de médicaments, ces dernières ont pour but de vectoriser les médicaments au sein des cellules à traiter d'où leur dénomination : nano vecteurs [160]–[163] (Figure 14). La fonctionnalisation des NPs PEGylées par des ligands spécifiques dépendra de la nature du PEG choisi, et plus spécifiquement de la possibilité de la deuxième extrémité du PEG à interagir avec les groupements fonctionnels du ligand (par exemple l'extrémité CH₃ est inerte tandis que l'extrémité COOH est capable de se lier à un ligand). Un large panel de molécules thérapeutiques (par exemple des anticorps, des acides nucléiques...) peut être greffé à la surface des NPs afin de les rendre actives et les cibler ainsi pour de multiples thérapies. En vue du fonctionnement biologique irrégulier des cellules cancéreuses, ces dernières, selon la localisation de la tumeur, ont tendance à surexprimer des protéines de surface qui sont ainsi utilisés comme marqueurs spécifiques pour leur reconnaissance. Les récepteurs les plus abondants dans les cellules cancéreuse sont les récepteurs de la transferrine et de l'acide folique, d'où l'utilisation abondante de transferrine ou de folate en tant que ligands pour la délivrance des médicaments [164]–[167]. Par ailleurs, par exemple dans les tumeurs solides (supérieures à 1–2 mm³) et vascularisées (Figure 13b), le ciblage actif de l'angiogenèse (formation des nouveaux vaisseaux sanguins) et en particulier des cellules endothéliales cancéreuses peut provoquer la mort des cellules cancéreuses d'une manière indirecte. En effet, en ciblant les cellules endothéliales, l'angiogenèse peut être

perturbée ce qui aboutit à la destruction des vaisseaux sanguins et donc les cellules cancéreuses sont détruites par un manque d'apport d'oxygène et de nutriments. Le ciblage actif des cellules endothéliales, tout comme le ciblage de tout type de cellules cancéreuses, se fait par activation des NPs (par exemple en les fonctionnalisant avec le facteur de croissance VEGF) contre des récepteurs surexprimés sur les cellules endothéliales cancéreuses (comme par exemple : le récepteur du facteur de croissance endothélial VEGFR). Le récepteur extracellulaire de l'intégrine $\alpha\beta3$ est aussi très abondant dans les cellules endothéliales et donc peut être utilisée pour activer les NPs contre ce récepteur. Ceci permet ainsi de cibler les cellules endothéliales cancéreuses et donc permet de tuer par conséquent les cellules cancéreuses de la tumeur.

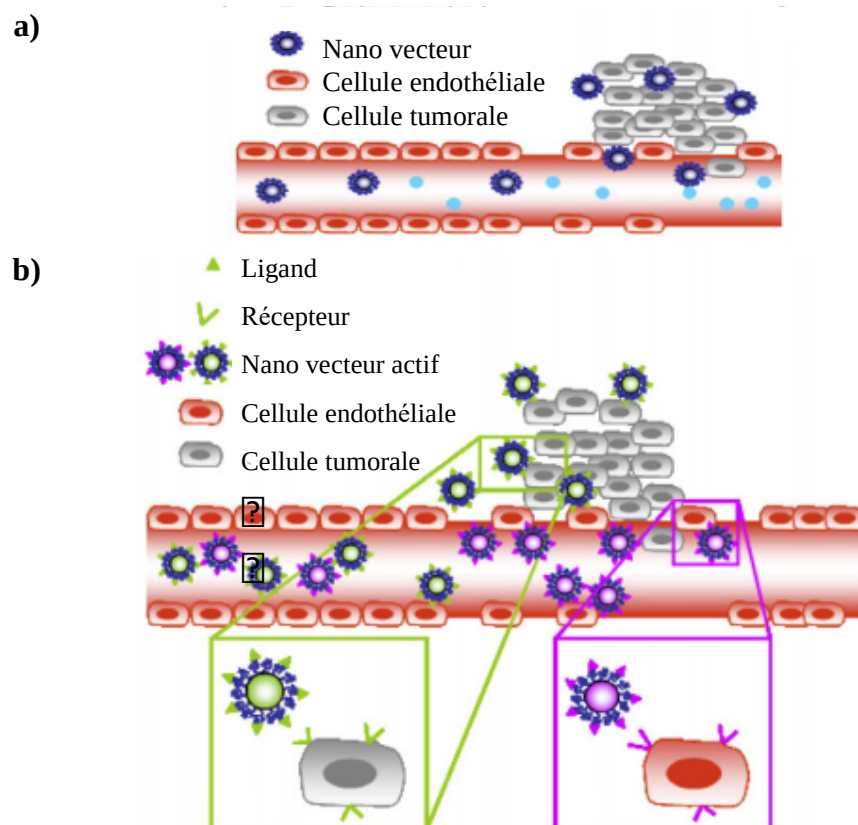


Figure 13 : Ciblage actif et passif des nano vecteurs. **a)** Ciblage passif des nano vecteurs par l'effet EPR dans une tumeur solide. **b)** Ciblage actif des nano vecteurs dans une tumeur solide. Figure modifiée à partir de la référence [168].

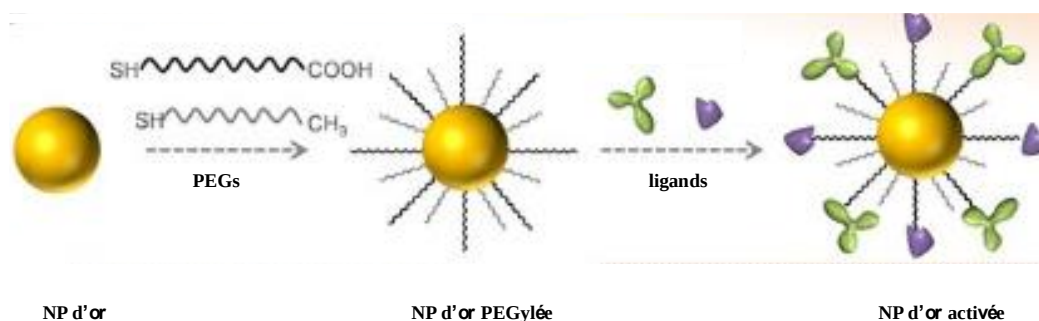


Figure 14 : Fonctionnalisation des NPs d'or. Figure adaptée à partir de la référence [169].

2.9.1. Prise en charge des NPs

La liaison du ligand avec son récepteur entraîne l'entrée des NPs à l'intérieur de la cellule et ce fait est connu sous le terme d'internalisation. Cette internalisation dépend principalement des différentes propriétés physicochimiques des NPs [170]. Ces paramètres peuvent être la forme, la taille, la charge et la nature des groupements de surface des NPs. D'une manière générale, les NPs ayant une taille supérieure à 200 nm sont généralement phagocytées. Tandis que, les NPs de tailles plus petites sont endocytées. L'impact de la forme sur l'internalisation demeure peu étudié mais les NPs d'or sphériques semblent s'internaliser plus efficacement [171]. En ce qui concerne la taille, Arnida et al [172] ont montré que les NPs d'or sphériques ayant une taille de 50 nm sont les mieux internalisées. Dans ce cas, l'internalisation de ces NPs, dépendante essentiellement de la nature des protéines présentes sur la membrane, est de 500 à 6000 par cellule [173]. La charge de surface semble aussi influencer l'internalisation des NPs à l'instar des nanoparticules cationiques qui ont une meilleure affinité avec les membranes cellulaires. Par ailleurs, la voie d'internalisation des NPs est principalement dépendante de la nature de leur surface, ce qui va conditionner l'interaction des NPs avec la surface membranaire (endocytose médiée par la clathrine, macropinocytose, phagocytose...). D'une manière générale, la voie d'internalisation ainsi que le devenir intracellulaire des NPs thérapeutiques sont dépendants des caractéristiques physico-chimiques de ces NPs et présentent un enjeu clé pour l'efficacité du médicament. Une fois les NPs à l'intérieur de la cellule, la libération du médicament dans l'environnement enzymatique des lysosomes ou directement dans le cytoplasme cellulaire est connu sous le terme de délivrance des médicaments et joue un rôle prépondérant sur l'activité pharmacologique [174].

2.9.2. Toxicité des NPs d'or

Etant biocompatible, l'or colloïdal a été longuement étudié en thérapie. Cependant de nombreuses études utilisant les NPs d'or suscitent des incertitudes concernant leur toxicité une fois en contact avec les organismes vivants. Cette toxicité provient principalement des paramètres physico-chimiques tel que la charge surfacique, la forme, la taille et la nature du stabilisateur [175], qui sont impliqués dans l'interaction NPs-cellules. En effet, plusieurs chercheurs ont confirmé que la toxicité des NPs d'or dépend de la taille, forme et de la nature des groupements de surface des NPs [176]. Par exemple, Chen et al ont montré que la toxicité des NPs d'or sphériques est liée à leur taille. L'injection des NPs, ayant une taille entre 8 et 37 nm, a montré des perturbations de santé entraînant la mort des souris, tandis que l'injection à la même concentration des NPs, ayant une taille inférieure à 8 nm ou supérieure 37 nm, n'ont montré aucun impact sur les souris [177]. En ce qui concerne la forme, Wang et al [178] ont étudié *in vitro* la toxicité des NPs d'or sous différentes formes : hexapodes, bâtonnets et en cage, après 48h d'incubation avec des cellules cancéreuses de sein (MDA-MB-435). Ils ont démontré que les nanohexapodes sont moins toxiques que les nano bâtonnets et NPs d'or en cage. Ils ont aussi montré que les nanohexapodes sont les premiers à être internalisés suivis des nano bâtonnets et des NPs en cage. Ils ont confirmé cette observation avec les mêmes formes des NPs d'or mais recouverts de PEG. Par ailleurs, Niidome et al [179] ont comparé la cytotoxicité des nano bâtonnets stabilisés ou bien par le bromure de cétrimonium (CTAB) ou bien par le PEG, sur des cellules Hela. Ils ont démontré que pour une concentration de 0.05mM de NPs, la viabilité des cellules est de l'ordre de 90% pour les nano bâtonnets PEGylés tandis que dans le cas des nano bâtonnets-CTAB, la viabilité des cellules n'est que de 20%. A 0.1 mM, les cellules incubées avec les nano bâtonnets-CTAB sont toutes mortes (0% de viabilité) alors que les nano bâtonnets-PEGylées n'ont montré aucun effet sur la viabilité des cellules (toujours 90%). Par ailleurs, Parta et al. ont constaté que les NPs citratées n'étaient pas cytotoxiques pour les cellules rénales des hamsters, mais cytotoxiques à certaines concentrations pour les cellules de carcinome humain [180]. Cependant, Lopez chavez et al. ont montré que l'exposition des cellules humaines du cancer du côlon (HT-29) et du foie (HepG2) à des NPs d'or de différents diamètres (ici, 10,30 et 60nm) engendrent des dommages de l'ADN et la production des ROS *in vitro*. Ces mêmes chercheurs ont regardé l'effet de ces NPs sur des rats Wistar. Ils ont montré, par spectrométrie de masse à plasma induit (ICP-MS), la présence d'une grande quantité des NPs d'or dans le foie. Une carbonylation des protéines et une peroxydation des

lipides ont été observées suite à l'accumulation de ces NPs d'or. Ceci a conduit ainsi à des cassures d'ADN irréversibles. Par ailleurs, ces chercheurs ont montré que cet effet toxique des NPs d'or augmente en diminuant le diamètre des NPs d'or (ici, 10nm), autrement-dit, plus la NPs est petite, plus elle facilement endocytée dans les cellules et induit des dommages au niveau de l'ADN. D'une manière générale et afin d'être sûrs de la non-toxicité des NPs utilisées, il serait préférable de tester la toxicité de chaque type de NPs d'or employée à chaque étude.

Chapitre II : L'électroporation

L'électroporation est un procédé physique basé sur l'interaction entre un champ électrique et des cellules, et plus spécifiquement leurs membranes plasmiques. Afin de comprendre cette interaction bio-électromagnétique, il est indispensable de rappeler la structure, la composition et les fonctions de la membrane plasmique et également discuter sa réponse aux champs électriques appliqués.

1. La membrane

1.1. Structure et composition de la membrane plasmique

La membrane plasmique, qui est indispensable à la vie de tous les systèmes biologiques, est une structure/barrière biologique qui a essentiellement pour rôle l'isolement de la cellule de son environnement. Autrement-dit assurer la séparation de l'intérieur de la cellule, le cytoplasme, du milieu extracellulaire, tout en maintenant des communications et des échanges entre le milieu intra et extra-cellulaire. Ce rôle biologique est déterminé par le fait que la membrane plasmique contrôle, via sa très large collection de canaux et de récepteurs, tous les échanges entre l'intérieur et l'extérieur, en préservant ainsi l'intégrité et l'activité métabolique des cellules [181]. En effet, la membrane plasmique est composée d'une double couche lipidique, où les lipides vont s'assembler spontanément pour former une membrane d'une épaisseur de 5 nm. Cependant, cette structure lipidique est caractérisée par la présence des protéines, appelées ainsi protéines membranaires (Figure 15).

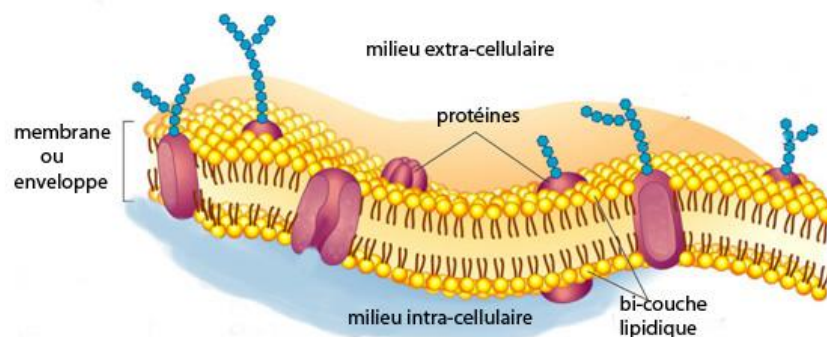


Figure 15 : Représentation schématique de la membrane plasmique. Adapté du site web : <https://www.aquaportail.com/definition-2727-membrane-cytoplasmique.html>

En raison de l'importance de la taille de ces protéines comparativement à celles des lipides, ces derniers sont plus abondants que les protéines au sein de la membrane plasmique. Selon Albert et al [182], d'une manière générale, dans une membrane plasmique, chaque 50 lipides sont accompagnés d'une protéine membranaire. Cependant, la proportion des protéines membranaires varie selon les cellules et en particulier selon l'activité métabolique (par exemple ces protéines membranaires représentent, respectivement 25% et 40%, de la masse de la membrane des cellules nerveuses et des adipocytes[183]).

1.2. Les lipides et leurs rôles de barrière au sein de la membrane

Malgré sa faible épaisseur, la membrane est une structure complexe et dynamique impliquée dans divers processus cellulaires critiques [184], [185]. Afin de comprendre ces différentes fonctions, en particulier, son rôle dans le métabolisme cellulaire, il est nécessaire de détailler d'avantage sa composition chimique. Comme cela a été décrit, la membrane est composée essentiellement de lipides qui représentent à peu près 50% de la masse membranaire. Dans les cellules eucaryotes, la membrane est composée principalement par les phospholipides et le cholestérol [181]. Chaque phospholipide, qui est une molécule amphiphile, est constitué de deux chaînes d'acides gras hydrophobes (queues) et d'une tête hydrophile. En raison de la présence des phospholipides et de la nature de leurs interactions avec le milieu extracellulaire aqueux, la membrane est définie de deux couches externes hydrophiles et une couche centrale hydrophobe. Dans cette partie hydrophobe, les chaînes d'acides gras peuvent être saturées ou insaturées. Ces insaturations jouent un rôle important dans la fluidité de la membrane (discuté en détail dans la section suivante), et ceci est lié au fait que les phospholipides représentent les lipides les plus abondants dans la membrane plasmique. Le cholestérol, jouant un rôle opposé dans la fluidité membranaire, s'associe aux phospholipides.

Cette structure lipidique, indispensable au rôle barrière de la membrane, permet une perméabilité aux petites molécules afin de maintenir l'intégrité de la composition de la cellule. Néanmoins, la membrane plasmique est imperméable aux molécules chargées (les ions) ou les grosses molécules non polaires et non chargées. Etant indispensables au fonctionnement des cellules, ces ions et ces molécules vont être internalisés à l'intérieur de la cellule par des transporteurs, les protéines membranaires.

1.3. Les protéines et leurs rôles dans les échanges avec le milieu extracellulaire

Afin de maintenir le gradients de concentration d'électrolytes, de nutriments et d'autres molécules essentielles, les protéines membranaires vont servir de transporteurs, en impliquant deux voies principales de transports : passif et actif [186]. Chaque protéine membranaire joue un rôle de filtre sélectif, où elle assure le transport de certaines molécules entre les deux compartiments. Ce transport dépend de deux gradients : un gradient chimique, déterminé par la différence de concentration de la substance entre les deux compartiments, et un gradient de potentiel électrique, dû à la différence de de concentration en ions de part et d'autre de la membrane [187]. Le transport, qui ne nécessite pas d'apport énergétique, et implique la présence des protéines membranaires, en particulier les protéines transmembranaires, est connu sous le terme de diffusion facilitée.

1.4. Potentiel transmembranaire de repos

Contrairement au transport facilité, les protéines membranaires peuvent transporter d'une manière active des solutés à travers la membrane en utilisant de l'énergie chimique, généralement de l'ATP. Ce transport nécessitant l'apport d'énergie pour transporter les solutés contre leurs gradient de concentration est appelée transport actif [188]. Les pompes ioniques, en particulier la pompe ATPase Na^+/K^+ , joue un rôle indispensable dans le fonctionnement de la cellule. En effet, cette pompe joue un rôle important dans la mise en place d'un potentiel membranaire. D'une manière générale, la pompe ATPase Na^+/K^+ va constamment faire sortir les ions Na^+ à l'extérieur de la cellule et faire rentrer les ions K^+ à l'intérieur de la cellule. En effet, à chaque cycle de la protéine, la pompe va libérer 3 Na^+ à l'extérieur de la cellule contre 2 K^+ à l'intérieur de la cellule. Ce qui induit ainsi un déficit net en charges positives à l'intérieur de la cellule. Ainsi, ces déplacements d'ions sont à l'origine d'une différence de potentiel de part et d'autre de la membrane, appelée la différence de potentiel de repos ($\Delta\Psi_0$) [189]. Ce potentiel de repos, est essentielle au fonctionnement cellulaire et varie entre -10 mV et -90 mV selon le type cellulaire et l'activité métabolique [190].

2. Introduction à l'électroporation

2.1. Historique et définitions

L'électroporation est définie par l'application d'impulsions, intenses et courtes, de champs électriques sur les cellules afin d'augmenter leur perméabilité membranaire. Les premiers travaux sur ce concept remontent aux années 60 et plus spécifiquement, ont été initiés par Sale and Hamilton en 1968 [191], [192]. En étudiant des microorganismes (des bactéries et des levures), les deux chercheurs ont montré que l'effet létal et non thermique des impulsions sur ces microorganismes dépend de l'amplitude du champ électrique appliqué, du nombre d'impulsions et de la forme de ces microorganismes. En 1972, Neumann et al [193] ont montré que lorsque des granules de chromaffine, utilisées comme modèle de vésicules, sont exposés à des impulsions électriques (ici, 20kV/cm), un relargage de catécholamines et une perméabilité transitoire de la membrane sont causés. Quelques années plus tard, Kinosita et Tsong [194] ont confirmé cette observation et ont montré que lorsque les érythrocytes sont exposés à un champ électrique (ici, 2.2KV/cm), un seuil critique de potentiel transmembranaire est atteint, permettant ainsi aux ions et aux molécules non perméables de traverser les membranes. Selon cette étude, le passage des molécules à travers les membranes est assuré par la présence de pores. En 1982, Neuman et al [195] ont étudié le transfert de l'ADN dans des cellules Lyoma de souris en appliquant un champ électrique plus long (8 kV/cm, 5 microsecondes). Six ans plus tard, Mir et al [196], ont montré qu'en appliquant 8 impulsions carrées de 100µs à 1500V/cm, une perméabilisation de 90% des cellules NIH 3T3 à la protéine antivirale Pokeweed (molécule toxique et non perméable) a été observée. De nos jours, l'électroporation a été étudiée par de nombreux groupes de chercheurs dans le monde [197]–[200].

2.2. Le principe

L'électroporation (électroperméabilisation) se produit lorsque les cellules sont soumises à un champ électrique d'une amplitude suffisamment élevée. Cette technique va déstabiliser les membranes plasmiques en augmentant ainsi leur perméabilité. En effet, les cellules sont placées entre deux électrodes où le champ électrique est appliqué. Les deux zones de la cellule qui sont face aux électrodes sont considérées les plus exposées aux champs électriques (cf. équation de Schwan), montrant ainsi une perméabilisation maximale dans ces deux régions. Selon les paramètres des impulsions électriques (amplitude, durée, nombre

de pulses et la fréquence de leur répétition), les propriétés biophysiques de la membrane plasmique et du milieu extracellulaire [201], l'électroporation peut être réversible, où la membrane plasmique est capable de se réparer après le pulse, ou irréversible, ce qui conduit ainsi à la mort de la cellule. D'une manière générale, l'électroporation réversible est employée pour faire introduire des molécules thérapeutiques d'intérêt. Ces molécules peuvent être des médicaments [202] ou des acides nucléiques [203], [204]. L'électroporation réversible peut aussi contribuer à la fusion des cellules entre elles [205]. Tandis que l'électroporation irréversible est utilisée *in vivo* dans le but de l'ablation tumorale et en cardiologie [206]. Les principales applications de l'électroporation sont résumées dans la Figure 16. Dans la section II-7, les applications de l'électroporation seront discutées plus en détails.

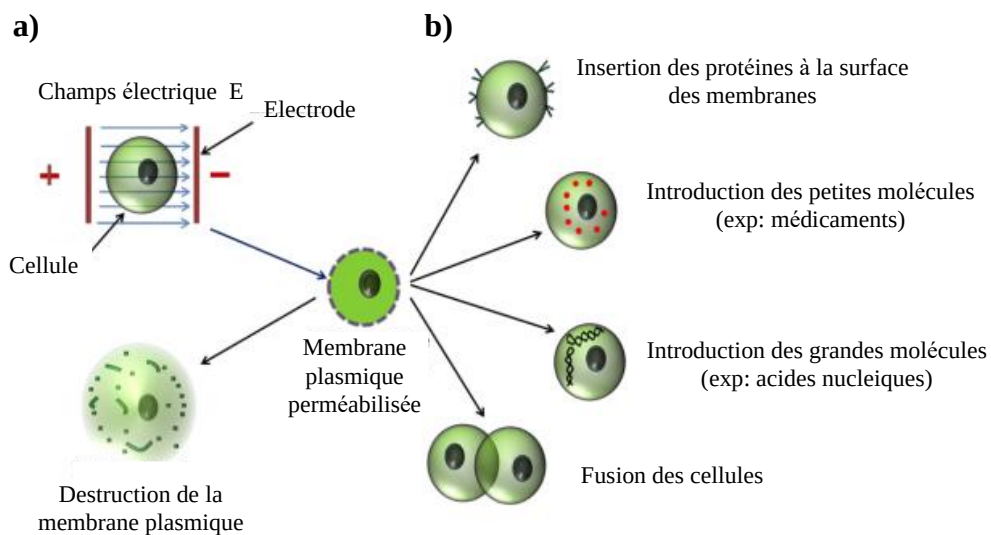


Figure 16 : Différentes applications de l'électroporation. **a)** principe de l'électroporation et perméabilisation localisée. **b)** Applications : perméabilisation réversible, fusion cellulaire et perméabilisation irréversible. Adapté » de la référence [207].

2.3. Le potentiel transmembranaire induit

A l'état de repos, la membrane possède un potentiel de repos, assuré par la fonction des pompes ATPase Na^+/K^+ (cf II - 1.4). Cependant, lorsqu'une cellule est exposée à un champ électrique, les charges (en particulier les ions) contenues dans les milieux intra et extracellulaire se déplacent sous l'action des forces électrophorétiques. Par conséquent, la membrane, qui est considérée comme un isolant d'un point de vue électrique, va se charger. Un potentiel transmembranaire induit ($\Delta\Psi_i$), créé par ce champ électrique, est alors ajouté au potentiel de repos transmembranaire ($\Delta\Psi_0$). Pour les cellules sphériques, ce potentiel transmembranaire induit $\Delta\Psi_i$ est décrit par l'équation 4 [208]

Cette équation est connue sous le terme d'équation de Schwan :

$$\Delta\Psi_i = \frac{3}{2} \cdot R \cdot E \cos(\theta)$$

Équation 4 : Équation de Schwan

Selon l'équation de Schwan, le potentiel transmembranaire induit en un point, est dépendant de la position de ce point et plus spécifiquement de l'angle θ lié à cette position. La Figure 17 représente le potentiel transmembranaire induit en tout point de la surface membranaire. Lorsque la cellule est soumise à un champ électrique, une accumulation maximale de charges est observée sur les deux régions de la membrane qui sont face aux électrodes, créant ainsi une perméabilisation membranaire maximale au niveau de ces deux régions. Du côté de l'anode, une accumulation de charges positives à la surface de la cellule induit une hyperpolarisation de la membrane. Tandis que, du côté de la cathode, une accumulation de charges négatives à sa surface induit la dépolarisation de la membrane. Par ailleurs, selon l'équation de Schwan, le potentiel transmembranaire acquiert une valeur maximale, dans ces deux régions, en raison de l'angle θ qui est de 0° ou 180° , où la direction du champ électrique appliqué est respectivement, du même sens ou du sens opposée à la normale à la membrane cellulaire. Cependant, ce potentiel transmembranaire est nul dans les régions membranaires perpendiculaires au champ électrique.

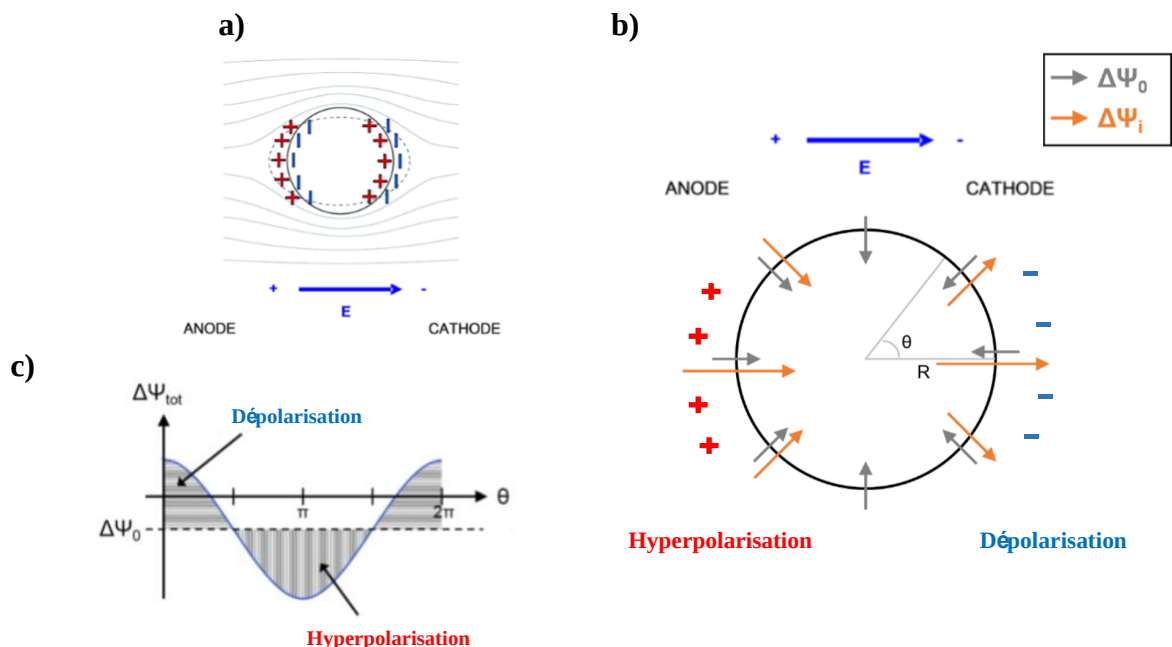


Figure 17 : Le potentiel transmembranaire induit. **a)** Lignes des de champ et répartition des charges sur les 2 pôles des cellules face à l'anode et à la cathode. **b)** Représentation des variations de la différence de potentiel transmembranaire induit par l'application d'un champ électrique uniforme sur une cellule de rayon r . **c)** Évolution du potentiel transmembranaire le long de la membrane cellulaire en fonction de l'angle entre le champ électrique et un point sur la membrane cellulaire. Adapté de la référence [209]

L'équation de Schwan n'est valable que sur des cellules sphériques. Cette théorie a été vérifiée par Kinosita et al [210] pour la première fois sur des œufs non fécondés d'oursins qui sont aussi des cellules de forme sphériques. En effet, Kinosita et al ont confirmé cette théorie en observant les variations du $\Delta\Psi_i$ grâce à un marqueur fluorescent (le RH292) sensible aux potentiels transmembranaires, tout en synchronisant l'excitation par le laser et le champ électrique appliqué (Figure 18). Kotnik et al [211] ont également démontré expérimentalement la validité de l'équation de Schwan sur des cellules vivantes en suspension.

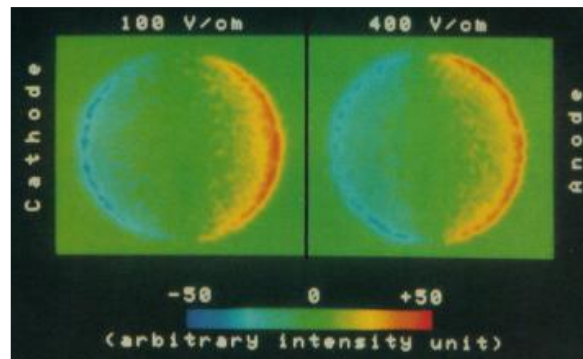


Figure 18 : Variation de $\Delta\Psi_i$ observée grâce à un marqueur sensible aux potentiels transmembranaires : L'acquisition de la fluorescence de RH292 synchronisée avec un pulse de (100 V/cm d'une durée de 20 μ s) et un pulse de (400 V/cm d'une durée de 25 μ s) sur des œufs d'oursins. Le potentiel induit atteint sa valeur maximale dans les régions faces aux électrodes (déterminé par la fluorescence). La fluorescence dans la région face à l'anode augmente avec le temps alors qu'une réponse opposée a été observée face à la cathode[210].

2.4. Le seuil de perméabilisation

Afin de déclencher une perméabilisation de la membrane, le potentiel transmembranaire total, équivalent à $\Delta\Psi_0 + \Delta\Psi_i$, doit dépasser un certain seuil de perméabilisation [193]. Le terme de seuil de perméabilisation a été introduit pour la première fois par Neumann et Rosenheck en 1972. Cependant, on ne peut pas attribuer une valeur de seuil fixe, par ce que cette dernière dépend de plusieurs paramètres tels que le type cellulaire, la taille des cellules, et également la valeur du potentiel du repos. Par exemple, Gehl et al [212] ont montré que pour perméabiliser les fibres musculaires, *in vivo* et en utilisant des électrodes plates, un champ électrique seuil de 0.45kV/cm, répété 8 fois et d'une durée de 99 μ s doit être appliqué. Par ailleurs, Saulis et al ont montré que les cellules d'ovaires d'hamster chinois (CHO) et les cellules C6 de gliome de rat nécessitent un pulse de 0.1 ms de 0.5kV/cm pour être perméabilisées tandis que les érythrocytes sont perméabilisés à partir de 1kV/cm avec le

même nombre de pulses et durée [213]. En effet, cette augmentation de l'amplitude du champ électrique nécessaire pour perméabiliser les érythrocytes (par comparaison aux CHO et C6) s'explique par le fait que le seuil de perméabilisation, dérivant du potentiel transmembranaire induit, est inversement proportionnel au diamètre de la cellule. Autrement-dit, plus les cellules ont un diamètre petit (les érythrocytes) plus le seuil de perméabilisation est grand. D'une manière générale, le seuil de perméabilisation correspond à un potentiel transmembranaire qui varie de 200 à 1000 mV et dépend du biomarqueur utilisé pour détecter la perméabilisation [214]–[216].

3. De l'électroporation à l'électroperméabilisation

Dans la littérature, l'application du champ électrique sur des cellules, est appelée électroporation, électroperméabilisation ou électropulsation. Cependant, ces termes mettent en évidence un aspect commun, qui est la déstabilisation de la membrane plasmique sous l'effet du champ électrique. Particulièrement, au-dessus du seuil du potentiel transmembranaire, des changements de structure se produisent au niveau de la membrane de façon à la rendre perméable à des molécules qui n'ont pas accès à l'intérieur de la cellule dans un temps normal/ou en absence des impulsions électriques. Néanmoins, l'étude de ces changements de structure et des mécanismes moléculaires impliqués dans les interactions des impulsions électriques avec la membrane plasmique, suscitent encore des divergences/ou restent insaisissables [217].

3.1. Théorie initiale : formation de pores

L'étude de l'électroperméabilisation, à l'échelle moléculaire, a été initiée par Abidor et al [218], en 1979 qui a mentionné que la rupture de la membrane est associée à des défauts au niveau de la membrane, qui sont connus sous le nom de pores. Ces pores sont issus de l'évolution des micropores apparus dans la membrane sous l'influence du champ électrique. Cette théorie des pores a été étudiée par de nombreux chercheurs dans les années suivantes [219], [220]. En 1996, Weaver et Chizmadzhev [221] ont montré que l'élévation du potentiel transmembranaire induit la formation des pores hydrophiles ou pores aqueux au niveau de la membrane. Cependant, depuis ce temps, aucune étude expérimentale, n'a pu montrer à quoi ressemblent réellement ces pores dans la bicouche lipidique. En 2004, Tieleman et al [222] a étudié le mécanisme de formation de ces pores par des simulations directes des

bicouches de phospholipides en dynamique moléculaire, ce qui a permis de voir ces pores virtuellement, *in silico*. Tieleman a montré dans cette étude que la formation des pores est due à des gradients des champs électriques locaux situés à l'interface eau / lipide. Les molécules d'eau vont se déplacer suivant ces gradients de champ à l'intérieur de la bicouche, en créant ainsi des défauts membranaires. Par conséquent, le passage progressif des molécules d'eau va permettre le grossissement/ou élargissement de la colonne d'eau formée à travers la membrane jusqu'à la formation d'un pore hydrophile. Cette hypothèse a été confirmée par M. Tarek[223], qui a montré que les molécules d'eau interfaciale s'organisaient de part et d'autre de la membrane et finissaient par se rejoindre afin de former un canal hydrophile (Figure 19). En 2013, Tokman et al [224] ont confirmé ce rôle clé de l'eau interfaciale dans la formation des pores. En comparant des simulations avec et sans la bicouche lipidiques, Tokman et al ont montré que le processus de formation de pores est induit par la réorganisation de l'eau interfaciale, et plus spécifiquement cette réorganisation des dipôles d'eau est induite par le champ aux interfaces eau-lipide (ou eau-vide). Il est aussi nécessaire de mentionner que les dipôles des têtes polaires des phospholipides vont s'aligner avec les dipôles de l'eau interfaciale ce qui contribue également à la formation des pores [225]. Ils ont montré aussi que les pores sont créés après le début des impulsions électriques. Breton et al [226] a ensuite confirmé cette rapidité d'ouverture et de fermeture des pores sur les GUVs, en appliquant une impulsion de 10 nanosecondes et en suivant l'internalisation de siARN fluorescent. Une fois l'impulsion électrique arrêtée, des molécules de siARN ont déjà eu le temps de rentrer et celles qui étaient en train de traverser la membrane sont piégées dans la bicouche lipidique des GUVs. Cependant, ce cycle de vie des pores n'est confirmé que dans le cas des impulsions nanosecondes.

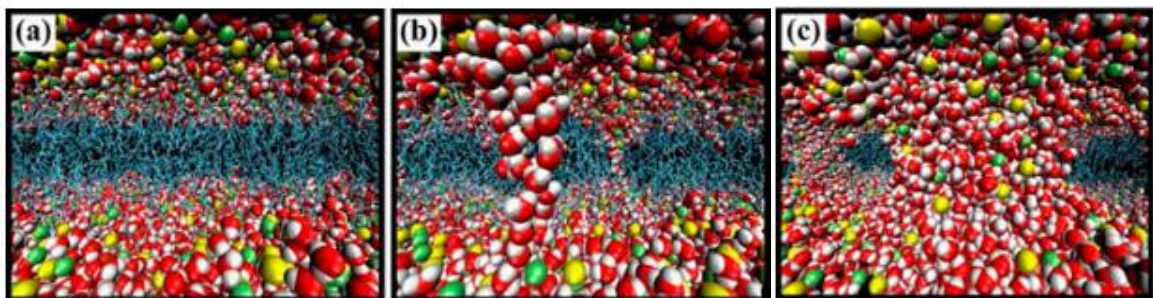


Figure 19 : Simulation en dynamique moléculaire de l'évolution d'une bicouche lipidique de dimyristoyl-phosphatidylcholine (DMPC). **a)** La bicouche lipidique à l'équilibre. **b)** Formation des pores hydrophiles au stade initial du processus d'électroporation lorsque la bicouche est soumise à un champ électrique **(c)** Formation à un stade ultérieur de grands pores hydrophiles stabilisés par des groupes de têtes lipidiques [223].

3.2. Oxydation des lipides au cours de la phase de l'électroperméabilisation

Bien que la formation transitoire de pores hydrophiles dans la bicouche lipidique lors de la perméabilisation membranaire est désormais un mécanisme largement reconnu, il existe de plus en plus de preuves qui montrent que l'exposition des cellules à des impulsions électriques provoque aussi des modifications chimiques des lipides et une modulation de la fonction des protéines membranaires contribuant ainsi à l'augmentation de la perméabilité de la membrane [227]. Ainsi, plusieurs études ont montré que l'électroporation induit la peroxydation des lipides membranaires (oxydation des acides gras insaturés). Cette théorie a été confirmée chez les bactéries [228], [229], chez les plantes [230], [231], les cellules mammifères [232], [233] et également sur les liposomes [234], [235] composés de lipides insaturés. Des études ont montré que les impulsions électriques (milli- ou microsecondes) sont capables de générer des ROS qui induisent des dommages dans les lipides insaturés, augmentant ainsi la perméabilité de la membrane [233], [236]. Cependant, beaucoup d'autres études contredisent cette hypothèse sur l'origine des ROS, en montrant que les impulsions électriques ne font que faciliter la peroxydation lipidique, en présence des ROS déjà existants avant l'impulsion électrique. Ces ROS, peuvent être générés à partir de sources endogènes (par exemple : mitochondries, réticulum endoplasmique) ou produites en réponse à un stimuli exogène (par exemple, des rayonnements ionisants). Ces dérivés réactifs de l'oxygène, par exemple le peroxyde d'hydrogène H_2O_2 , ou le radical hydroxyle ($\bullet OH$), sont très réactifs par la présence de l'électron de valence. Les interactions entre les ROS et les lipides ont été étudiés par diverses méthodes telles que la fluorescence, la résonance paramagnétique électronique ou la dynamique moléculaire [237], [238]. Ces études ont montré que la présence des lipides oxydés conduit à l'expansion latérale et à l'amincissement de la bicouche, ce qui augmente la mobilité lipidique (en particulier, l'interaction flip-flop) et favorise la formation des pores hydrophiles. Par ailleurs, Breton et al [235] ont montré que l'application des impulsions nanosecondes induit l'oxydation des phospholipides insaturés des GUVs et que le niveau d'oxydation est dépendant de la durée des impulsions électriques. Cette étude suggère que l'oxydation des insaturations des phospholipides provoquent des changements physico-chimiques de la membrane ce qui permet aux membranes de rester perméables après l'application des impulsions. De plus, dans le même laboratoire de recherche, Azan et al [239] ont montré, que l'électroperméabilisation affecte non seulement les lipides mais aussi les protéines de la membrane. Ils ont démontré, par la

spectroscopie RAMAN, que l'électroperméabilisation crée des modifications de la phénylalanine et de l'amide I qui sont directement impliqués dans la composition et la structure des protéines membranaires. Plusieurs études ont également confirmé l'effet des dommages oxydatifs et les changements conformationnels des protéines qui s'effectue pendant la phase de l'électroperméabilisation [240], [241]. Cette phase d'électroperméabilisation qui se déroule après l'application des impulsions électriques, se caractérise par la formation des pores d'une durée de vie de quelques secondes jusqu'à quelques minutes (Figure 20). En effet, pendant l'étape d'électroperméabilisation, pour tous types de pulses, la perméabilité de la membrane dépendra de la densité des lipides oxydés dans la membrane. Il est nécessaire de rappeler que l'oxydation des phospholipides insaturés se fait uniquement dans les zones où le potentiel transmembranaire total a atteint le seuil de perméabilisation [242]. Juste après le pulse électrique, la densité locale des lipides oxydés est élevée ce qui rend la membrane très perméable. Progressivement, les lipides oxydés vont diffuser latéralement dans la membrane, ce qui contribue à la diminution de leur densité locale et par conséquent diminue la perméabilité de la membrane. Un faible niveau de perméabilité de la membrane restera jusqu'à l'élimination complète des lipides oxydés de la membrane. En effet, les cellules vont renouveler leurs lipides membranaires par le processus d'endocytose / exocytose. Ce processus peut durer plusieurs heures [243], [244].

Il est donc intéressant de différencier le terme électroporation du terme électroperméabilisation. En effet, à la suite de l'application d'un champ électrique, l'électroporation renseigne sur la perméabilité transmembranaire d'un point de vue électrique, tandis que l'électroperméabilisation tient compte de la structure et des événements qui se produisent au niveau moléculaire. Autrement dit, l'électroperméabilisation nous indiquera les effets dûs aux formations des pores à court terme et les phénomènes d'oxydation à long terme. Cependant, durant l'application du champ électrique, c'est-à-dire durant la phase d'électroporation, les pores formés ne durent pas des secondes, ils ont une durée de vie qui est à peine plus que la durée des impulsions électriques.

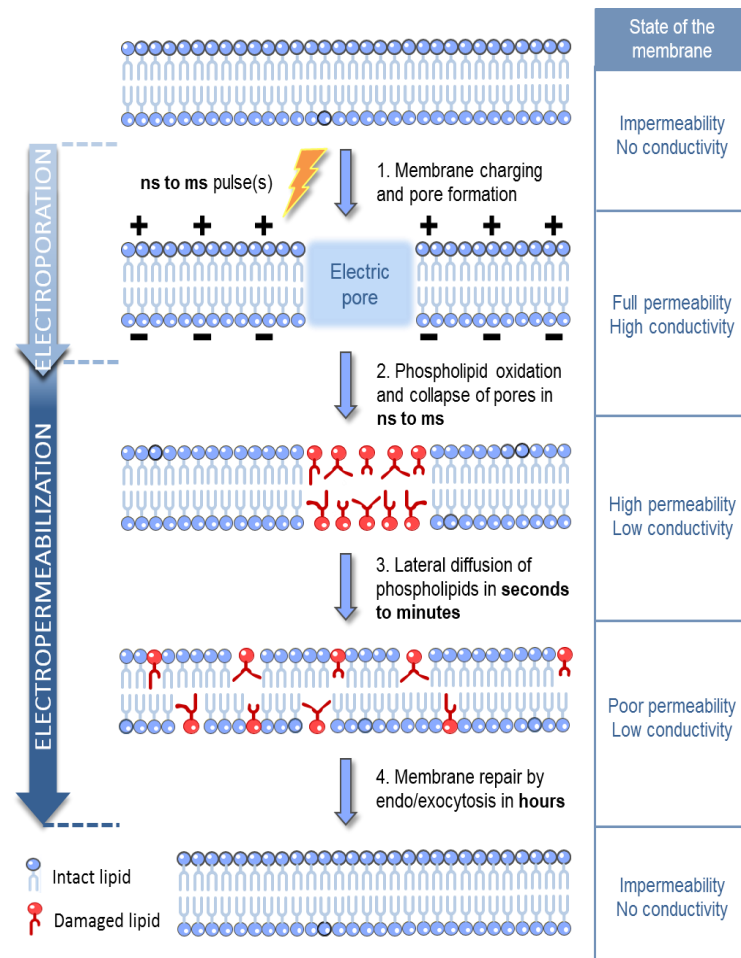


Figure 20 : Représentation schématique de l'électroporation et l'electropermeabilisation [245].

3.3. La réparation de la membrane

Le phénomène d'électroperméabilisation a été décrit en 3 étapes : l'étape de création de pores, la stabilisation et l'annihilation de structures transitoires de perméabilisation [246]. Dans le cas de la perméabilisation réversible [193], la membrane plasmique a la capacité de réparer les défauts causés par les impulsions électrique, en fermant les pores créés et en rendant la membrane imperméable. Dans le cas de la perméabilisation irréversible, les amplitudes des impulsions électriques induisent un potentiel transmembranaire extrêmement élevée qui dépasse la capacité de la cellule à se réparer [193]. La membrane demeure ainsi perméable et induit par conséquent la mort cellulaire. La durée de l'état perméabilisé peut être ainsi associée/ reliée au temps de réparation de la membrane. Selon de nombreux paramètres, ceci peut durer de quelques secondes à quelques minutes. En 1988, Lopez et al [247] ont montré que les cellules montrent une perméabilisation plus longue que les vésicules de phospholipides et que la perméabilisation des cellules est dépendante de la température, autrement dit, plus la température est basse, plus la réparation de la membrane

est retardée (par exemple à 4°C la membrane reste perméable au moins pendant 6 heures) . Un an plus tard, Rols et Teissié [248] ont montré que cet état de perméabilisation dépend de l'intensité du pulse électrique ainsi que du milieu de pulsation. Les mêmes chercheurs ont montré, une année plus tard, que la réparation de la membrane dans le cas des cellules ne dépend pas de l'intensité du champ électrique mais qu'elle est affectée par le nombre et la durée des impulsions électriques [249]. Dans la même année, Rols et Teissié ont montré que le relargage de l'ATP est linéaire avec l'application du champ électrique, expliquant ainsi l'importance de l'ATP et l'ADP pour la restructuration de la membrane après l'application des impulsions électriques [250]. En 2004, Shirakashi et al ont souligné le rôle de la conductivité du milieu extérieur sur la réparation membranaire. Ils ont montré que plus le milieu est conducteur, plus la réparation membranaire est rapide [251]. Par ailleurs, Gabriel et Teissié [252] ont montré que la présence des ROS induit un stress cellulaire qui va induire par conséquent une réparation membranaire plus longue. Par ailleurs, Teissié et al [253] ont montré que la réparation de la membrane plasmique est contrôlé par le cytosquelette, et en particulier par les microtubules. Kanduser et al [254] ont montré que la réparation de la membrane dépend également du type cellulaire et plus précisément de la fluidité membranaire. Ils ont montré ainsi, qu'en appliquant 8 pulses de 100µs (à la fréquence de répétitions de 1Hz) avec une amplitude de 535V/cm, les cellules B16-F1 réparent leurs membranes en 5min après le pulse, tandis qu'en appliquant le même nombre de pulse et la même durée avec une amplitude de 735V/cm, les cellules V-79 reviennent à leur état initial 20 min après le pulse.

Si on résume tous ses paramètres, on peut conclure que la réparation de la membrane dépend de divers paramètres qui agissent directement sur la vitesse de restauration de la membrane. Ces paramètres peuvent être exogènes (conductivité, température) ou endogènes (cytosquelette, taux de ROS, manque d'interactions entre les lipides et les protéines membranaires), et peuvent perturber directement ou indirectement le processus d'endocytose/exocytose, responsable de la réparation de membrane.

4. Différentes impulsions électriques

4.1. Les impulsions millisecondes

Les impulsions millisecondes (msPEFs) sont utilisées pour perméabiliser la membrane plasmique mais également pour déplacer les acides nucléiques *in vivo*. Ce déplacement d'acides nucléiques a pour but de faire exprimer des molécules d'intérêt dans les cellules ou les tissus. Ces impulsions millisecondes, comme leur nom l'indique, ont une durée de temps à l'échelle de la milliseconde. En raison de cette longue durée, ces impulsions millisecondes sont généralement délivrées à des basses amplitudes afin de maintenir une électroporation réversible. Dans le cas contraire, une perméabilisation irréversible se produirait. Pour cela, ces impulsions électriques sont aussi connues sous le nom de LV (pour Low Voltage). Par exemple, Golzio et al ont montré *in vitro* que l'application de 10 impulsions de 0.8 kV/cm d'une durée 0.1 ms à 5 ms induit une perméabilisation réversible des CHO [255]. Cependant, en augmentant l'amplitude de l'impulsion (3kV / m) avec 15 impulsions de 2 ms une perméabilisation irréversible se produit, ce qui a permis à Coustets et al [256] d'extraire des protéines des microalgues (électroextraction). Luengo et al [257] ont aussi montré une perméabilisation irréversible de 90% des cellules végétales de *Chlorella vulgaris*, en appliquant 20 impulsions de 5 kV/cm et une durée de 20 ms. Par ailleurs, en raison de leur longue durée, ces impulsions sont capables de générer une force électrophorétique, permettant ainsi le déplacement des acides nucléiques vers l'intérieur des cellules. Selon les paramètres des impulsions, ces dernières peuvent à la fois assurer le déplacement des acides nucléique et aussi la perméabilisation cellulaire. Par exemple, Rols et al [258] ont pu transfecter un plasmide codant pour un gène de bêta-galactosidase dans 50 à 60% des cellules CHO en appliquant uniquement des impulsions millisecondes (ici, 10 impulsions carrées de 5ms à une amplitude de 0.6kV/cm). La même équipe de recherche a montré un taux de transfection de 4% du même gène (bêta-galactosidase) dans des tumeurs de mélanome des souris B16 en appliquant 70-90 V/cm avec 10 pulses de 5ms. La fréquence de répétition est fixé à une impulsion par seconde dans les deux études [259]. Cependant, ces impulsions millisecondes, qui peuvent être perméabilisantes ou pas (selon les paramètres de l'amplitude du champ électrique), sont souvent combinées avec des impulsions microsecondes, qui eux sont plutôt connues pour leur rôle perméabilisant. Cette combinaison micro + millisecondes sera détaillée ci-dessous.

4.2. Les impulsions microsecondes

Les impulsions microsecondes (μ sPEFs) sont considérées les plus utilisées dans le monde de l'électroporation pour leur rôle perméabilisant. Ce sont des impulsions rectangulaires d'une durée de l'ordre de 100 μ s. Contrairement aux impulsions millisecondes et en raison de leur intérêt perméabilisant, ces impulsions ont une courte durée mais une amplitude plus importante, d'où leur nom de HV (High Voltage). Un nombre classique d'impulsions allant de 1 jusqu'à 8 impulsions de 100 μ s avec des amplitudes allant de 1 à 1.3 kV/cm ont permis la perméabilisation de nombreux types de cellules. Cette perméabilisation a été détectée par l'internalisation de nombreuses molécules, *in vitro*, telles que le Lucifer Yellow [260], la bléomycine [261] et l'iodure de propidium [262]. L'internalisation des acides nucléiques, *in vivo*, peut se faire par l'application des millisecondes seules (comme discuté ci-dessus) ou uniquement par l'application des microsecondes [263]. Cependant la combinaison LV+HV afin de guider ces molécules chargées à l'intérieur des cellules a montré un grand intérêt pour le transfert des gènes. Par exemple, Satkauskas et al [264] ont montré la combinaison d'une HV de 100 μ s, d'une amplitude de 800 V/cm suivie d'une LV de 100 ms, d'une amplitude de 80 V/cm (séparées par 100s) a permis d'avoir une transfection efficace de l'ADN dans le tissu musculaire des souris C57BL/6. En effet, durant cette étude, en modulant les paramètres de LV et HV, ils ont démontré qu'une application préalable de HV était nécessaire pour perméabiliser les tissus musculaires alors que le transfert d'ADN dépend principalement des impulsions LV. Ensuite, André et al [265] ont confirmé l'importance de la combinaison HV+LV pour la transfection de l'ADN et ceci en étudiant la transfection dans plusieurs tissus tumoraux tels que le foie, le muscle et la peau. Ils ont montré que pour avoir une bonne transfection d'ADN *in vivo*, le temps de latence entre HV et LV doit être de l'ordre d'une seconde. Ils ont aussi étudié des facteurs spécifiques aux tissus qui jouent un rôle important dans l'efficacité respective des impulsions HV et LV. Dans la même année, Hojman et al [266] ont montré que la combinaison d'une HV suivie d'une LV est moins toxique et limite les dommages tissulaires par comparaison avec l'application de 8 HV perméabilisantes. Ceci contribue ainsi à une meilleure transfection de gènes dans le muscle. Par ailleurs, comme le montre la figure 16, les impulsions microsecondes peuvent être utilisées pour réaliser la fusion de cellules en contact [205] ou détruire l'intégrité de la membrane afin de causer la mort cellulaire, dans le cas de l'électroporation irréversible [206].

Il est nécessaire de mentionner que dans les deux cas d'impulsions milli et microsecondes, le mécanisme de perméabilisation est quasiment le même. En effet, ces deux impulsions sont considérées longues par rapport au τ_m (temps de chargement de la membrane qui est de l'ordre de 100 nanosecondes). Autrement dit, le potentiel transmembranaire induit par ces impulsions électriques est assez long et suffisant pour charger la membrane.

5. Différents types d'électrodes et de générateurs utilisés lors de l'électroporation

Le cliniporator est un générateur permettant de délivrer des impulsions carrées milli- et microsecondes. Possédant un système de contrôle intégré, il fournit directement à l'utilisateur la forme temporelle complète des impulsions délivrées et peut alterner entre les impulsions courtes et longues. En effet, il existe de nombreux générateurs qui ont été utilisés pour de nombreuses études d'électroporation précliniques [265][267] et cliniques [268], [269]. Par exemple, en ce qui concerne les essais cliniques, le Cliniporator 2 (Igea, Carpi, Italie) a été utilisé durant le projet européen ESOPE (cf II-7) dans le cadre de l'électrochimiothérapie des tumeurs cutanées et sous-cutanées entre 2003 et 2005 [270][271]. Le cliniporator VITAE (Igea, Carpi, Italie) a été utilisé pour traiter les tumeurs profondes et les grandes tumeurs osseuses ou des organes internes en 2012 [272]. Par ailleurs, le nanoKnife, distribué par une compagnie américaine mais fabriqué en Europe, a été utilisé pour l'ablation tumorale sans l'utilisation de drogue à partir de 2013 [273], [274].

Afin de délivrer des impulsions électriques, les générateurs sont connectés aux cellules ou aux tissus par l'intermédiaire d'électrodes. Différents types d'électrodes peuvent être utilisées dans le monde de l'électroporation. Ces électrodes peuvent être non-invasives (plates) ou invasives (aiguilles en ligne ou en hexagone centré) (Figure 21). Les applications de l'électroporation utilisant ces électrodes pour traiter les cellules et les tissus cancéreux seront discutées plus en détail dans la section suivante.

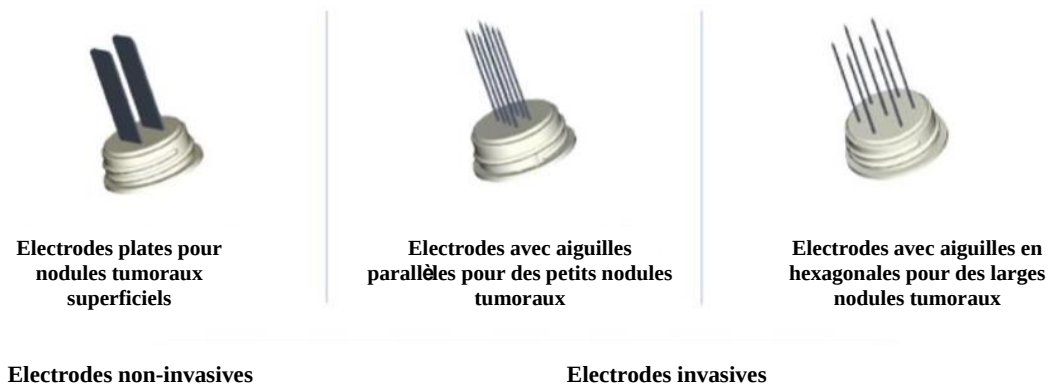


Figure 21 : Différents types d'électrodes utilisées dans le monde de l'électroporation [271]

6. Applications de l'électroporation

Comme décrit précédemment, l'électroperméabilisation dépend de divers paramètres qui peuvent influencer directement ou indirectement son efficacité. Cependant, les applications de l'électroperméabilisation sont essentiellement à l'origine/ou le résultat des choix des paramètres du champ électrique appliqué [193]–[195]. Ce choix des paramètres d'impulsions électriques joue un rôle critique sur l'état de perméabilisation qu'on souhaite atteindre et par conséquent sur la nature de l'application biomédicale souhaitée. D'une manière générale, en fonction des paramètres d'impulsions électriques, trois états de perméabilisation différents de la membrane plasmique peuvent être induits : pas d'électroperméabilisation (seuil non atteint), électroperméabilisation réversible et électroperméabilisation irréversible (IRE) (Figure 22).

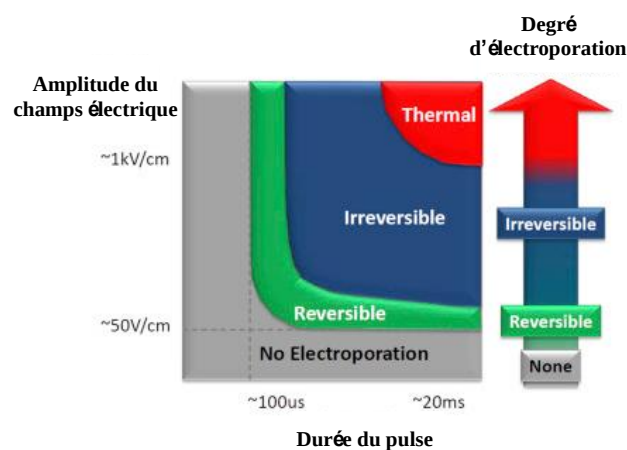


Figure 22 : Schéma des différents effets d'impulsions électriques [275].

Chaque état de perméabilisation est plus ou moins intéressant pour l'une ou l'autre des applications biomédicales différentes qui seront détaillées dans le paragraphe suivant. Cependant, malgré les distinctes fins thérapeutiques rendues possible par ces différents états

de perméabilisation de la membrane plasmique, l'électrochimiothérapie et l'électrogénotherapie ont un but commun c'est d'atteindre, d'une manière réversible, l'intérieur de la cellule. En effet, en ayant accès à l'intérieur de la cellule, l'électroporation permet l'introduction des diverses molécules anti-cancéreuses par la technique de l'électrochimiothérapie. Elle permet également l'entrée des acides nucléiques par l'électrogénotherapie. Contrairement à l'électrochimiothérapie et à l'électrogénotherapie, l'électroporation irréversible n'a pas pour but de faire rentrer des molécules d'intérêt (médicaments ou acides nucléiques) à l'intérieur de la cellule mais plutôt se caractérise par l'application d'un champ électrique extrêmement élevé qui va aboutir à la destruction de la tumeur. L'électrogénotherapie et l'électroporation irréversible n'étaient pas abordées dans le cadre de cette thèse. Le traitement du cancer reste de nos jours une des principales applications de l'électroporation [276] (Figure 23).

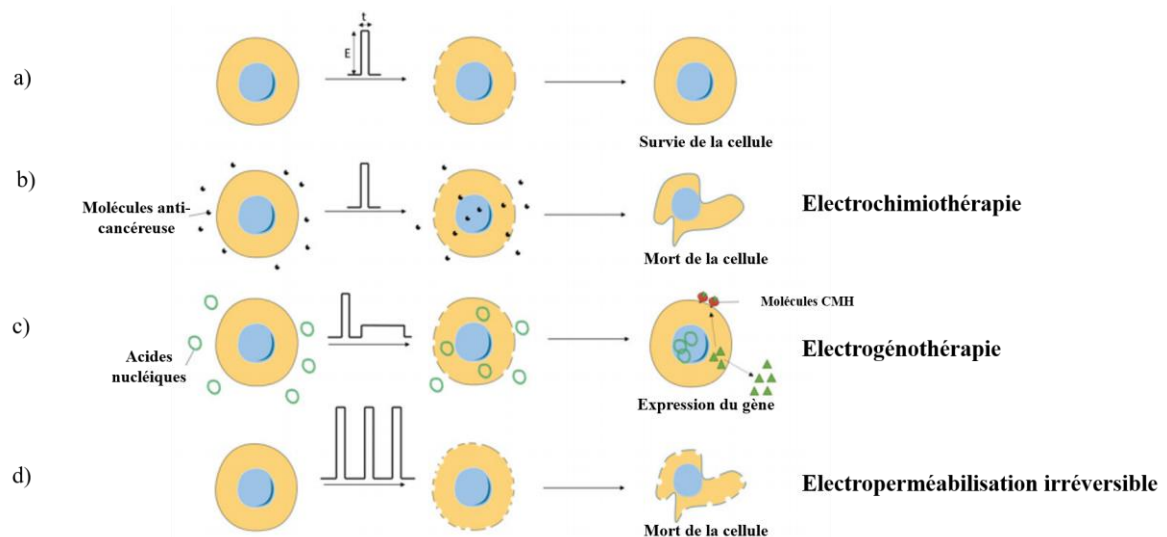


Figure 23 : Applications de l'électroporation. **a)** Principe de l'électroporation. **b)** principe de l'électrochimiothérapie. **c)** principe de l'électrogénotherapie. **d)** principe de l'électroperméabilisation irréversible. Figure modifiée à partir de l'article de Calvet et al [277].

7. Electrochimiothérapie (ECT)

7.1. Principe

L'ECT est un traitement non-thermique qui consiste en l'application des impulsions électriques combinée à l'administration de molécules anticancéreuses (chimiothérapies) non ou faiblement perméables (en l'absence des pulses). Cette technique non-chirurgicale sert ainsi de traitement thérapeutique dans divers cas des tumeurs solides (cutanées ou sous-cutanées). Les impulsions électriques sont délivrées de manière à induire une électroporation réversible de la zone à perméabiliser. Ces impulsions doivent occuper tout le volume de la

tumeur à traiter. Les molécules anticancéreuses sont injectées localement ou via une voie systémique afin d'atteindre les cellules à traiter et induisent par conséquent leur mort cellulaire (Figure 24). Contrairement à l'IRE qui sert à tuer les cellules par des impulsions électriques élevées, la mort cellulaire avec l'ECT est induite essentiellement par l'effet cytotoxique des molécules anti-cancéreuses. Durant mon projet de thèse, des essais d'électroporation en présence de chimiothérapie ont été étudiés *in vitro* et l'ECT a été testée *in vivo*. Elle sera plus détaillée dans la section suivante

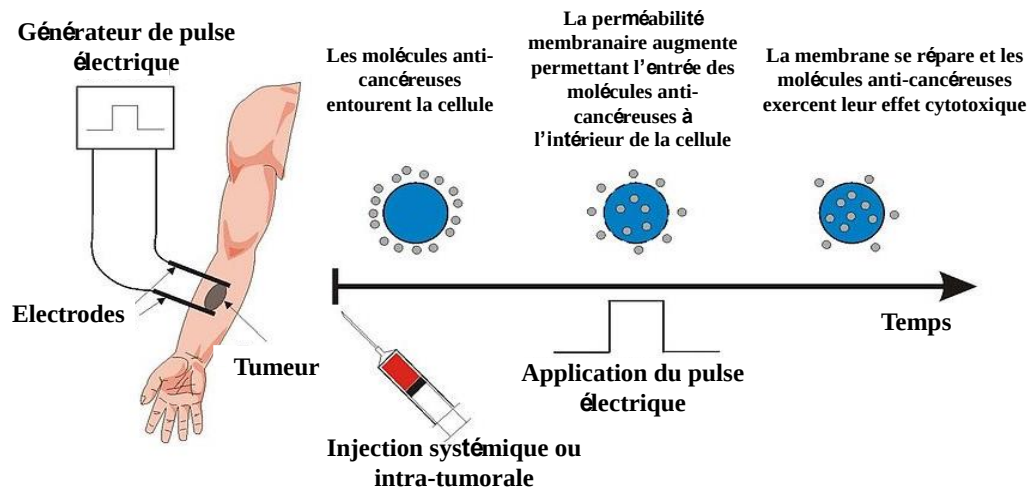


Figure 24 : Principe de l'électrochimiothérapie [278].

7.2. Historique

Bien que le terme de l'électrochimiothérapie est apparu avec la publication de Mir et al en 1991 [279], des travaux préliminaires ont commencé en 1986-1987 par Banoun et al, puis par Orlowski et al [280] qui ont étudié *in vitro*, l'entrée de diverses molécules anti-cancéreuses à l'intérieur des cellules DC-3F électropérabilisées. En effet, cette équipe a montré que les molécules anti-cancéreuses hydrophiles, qui ne sont pas ou très faiblement capables de traverser la membrane plasmique, provoquent une cytotoxicité très importante dans la cellule électropérabilisée. En combinant les impulsions électriques en présence de ces molécules anti-cancéreuses, leur cytotoxicité peut aller jusqu'à 200 fois pour la netropsine et jusqu'à 700 fois pour la bléomycine. Tandis que l'entrée des molécules hydrophobes (l'actinomycine D) à la suite de l'application du champ électrique, n'a pas montré de différence, en raison de la facilité qu'elle possède à traverser la membrane plasmique, et ceci à cause de sa composition chimique. En 1991, la même équipe a confirmé le potentiel cytotoxique de la bléomycine, observé *in vitro*, sur des tumeurs transplantées en sous-cutanée. Ils ont montré ainsi une réduction des tumeurs voire même leur éradication

[279]. Ce travail a été confirmé la même année par Belehradek et al sur des tumeurs spontanées chez des souris C3H/Bi [281]. A noter qu'un travail similaire avait été publié par Okino et al [282] qui ont montré *in vivo*, que l'application d'impulsions électriques non optimisées (à décroissance exponentielle, de 5kV pic) en présence de la bléomycine permet la diminution de la masse tumorale de 17%, 4 jours après le traitement.

Par la suite, Poddevin et al [261] ont démontré sur les cellules DC-3F que l'internalisation de quelques centaines de molécules de bléomycine dans le cytoplasme suffisaient pour induire la mort cellulaire. De plus, Gehl et al [283] ont montré que la cytotoxicité du cisplatine dans les cellules perméabilisées est seulement 3 fois meilleure par comparaison avec les cellules non perméabilisées. Pour cela, la bléomycine est souvent utilisée comme molécule anti-cancéreuse pour le traitement des cellules cancéreuses par l'électrochimiothérapie.

Le premier essai clinique a été réalisé en 1991 [284] où le traitement a montré une bonne tolérance par les patients avec une efficacité antitumorale claire. Les impulsions électriques appliquées allaient de 4 à 8 impulsions rectangulaires de 100 μ s avec une amplitude de 1.3 kV/cm. Par la suite, un autre essai clinique [285] a été réalisé en 1996 sur 6 patients. L'application de 8 pulses rectangulaires de 100 μ s à 1.3 kV/cm après l'injection intraveineuse de la bléomycine, montrait des réponses partielles ou totales de divers types de tumeurs, avec une bonne tolérance par les patients et sans aucun effet secondaire dû aux impulsions électriques. En 2004-2005, une autre étude, ESOPE (European Standard Operating Procedures of Electrochemotherapy), a été réalisée [286]. Durant cette étude, 247 patients ont été traités où 202 patients avec 655 nodules tumoraux ont été traités avec la bléomycine combinée avec l'électroperméabilisation et 45 patients avec 354 nodules tumoraux ont été traités avec du cisplatine combiné avec l'électroperméabilisation. Cette étude excluait les tumeurs de taille supérieure à 3 cm. Diverses tumeurs ont été étudiées durant cette étude telles que les métastases de mélanome de peau, de tête et de cou, de cancer mammaire ou ovarien et du sarcome de Kaposi. Cette étude utilisant la bléomycine ou le cisplatine a montré environ 85% d'efficacité tumorale.

Les électrodes utilisées pour l'ECT sont généralement des électrodes plates ou à aiguilles. Cependant, en raison du succès de l'ECT, il y a eu de nombreux développements de nouveaux types d'électrodes adaptées pour traiter un grand nombre de tumeurs superficielles et également internes [276]. En effet, les applications actuelles de l'ECT concernent le

traitement des métastases cutanées et sous-cutanées de grande taille mais aussi le traitement de tumeurs internes comme le foie [287], le cerveau [288] et l'adénocarcinome pancréatique [289].

7.3. La bléomycine en électrochimiothérapie

7.3.1. Origine et structure de la bléomycine

La bléomycine est un agent anti-cancéreux, produit par la bactérie *Streptomyces verticillus* et a été découverte en 1966 par Umezawa et al [290]. Cette molécule hydrophile n'est pas capable de diffuser à travers la membrane plasmique, en raison de sa taille et de sa composition non lipophile [291][292]. La bléomycine de 1500 Da est composée de 4 parties (Figure 25) : les deux sous-parties (1) et (2), sont impliquées dans l'interaction avec l'ADN (via la déchloration du noyau bithiazole [293]), la 3ème partie va servir de chélateur de métaux et la quatrième partie (carbohydates) n'est pas encore déterminé [294]. Comme discuté précédemment, il a été démontré que la bléomycine est une molécule anti-cancéreuse efficace pour le traitement de différents cancers chez la souris [295] et chez l'Homme [296]. Elle est considérée comme une chimiothérapie efficace (si on prend en considération ses critères d'inclusions) des carcinomes de testicules, de cou et de la tête et également des lymphome Hodgkiniens et non- Hodgkiniens.

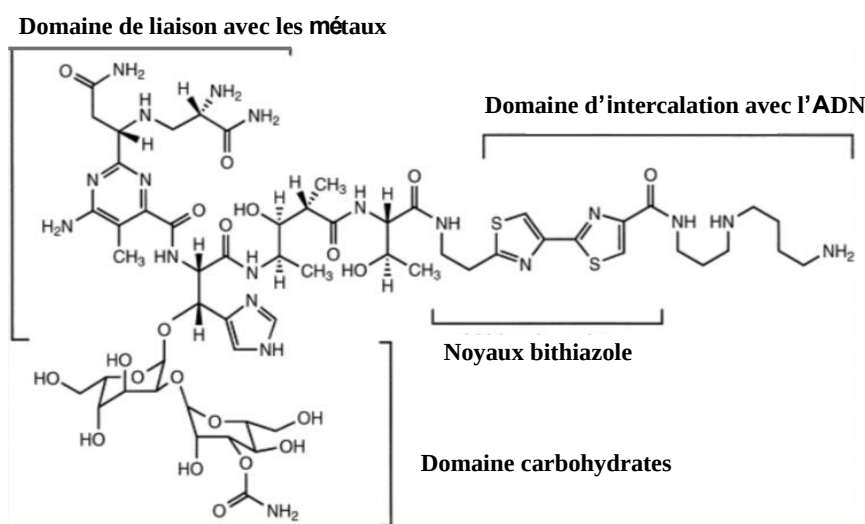


Figure 25 : Structure de la molécule de bléomycine [293].

7.3.2. Mécanisme de fonctionnement

Une fois la bléomycine dans le cytoplasme de la cellule électroperméabilisée, elle se dirige vers sa cible : l'ADN. Dans les 30 secondes qui suivent son entrée [297], les cassures de

l'ADN commencent à se produire. En effet, la bléomycine va fixer une molécule de fer (sous forme Fe^{2+}) et forme par conséquent un complexe Fe/O_2 . Une fois que le Fe^{2+} s'oxyde en Fe^{3+} , ce complexe va attaquer le désoxyribose de l'ADN sur différentes positions du brin (généralement sur des séquences GC) [298]. Ainsi, la bléomycine va couper l'ADN, ou bien sur les deux brins, ou bien sur un seul brin [299]. La bléomycine peut causer jusqu'à 10 coupures de l'ADN par cellule [300]. La bléomycine induit généralement la mort de la cellule lors de la mitose (plus spécifiquement à la phase M du cycle cellulaire) [297]. En effet, en attaquant toutes les cellules perméabilisées, les effets de la bléomycine ne sont observés que dans les cellules qui sont en cycle. Cette capacité sélective fait d'elle un avantage majeur pour son utilisation en ECT. Par ailleurs, Poddevin et al ont montré sur les cellules DC-3F exposées à un champ électrique de 1500V/cm (8 impulsions de 0.1 ms) que l'internalisation de 400 molécules de bléomycine/cellule suffisaient pour induire la mort cellulaire.

Par ailleurs, l'effet thérapeutique de la bléomycine peut être accentué par d'autres mécanismes. Ainsi, il est nécessaire de mentionner les effets induits suite à l'application du champ électrique tels que : la vasoconstriction (connue sous le nom anglais de vascular lock et qui est définie par la diminution du diamètre des vaisseaux sanguins) et la réduction du flux sanguin tumoral dans la zone traitée. Les cellules tumorales survivant aux effets directs de l'ECT sont par conséquent exposées à un manque d'oxygène et de nutriments et sont ainsi entraînées dans une cascade secondaire de mort cellulaire. De plus, cette réduction du flux sanguin tumoral permet de piéger localement la molécule cytotoxique dans la région traitée [301]. Cet effet est avantageux spécifiquement dans le cas de la cisplatine et ceci en raison de sa diffusion dans les cellules grâce à sa petite taille, bien qu'elle soit hydrophile. Par ailleurs, le vascular lock pourrait contribuer aussi à la régression tumorale des tumeurs solides. Par ailleurs, ce phénomène peut également jouer un rôle efficace dans le traitement des tumeurs internes très vascularisées (par exemple le foie) [302].

L'efficacité de l'ECT peut être optimisée par une combinaison supplémentaire : l'immunothérapie. Par exemple, Calvet et al [303] ont montré que l'ECT avec la bléomycine est capable d'induire une réponse immunitaire innée dans la zone traitée. En effet, ces chercheurs ont montré que l'injection des cellules détruites par l'ECT dans des souris immunocompétentes entraînait une réponse immunitaire qui va empêcher par conséquent la croissance des cellules cancéreuses. Cet effet a été observé par Mir et al [304] en injectant dans les tumeurs à traiter des cellules allogéniques transfectées avec le gène de

l'interleukine-2. Ces cellules vont sécréter de l'interleukine 2 (Il-2), ce qui a augmenté par conséquent le nombre de tumeurs en régression complète. Cet effet peut également être observé en injectant directement de l'Il-2 dans la zone tumorale [305]. La combinaison de l'ECT et de l'immunothérapie a été testée sur plusieurs tumeurs et a montré une efficacité optimisée dans le traitement des tumeurs [306].

8. Comparaison de l'ECT avec les autres traitements du cancer

Le cancer est considéré comme l'une des principales causes de mort dans le monde entier. Selon le World Health Organisation [307], le cancer était responsable de la mort de 9.6 millions de personnes en 2018 dont 157 400 morts en France. Les cancers les plus fréquents sont ceux de la prostate, du sein, du côlon-rectum et du poumon. Selon l'Institut National du Cancer français [308], entre 2010 et 2018, la mortalité causée par le cancer a diminué de 2,0 % par an chez les hommes et de 0,7 % par an chez les femmes. Chez l'homme, le cancer du poumon est au premier rang des décès, et chez la femme c'est le cancer du sein qui représente la première cause de décès. Cette baisse est liée à des diagnostics plus précoces et à des traitements plus efficaces.

8.1. La chirurgie

La chirurgie est une méthode simple qui a été longuement utilisée pour l'ablation des tumeurs solides[309]. Cependant, cette méthode ne permet pas le traitement des métastases distantes et invisibles et elle semble être difficile à réaliser dans certaines tumeurs, en raison de l'emplacement de la tumeur. Par ailleurs, il a été démontré dans diverses études [310]–[312] que la chirurgie peut ne pas extraire la totalité de la tumeur et les cellules tumorales qui y échappent sont ainsi capables de régénérer une croissance tumorale. Hormis le fait qu'il s'agit d'une procédure invasive pouvant même conduire à des cicatrices importantes, l'absence de consommation de médicament empêche l'apparition de plusieurs effets secondaires. Bien que la chirurgie soit considérée comme la technique de base pour le traitement du cancer, l'électro chimiothérapie est moins invasive que cette technique (vu que l'ECT traite les tumeurs solides). De plus, l'ECT a déjà été comparé au traitement chirurgical pour traiter des tumeurs de mastocytes chez des chiens. Dans cette étude [313], en un seul traitement, l'ECT (en utilisant la cisplatine) a montré une efficacité similaire au traitement chirurgical (ablation complète de la tumeur). Trente mois après le traitement, le traitement

des tumeurs avec l'ECT a montré 70% de réponse complète, alors que la chirurgie a montré 50% de réponse complète (non significative). Cependant la durée moyenne du contrôle des tumeurs était plus longue dans le groupe traité par ECT, comparé au groupe traité par chirurgie. De plus, l'ECT peut être combiné à la chirurgie, spécifiquement pour traiter les tumeurs de grandes tailles.

8.2. La chimiothérapie

La chimiothérapie est une technique qui vise à détruire les cellules cancéreuses quel que soit l'endroit de ces dernières. Cette technique fait référence à l'utilisation de médicaments anticancéreux par voie systémique pour tuer les cellules tumorales ou réduire leur prolifération. En effet, ces médicament-anticancéreux ont la capacité de tuer les cellules cancéreuses mais aussi les cellules saines (cellules hématopoïétiques, cellules des follicules pileux, cellule du tube digestif). En effet, malgré leur efficacité pour tuer les cellules cancéreuses, ces médicaments manquent de spécificité envers les cellules anormales et donc leur administration engendre par conséquent de nouvelles maladies qui n'étaient pas présentes auparavant (cardiovasculaires, pulmonaires, digestives ou hépatorénales). Cet effet représente le facteur critique majeur de la chimiothérapie, en raison des effets secondaires générés et amplifiés par ces médicaments [314]. Afin de surmonter ces effets indésirables des chimiothérapie, l'ECT peut être pratiquée tout en ayant une efficacité du traitement [315]–[317]. Etant donné que l'ECT est défini par l'application du champ électrique en présence de la chimiothérapie, cette technique permet de potentialiser l'effet cytotoxique des médicaments. En raison de son hydrophilie et de sa grande taille, la bléomycine ne pénètre pas à l'intérieur des cellules perméabilisées. Ceci permet ainsi de délivrer une concentration suffisante du médicament à l'intérieur des cellules tumorales, tout en minimisant la concentration de médicament dans les tissus normaux. De plus, étant donné que la molécule cytotoxique (la bléomycine) ne peut tuer que les cellules en division, l'effet de cytotoxicité n'est observé que dans les cellules tumorales (en division rapide). Les cellules saines voisines ayant reçus des impulsions électriques seront moins affectées.

8.3. La radiothérapie

La radiothérapie est utilisée pour traiter environ 50% cancers. Elle consiste à envoyer des rayons ionisants (rayons X) sur les cellules cancéreuses, qui vont ainsi créer des dommages

directs ou indirects (par la génération des ROS) à l'ADN, empêchant ainsi la division des cellules et leur prolifération. Par conséquent, la radiothérapie va essentiellement provoquer une perturbation du cycle mitotique ou déclencher le processus apoptotique, induisant ainsi la mort cellulaire [318]. Cependant, comme la chimiothérapie, ce traitement n'est pas spécifique aux cellules cancéreuses, et il est également à l'origine d'effets secondaires. Pour cela, de nos jours, la radiothérapie est souvent combinée avec des stratégies innovantes (comme la thérapie ciblée [319], [320] ou l'utilisation de NPs [321], [322]) dans le but d'améliorer l'irradiation des cellules cancéreuses et minimiser les dommages des cellules saines voisines. D'une façon intéressante, l'ECT provoque moins d'effets secondaires que la radiothérapie, en raison de sa spécificité de traiter localement la tumeur. Autrement-dit, traiter la tumeur par application d'un champ électrique est plus spécifique qu'envoyer des rayons ionisants, qui vont éventuellement attaquer plus les cellules saines. De plus, comme expliqué dans le paragraphe précédent, le médicament cytotoxique (la bléomycine) n'attaque pas les cellules en division (c'est-à-dire les cellules tumorales). Par ailleurs, l'ECT est plus facile à réaliser et peu coûteuse par rapport à la radiothérapie (ce qui pourrait être bénéfique spécifiquement pour les petits hôpitaux ou les pays en développement, pour éviter de payer les coûts des appareils de radiothérapies. De plus, le cliniporator est un appareil facilement transportable comparativement à l'appareil de radiothérapie et donc l'ECT peut être beaucoup plus utilisée.

8.4. Immunothérapie

L'immunothérapie consiste à stimuler le système immunitaire des patients atteints de cancer afin de renforcer leurs défenses naturelles contre les cellules cancéreuses. En injectant des immunothérapies (antigène, cytokines ou anticorps), cette technique tend à favoriser l'immunité contre les cellules cancéreuse et/ou diminuer le contrôle de ces dernières sur le système immunitaire [323], [324]. L'électrochimiothérapie combinée avec l'immunothérapie a déjà été évoquée dans la section des applications de l'électroporation.

9. Avantages et limites de l'électrochimiothérapie

De nos jours, l'ECT est utilisée comme traitement clinique pour les tumeurs cutanées et sous-cutanées [325]–[327] et également pour les tumeurs internes [272]. Elle est appliquée dans plus de 150 centres cliniques européens. D'une manière générale, l'ECT est très

efficace [328] pour le traitement local des tumeurs superficielles ayant de nombreuses origines histologiques. Dans la littérature, l'ECT a montré généralement environ 80% de réponse objective (OR) incluant toutes les histologies tumorales dont environ 60–70% de régression tumorale complète (« CR pour complete response ») après un seul traitement. Ces résultats ont été démontrés essentiellement dans le cas des tumeurs de moins de 3 cm de diamètre et où le patient a subi une seule ECT [329]–[331]. Cependant, dans le cas des tumeurs plus grandes (supérieure à 3cm), le taux des réponses objectives est plus faible [332], [333]. L'ECT peut être répétée dans le cas des tumeurs persistantes ou en progression [334]. Par ailleurs, ECT est une technique rapide (25min) [335] où l'anesthésie peut être locale ou générale (dépendante de la tumeur). Elle est généralement réalisée lorsque la chirurgie ou la radiothérapie ont déjà échoué ou ne peuvent pas être appliquées. Elle peut aussi s'appliquer en combinaison avec d'autres traitements (par exemple : radiothérapie ou chirurgie). Aussi, l'ECT est une technique relativement peu coûteuse par rapport aux autres traitements et ne nécessite pas un long séjour hospitalier en post-traitement [336].

Par ailleurs, il est nécessaire de mentionner que l'efficacité de l'ECT est liée aux divers paramètres dont le choix de la molécule anti-cancéreuse à injecter ainsi que sa voie d'administration. Par exemple, l'ECT appliquée avec la bléomycine administrée par voie intra-tumorale a montré 90% d'efficacité avec 77% de réponses complètes tandis que l'injection de cisplatine par la même voie a montré 84% d'efficacité avec 74% de réponses complètes. Cependant, il est intéressant de noter que la cisplatine est généralement administrée en intra tumorale pour concentrer l'effet cytotoxique de cette molécule. Ainsi, l'injection de la cisplatine est plus intéressante pour traiter les tumeurs de petite taille. Par exemple, Giardino et al [317] ont comparé la cytotoxicité de la bléomycine et de la cisplatine utilisée en pré-clinique et clinique. Ils ont montré que la formation de pores au niveau de la membrane perméabilisée d'augmenter localement la toxicité jusqu'à 10 000 fois pour la bléomycine et 80 fois pour le cisplatine. C'est pour cette raison que la cisplatine est injectée en intratumoral pour pouvoir potentialiser son effet au niveau de la tumeur perméabilisée. Contrairement à la cisplatine, la bléomycine est généralement injectée par voie intraveineuse en concentration tolérable (qui est relativement faible) pour éviter tous dommages pulmonaires. En raison de sa forte cytotoxicité et de son hydrophilie, la bléomycine ne pénètre qu'à l'intérieur des cellules pulsées (tumorale). Pour ces raisons, la bléomycine est plus utilisée en clinique. Par ailleurs, Mir et al [337] décrivent d'autres facteurs à prendre en

compte pour avoir une ECT efficace comme notamment les impulsions électriques délivrées, le choix des électrodes, le suivi des patients et l'anesthésie.

Bien que l'ECT soit avantageuse et efficace pour le traitement de nombreuses tumeurs solides, cette technique peut être limitée dans certains cas. Un exemple de traitement d'une petite tumeur au niveau des jambes (Figure 26) montre une régression complète 4 à 6 semaines après le traitement en utilisant la cisplatine en tant que chimiothérapie. Une légère dépigmentation de la peau avec un effet esthétique satisfaisant a été observée. Cependant, toujours en injectant la cisplatine en intra-tumorale, l'ECT a montré une régression partielle de la tumeur jusqu'à 4 mois mais au bout de 8 mois la tumeur a déjà repris sa croissance, dans le cas des tumeurs de grande taille (Figure 27). En ce qui concerne l'ECT combinée avec la bléomycine, une étude italienne impliquant 13 instituts italiens a été réalisée, dans le cadre du cancer des seins, afin de suivre la survie sans progression local des tumeurs chez des patients qui ont été traités par l'ECT. En injectant la bléomycine en intraveineux, les patients avec des tumeurs de petites tailles (<3 cm) n'ont montré que 80.3 % de réponse complète, tandis que les patients ayant de grandes tumeurs ont montré que 46.1% de réponse complète [338]. En effet, plus la tumeur est grande, plus le champ électrique ne se distribue pas de la même manière dans tout le volume tumoral. Cette inhomogénéité du champ électrique explique l'inefficacité relative de l'ECT observée dans les grandes tumeurs. Miklavcic et al [339] ont confirmé ce fait en montrant que même 6% des cellules tumorales qui ont échappé à l'ECT sont suffisantes pour régénérer une croissance tumorale.

En ce qui concerne les tumeurs internes, un premier essai clinique [272] a été réalisé sur le foie et l'œsophage en 2012. Cet essai incitait à augmenter la probabilité d'éradication complète de la tumeur et ceci en développant des électrodes bien positionnées et qui permettent une distribution homogène du champ électrique tout en minimisant les dommages induits dans les tissus ou organes sains. Quelques années plus tard, des électrodes adaptées à des multiples tumeurs internes ont été développées [340]–[342] et testées sur différents types de tumeurs (foie, cerveau..). Cependant, l'ECT dans le cas des tumeurs internes nécessite impérativement une opération chirurgicale afin d'accéder aux organes tumoraux. Ce fait peut être considérée comme un facteur défavorable, en raison de la douleur associée à ce traitement et également au coût lié à cette opération.

Par ailleurs, la douleur liée à l'application du champs électrique représente est l'un des principaux facteurs limitant de l'ECT [185]. En effet, bien que les effets secondaires de

l'ECT soient négligeables, cette technique produit des sensations de douleur après le traitement. Ces douleurs sont ressenties dans la zone traitée (pulsée). Ces douleurs peuvent être associées à l'apparition des œdèmes ou d'érythèmes de la zone traitée ou aussi des brûlures de cette zone à cause de l'application d'un voltage fort. En effet, en augmentant le voltage du champ électrique, la résistance électrique de la peau diminue d'une manière significative. Il n'est donc pas surprenant que le niveau de la sensation puisse s'aggraver considérablement en augmentant le voltage appliqué. Par exemple, Zhang et al [343] ont rapportés dans le cadre du dysfonctionnement érectile, les sensations douloureuses ressenties par 20 patients. Ces derniers ont révélé une diminution de 25% de tolérance respective entre une impulsion de 80 V de 3ms et la même impulsion à 60V. De plus, bien que cette douleur soit essentiellement dépendante du voltage appliqué, il est nécessaire de mentionner qu'elle n'est pas la même d'un individu à un autre et dépend également de l'emplacement anatomique de la tumeur (plus spécifiquement des récepteurs sensoriels). Par ailleurs, l'application des impulsions électriques est associée à des contractions musculaires, qui ont été rapportées comme sensations très douloureuses [344]. Ainsi, en diminuant ces sensations de douleur, on pourrait faire l'ECT plus souvent avec une anesthésie locale ce qui rendrait l'ECT plus abordable, et permettrait une plus grande diffusion de l'ECT. Enfin, l'ensemble de ces paramètres indique, que malgré la sûreté et l'efficacité de l'ECT, ce traitement peut encore être amélioré.

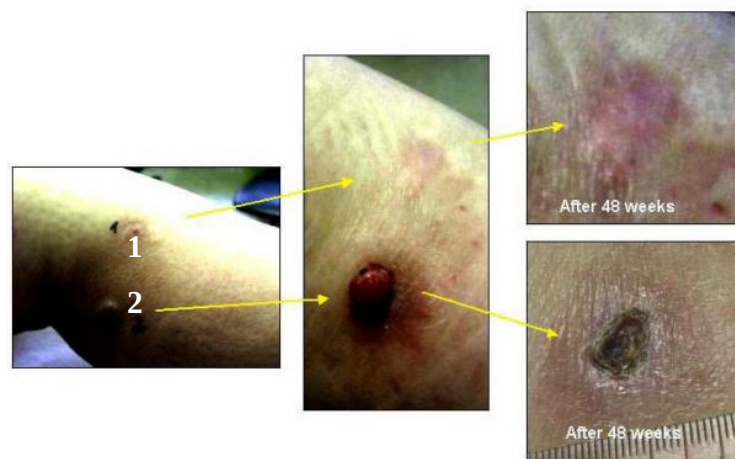


Figure 26 : Exemple d'un bon contrôle tumoral local chez un patient avec deux nodules tumoraux sur la jambe. Le premier nodule tumoral (n°1) a été traité une fois et la tumeur a régressé, après un an il n'y a pas eu de rechute et un bon effet cosmétique est observé. Le deuxième nodule tumoral (n°2) a été traité trois fois dans un intervalle de deux mois et à chaque fois une bonne réponse a été obtenue [345]. Durant ce traitement, la cisplatine a été utilisée comme chimiothérapie.



Figure 27 : Exemple de traitement de tumeur large sur le dos d'un patient atteint de mélanome malin. 9 séances consécutives à intervalles de 2 à 4 semaines. Après 8 mois, la croissance de la tumeur a été obtenue [345]. Durant ce traitement, la cisplatine a été utilisée comme chimiothérapie.

PROBLÉMATIQUE ET OBJECTIFS

PROBLÉMATIQUE ET OBJECTIFS

Tout en maintenant l'efficacité du traitement, l'objectif de ma thèse est de pouvoir réduire l'amplitude du voltage appliqué lors d'une ECT, afin de rendre l'utilisation de cette technique moins contraignante et plus répandue. Pour cela, nous avons souhaité étudier la combinaison des nanoparticules conductrices avec l'ECT. L'utilisation de ces nanoparticules conductrices servirait à amplifier autour d'elles, localement, le champ électrique appliqué. Ceci conduirait à une réduction de l'amplitude du champ électrique externe, tout en aboutissant à une ECT performante.

Cette réduction du voltage appliqué permettrait de diminuer les effets limitants de l'électroporation tout en conservant une réponse complète de l'ECT. En effet, des douleurs et des contractions musculaires désagréables sont associées au passage d'un fort voltage du champ électrique. Ainsi, en amplifiant localement le champ électrique par des nanoparticules conductrices, la nécessité d'appliquer un fort voltage du champ électrique pour aboutir à une électroporation efficace serait amoindrie. Par conséquent, une diminution des sensations de ces douleurs et de ces contractions dues lors de l'ECT peut être obtenue. Cette réduction de voltage permettrait ainsi la diminution des soins ambulatoires (tel que l'anesthésie).

Par ailleurs, dans les cas des tumeurs de grandes tailles ou des tumeurs internes, l'uniformité du champ électrique pourrait être améliorée en présence des nanoparticules conductrices. Bien que ces nanoparticules conductrices induisent des hétérogénéités locales du champ électrique autour d'elles, ces nanoparticules pourraient améliorer l'homogénéité de l'électroporation à l'échelle globale. En effet, ces nanoparticules permettraient d'amplifier localement l'effet du champ électrique dans les zones moins exposées aux impulsions électriques, conduisant ainsi à une amélioration de l'électroporation des cellules. Injectées au centre de la tumeur, là où le champ électrique est le plus faible si on applique les impulsions avec des aiguilles placées plutôt en périphérie de la tumeur (pour en couvrir tout le volume), les NPs augmenteraient localement le champ là où il pourrait être insuffisant. D'une façon intéressante, l'utilisation des nanoparticules conductrices permettrait d'optimiser et d'étendre l'utilisation de l'électrochimiothérapie chez un plus grand nombre de patients.

Afin d'amplifier localement le champ électrique au niveau de la membrane cellulaire et améliorer par conséquent l'entrée de la molécule cytotoxique, les nanoparticules

conductrices devraient être en contact avec la membrane des cellules. Pour cela, il fallait que cette interaction nanoparticules/membranes cellulaires soit étudiée étape par étape.

- 1) Le premier objectif de la thèse est d'étudier cette interaction et de valider la preuve de concept de cette nouvelle approche. Ainsi différentes méthodes de rapprochement entre les nanoparticules conductrices et les membranes cellulaires ont été étudiées *in vitro*. Cette première étude nous a permis ainsi de comparer l'efficacité de l'électroporation en utilisant différents types de nanoparticules et en testant également diverses méthodes de rapprochement.
- 2) Dans un second temps, afin d'aller plus loin dans la preuve de concept, nous avons optimisé les interactions entre les nanoparticules conductrices et les membranes cellulaires, tout en amplifiant davantage le champ électrique local autour de ces nanoparticules conductrices.
- 3) Dans un troisième temps, ces résultats rapportés *in vitro* ont été testés *in vivo* sur un modèle murin.
- 4) Les mécanismes impliqués dans l'amplification du champ électrique en présence des nanoparticules conductrices ont été également étudiés.

RÉSULTATS

RÉSULTATS

Article 1 : Electroperméabilisation cellulaire améliorée par des nanoparticules conductrices

Amina Ghorbel, Lluís M Mir et Tomás García-Sánchez

Vectorologie thérapeutique anticancéreuse, UMR 8203, CNRS, Université Paris-Sud, Gustave Roussy, Université Paris-Saclay, F-94805 Villejuif, France

Publié le 19 Septembre 2019 dans *Nanotechnology (IOPscience)*

Ce premier article met en évidence le potentiel des nanoparticules (NPs) conductrices à améliorer l'électroporation des cellules. Cette amélioration de l'électroporation a été observée grâce à l'amplification du champ électrique appliqué par les NPs conductrices. Ces dernières ont montré ainsi une augmentation de l'effet du champ électrique grâce à leur capacité à concentrer ce champ électrique autour d'elles ce qui a conduit à l'amélioration de l'électroporation des cellules. Plus précisément, cet article souligne l'importance du contact / distance physique entre les nanoparticules conductrices et les cellules, pour amplifier localement le champ électrique appliqué. En effet, pour agir en tant que nano amplificateurs, ces nanoparticules doivent être le plus près possible des surfaces des membranes cellulaires sans y être internalisées. Une fois à la surface des membranes des cellules cancéreuses, l'efficacité de électroporation a été comparée en présence et en absence des nanoparticules conductrices, en utilisant une substance cytotoxique non perméante (en l'occurrence un médicament anticancéreux, la bléomycine) comme indicateur d'electroperméabilisation. Les nanoparticules d'or (40 nm) sont les nanoparticules conductrices standard utilisées durant cette thèse.

Dans un premier temps, des simulations *in silico* ont été réalisées pour étudier théoriquement les déviations des lignes du champ électrique dans les régions qui entourent les NPs conductrices et pour pouvoir également estimer l'augmentation de l'intensité du champ électrique en présence de ces nanoparticules conductrices. Ces simulations suggèrent que dans les régions où les NPs sont en contact étroit entre elles (très agrégées), le champ

électrique n'est pas amplifié, tandis que dans les régions où les NPs sont groupées mais plus isolées, le champ électrique est fortement amplifié. Pour pouvoir amplifier le champ électrique autour des NPs et donc améliorer l'efficacité de l'électroporation, ces NPs conductrices doivent être au plus proche des membranes cellulaires.

Dans un second temps, le potentiel des nanoparticules conductrices à améliorer l'efficacité de l'électroporation, a été testé en étudiant différentes manières de rapprochement entre les nanoparticules et les membranes cellulaires. Le but principal était de déterminer une condition de rapprochement entre les NPs et les membranes cellulaires optimale sans que les NPs soient internalisées à l'intérieur des cellules. Ainsi, l'accumulation des nanoparticules conductrices à la surface de la membrane cellulaire, par sédimentation, a été étudiée en utilisant différentes conditions d'incubations des cellules avec ces nanoparticules *in vitro*. En incubant les nanoparticules 3h à 4°C avec les cellules, ces NPs ont pu augmenter l'effet du champ électrique par rapport à la condition sans NPs. Pour la suite, cette condition d'incubation a été choisie comme condition optimale d'interaction entre les nanoparticules et les membranes cellulaires.

Dans un troisième temps, différents types des nanoparticules (NPs de platine et de silice) ont été testés *in vitro* afin de vérifier le potentiel amplificateur du champ électrique crée par les nanoparticules d'or. Etant conductrices, les NPs de platine ont confirmé que l'effet amplificateur du champ électrique provient du matériel conducteur. Etant non conductrices, les NPs de silice ont confirmé davantage cette hypothèse en ne montrant aucun effet sur le champ électrique appliqué (malgré leur présence à la surface des membranes cellulaires).

Dans un quatrième temps, afin de valider et quantifier davantage l'effet des NPs conductrices sur l'amélioration de l'électroporation cellulaire, des expériences de microscopie à fluorescence, en temps réel, ont été réalisées dans des conditions d'incubation de 3h à 4 °C. Durant ces expériences, un fluorophore (Fluo-4) a été utilisé pour détecter l'entrée du calcium du milieu extracellulaire à travers les electropores de la membrane plasmique. L'intensité de fluorescence de Fluo-4 a été quantifiée en présence et en absence des NPs conductrices et a montré une augmentation significative en présence des NPs conductrices.

Cette étude a prouvé que l'accumulation de NPs conductrices (platine et or) à la surface des cellules permet l'amélioration des effets du champ électrique. Cette amélioration a été confirmée par des tests d'efficacité de clonage en utilisant la bléomycine et aussi par mesure de l'intensité de fluorescence en utilisant un marqueur fluorescent (le Fluo-4). Cette première étude a montré que l'effet d'amplification du champ électrique par les NPs conductrices est préférentiellement médié par des NPs individuelles et non agrégées (qui semblent être plus efficaces que les NPs agrégées). Ce premier article nous a permis ainsi de valider l'hypothèse d'utilisation des NPs conductrices en tant que nano amplificateurs.

Conductive nanoparticles improve cell electroporability

Amina Ghorbel , Lluís M Mir and Tomás García-Sánchez 

Vectorology and Anticancer Therapies, UMR 8203, CNRS, Univ. Paris-Sud, Gustave Roussy, Université, Paris-Saclay, F-94805 Villejuif, France

E-mail: tomas.garcia-sanchez@outlook.com

Received 26 April 2019, revised 4 July 2019

Accepted for publication 16 August 2019

Published 19 September 2019



Abstract

Conductive nanoparticles (NPs) were proposed to locally amplify the external electric field (EF) intensity at the cell surface to improve cell electroporation. To better understand the physical mechanisms behind this improvement, different types of NPs and several incubation conditions were applied to adherent cells in the present study. The enhancement of electroporation was observed in the presence of conductive NPs but not when non-conductive NPs were used. Experimental data demonstrate the influence of the incubation conditions between cells and NPs, which impact on the number and quality (aggregated or isolated) of the NPs surrounding the cells. While NPs can increase the number of electroporated cells, they have a more pronounced impact on the level permeabilization of each individual cell. Our results reveal the potential of conductive NPs to enhance the efficiency of electroporation via the amplification of the local EF at the cell surface as shown by numerical simulations.

Supplementary material for this article is available [online](#)

Keywords: conductive nanoparticles, electroporability, local electric field, electroporation

(Some figures may appear in colour only in the online journal)

Introduction

In recent years, nanoparticles (NPs) have emerged as important tools in modern medicine with numerous applications because of their specific properties: chemical reactivity, energy absorption, biological mobility and diffusion [1]. Today's main applications of NPs in the field of medicine are focused in their use as contrast agents in medical imaging and as carriers for drug delivery [2, 3]. The physical properties of certain NPs are also used in some therapeutic approaches. NPs have been proposed to treat cancer by photo-thermal therapy, the process of using NPs absorbing near-infrared light to kill cancer cells by the heat generated from the NPs illumination [4]. In this case, NPs are no longer simple drug carriers but they become therapeutic entities themselves. In this regard, the present work seeks to investigate the use of the conductive properties of certain NPs to enhance the effect of electric field (EF)-mediated cell permeabilization.

Cell electroporability, or electroporation, is defined as the increase in the permeability of biological

membranes to molecular species in response to the application of high intensity electric pulses (EP). One of the most commonly accepted explanations for electroporation is based on the rearrangement of the lipid molecules in the membrane leading to the formation of hydrophilic pores responsible for the transport of molecules in- or outward the cell [5] interestingly, it is possible to achieve electroporation *in vitro* and *in vivo* for every cell or tissue type. This makes electroporation a widespread technique applied in very different applications both in the biotechnological and clinical world (e.g. for gene transfer and DNA vaccination [6, 7]).

Especially important is its application for cancer treatment [8, 9]. When the principle of electroporation is combined with certain chemotherapeutic drugs, the cytotoxicity of these drugs is increased by several tens to hundred folds, leading to improved and dramatic responses in the target tumors. This is called electrochemotherapy (ECT) [10] which is defined as the local potentiation, by means of electric pulses (EPs), of the anti-tumor activity of a non-permeant (like bleomycin [11]) or a low permeant (like cisplatin [12, 13])

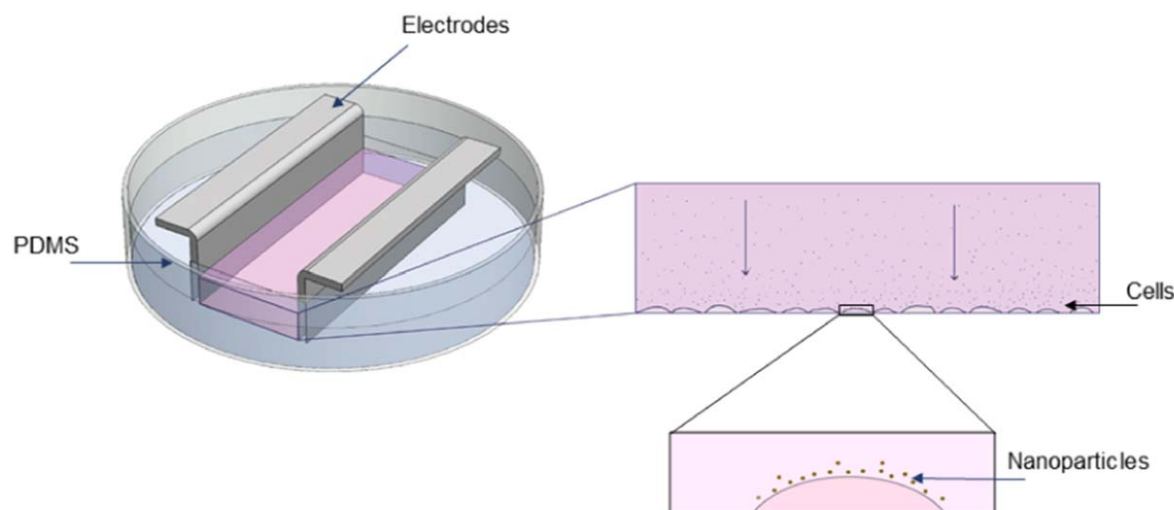


Figure 1. Schematic description of the experimental setup used for the delivery of electric pulses. Plate electrodes are positioned at both sides of a rectangular PDMS insert where cell monolayers are grown.

anticancer drug possessing a high intrinsic cytotoxicity. Interestingly, this technique has been especially effective in cutaneous and subcutaneous metastases [10]. Furthermore, among the possible applications of electroporation that are worth mentioning, irreversible electroporation (IRE) is also currently used in clinics to perform tumor ablation [14].

One of the main requirements for a fully effective electroporation treatment is the complete coverage of the sample under treatment by a sufficiently intense and uniform EF amplitude. Thus, novel approaches to enhance the EF intensity and homogeneity in the treated volumes should be developed to improve and extend ECT use of to larger number of patients.

The main goal of the present work is to study the use of conductive NPs as a method to locally amplify, at the level of the cell membrane, the intensity of the external EF applied. Used as nanoamplifiers, the conductive NPs would consequently lead to a reduction in the external EF intensity required to achieve effective cell electroporation and a few studies confirmed this idea.

As far as the authors know, the first experimental observation of the effects of conductive nanomaterials in electroporation was the permeabilization of bacteria using carbon nanotubes (CNTs) as local amplifiers of microwave electromagnetic fields [15]. In this study the authors explained that the elongated shape of CNTs causes a strong field enhancement at the CNT tip which could help in the facilitated electroporation of bacteria when CNTs are correctly oriented. Similarly, three more recent studies using CNTs showed improvements in the results obtained during electroporation [16–18]. Also, in the field of irreversible electroporation, two studies demonstrated the decrease of around two-fold in the EF required to kill human neuroblastoma or HeLa cells using boron nitride nanotubes [19, 20]. However, the mechanism by which this EF amplification produces cell electroporation was not elucidated. Additionally, another study reported the use of

cellulose nanocrystals to mechanically modify the cell membrane lowering the required EF intensity to kill cells [21].

Finally, the use of gold nanoparticles (GNPs) combined with electroporation has shown the enhanced DNA transfection efficiency of mammalian cells [22]. In the most recent study published by the same group, the authors explain the ability of gold nanoparticles to improve and focalize the EF applied what leads to an increased percentage of transfected cells [23]. However, the mechanisms proposed in those studies to explain the experimental observations are far to be clear.

The research work here presented aims to go further in the understanding of the potential use of conductive NPs for enhancing the efficiency of electroporation. Different NPs materials and incubation conditions were studied *in vitro* using an anticancer drug (bleomycin) as an electroporation indicator. Additionally, a fluorescent marker was also used to better understand our results.

Methods

Cell culture

Chinese hamster lung cell line (DC-3F) was grown and maintained as a monolayer in minimum essential medium (MEM) (Life Technologies, Saint-Aubin, France) supplemented with 10% fetal bovine serum (Life Technologies) and 1% penicillin-streptomycin at 37 °C and 5% CO₂ and was routinely sub-cultured every two days. For the experiments, 600 µl of cells prepared at a density of 1.3×10^5 cells ml⁻¹ were grown for 24 h to reach around 80% confluence in a rectangular bottomless chamber of 2 cm² constructed in PDMS (polydimethylsiloxane) inserted inside a 35 mm Petri dish (figure 1).

Reagents

Gold nanoparticles (GNPs) with an average size of 40 nm in citrated water were purchased from Sigma-Aldrich (741981-100 ml). The GNPs were used at a working concentration of $50 \mu\text{g ml}^{-1}$. To remove most of the citrate buffer, the solution was concentrated (5X) by centrifugation at 11000 rpm for 10 min (Eppendorf centrifuge, model 5810 R), to eliminate the possible effects of this buffer on cells during the exposure to the EFs. GNPs were re-suspended in serum-free MEM and sonicated for 10 min at 25°C (sonicator model VWR 300D at maximum power) before adding them to the cells.

Non-conductive silica nanoparticles (SNPs) (NanoComposix (MEL0053)) with an average diameter of $50 \text{ nm} \pm 5 \text{ nm}$, used as controls ($50 \mu\text{g ml}^{-1}$); after sonification of the stock solution (10 mg ml^{-1}), the SNPs were directly resuspended in free-serum MEM and added to the cells.

Conductive Platinum NPs (50 nm) (NanoComposix (JSD0017)) were used in the same manner as GNPs.

Electropulsation setup

Specially adapted electrodes were used to expose the entire monolayer to the EP. The two stainless steel electrodes, 0.6 cm, were connected to a Cliniporator™ (IGEA, Carpi, Italy) which delivered four or eight EP with $100 \mu\text{s}$ duration at a fixed field intensity of 600 V cm^{-1} and a repetition rate of 1 Hz.

Electropermeabilization assessment via clonogenic assay

Electropermeabilization of living cells was measured by a clonogenic assay using bleomycin [24]. Adherent cells were washed with phosphate buffered saline and NPs solution was added to the cell monolayer. Several interaction conditions of cells with NPs were tested at 4°C . Thereafter, electrodes were placed and $50 \mu\text{l}$ of bleomycin were added to the $600 \mu\text{l}$ of medium to reach a final concentration of 30 nM. Two minutes later, cells were pulsed. Ten minutes later, electrodes were removed and cells were washed once with PBS, detached with TryPLE Express (Life Technologies), suspended in medium, counted and diluted in order to deposit 250 cells per well of a six-multiwell plate. Not pulsed cells used as controls were handled similarly. After 5 d of cell culture, cells were washed twice, fixed with crystal violet solution (0.2% Crystal Violet, 10% formaldehyde and 20% ethanol in H_2O), and resulting colonies were counted. The viability rate in percentage was referred to non-pulsed cells and calculated for each treatment condition. Experiments were performed in three independent days and each one included a triplicate for each condition. Two-way ANOVA followed by Tukey multiple comparisons test was used to study the significance of differences.

Transmission electron microscopy (TEM) of cells-nanoparticles interaction

To study the exact location of nanoparticles with respect to cell membrane, TEM microscopy of attached cells was performed.

After each particular NPs-cell interaction condition, cells were instantaneously fixed in 2% glutaraldehyde in 0.1 M Sorensen's phosphate buffer (pH 7.3) for 1 h at 4°C , post-fixed with 2% osmic acid at room temperature for 1 h, rinsed in water and dehydrated in a grade ethanol series *in situ*. Cell monolayers were embedded on the surface of inverted Epon812-filled capsules. Polymerization was complete after 48 h at 60°C . Ultra-thin sections were collected on 200 mesh grids coated with Formvar and carbon, stained with standard uranyl acetate and lead citrate before observation with a Tecnai 12 electron microscope (FEI). Digital images were taken with a SIS Megaview III CCD camera.

Fluorescence microscopy

In order to have a different quantification of the level of cell electropermeabilization, real-time fluorescent microscopy was used. Fluo-4 AM ($\lambda_{\text{ex}} = 496 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 515 \text{ nm}$) which is a fluorescent calcium marker was used as a probe to visualize the variations in the cytosolic calcium concentration as a result of membrane permeabilization. DC-3F were cultured 24 h in the rectangular chambers (figure 1) and then incubated in the presence of Fluo-4-AM ($5 \mu\text{M}$) for 30 min in a humidified atmosphere at 37°C and 5% CO_2 . Afterwards, the excess of extracellular fluorescent dye was washed and cells were incubated in the presence or not of NPs at 4°C . Subsequently, the electrodes were placed and the Petri dish was mounted on the stage of a fluorescent microscope (Zeiss Axio Observer Microscope using a 20x objective). Images were acquired every 5 s using Zeiss AxioCam Hrc camera (exposure time of 200 ms) from 1 min before until 3 min after the EP delivery. Sequential images were post-processed with ImageJ software and the variations in fluorescence intensity were automatically quantified for each individual cell. Statistical significance of differences was studied with unpaired t-test followed by Tukey multiple comparisons test.

EF theoretical simulations

Finite element method (FEM) simulations using commercial software COMSOL Multiphysics (AC/DC Module) were performed to study the changes in the EF distribution produced by the presence of conductive or non-conductive NPs around the cell membrane. A simple 2D geometry was simulated including a single spherical cell decorated with a group of 40 nm nanoparticles randomly distributed around its plasma membrane. Plasma membrane was modeled as a thin layer of 5 nm ($\sigma = 1.10^{-7} \text{ S m}^{-1}$, $\epsilon_r = 11.7$), conductivities of intracellular and extracellular media were 1 and 1.5 S m^{-1} , respectively. Finally, the gold NPs (GNPs) were modeled as 40 nm solid spheres with a conductivity of $45.6 \times 10^6 \text{ S m}^{-1}$, while a conductivity of 0.001 S m^{-1} was attributed to the non-conductive NPs. A constant voltage was imposed between two parallel electrodes at the top and bottom borders of the domain (electric potential and ground) to have a voltage to distance ratio ($E = V/d$) of 600 V cm^{-1} .

Results

Theoretical simulation

Electromagnetic simulations permitted to model the EF distribution around NPs and cell membrane. The simulations were performed to study the deviation of the EF lines in the region surrounding NPs and to have an estimated rate of the EF intensity enhancement in the presence of NPs. In figure 2(a) left panel, the resulting EF distribution and current density lines are displayed for the entire simulated cell. Apparently, there is no noticeable modification in the general EF distribution due to the presence of NPs. However, the magnification around the domain where NPs were included shown in figure 2(a) right panels, brings a very different conclusion. It can be clearly observed how the presence of NPs (conductive or not) disturbs locally the distribution of EF. In the upper panel, for conductive NPs, the results are similar to the ones obtained in a classical simulation with microelectrodes, the NPs, acting as nanoelectrodes, amplify the local EF in the space between adjacent NPs. In the lower right panel of figure 2(a), the results for non-conductive NPs show that there is not any amplification of the EF in the region where NPs are present. To have a better estimate of the amplifying effect of conductive NPs, figure 2(b) shows the EF intensity along a line describing an arc at a distance of 5 nm parallel to cell membrane for the region simulated with GNPs in figure 2(a) upper right panel.

In the space out of the region with nanoparticles, the EF value is almost constant. On the contrary, in the presence of nanoparticles the EF intensity strongly varies depending on the relative position to NPs. It can be observed how in defined positions, there are peaks where the EF is highly amplified, more than 50% of amplification is quantified in all cases. The simulations suggest that in the regions where NPs are in close contact between them (highly aggregated NPs) the EF is not amplified, while in the regions where the NPs are grouped but more isolated the EF is highly amplified. These simple simulations support the idea that, upon the application of an external EF, the presence of conductive NPs around the cell membrane can modify the EF distribution and that NPs can act as local nanoamplifiers of the EF. This amplifying effect could thus improve the electroporation outcome compared to the case without nanoparticles. This concept is shown in the next sections.

Proof of concept

The initial aim of our research was to determine if the accumulation of conductive NPs at the surface of the cell membrane had a beneficial effect on cell electroporation. To this end, the standard experimental condition involved the incubation of GNPs with cells for 1 h at 4 °C (figure 3(a)), to ensure that NPs accumulated only around the surface of the cell membrane and were not internalized by the cells. It is known that the internalization of GNPs is mediated by endocytosis and that this phenomenon is almost completely halted at 4 °C [25–27].

The effectiveness of electroporation level was quantified by the clonogenic assay using bleomycin as a permeabilization reporter in the presence or not of NPs. In order to assess the possible effects of the EF pulses alone, or a combination of both NPs and EP, the effects of the EF with and without NPs and with and without bleomycin were compared for every pulsing condition. Prior to that, we verified the absence of toxicity of the GNPs alone (without EP) on cells (see supplementary material available online at stacks.iop.org/NANO/30/495101/mmedia).

Results in figure 3(a), show that in the absence of bleomycin the exposure of the cell monolayer to eight pulses at 600 V cm⁻¹ in the presence or not of GNPs resulted in an around 20% of cell death. This effect could be explained by a certain level of irreversible electroporation or other electrochemical effects on cells in the vicinity of the electrodes and occurred independently of the presence or not of GNPs. Thus, we can conclude that the GNPs in contact with cells did not increase the level of irreversible electroporation or produced any additional toxic effect. When bleomycin was added, the % of death cells considerably increased as a result of reversible electroporation. In this case, in the presence of GNPs there was a systematic increase in the effect of the EF (although not statistically significant) (average increase of about 10%).

Although the increase observed after this first proof of concept was small, our results suggested that conductive NPs seem to improve the EF around the cell membrane. An additional set of experiments using four EP, showed a similar increase of 10% in cell death in the presence of GNPs (data not shown).

Finally, TEM was performed to verify the location of GNPs after 1 h of incubation at 4 °C. In figure 3(b) TEM images of a representative area are shown. The picture shows a poor accumulation of GNPs on the surface of the cell membranes which are mainly in an aggregated state. DLS measurements also confirmed that most of the NPs were aggregated in the used medium (supplementary material). Therefore, the slight increase observed in the EF could be related to the scarce amount of GNPs located around the cell membrane.

Optimization of the interaction NPs-cell membrane

Encouraged by the previous results, different approaches were tested to maximize the accumulation of NPs at the level of the cell membrane, always avoiding their internalization.

Centrifugation of the conductive nanoparticles towards the attached cell monolayer

The first approach to optimize the interaction between GNPs and the cell monolayer was to accumulate the NPs at the bottom of the culture dish (near the cell monolayer) by centrifugation (more details and the results can be found in the supplementary material). This first approach did not produce an improvement in electroporation efficiency compared to the condition without NPs.

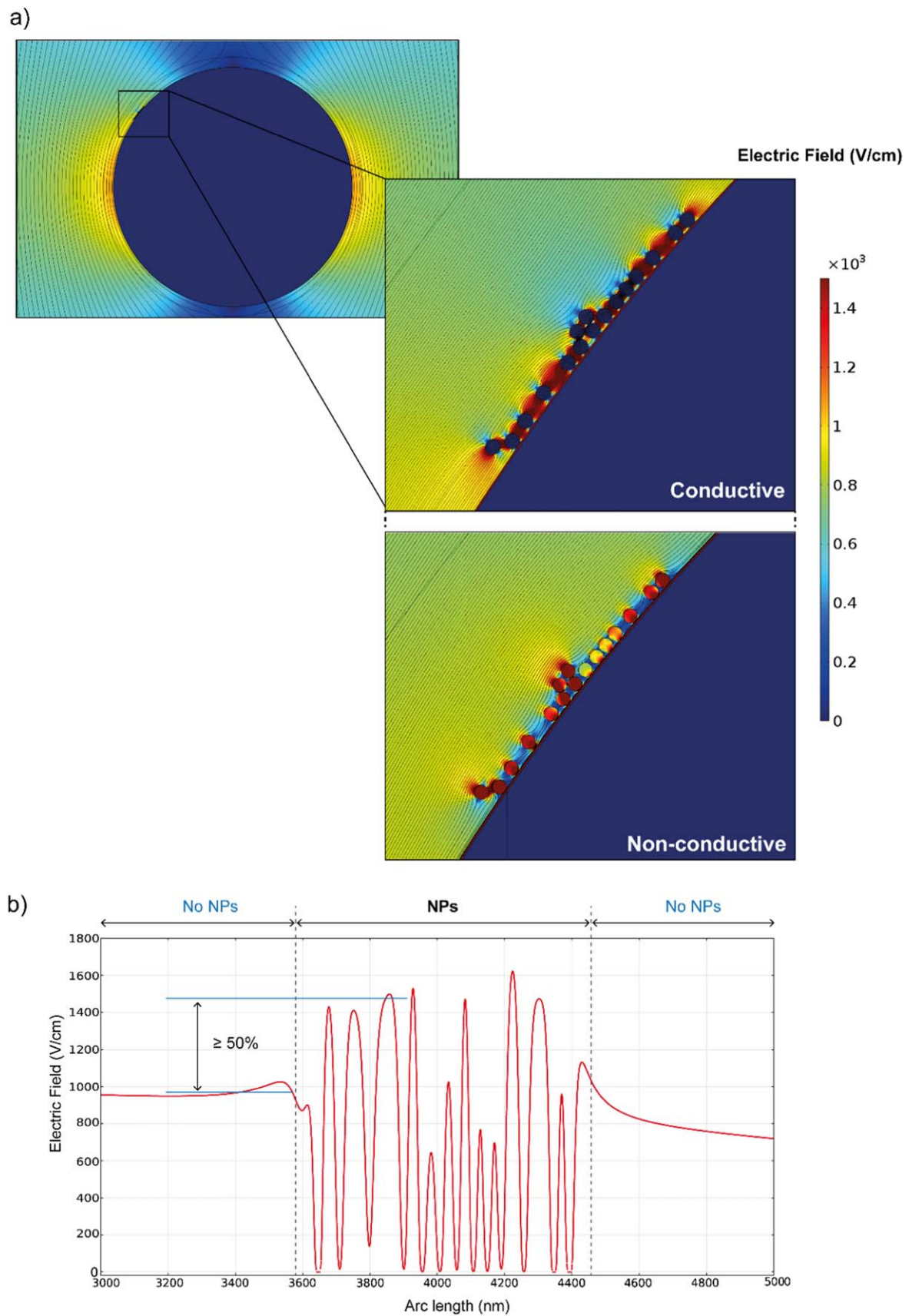


Figure 2. (a) FEM simulation of the electric field distribution around a single cell in contact with NPs. Electric field (V cm^{-1}) is represented in colors and the stream lines correspond to the resulting current density distribution. The EF distribution is shown conductive ($\sigma = 45.6 \times 10^6 \text{ S m}^{-1}$, upper panel) and non-conductive ($\sigma = 0.001 \text{ S m}^{-1}$, lower panel). (b) Corresponding EF intensity along an arc segment 5 nm parallel to the cell membrane in the case of conductive NPs. The region shown corresponds to the area enlarged in the insert of the upper panel.

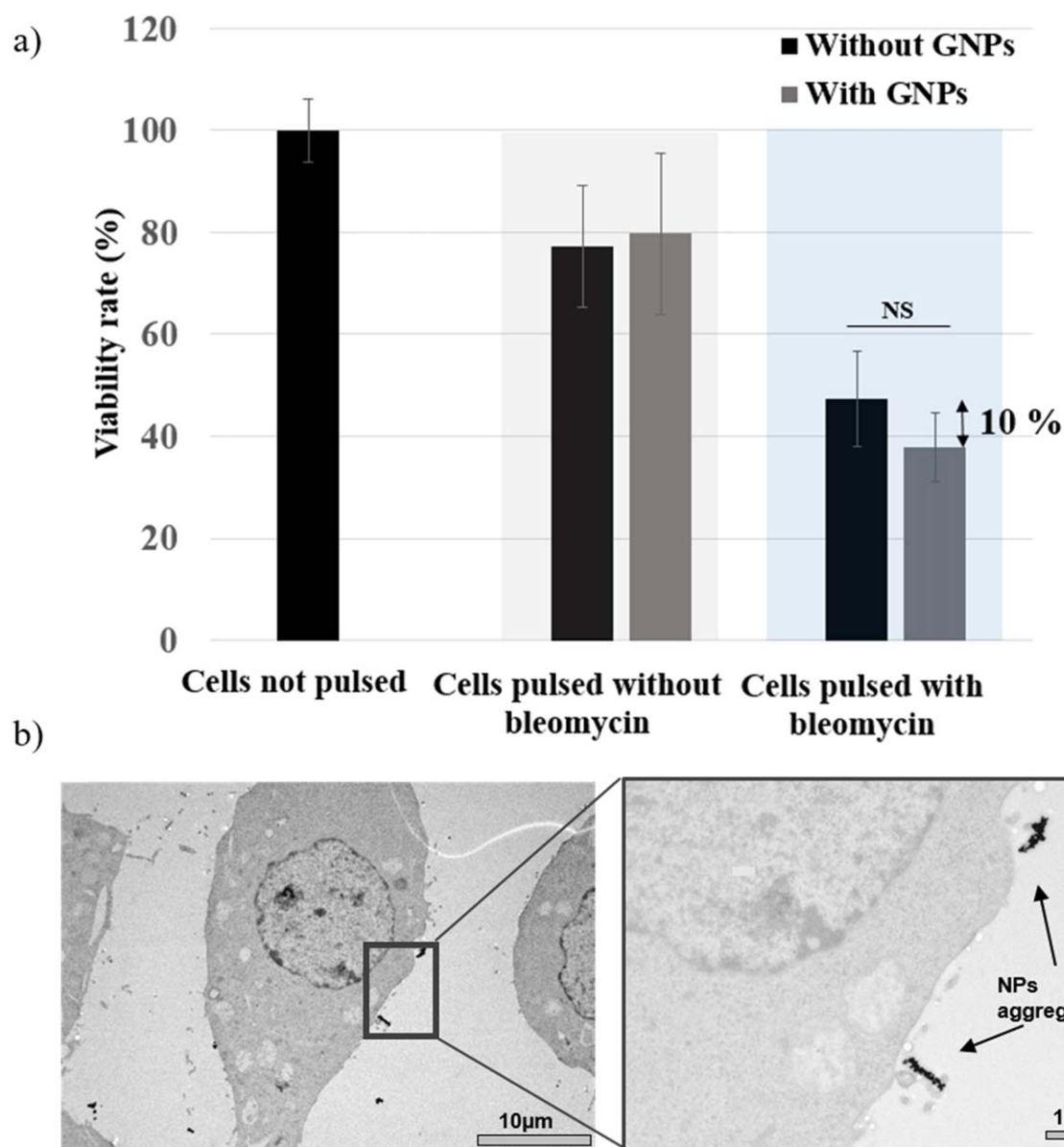


Figure 3. (a) Clonogenic assay: eight electric pulses of $100 \mu\text{s}$ at 600 V cm^{-1} applied in combination (or not) with bleomycin in the presence (or not) of GNPs. The error bars correspond to $\pm$ standard deviation. Experiments were performed on three independent days and each one included a triplicate for each condition. (b) TEM image of GNPs incubated with cell monolayer during 1 h at 4°C .

Increase of the incubation period with the conductive nanoparticles

The incubation at 4°C of the GNPs with the cell monolayer was increased to 3 h (figures 4(a) and (b)). The delivery of four EP at 600 V cm^{-1} in the absence of bleomycin resulted in the same percentage of cell death than the one obtained with 1 h incubation. This confirms again that the NPs alone do not have a toxic effect on cells. However, in the presence of bleomycin, the presence of GNPs increased the EF effect by around 24% with respect to the condition without NPs. In figure 4(b), a representative TEM image confirms an increase in the number of GNPs present around each cell. This observation suggests that the increase in the incubation time benefits the slow accumulation of GNPs on the cell surfaces, allowing a better interaction between NPs and the cell

membrane. Also, GNPs seem to be closer to the cell membrane compared to 1 h incubation condition.

Effect of non-conductive nanoparticles

In order to demonstrate that the observed effect is related to the presence of highly conductive NPs, non-conductive Silica NPs (SNPs) were used as controls. Cells were incubated for 1 h at 4°C and four EPs at 600 V cm^{-1} were applied. Data in figure 5(a) reveal the same percentage (around 20%) of cell death in the absence of bleomycin produced by the four EP application. Using the incubation condition of 1 h at 4°C , the accumulation of SNPs around the cell membrane was considerably higher than the observed in the condition involving GNPs (figure 5(b)). Despite this high accumulation, the combination of SNPs with cells did not show an increase of

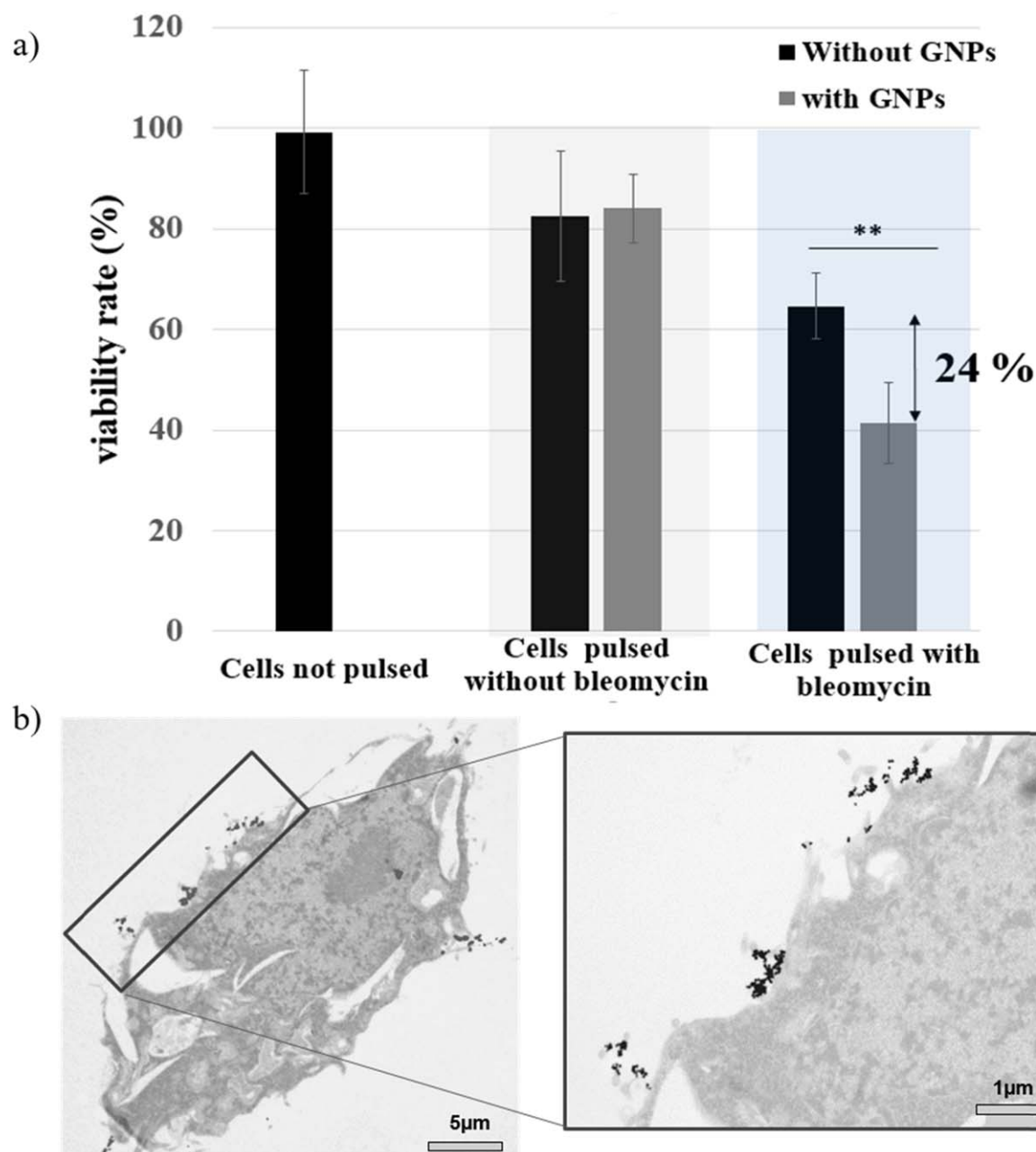


Figure 4. Clonogenic assay: four electric pulse of $100 \mu\text{s}$ at 600 V cm^{-1} applied in combination or not with bleomycin in the presence of GNPs after 3 h incubation at 4°C ($p < 0.0069$). The error bars correspond to two triplicate experiments performed independently. (b) TEM images of GNPs incubated with cell monolayer during 3 h.

the electroporation efficiency in the presence of bleomycin compared to the condition without SNPs. The same experiment was also performed after 3 h of incubation at 4°C and confirmed that there was not any increase in the effect and thus no dependence on the incubation time in this case (see supplementary information for the results). These results suggest that only the combination with conductive nanoparticles increases the effect of the EF.

Effect of platinum nanoparticles

Besides the use of non-conductive NPs, the idea in this section was to confirm that the intensification of the

electroporation effect was also possible with other conductive materials. Clonogenic assay was performed using another type of conductive NPs, Platinum NPs (Pt-NPs). The Pt-NPs were incubated with cells during 3 h at 4°C and four EPs at 600 V cm^{-1} were applied. Data in figure 5(c) display the same % (around 15%) of cell death in the absence of bleomycin due to the pulse application. However, in the presence of bleomycin, the combination with platinum NPs significantly increased the EF effect by around 15% with respect to the condition without NPs. Representative TEM images in figure 5(d) confirmed that the effect observed could be due to a large accumulation of NPs around the cell membrane. Even though the number of Pt-NPs around the cells seems to be

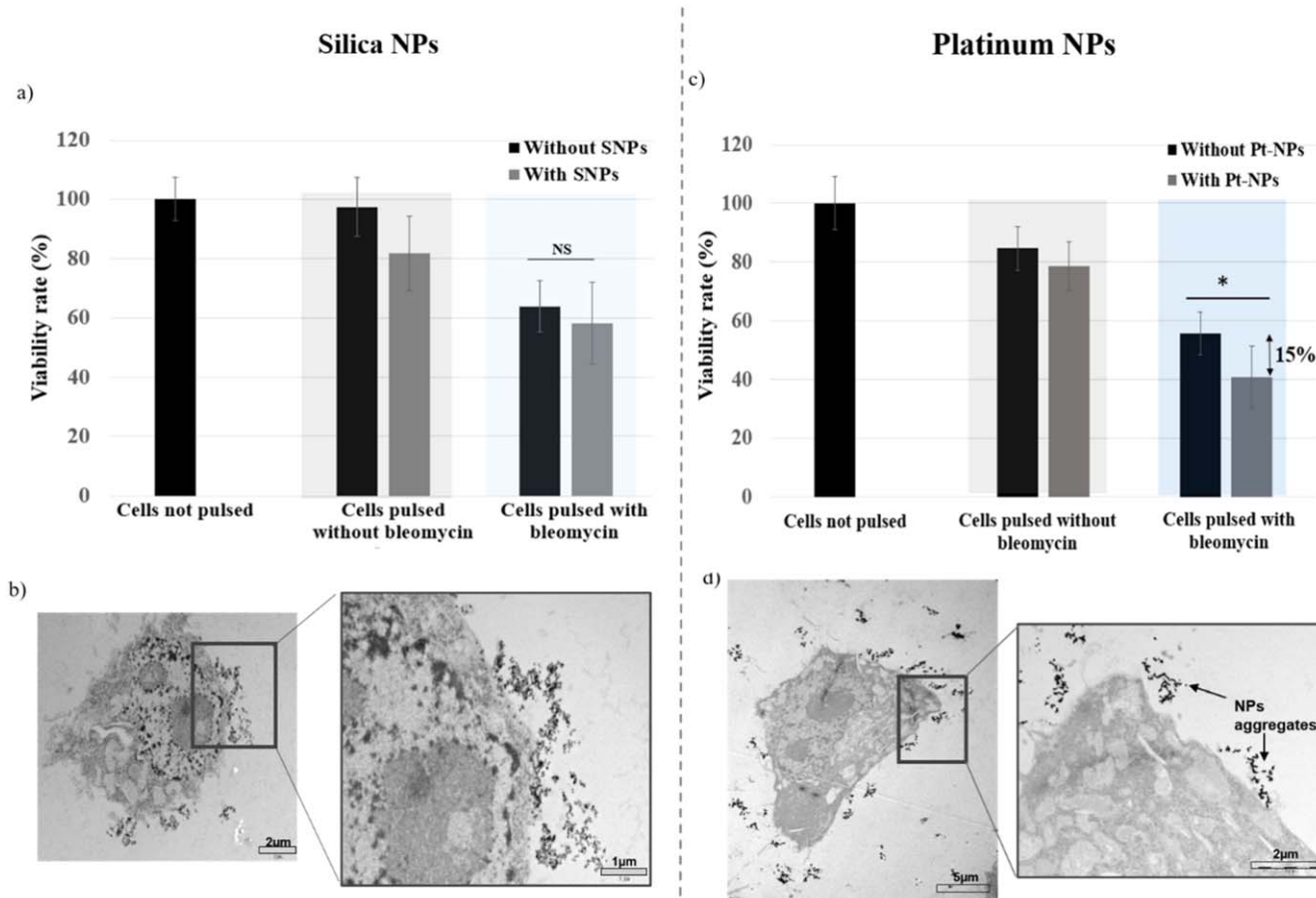


Figure 5. (a). Clonogenic assay: four electric pulses of $100\ \mu\text{s}$ at $600\ \text{V cm}^{-1}$ applied in combination or not with bleomycin in presence of SNPs. The error bars correspond to three triplicate experiments performed independently ($p < 0.0069$). (b) TEM images of SNPs incubated with cell monolayer during 1 h at 4°C . (c) Cloning efficacy assay: four electric pulses of $100\ \mu\text{s}$ at $600\ \text{V cm}^{-1}$ applied in combination or not with bleomycin in presence of Pt-NPs. The error bars correspond to three triplicate experiments performed independently ($p < 0.0415$). (d): TEM images of platinum NPs incubated with cell monolayer during 3 h at 4°C .

larger than the number of GNPs under the same incubation conditions, the TEM pictures suggest that the distance between NPs and the cell surface is also higher. The higher effect observed with Pt-NPs could be explained by the fact that NPs are closer to the cell membrane and so the local amplification of the EF is directly related to the distance of NPs to the cell membrane. These results show that the combination of electroporation with another conductive nanomaterial produced effects similar to those achieved with the GNPs and support the hypothesis of a local amplification of the EF at cell surfaces.

Real-time fluorescent microscopy

To further validate and quantify the effect of conductive NPs on the local enhancement of cell electroporation, real-time fluorescence microscopy experiments were performed under the incubation condition of 3 h at 4°C using GNPs. Fluo-4 was used to detect the calcium entry from the extracellular medium through the transiently electroporated plasma membrane. A preliminary study was performed to establish the EF minimum level necessary for the onset of the attached DC-3F cells to Ca^{2+} ions which are smaller than the

bleomycin molecules electroporation under the particular conditions of our experiments: the minimum EF intensity was $400\ \text{V cm}^{-1}$.

Figure 6(a) shows an example of the fluorescence detected into cells incubated in the presence of GNP just after the EF delivery. The quantification of the fluorescence inside the cells was measured in the presence or not of GNPs. The level of fluorescence detected in each analyzed cell before the pulses was considered as the background for this cell and removed along the time-lapse video recording for normalization. The curves represented in figure 6(b) display an example of the evolution in the fluorescence intensity of the Ca^{2+} signal inside the cells before and after pulses. Each condition was repeated at least nine times. Two parameters were calculated, the permeabilization rate which is defined as the ratio of cells displaying a Ca^{2+} peak over the total cell number in the microscope field, and the peak intensity calculated as the median of the maximum fluorescent intensity values of the permeabilized cells.

The percentages of permeabilization shown in figure 6(c) confirmed the results obtained in the clonogenic assay: compared to the condition without NPs, the combination with GNPs shows an increase of around 15%. More interestingly,

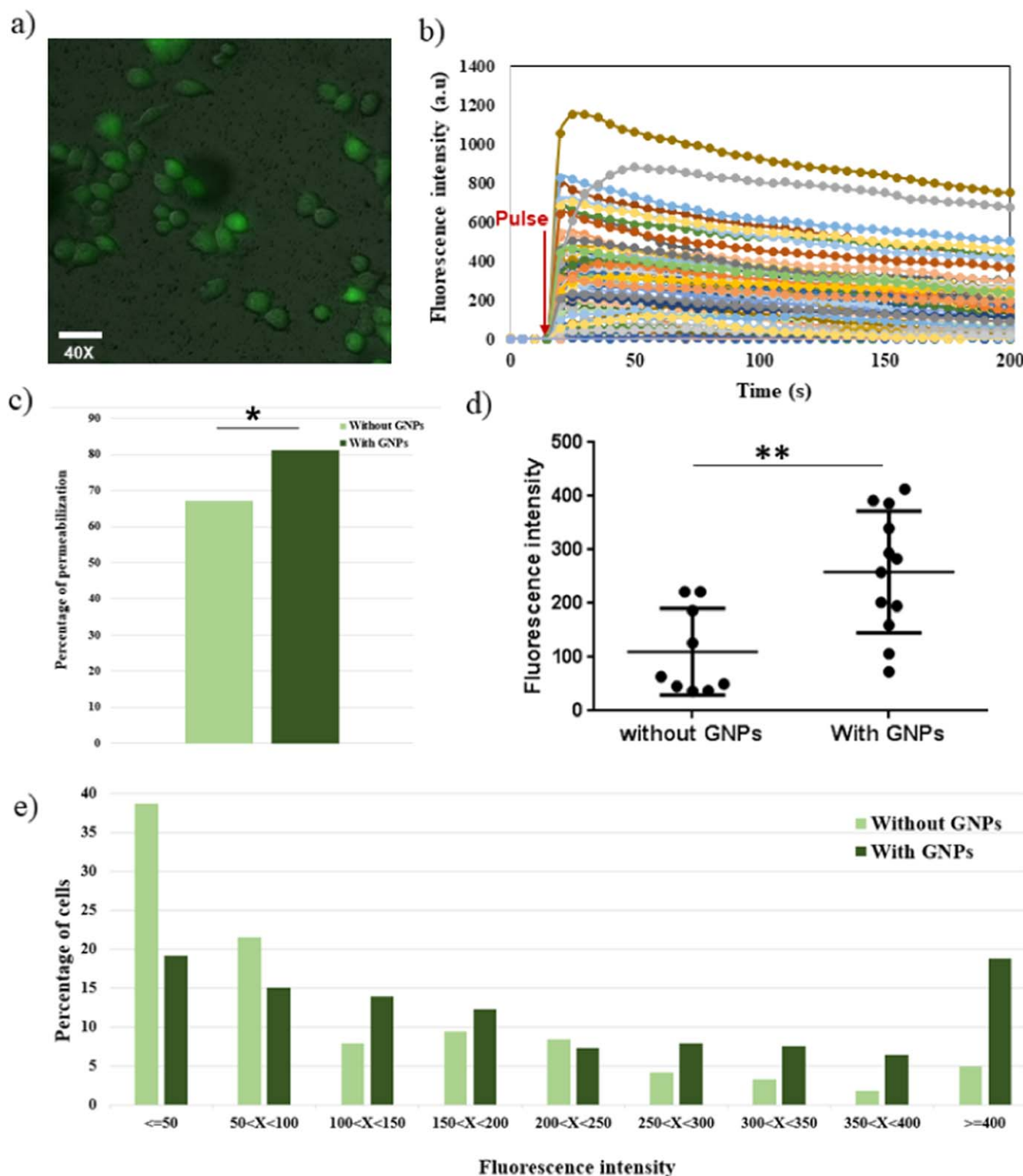


Figure 6. (a) Representative micrograph of an overlay of bright field and fluorescence images of cells in the presence of GNPs just after the electric field exposure. (b) Example of fluorescence intensity evolution of cells before and after pulse delivery (each color line corresponds to a single cell). (c) The percentage of permeabilized cells in the absence and the presence of GNPs (* $p < 0.0142$), (d) average fluorescence intensity of cells in contact or not with GNPs (** $p < 0.001$), (e) distribution of the cell population analyzed in terms of the fluorescence intensity in the presence or not of GNPs.

the values of the cytosolic Ca^{2+} peak intensity (figure 6(d)) show a significant difference between cells pulsed in the absence or the presence of the GNPs. Specifically, these results show that the addition of GNPs increases the

fluorescence intensity of the cells by more than two-fold on the average. Due to the high variability observed, the distribution of fluorescence in the cell population analyzed is shown in figure 6(e) for clarification. Only the cells

considered as permeabilized (displaying a calcium peak) were included in this analysis. In the absence of GNPs, a majority of cells showed a low fluorescence intensity (almost 40% of cells had a fluorescence intensity lower than 50 a.u.) suggesting that the level of permeabilization achieved was very low. In contrast, in the presence of GNPs, the percentage of the population displaying a low intensity of fluorescence was considerably lower while the number of cells with high intensity peaks was higher than in the absence of GNPs.

Discussion

Our results suggest that the plasma membrane is strongly influenced by the number and the aggregation level of NPs around the cell membrane. Indeed, the amplification of the electroporation effect was observed only in the presence of conductive NPs (not only gold, but also, for example, platinum NPs). Even though a higher accumulation of NPs around the cell membrane was observed in the presence of non-conductive SNPs, no increase in the effectiveness of cell electroporation was found. These observations are in agreement with studies which have shown the ability of other conductive materials (i.e. carbon nanotubes (CNTs)) to enhance cell electroporation [16, 18]. However, these studies attributed the observed effects to the NPs shape and dielectric properties and suggested that the possible orientation of the elongated CNTs caused the cell electroporation (tip effects). Our results rather emphasize the local deviation of the EF in the presence of conductive NPs as the major cause of the improvement of the external EF effects, as shown in our numerical simulations.

Accordingly, the number of NPs around the cell membrane has also a major influence in the amplification of the EF as shown by the TEM images: the higher the number of conductive NPs around the cells, the larger the improvement in cell electroporation. This was achieved through the increase from 1 to 3 h of the incubation time of GNPs with cells at 4 °C, which is in agreement with Zu *et al* [23]. These observations highlight the importance of the physical contact/distance between GNPs and cells to achieve the local amplification of the applied EF. Gravity only imposes a rather long time of incubation, which can lead to NPs internalization by endocytosis; therefore, incubation must be performed at 4 °C, which limits the maximum duration of the incubation.

Interestingly, a detailed analysis of the TEM images revealed that the increase in the incubation time to 3 h did not increase only the number of NPs around the cell membrane (which seem to be closer the cell membrane compared to 1 h incubation condition) but also the presence of isolated NPs around the membrane. While at 1 h only aggregates were observed (as they probably sediment faster than the isolated NPs), at 3 h isolated NPs (Gold/platinum NPs) were also present in a dispersed state. According to the FEM simulations, spatially distributed NPs would produce a higher EF amplification than highly aggregated NPs because it is in the

region between adjacent NPs where the amplification is produced. Thus, the amplification of EF is influenced not only by the total number of NPs (especially if most of them are aggregated) but also by the presence of isolated conductive NPs near to the cell membrane. This hypothesis is corroborated by the results using Pt-NPs which, in TEM, present much more and larger aggregates than dispersed Pt-NPs. It is important to note that finally, the distance to the membrane of isolated conductive NPs seems to be the important factor in the electroporation outcome. Qiu *et al* [28] seemed to indicate that the presence of GNPs in the extracellular medium could increase the conductivity of the extracellular buffer, thus influencing the electroporation outcome. However, in our case the significant increase in the effect observed after 3 h incubation was not related to the concentration (the same amount of NPs was used in all tested conditions). Furthermore, the influence of the conductivity of the extracellular buffer on electroporation efficiency is still controversial [29].

In the present study, we only explored the use of spherical nanoparticles but it would be interesting to explore more complex nanoparticles shapes like nanorods, nanostars, nanoflowers, etc. The tip effects that could be produced in these NPs shapes would create even a more abrupt local EF amplification. Finally, from our results, we can also conclude that a surface coating of the conductive NPs that would decrease their tendency to aggregate could increase the number of isolated NPs located close to the membrane and therefore their effectiveness in the electroporation outcome.

Conclusion

Our data from clonogenic assays evidence that the accumulation of conductive NPs (GNPs or Pt-NPs) at the surface of the cells causes an enhancement of the electric pulses effects, which sustains the role of these NPs as nanoamplifiers of externally applied EFs at the cell surface. This effect is preferentially mediated by individual spatially distributed NPs, the aggregates appearing to be less efficient. Furthermore, the results from the fluorescence experiments show that the combination with GNPs had an impact, not only in the percentage of permeabilization, but also in the extent of permeabilization of each individual cells as confirmed by a higher fluorescence intensity. This observation suggests that even if the local amplification of the EF is low, it can play an important role to increase the size or the number of membrane pores during electroporation and thus the efficiency of the treatment. Future research will be necessary to optimize the interaction between conductive NPs and the cell membrane, including the possible surface modification of NPs to decrease their aggregation, and to study new materials and NPs shapes with the final goal of translating these *in vitro* results to *in vivo* experiments. Indeed, the injection of conductive NPs in the tissues could consequently lead to a relevant reduction of the EF intensity required to achieve *in vivo* effective cell electroporeabilization.

Acknowledgments

We acknowledge Sylvie Souquere from 'Plateforme de microscopie électronique cellulaire', UMS 3655-AMMICA, who acquired the TEM images, Jean-Remi Bertrand who provided insight and expertise in the DLS measurements and Franck André for his advice and general supervision. Additionally, we acknowledge our colleague Shirmoné Botha for her revision of the English of part of the manuscript.

This work was partially funded by La Ligue contre le Cancer postdoctoral fellowship program and a grant of Tunisian government. The authors thank the funding support of the CNRS, Gustave Roussy, Univ. Paris-Sud and Université Paris-Saclay, as well as the ITMO Cancer in the frame of the Plan Cancer 2015–2019 (project PC201517).

ORCID iDs

Amina Ghorbel  <https://orcid.org/0000-0002-7363-2194>

Tomás García-Sánchez  <https://orcid.org/0000-0002-1115-0683>

References

- [1] Murthy S K 2007 Nanoparticles in modern medicine: state of the art and future challenges *Int. J. Nanomed.* **2** 129–41
- [2] Busquets M A, Estelrich J and Sánchez-Martín M J 2015 Nanoparticles in magnetic resonance imaging: from simple to dual contrast agents *Int. J. Nanomed.* **140** 1727–41
- [3] Baetke S C, Lammers T and Kiessling F 2015 Applications of nanoparticles for diagnosis and therapy of cancer *Br. J. Radiol.* **88** 20150207
- [4] Jaque D et al 2014 Nanoparticles for photothermal therapies *Nanoscale* **6** 9494–530
- [5] Azan A, Gaillieue F, Mir L M and Breton M 2017 Cell membrane electroporation: chemical analysis of cell membrane modifications and associated transport mechanisms *Adv. Anat. Embryol. Cell Biol.* **227** 59–71
- [6] Yarmush M L, Golberg A, Serša G, Kotnik T and Miklavčič D 2014 Electroporation-based technologies for medicine: principles, applications, and challenges *Annu. Rev. Biomed. Eng.* **16** 295–320
- [7] Mir L M 2008 Application of electroporation gene therapy: past, current, and future *Methods Mol. Biol.* **423** 3–17
- [8] Low L et al 2009 DNA Vaccination with electroporation induces increased antibody responses in patients with prostate cancer *Human Gene Ther.* **20** 1269–78
- [9] Calvet C Y, André F M and Mir L M 2014 Dual therapeutic benefit of electroporation-mediated DNA vaccination *in vivo*: enhanced gene transfer and adjuvant activity *Oncoimmunology* **3** e28540
- [10] Marty M et al 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.* **4** 3–13
- [11] Gothelf A, Mir L M and Gehl J 2003 Electrochemotherapy: results of cancer treatment using enhanced delivery of bleomycin by electroporation *Cancer Treat. Rev.* **29** 371–87
- [12] Florea A-M and Büsselberg D 2011 Cisplatin as an anti-tumor drug: cellular mechanisms of activity, drug resistance and induced side effects *Cancers* **3** 1351–71
- [13] Serša G, Kranjc S and Čemažar M 2000 Improvement of combined modality therapy with cisplatin and radiation using electroporation of tumors *Int. J. Radiat. Oncol.* **46** 1037–41
- [14] Davalos R V, Mir I L M and Rubinsky B 2005 Tissue ablation with irreversible electroporation *Ann. Biomed. Eng.* **33** 223–31
- [15] Rojas-Chapana J. a., Correa-Duarte M. a., Ren Z, Kempa K and Giersig M 2004 Enhanced introduction of gold nanoparticles into vital acidithiobacillus ferrooxidans by carbon nanotube-based microwave electroporation *Nano Lett.* **4** 985–8
- [16] Raffa V, Ciofani G, Vittorio O, Pensabene V and Cuschieri A 2010 Carbon nanotube-enhanced cell electroporation *Bioelectrochemistry* **79** 136–41
- [17] Rojas-Chapana J, Troszczynska J, Firkowska I, Morszeck C and Giersig M 2005 Multi-walled carbon nanotubes for plasmid delivery into *Escherichia coli* cells *Lab Chip* **5** 536–9
- [18] Wang L, Liu D, Zhou R, Wang Z and Cuschieri A 2015 Tumour cell membrane poration and ablation by pulsed low-intensity electric field with carbon nanotubes *Int. J. Mol. Sci.* **16** 6890–901
- [19] Raffa V, Ciofani G and Cuschieri A 2009 Enhanced low voltage cell electroporation by boron nitride nanotubes *Nanotechnology* **20** 075104
- [20] Raffa V, Riggio C, Smith M W, Jordan K C, Cao W and Cuschieri A 2012 BNNT-mediated irreversible electroporation: its potential on cancer cells *Technol. Cancer Res. Treat.* **11** 459–65
- [21] Colacino K R, Arena C B, Dong S, Roman M, Davalos R V and Lee Y W 2014 Folate conjugated cellulose nanocrystals potentiate irreversible electroporation-induced cytotoxicity for the selective treatment of cancer cells *Technol. Cancer Res. Treat.* **14** 757–66
- [22] Huang S, Deshmukh H, Rajagopalan K K and Wang S 2014 Gold nanoparticles electroporation enhanced polyplex delivery to mammalian cells *Electrophoresis* **35** 1837–45
- [23] Zu Y, Huang S, Liao W-C, Lu Y and Wang S 2014 Gold nanoparticles enhanced electroporation for mammalian cell transfection *J. Biomed. Nanotechnol.* **10** 982–92
- [24] Cemazar M, Miklavcic D and Sersa G 1998 Intrinsic sensitivity of tumor cells to bleomycin as an indicator of tumor response to electrochemotherapy *Japan. J. Cancer Res.* **89** 328–33
- [25] Nam H Y et al 2009 Cellular uptake mechanism and intracellular fate of hydrophobically modified glycol chitosan nanoparticles *J. Control. Release* **135** 259–67
- [26] Chithrani B D and Chan W C W 2007 Elucidating the mechanism of cellular uptake and removal of protein-coated gold nanoparticles of different sizes and shapes *Nano Lett.* **7** 1542–50
- [27] Chithrani B D, Ghazani A A and Chan W C W 2006 Determining the size and shape dependence of gold nanoparticle uptake into mammalian cells *Nano Lett.* **6** 662–8
- [28] Qiu H, Joshi R P and Pradhan A 2014 Simulation of nanoparticle based enhancement of cellular electroporation for biomedical applications *J. Appl. Phys.* **116** 184701
- [29] Silve A, Leray I, Poignard C and Mir L M 2016 Impact of external medium conductivity on cell membrane electroporation by microsecond and nanosecond electric pulses *Sci. Rep.* **6** 19957

Supplementary

Characterization of NPs suspensions by Dynamic light scattering (DLS)

The average effective diameter of the colloidal NPs suspensions used in the experiments were measured by Dynamic Light Scattering (DLS) (Brookhaven, Nanobrook 90plus PALS). To have information about the stability of NPs in the culture medium, NPs were re-suspended in serum-free MEM culture medium, sonicated (as described in reagents section) and at least three measurements were independently taken for each sample. Here, it is noteworthy to mention that citrate buffer acts as a stabilizing agent by forming a layer of citrate ions over the surface of GNPs, inducing enough electrostatic repulsion between individual particles to keep them well dispersed in the medium thus preventing aggregation. However, the culture medium used is composed of a high concentration of negatively charged ions (e.g. high ionic strength, salt content, or the presence of bio macromolecules). Hence, a comparison between GNPs in their commercial buffer (citrate buffer) and GNPs in culture medium was performed. The same measurements were also performed for the silica non-conductive NPs (SNPs) and for the Platinum NPs.

Nanoparticle characterization

Dynamic light scattering (DLS) was used to study the stability of different NPs dispersed in a liquid solution. Fig. S1 displays the intensity distributions produced by a typical algorithm where the percentage of intensity is shown as a function of particle diameter. The effective diameter (defined as hydrodynamic diameter), was detected for GNPs, SNPs and Pt-NPs dispersed either in their commercial buffer (citrate buffer) or in the serum-free medium. The intensity size distribution of GNPs dispersed in their commercial buffer displays a single peak around 50 nm (black line in Fig. S1 b). However, when they were measured in serum-free MEM the graph displays a double peak distribution with an average effective diameter of 430 nm (red line in Fig. S1b). The increase of effective diameter observed in serum-free MEM clearly indicates an aggregation of GNPs that could be explained by the high ionic strength of the suspension (i.e. salt ions presence), leading to a modification in the electrostatic double layer at the surface of NPs. These changes result in a weakening of the repulsion forces between neighbor NPs, thus a dominance of the attractive forces (Van der Waals forces) that produce NPs aggregation [1]. The intensity size distribution of Pt-NPs dispersed in their commercial buffer show also a peak around 50nm (black line in Fig. S1 c) and a single peak with an average effective diameter of 852 nm (red line in Fig. S1c) in serum-free MEM. The increase of effective diameter in Pt-NPs case indicate also an aggregation of Pt-NPs that could be explained by the high ionic strength of the medium and due to the minor or absence amount of serum in the media[2][3].

In comparison, the intensity size distribution of SNPs dispersed in commercial (water) and serum-free MEM (Fig. S1 a) was characterized by a mean peak of 47 nm and 57 nm, respectively. The slight increase of

effective SNP diameter in serum-free MEM is negligible meaning that there is no aggregative process. These observations are in agreement with Graf et al [4], who demonstrated that non-functionalized SNPs show weak, time-dependent aggregation in culture media (DMEM) as well as a constant hydrodynamic diameter after several hours.

The polydispersity indexes (defined as the width of the NPs distribution in a liquid solution) displayed an increase when GNPs and SNP were prepared in the culture media. This also suggests changes in NPs stability but the values obtained ($PDI < 0.2$) are generally considered as acceptable. From these DLS measurements, we confirm that the colloidal stability of GNPs is altered under the experimental conditions used in this study (serum-free MEM). Thus, it is important to stress that possible effects observed in the experiments below are the result of the interaction of NPs aggregates and not mono-dispersed NPs.

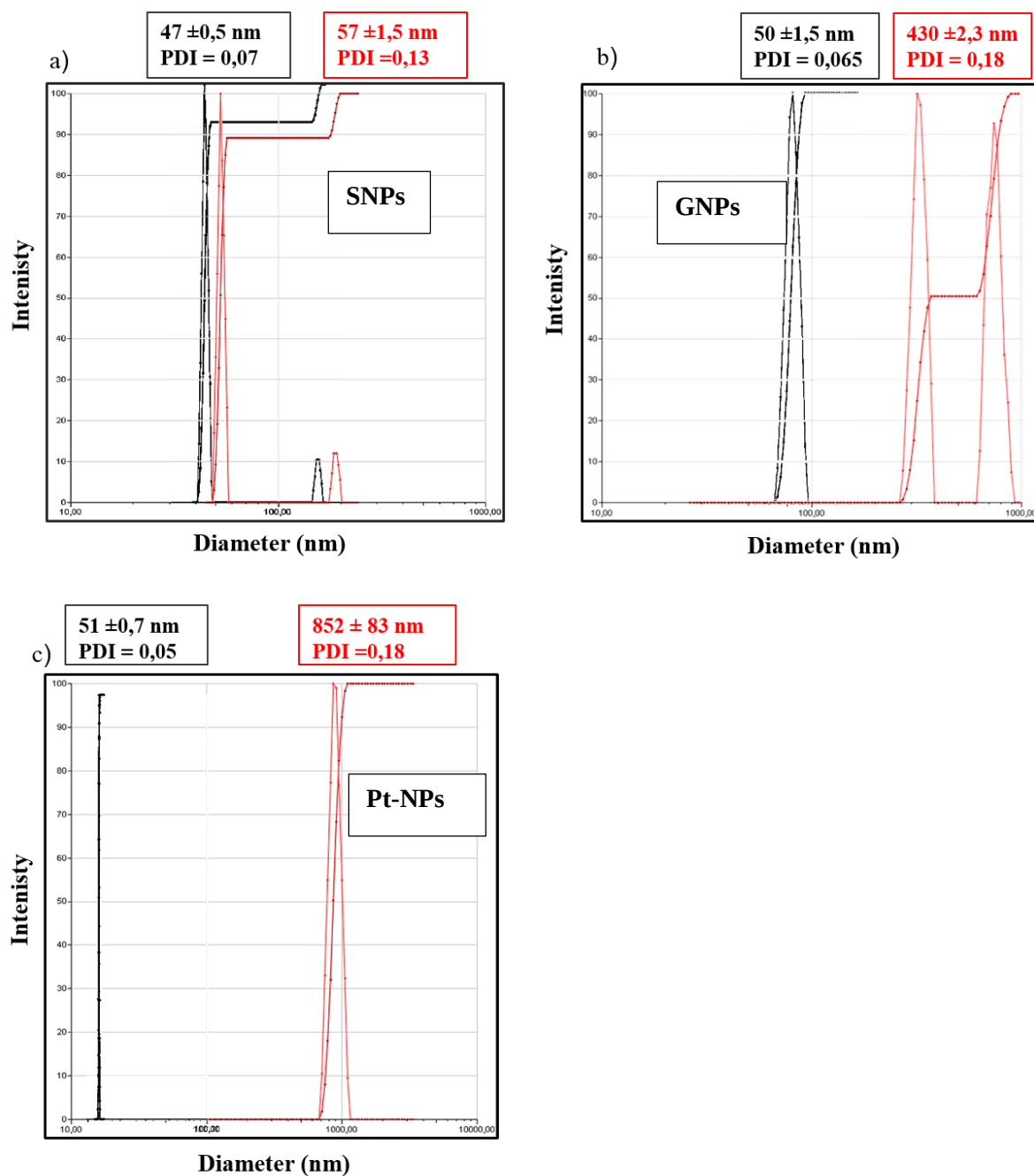


Fig. S1: Determination of nanoparticles size by DLS measured by the intensity methods. a) Size distribution of SNPs dispersed in commercial (dark curve) and serum-free MEM (red curve). b): Size distribution of GNPs dispersed in commercial (dark curve) and serum-free MEM (red curve). c): Size distribution of Pt-NPs dispersed in commercial (dark curve) and serum-free MEM (red curve). The effective diameters are the mean values of at least three independent measurements ($\pm$ Standard Deviation/ PDI: Polydispersity of samples).

Centrifugation of conductive nanoparticles towards an attached cell monolayer

After the addition or not of GNPs, the Petri dishes containing the cell monolayer were centrifuged at 1100 rpm for 5 minutes (using plate rotors and Eppendorf centrifuge 5810R). After centrifugation, the electrodes were placed and the experiment was performed as described above using in this case 4 electric pulses. Previously, cell viability was evaluated using the MTT assay to test the possible cell death caused by the centrifugation of GNPs itself. Results showed no effect of the centrifugation alone on cell viability (Data not shown).

In the presence of bleomycin and GNPs, the clonogenic assay (Fig. S2) revealed no difference in the effects of the electric field with respect to the condition without NPs after the delivery of 4 electric pulses (around 45 % of cell death). In the absence of bleomycin, the resulting cell death was also similar in the presence or absence of NPs at around 15%. TEM images (data not shown) confirmed that, in fact, there was no NPs in contact or around the cell membrane after 5 minutes of centrifugation. According to this observation, it can be concluded that the absence of differences in the conditions with NPs could be related to the weakness of the interactions between the NPs and cells. The mechanical forces during centrifugation and the short incubation period (only 5 minutes) were not enough to create a strong interaction between the NPs the cell surface. Subsequently, in order to improve the GNP-cell monolayer interaction, the incubation period of GNPs with cells was increased.

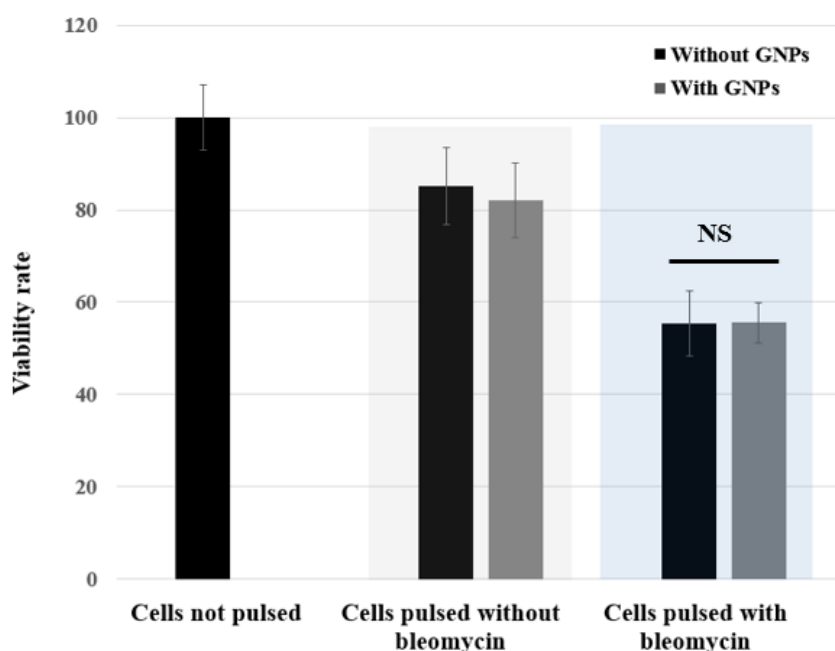


Fig. S2: Clonogenic assay: 4 electric pulse of 100 μ s at 600V/cm applied in combination or not with bleomycin in the presence of GNPs centrifuged towards an attached cell monolayer. The error bars correspond to two triplicate experiments performed independently.

Nanoparticle toxicity

In order to study the possible effects of GNPs alone on the viability of cells, cell monolayers were incubated with GNPs of 40 nm during 3 hours at 4°C (condition used during experiments). Cells were seeded in the rectangular chamber inside a 35 mm petri dish as described in the Materials and Methods section at a density of 6×10^5 cells/ml to reach 40% of confluence the day of the experiments. At the end of incubation in the presence or not of GNPs cells were washed once with PBS and 500 µl of complete MEM medium were added into the chambers. After 24 hours of incubation in a humidified 5% CO₂ atmosphere at 37 °C, cell monolayers were stained to easily localize their nuclei, using 375 nM of the fluorescent dye Hoechst 33342 (Fischer Scientific). After 30min of incubation, the Petri dishes were washed once with PBS and 500 µl of complete MEM were added before imaging the cells. The fluorescence of the cells was detected using a Zeiss Axio Observer Microscope using a 20x magnification. For each condition, 3 images of cells were taken from different regions of the cell monolayer, and the number of cells was counted. The percentage of cell survival was reported with respect to control cells (incubated without NPs). Each experiment was repeated 3 times.

The results in Fig. S3 show the same level of cell survival in the presence or in the absence of GNPs confirming the nontoxic effect of GNPs.

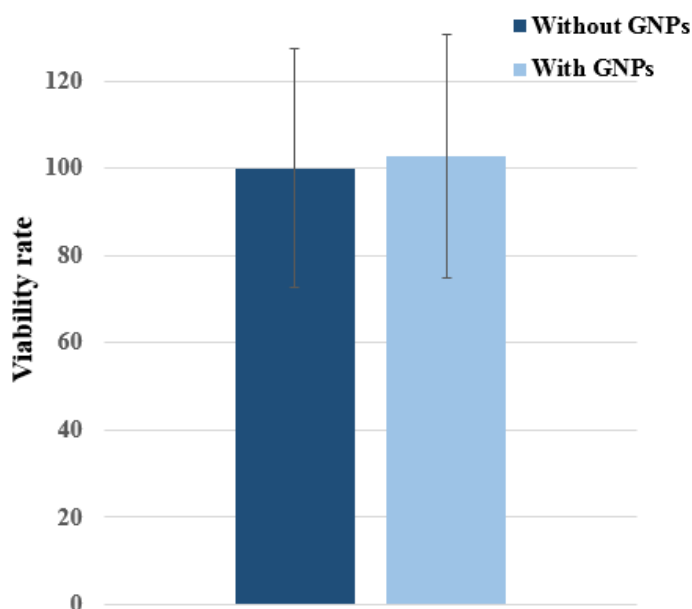


Fig. S3: Viability rate of cells cultured for 24 hours after their incubation in the presence of GNPs during 3 hour at 4°C. Results are normalized with respect to the viability of cells incubated in the absence of GNPs.

References:

- [1] T.L. Moore, L. Rodriguez-Lorenzo, V. Hirsch, S. Balog, D. Urban, C. Jud, B. Rothen-Rutishauser, M. Lattuada, A. Petri-Fink, Nanoparticle colloidal stability in cell culture media and impact on cellular interactions, *Chem. Soc. Rev.* 44 (2015) 6287–6305. doi:10.1039/C4CS00487F.
- [2] H. Gehrke, J. Pelka, C.G. Hartinger, H. Blank, F. Bleimund, R. Schneider, D. Gerthsen, S. Bräse, M. Crone, M. Türk, D. Marko, Platinum nanoparticles and their cellular uptake and DNA platination at non-cytotoxic concentrations, *Arch. Toxicol.* 85 (2011) 799–812. doi:10.1007/s00204-010-0636-3.
- [3] A. Elder, H. Yang, R. Gwiazda, X. Teng, S. Thurston, H. He, G. Oberdörster, Testing Nanomaterials of Unknown Toxicity: An Example Based on Platinum Nanoparticles of Different Shapes, *Adv. Mater.* 19 (2007) 3124–3129. doi:10.1002/adma.200701962.
- [4] C. Graf, Q. Gao, I. Schütz, C.N. Noufele, W. Ruan, U. Posselt, E. Korotianskiy, D. Nordmeyer, F. Rancan, S. Hadam, A. Vogt, J. Lademann, V. Haucke, E. Rühl, Surface Functionalization of Silica Nanoparticles Supports Colloidal Stability in Physiological Media and Facilitates Internalization in Cells, *Langmuir*. 28 (2012) 7598–7613. doi:10.1021/la204913t.

Article 2 : Accumulation des nanoparticules conductrices par électrophorèse pour l'amélioration de l'électroperméabilisation cellulaire

Amina Ghorbel¹, Franck M. André¹, Lluís M. Mir^{1*}, Tomás García-Sánchez^{1,2}

¹Université Paris-Saclay, Institut Gustave Roussy, CNRS, Metabolic and systemic aspects of oncogenesis (METSYS), 94805, Villejuif, France

²Department of Information and Communication Technologies, Universitat Pompeu Fabra, Roc Boronat, 138, 08018 Barcelona, Spain

Publié le 20 août 2020 dans *Bioelectrochemistry*

Afin d'aller plus loin dans la preuve de concept validée dans le premier article, l'objectif principal de ce deuxième article est d'optimiser l'interaction entre les nanoparticules (NPs) conductrices et les membranes des cellules cancéreuses. En effet, afin de pouvoir valider l'effet des NPs conductrices sur le champ électrique appliqué *in vivo*, une étape d'optimisation semble être nécessaire pour pouvoir passer de l'étude *in vitro* à une étude *in vivo*. Tout en tenant compte de l'efficacité des résultats obtenus précédemment (article 1), la stratégie de sédimentation (incubation 3h à 4°C) s'avère être une approche limitante pour l'étude *in vivo*. Pour cela, l'objectif de ce deuxième article est d'améliorer cette stratégie de sédimentation tout en conservant une bonne interaction entre les NPs et la membrane cellulaire nécessaire à l'amplification du champ local. Par ailleurs, en raison de l'importance de la distribution des NPs à la surface pour amplifier le champ électrique local (comme montré dans l'article 1), l'étude de différentes propriétés des NPs d'or (agrégées et isolées) ont été explorées pour améliorer davantage l'efficacité de l'électroporation. L'effet amplificateur des NPs conductrices a été révélé par comparaison à l'absence de NPs via des tests d'efficacité de clonage, en utilisant la bléomycine en tant qu'indicateur du pourcentage des cellules perméabilisées.

Dans un premier temps, des images des cellules incubées avec des NPs d'or ont été prises en microscopie électronique en transmission (TEM). Contrairement aux images TEM

observées dans le premier article, ces images des cellules ont été prises après l'application du champ électrique. Ces images ont montré un résultat inattendu, où les NPs ont été rapprochées de la surface des cellules d'une manière significative grâce à l'application du champ électrique, et ceci par comparaison aux cellules incubées avec les NPs en l'absence des impulsions électriques. De plus, les NPs d'or semblaient être très proches de la membrane cellulaire après l'application des impulsions électriques. Ce résultat a suggéré que l'application d'impulsions électriques pourrait rapprocher les NPs des cellules et pourrait par conséquent améliorer l'interaction NPs/membrane cellulaire.

Dans un second temps, à la suite de cette observation, l'électroporation des cellules a été testée (par l'efficacité de clonage) en présence des NPs d'or, en appliquant deux trains d'impulsions électriques microsecondes où la première impulsion avait pour but de ramener les NPs à la surface des cellules (comme observé sur l'image TEM). En rajoutant la bléomycine après ce premier train d'impulsions microsecondes, les NPs présentent à la surface des cellules, ont montré une augmentation de l'effet du champ électrique (donc du 2^{ème} train de pulses).

Dans un troisième temps, l'électroporation des cellules a été également testée (par efficacité de clonage) en présence des NPs d'or mais en appliquant cette fois-ci différents types d'impulsions électriques. En effet, afin d'éviter tout effet perméabilisant dû au premier train d'impulsions électriques et également tester l'électrophorèse des NPs d'or, ce premier train d'impulsions a été remplacé par une seule impulsion électrique de longue durée et de faible amplitude, qui a essentiellement un but électrophorétique. Cette impulsion, de l'ordre de 400 millisecondes, a permis d'optimiser les interactions entre les NPs/ et les membranes cellulaires. Les paramètres du deuxième train d'impulsions électriques, qui a pour but de perméabiliser les cellules, ont été conservés (impulsions microsecondes : 8 impulsions carrées d'une durée de 100 μ s et d'une amplitude de 600 V/cm répétées à la fréquence d'une impulsion par seconde).

Entre temps, différentes propriétés des nanoparticules d'or ont été caractérisées par DLS, sous l'influence des deux types d'impulsions électriques. Etant donné que le revêtement des NPs d'or (par le polyéthylène glycol (PEG)) nous a permis d'obtenir des NPs non-agrégées, l'effet d'amplification du deuxième train d'impulsions microsecondes a été testé en présence de ces NPs PEGylées et donc non-agrégées (PEG-GNPs) ou des NPs d'or plus au moins agrégées (GNPs). Les effets d'amplification de ces deux propriétés des NPs

conductrices sur les champs électriques ont été comparés par des tests d'efficacité de clonage.

Cette étude représente la première application d'une force électrophorétique sur les NPs conductrices, isolés (c'est-à-dire PEGylées) ou en agrégats (GNPs), afin de les déplacer à la surface des cellules, dans le but de l'amélioration de l'électroporation cellulaire. En effet, cet article nous a permis non seulement d'amplifier davantage l'effet du champ électrique en présence des NPs conductrices (de 20 à 30%) mais aussi de surmonter la nécessité d'une longue incubation à 4°C. La stratégie de sédimentation est ainsi réduite de 3 h à 1h grâce à l'effet électrophorétique, tout en améliorant l'interaction de la membrane cellulaire avec les NPs

PII: S1567-5394(20)30240-1
 DOI: <https://doi.org/10.1016/j.bioelechem.2020.107642>
 Reference: BIOJEC 107642

Received Date: 16 April 2020
Revised Date: 20 August 2020
Accepted Date: 20 August 2020

This is a PDF file of an article that has undergone enhancements after acceptance, such as the addition of a cover page and metadata, and formatting for readability, but it is not yet the definitive version of record. This version will undergo additional copyediting, typesetting and review before it is published in its final form, but we are providing this version to give early visibility of the article. Please note that, during the production process, errors may be discovered which could affect the content, and all legal disclaimers that apply to the journal pertain.

Bioelectrochemistry
Formerly Bioelectrochemistry and Bioenergetics

An International Journal Devoted to
Biochemical Aspects of Biology and
Biological Aspects of Biochemistry

Official Journal of the Bioelectrochemistry Society

Editor in Chief
P. Vashina

Electrochemical properties of chlorophenol red at disposable carbon electrodes: inspirations for Electrochemical cell detection

C. Giamberini, T. Bignani, P.J. Mahon,
J.S.S. Doorn, A.C. Tavares, M.S. Biondo,
M.E. Oliveira, G.L. D'Amico, J. Bressan,
L.P. Sabatini, P. J. Davis

Available online at www.sciencedirect.com
ScienceDirect

Electrophoresis-assisted accumulation of conductive nanoparticles for the enhancement of cell electroporability

Amina Ghorbel¹, Franck M. André¹, Lluís M. Mir^{1*}, Tomás García-Sánchez^{1,2}

¹Université Paris-Saclay, CNRS, Institut Gustave Roussy, Metabolic and systemic aspects of oncogenesis (METSYS), 94805, Villejuif, France

²Department of Information and Communication Technologies, Universitat Pompeu Fabra. Roc Boronat, 138, 08018 Barcelona, Spain

Lluís M. Mir <https://orcid.org/0000-0002-8671-9467> email: luis.mir@cnrs.fr

Tomás García-Sánchez <https://orcid.org/0000-0002-1115-0683> email: tomas.garcia@upf.edu

Abstract

The use of conductive nanoparticles (NPs) was previously proposed as a way to locally amplify the electric field (EF) intensity at the cell membrane to enhance cell electroporation. To achieve this, a close distance between the NPs and the cell membrane is mandatory. Here, a new method to improve the contact between NPs and cell surface using the effects of electric pulses (electrophoretic forces) is explored. The effects of two types of electric pulses are analyzed alone or combined in a two-pulse-train protocol on Chinese hamster DC-3F cells. Particularly we used 100 μ s duration pulses, low intensity-millisecond pulses and combinations of both. Finally, we studied the use of surface coated NPs (PEGylated) for this application. Our results demonstrate that the delivery of an electric field prior to the electroporation pulses increases the accumulation of NPs around the cell membrane suggesting that NPs are pushed towards the cell surface through electrophoretic forces. This allowed reducing the need for long incubations between cells and NPs to observe an enhancement of electroporation mediated by conductive NPs. Thus low intensity-millisecond pulses can be used to increase the accumulation of either aggregated or individual (i.e. PEGylated) NPs supporting the electrophoretic nature of the observed effects.

Keywords: gold nanoparticles, local electric field, pulsed electric fields, electroporation.

*Corresponding author:

Email: luis.mir@cnrs.fr

Telephone number: +33 1 42 11 47 92

Address: UMR 9018 CNRS, Gustave Roussy PR2, 114 rue E. Vaillant, 94805 Villejuif, Cédex.¹

Abbreviations: DC-3F: a Chinese hamster lung cell line; EF, electric field; NPs, nanoparticles; GNPs, gold nanoparticles; PDMS, Polydimethylsiloxane; PEG, poly(ethylene glycol) methyl ether thiol; PEG-GNPs, PEGylated surface coated GNPs; ECT, electrochemotherapy; PEFs, pulsed electric fields; μ sPEFs, microsecond pulsed electric fields; msPEFs, millisecond pulsed electric fields; MEM, minimum essential medium; DLS, dynamic light scattering; TEM, transmission electron microscopy.

1. Introduction

Over the past decades, nanoparticles (NPs) have emerged as promising tools, in several biomedical applications, such as drug nanocarriers[1–3] or as theranostics agents [4–8]. Based on their electrical properties, NPs can be classified into two categories: conductive NPs and non-conductive NPs. Non-conductive NPs which are mainly organic NPs (e.g. liposomes or polymers-based NPs) are known for their biocompatibility and biodegradability, constituting the most widely used NPs in drug delivery systems, especially to treat cancer[9]. Non-conductive NPs can also be inorganic NPs (e.g. silica NPs) which are used as gene transfection carriers and controlled release drug delivery systems for several biomedical applications[10]. Regarding conductive NPs, they can be inorganic or organic (e.g. PEDOT polymer-made[11]) NPs. Conductive NPs, in particular gold NPs (GNPs), were successfully explored in recent decades in the field of medicine, particularly for cancer treatment. Indeed, gold NPs have gained the attention of many researchers by their ability to be used as contrast agents in X-ray medical imaging [12] and as radioenhancement agents [13] to kill cancer cells. Moreover, GNPs were also used to treat cancer by photo-thermal therapy using NPs able to absorb near-infrared light to kill cancer cells by the heat generated from the NPs illumination[14]. Based on their high conductivity and their reduced toxicity [15] compared to others conductive materials, GNPs were used in our previous[16] work to investigate their potential for enhancing the efficiency of electroporation *in vitro*.

Electroporation or electropermeabilization, is defined as the permeabilization of the cell membrane induced by the exposure of the cells to short and intense electric field pulses [17]. Therefore, a considerable increase in the transport of ions and molecules (e.g. drugs) across the cell membrane is generated [18,19]. Based on electroporation, antitumor electrochemotherapy (ECT) represents the most successful clinical application of electroporation. This treatment consists in the application to the tumors of a small number (4 to 8) of intense electric field pulses (with an intensity between 1000 to 1300 V.cm⁻¹) combined with the administration of a non-/low-permeant anticancer drug (e.g. bleomycin [20] or cisplatin). Interestingly, not only drugs can be transferred into target cells but also macromolecules (e.g. nucleic acids). In the case of the transfer of charged macromolecules (e.g. DNA) using electric fields (EF), not only electroporation is involved but also electrophoresis [21]. The electrophoresis phenomenon can be easily combined with cell electroporation, using thus two types of electric pulses, in order to control the permeabilization of the cells at the first stage (one or several electroporative pulses) and then to control the transport of the charged molecules toward or across the permeabilized

membrane (one or several electrophoretic pulses). This technique was successfully applied *in vitro* [21] as well as *in vivo* [22,23].

The concept of combining electroporation with conductive NPs to amplify locally the electric field, has been tested in few recent studies. Conductive NPs other than GNPs were tested for irreversible ([24] or reversible [25] electroporation. GNPs were also used in combination with electric pulses to improve gene electrotransfer ([26,27] Our previous work *in vitro* [16] clearly showed an enhancement of the electroporation outcome likely due to local amplification of the external EF mediated by conductive NPs (not only GNPs but also Platinum NPs) present near the cell membrane, allowing thus for a reduction of the applied voltage. However, to obtain a significant enhancement of the EF effects compared to the case without conductive NPs, cells had to be incubated with the conductive NPs for a rather long time (3 h) at 4°C (in order to avoid the endocytosis). This enhancement was not statistically significant when the incubation lasted for only 1 h. The need for a long incubation is probably linked to the mechanism operating in the transport of the NPs to the close vicinity of the cell membrane, that is merely the physical sedimentation of the NPs at the surface of the attached cells. This sedimentation aspect also seemed to be a limiting approach to translate our *in-vitro* results to *in-vivo* studies. Therefore, the optimization of the interaction of the NPs with the cells seemed interesting to go further after the proof of concept previously reported [16].

The mechanisms involved in the amplification of the EF by conductive NPs are not yet clear, but our previous observations revealed the importance of the physical contact/distance and distribution of conductive NPs close to (in contact with) the cell membrane to achieve the local amplification of the applied electric field. Based on these previous observations and requests for efficacy, we elaborated the hypothesis that electrophoretic pulses could displace conductive NPs towards cell membrane, concentrating them near the membrane and even increasing the physical contact (reducing the distance) between the NPs and the cell membrane. These electrophoretic pulses should result in a further enhancement of the electroporation efficiency of classical microsecond electric pulses in the presence of conductive NPs. Thus, in this study we explored the possibility of using electrophoresis to effectively bring the GNPs at the cell surface, thus reducing the incubation time needed to observe a significant effect of NPs on cell electroporation enhancement. Moreover, to avoid NPs aggregation, a polymer-based surface coating of GNPs was used and the effects of coated GNPs alone or in combination with electrophoretic pulses were explored to enhance electroporation.

2. Materials and Methods

2.1 Cell culture

Chinese hamster lung cell line (DC-3F) was grown and maintained as a monolayer in MEM-Minimum Essential Medium (Life Technologies, Saint-Aubin, France) supplemented with 10% fetal bovine serum (Life Technologies) and 1% penicillin-streptomycin at 37°C and 5 % CO₂ and was routinely sub-cultured every two days. For the experiments, 600µl of cells at a density of 1.3×10^5 cells/ml were seeded in a 35 mm Petri dish in which a rectangular bottomless chamber made of PDMS (Polydimethylsiloxane) limited to 2 cm² the area offered to the cell culture[16]. Cells were then grown for 24 h, until they reached about 80 % confluence, and they were treated as described below.

2.2 Gold nanoparticles

Gold nanoparticles (GNPs) with an average size of 40 nm in citrated water (741981-100ml, Sigma-Aldrich, St. Quentin Fallavier, France) were used at a working concentration of 50 µg.ml⁻¹. The GNPs solution was concentrated (5X) by centrifugation at 11000 rpm for 10 min (Eppendorf centrifuge, model 5810R) to remove most of the citrate buffer and decrease the possible effects of this buffer on the cells during the exposure to the electric fields. GNPs were re-suspended in serum-free MEM and sonicated for 10 min at 25 °C (Ultrasonic Cleaner model VWR 300D at maximum power) before adding them to the cells. Conductivity measurements of the medium with and without the GNPs were performed using a FiveEasy FE30 conductivity meter (Mettler-Toledo, Schwerzenbach, Switzerland).

2.3 Pegylation of Gold nanoparticles

Poly(ethylene glycol) methyl ether thiol (PEG) of average molecular weight MW 6000 Daltons was purchased from Sigma-Aldrich (729159-1G). In order to produce PEG-capped GNPs, 60 µL of the PEG stock solution (4mg/ml) were added to citrate-capped GNPs (3 mL) to reach the final PEG concentration of 80 µg.ml⁻¹. The solution was then stirred for 1h at room temperature to allow the covalent grafting of PEG on the GNPs surface (exchange of the citrate molecules with PEG[28]). The resulting PEG-coated GNPs were then rinsed with 7 mL of distilled water and centrifuged at 11,000 rpm for 15 min. Subsequently, the supernatant was removed and the pellet (containing the PEG coated GNPs) was rinsed again with distilled water. This washing procedure was repeated twice to remove the excess of PEG molecules[28–30]. Finally, the obtained PEG-coated GNPs (PEG-GNPs) were re-suspended in

serum-free MEM and sonicated for 10 min at 25 °C (Ultrasonic Cleaner model VWR 300D at maximum power) before adding them to the cells at 50 $\mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$.

2.4 Characterization of NPs suspensions by Dynamic light scattering (DLS)

The average effective diameters and the zeta-potential of the colloidal NPs suspensions used in the experiments were measured by Dynamic Light Scattering (DLS) (Brookhaven, Nanobrook 90plus PALS). To retrieve information about the size of NPs in the culture medium, GNPs and PEG-GNPs were re-suspended in serum-free MEM culture medium, sonicated (as described in Gold nanoparticles section) and at least three measurements were independently taken for each sample. Here, it is noteworthy to mention that citrate buffer acts as a stabilizing agent by forming a layer of citrate ions over the surface of GNPs, inducing enough electrostatic repulsion between individual particles to keep them dispersed in the medium thus preventing their aggregation. However, the culture medium used is composed of a high concentration of ions (i.e. high ionic strength in the presence of bio macromolecules). Hence, a comparison between the DLS profiles of GNPs in their commercial buffer (citrate buffer) and GNPs and PEG-GNPs in serum-free culture medium was performed. Furthermore, to have an idea about the charge of the used NPs, zeta-potential measurements were also performed for GNPs and PEG-GNPs. For the measurement, samples already prepared in the serum free-medium (as described above) were diluted with distilled water. All measurements were carried out in triplicate.

2.5 Electropulsation setup

Two types of pulsed electric fields (PEFs) were delivered to the cells; they were classified as long duration PEFs (millisecond time scale; msPEFs, also termed here as LV) and short duration PEFs (microsecond time scale; μsPEFs , also termed here as HV). Specially adapted electrodes (two stainless steel parallel plates distant of 0.6 cm) were used to expose the entire monolayer to the electric pulses.

For the μsPEFs , the electrodes were connected to a Cliniporator™ (IGEA, Carpi, Italy), which delivered eight short electric pulses of 100 μs duration at a fixed voltage of 360 V (resulting in an electric field intensity of 600 $\text{V}.\text{cm}^{-1}$) and repetition rate of 1 Hz.

For the msPEFs, using the same experimental setup, electrodes were connected to an AFG 3251 TEKTRONIX generator which delivered one long electric pulse of 400 ms duration at a fixed voltage of 3 V (resulting in an electric field intensity of 5 $\text{V}.\text{cm}^{-1}$). This electric field intensity was chosen to ensure

the absence of electroporation by this pulse alone (this was verified using flow cytometry) (Data not shown).

2.6 Electroporation assessment via clonogenic assay

Electroporation of living cells was determined by means of a clonogenic assay using bleomycin. Adherent cells were washed with phosphate buffered saline and the NPs solution was added to the cell monolayer. In order to let the NPs go towards the cells surface, a first incubation of the attached cells with the NPs for 1 h at 4°C was performed under all conditions. Thereafter, after 5 min at room temperature, electrodes were placed and cells were submitted to the corresponding electric field. For the double pulse sequences, first one msPEF of 400 ms duration or eight μ sPEFs of 100 μ s duration were applied. If applicable, eight minutes later, 50 μ l of bleomycin were added to the 600 μ l of medium to reach a final concentration of 30 nM and two minutes later, cells were pulsed again using eight μ sPEFs of 100 μ s duration. Ten minutes after the second pulse train, electrodes were removed and cells were washed once with PBS, detached with TrypLE Express (Life Technologies), suspended in medium, counted and diluted in order to deposit 250 cells per well of a six-multiwell plate (three wells per experimental condition). Non-pulsed cells used as controls were handled similarly. After 5 days of culture, cells were washed twice, fixed with crystal violet solution (0.2% Crystal Violet, 10% formaldehyde and 20% ethanol in H₂O), and the stained colonies were counted. For each treatment condition, the viability rate of the treated cells was reported, in percentage, to the viability rate of the non-pulsed cells. In each experiment, each condition was independently repeated three times, and experiments were repeated three times in different days. Two-way ANOVA followed by Tukey multiple comparisons test were used to determine the significance of the differences.

2.7 Transmission Electron Microscopy (TEM) procedures

To study the exact location of the nanoparticles with respect to the cell membranes, we performed TEM microscopy. Immediately after each particular NPs-cell interaction condition, glutaraldehyde 2.5% was added over the cell monolayer, without any previous aspiration of the medium, in amounts allowing to reach a final concentration of about 2%-2.5%. The first step of the fixation procedure was therefore in the complete medium with 10% FCS, with minimal perturbation of the cells and NPs. Then medium was removed and 0.1 M Sorensen's phosphate buffer (pH 7.3) with 2% glutaraldehyde

was slowly and carefully added, and the attached cells fixed for 1 h at 4°C, post-fixed with 2% osmic acid at room temperature for 1 h, rinsed in water and dehydrated in a grade ethanol series in situ. Cell monolayers were embedded on the surface of inverted Epon812-filled capsules. Polymerization was complete after 48 h at 60 °C. Ultra-thin sections were collected on 200 mesh grids coated with Formvar and carbon, stained with standard uranyl acetate and lead citrate before observation with a Tecnai 12 electron microscope (FEI, Eindhoven, Netherlands). Digital images were taken with a SIS Megaview III CCD camera (Olympus, Tokyo, Japan).

2.8 Counting and localization of GNPs/ GNPs-aggregates with respect to the cell membrane

GNPs/GNPs-aggregates around cells were counted in the TEM images to better understand the mechanisms of the NPs effects. We categorized GNPs/GNPs-aggregates by their size and by their distance with respect to the cell membrane. This characterization was made considering the whole of the GNPs/ GNPs-aggregates present in each TEM image. At least 20 images were analyzed per condition. The number of GNPs/GNPs-aggregates were normalized with respect to the number of cells in the sections analyzed. Each TEM image depicted at least one cell. Thus, at least twenty cells randomly chosen were counted per experimental condition.

The size distribution of the GNPs-aggregates was classified in four groups: large aggregates of more than 20 GNPs, intermediate aggregates of 10 to 20 GNPs, small aggregates of 5 to 10 GNPs, and the “NPs” corresponding to the smallest aggregates, between 1 and 5 GNPs. The distance of GNPs to the cell membrane was categorized into three ranges of distance: “Close” corresponds to GNPs in contact with the cell membrane, “Intermediate distance” to GNPs that were at the surface but not in contact with the cell membrane and “Far” to GNPs which were far from the surfaces.

3. Results

3.1 Changes in gold nanoparticles distribution around cell membrane after electric field exposure

In our previous article [16], the accumulation of conductive GNPs (or Platinum-NPs) at the cell membrane of attached cells was performed by incubating the NPs with cells at 4°C (in order to prevent cell endocytosis and NPs engulfment, thus leaving the NPs at the cell surface) for different durations. We showed an improved accumulation of GNPs and the corresponding enhancement of electroporation

outcome with longer incubation time (1 h versus 3 h), likely produced by an increased sedimentation of NPs. In order to understand better the mechanisms involved in this enhancement of electroporation by GNPs accumulation, we explored by TEM the NPs distribution around the cells before and after the electric pulses delivery. Fig 1 corresponds to representative TEM images of GNPs incubated for 1h at 4°C before (Fig. 1a) and after (Fig. 1b) a single sequence of eight pulses of 100 μ s at 600 V.cm⁻¹.

As reported in our previous study Fig. 1a shows a poor accumulation of GNPs at the cell surface after the incubation for 1 h. Surprisingly, when TEM imaging was performed after the application of the pulses in the presence of GNPs (already incubated for 1 h at 4°C), a remarkable increase in the number of GNPs-aggregates was observed at the cell surface (Fig 1b). Moreover, in this case, GNPs seemed to be very close to the cell membrane suggesting that the pulse application approaches the GNPs to the cells and might enhance the interaction of the GNPs with the cells.

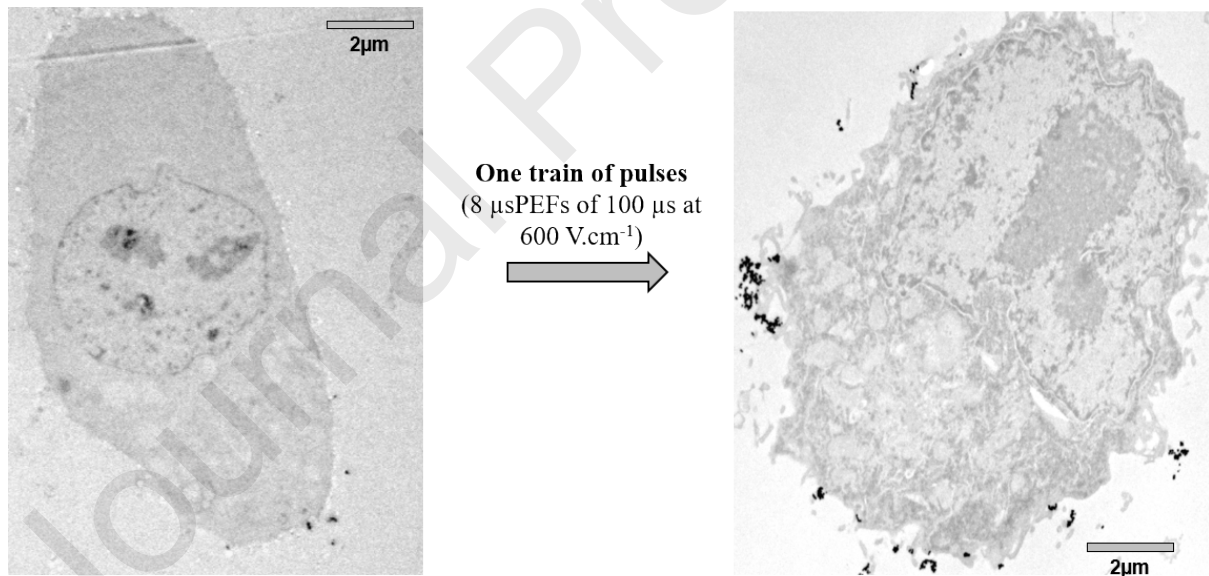


Fig. 1: a) Representative TEM image of an attached cell incubated with the GNPs during 1 h at 4°C. b) Representative TEM image of an attached cell incubated with GNPs during 1 h at 4°C and then pulsed using eight μ sPEFs of 100 μ s.

3.2 Effect of repeated application of microsecond pulses on GNPs-cells contact

Driven by the observation reported in the previous section, we decided to perform a series of experiments where the attached cells already in contact with GNPs for 1 h at 4°C were submitted to two trains of pulses: a first train of eight μ sPEFs of 100 μ s without bleomycin to improve cell membrane-GNP contact, and 10 minutes later, a second train of pulses of the same characteristics in the presence of bleomycin to test whether the cell electropermeabilization level was enhanced by the increase of the GNPs-cell monolayer contact. The cell electropermeabilization level was quantified using bleomycin as a permeabilization marker that was added to the cells eight minutes after the first train of pulses. This delay was selected since preliminary experiment (data not shown) showed that it was sufficient for cells to reseal from the first train of pulses. Results in the presence or not of GNPs were compared. It is worth mentioning that conductivity of the medium (13.1 ± 0.2 mS/cm in the absence of the GNPs) was not affected by the presence of the GNPs (13.2 ± 0.4 mS/cm with the GNPs at the concentrations used here).

Fig. 2 shows that in the absence of bleomycin, the exposure of the cell monolayer to two trains of eight μ sPEFs of 100 μ s resulted in about 15 % of cell death without significant differences between the conditions with or without GNPs. This effect could be explained by a certain level of irreversible electroporation or other electrochemical effects on the cells near the electrodes. Thus, we can conclude that neither the application of two trains of pulses nor a potentially strong accumulation of GNPs at the surface of the cell membrane (Fig.1b) lead to a significant increase in cell death. However, by adding bleomycin during the second pulse sequence, the combination of two trains of μ sPEFs with GNPs significantly increased the effect of the μ sPEFs by about 20 % compared to the case without GNPs.

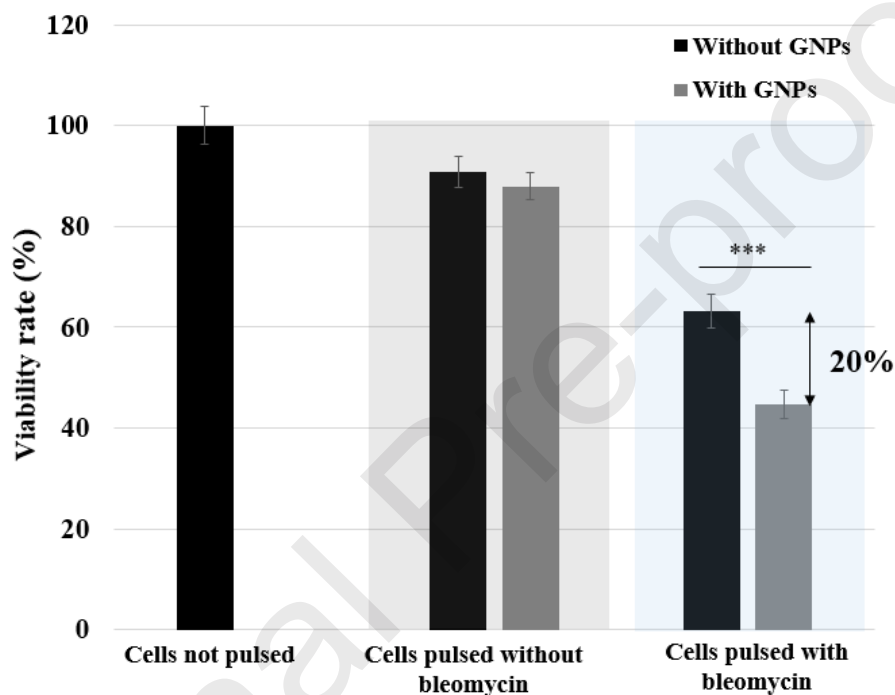


Figure 2: Clonogenic assay: Repeated pulse treatment of cells with two trains of eight μ sPEFs of 100 μ s applied in combination (or not) with bleomycin in the presence (or not) of GNPs previously incubated with the cells for 1 h at 4°C. The error bars correspond to $\pm$ the standard deviation. Experiments were performed in three independent days and each one included a triplicate for each condition.

In our previous study [16], pulsing the cells in the presence of bleomycin after the incubation of the cells with GNPs for only 1 h at 4°C resulted in a slight and non-significant increase of the electric field effects by around 10 %. Compared to this result here we show that the combination of the two pulses sequences significantly increases the effect to 20 %. This increase is similar to the effect achieved when GNPs were incubated with cells for 3 h at 4°C as also reported in [16]. Thus, the improved interaction of GNPs

and cell membrane produced by a first sequence of electric pulses enhances the effectiveness of the μ sPEFs and is an efficient way to minimize the need of a long incubation period of cells with NPs.

3.3 Use of non-permeabilizing, low amplitude and long duration PEFs

The application of two consecutive sequences of permeabilizing pulses could induce possible biases in the interpretation of the previous result mainly due to the previously reported sensitization and desensitization effects[32]-[33]. Thus, we explored if the observed improvement in cell electroporation could be reproduced using one low amplitude, long duration, non-permeabilizing electric pulse (one msPEF) to drive the GNPs close to the cell membrane. The second train of eight μ sPEFs of 100 μ s was maintained to cause the electropermeabilization of the cell membrane and analyze the GNPs effects. Therefore, attached DC-3F cells were similarly incubated for 1 h at 4°C and exposed to the two different trains of pulses, first the msPEF and then the μ sPEFs. Based on our large previous experience on the duration of electrophoretic pulses (mainly delivered *in vivo* after the electroporating pulses, with the aim to bring nucleic acids close to the electroporated membrane and to achieve a huge increase in the yield of the nucleic acids electrotransfer), we decided to use here PEFs of 400 ms that are long but, still, just electrophoretic (no electroporation at all by themselves) and not deleterious for the cells. As for the amplitude of the electric field, in our experimental setting, it was determined in a series of preliminary experiments using Yo-Pro-and flow cytometry. While one pulse of 10 V (16.6 V.cm⁻¹) and 5 V (8.3 V.cm⁻¹) were causing some cell permeabilization, one pulse of 400 ms and 4 V (6.6 V.cm⁻¹) or 3 V (5 V.cm⁻¹) did not electroporate the cells. We decided to apply 5 V.cm⁻¹ in order to have a security margin and be sure that no electroporation is caused by the 400 ms electrophoretic pulse. Thus, in the experiments reported in Fig 2, the first train of eight μ sPEFs of 100 μ s was replaced by a single msPEF of 400 ms and 5 V.cm⁻¹ in the absence of bleomycin. Then bleomycin was added and the second train of pulses was applied.

TEM imaging was performed to localize the GNPs after each treatment. Fig. 3a shows respectively cells incubated with GNPs for 1 h at 4°C either not pulsed (left panel) or pulsed only with one msPEF (400 ms at 5 V.cm⁻¹) (middle panel) or pulsed with both one msPEF followed by the μ sPEFs (after 10 min) (right panel). After the sole incubation of the GNPs with cells for 1h at 4°C, TEM images confirm again that a reduced number of GNPs-aggregates were around the cell membrane and poorly in contact with its surface. By applying one msPEF of 400 ms or the two-pulse sequence, there are noticeable

differences in the number and distance of the GNPs-aggregates around the cell surface compared to the incubation only condition. The table presented in Fig 3b displays the number of GNPs aggregates normalized with respect to the number of cells in the sections analyzed for the different conditions according to the classifications explained in Materials and Methods. There are noticeable changes caused by the msPEF or the combined msPEF plus μ sPEFs in the number and localization of the GNPs-aggregates of different sizes. First, for these two conditions, overall, the number of GNPs increased

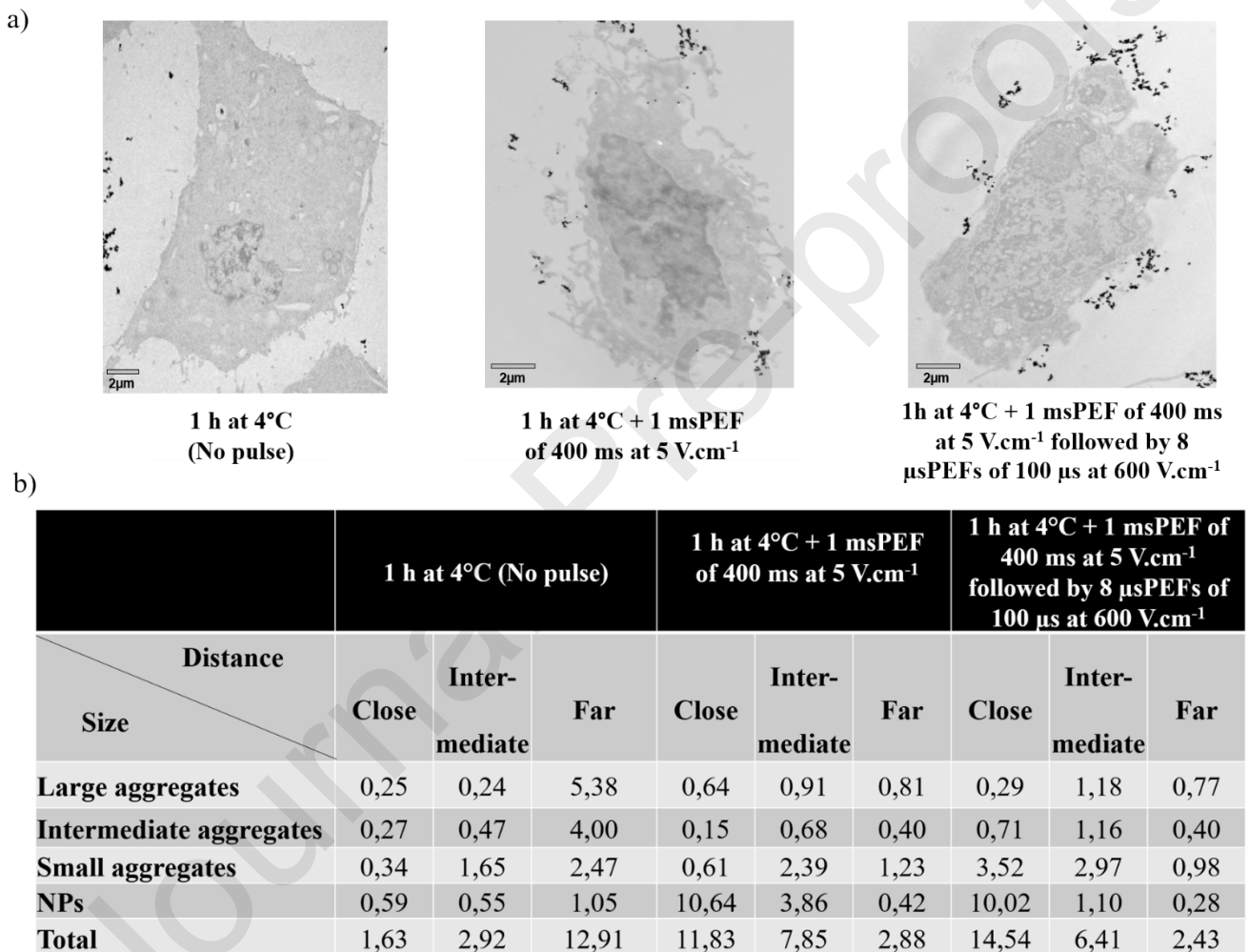


Fig. 3: a) TEM images after the incubation of 1 h at 4°C alone (left panel) or followed by one msPEF of 400 ms (middle panel) or by the combination of one msPEF of 400 ms and the train of eight μ sPEFs of 100 μ s (right panel). b) Number of nanoparticles per cell and per condition (size of the aggregates, distance to the cell membrane and experimental group). Large aggregates: of more than 20 GNPs; intermediate aggregates: of 10 to 20 GNPs; small aggregates: of 5 to 10 GNPs; and NPs: of one to 5 GNPs. Numbers in the table are normalized to the number of cells (in most of the images there was only one cell).

around the cells, whatever the size or distance. Second, we observed a decrease in the ratio of the number of large and intermediate aggregates to the number of small aggregates after the electric pulses delivery, specifically for the aggregates which are far from the surfaces. Third, not only the number of small aggregates or NPs increased, but also they were located closer to the membranes after the pulses delivery than in the absence of pulses delivery. The first and third observations correspond to our working hypothesis, the displacement of the GNPs towards the cell membrane due to pulse application. We were not expecting the reduction in the size of the GNPs (second observation) and we do not have a conclusive explanation. The forces exerted by the electric field on the large aggregates could help disassembling them, but we cannot exclude a fixation artefact. In any case, the important result is that the number of GNPs close to the membrane is largely increased after PEF application.

To ensure the absence of a permeabilization caused by one msPEF application, clonogenic assays of cells exposed only to msPEF were performed (Fig. 4a). In the presence or not of GNPs, we found the same level of cell survival as that of the control cells (100 % of viability). Fig. 4b presents the results of

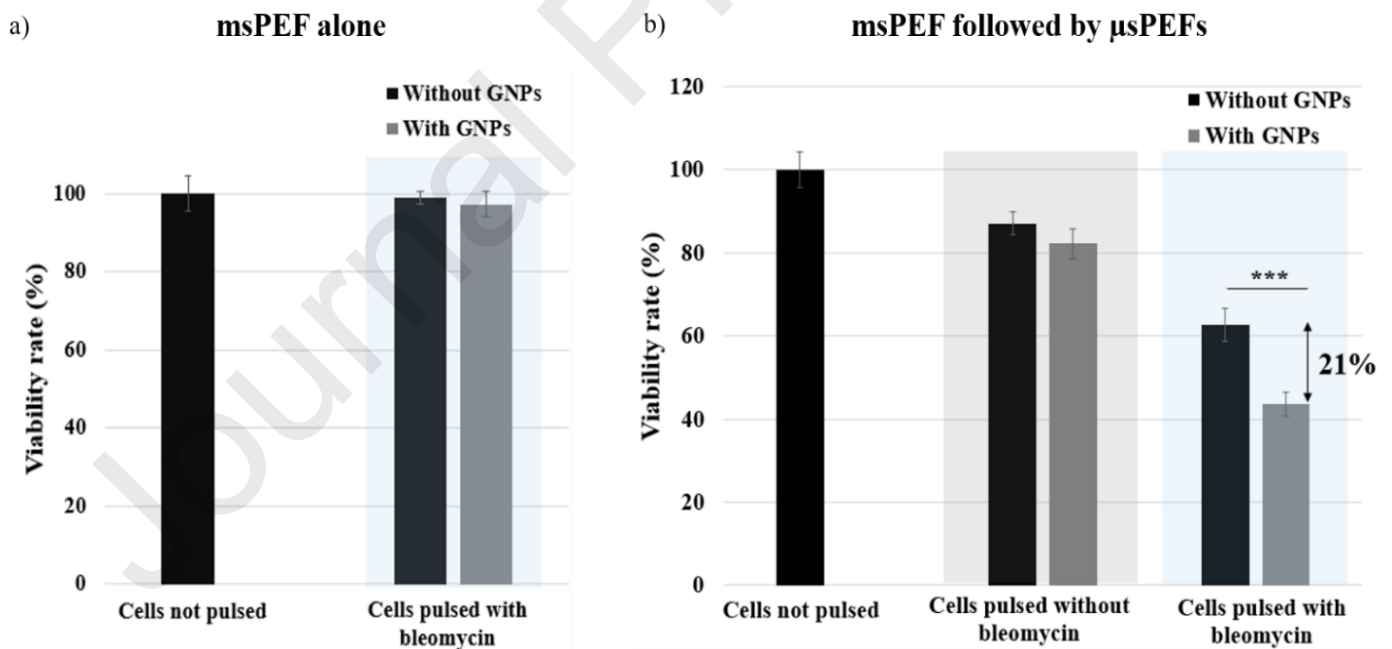


Fig. 4: a) Clonogenic assay of cells exposed to one msPEF of 400 ms at 5 V.cm⁻¹ applied in combination (or not) with bleomycin in the presence (or not) of GNPs after the incubation of the cells for 1 h at 4°C. b) Clonogenic assay of cells exposed to the combination of one long one msPEF and a train of eight μsPEFs of 100 μs applied in combination (or not) with bleomycin in the presence (or not) of GNPs after the incubation of the cells for 1 h at 4°C. Results are expressed as means ±SD. Experiments were performed in three independent days and each one included a triplicate for each condition.

the clonogenic assay of cells exposed to both one msPEF and the μ sPEFs, combined or not with GNPs. In the absence of bleomycin, the exposure of the cell monolayer to the two types of pulses (one msPEF and the train of μ sPEFs) resulted in around 20 % of cell death.

According to the results of Fig. 4a, we can confirm that this loss of viability was caused mainly by the μ sPEFs (the second train of pulses). When bleomycin was added, the percentage of dead cells in the presence of the GNPs was significantly increased by around 21 % compared to the case without GNPs. This result confirms that the application of a msPEF prior to the electroporation sequence with μ sPEFs increases the cell electroporability outcome. This supports the idea that the increased number of GNPs around the cells surface resulting from the msPEF is responsible of the observed enhancement in electroporation and this could result from the local amplification of the intensity of the applied electric field due to the GNPs in contact with the cell membrane.

3.4 Comparison of the physico-chemical characterization of GNPs and PEG-GNPs

According to the numerical simulations performed in our previous article, isolated GNPs (the “NPs”) would produce a higher EF amplification than highly aggregated GNPs. To validate experimentally this numerical result, as well as to reinforce the previous conclusions reported here above, we decided to modify the surface of GNPs to improve their stability and avoid aggregation in the working buffer (serum-free MEM culture medium). We coated GNPs with PEG (PEGylation) in order to assess the effects of the electric pulses on a population of individual nanoparticles, instead than on a population of aggregates of different sizes. After GNPs PEGylation as described in the Materials and Methods, we characterized the stability of the PEG-GNPs and non-PEGylated GNPs dispersed in serum-free MEM and compared them to GNPs dispersed in the commercial citrate buffer. Both the effective diameter and the charge were characterized (Table 1a and 1b). The GNPs in the commercial buffer displayed an effective diameter (defined as the hydrodynamic diameter) of about 50 nm but when the GNPs were dispersed in the serum-free MEM, an increase of the effective diameter of about 430 nm was observed due to the ionic content of the serum-free MEM. This increase in size confirms the presence of GNP-aggregates in the experimental medium. On the contrary, DLS measurements of PEG-GNPs, even in the serum-free MEM, displayed an average effective diameter of around 80 nm. This slight increase, from 50 nm to 80 nm, of the effective diameter between commercial (in citrate buffer) and PEGylated GNPs (in an ionic medium) could be explained by the increase of the hydrodynamic diameter caused by the PEG molecules inserted at the surface of the individual nanoparticles. Thus, we can conclude

that there was very few aggregation of the PEG-GNPs in the serum-free MEM, which was not the case with the non-PEGylated GNPs. Since the polydispersity index (PDI, defined as the width of the NPs distribution in a liquid solution) in the case of PEG-GNPs and GNPs-aggregates was larger than 0.1, we can confirm that these two samples could be considered as poly-disperse under our experimental conditions, with a dominant population of 80 nm and 430 nm for the PEG-GNPs and GNPs-aggregates, respectively. The zeta-potential of the PEG-GNPs (-22.3 mV) was very similar to the zeta-potential of the GNPs-aggregates (-20 mV). Therefore, we could anticipate that the possible electrophoretic displacement due to pulse application could still be possible in the PEG-GNPs.

a)

	Effective diameter (nm)	Polydispersity index (PDI)
Commercial GNPs	$50 \pm 1,5$	0,06
PEG-GNPs	80 ± 2	0,2
GNPs-aggregates	$430 \pm 2,3$	0,18

b)

	GNPs-aggregates (mV)	PEG-GNPs (mV)
1 st measurement	-27,5	-34,5
2 nd measurement	-18	-13,5
3 rd measurement	-14,5	-19
Average of measurements	$-20 \pm 6,1$	$-22,3 \pm 9,5$

Table 1: a) Determination of nanoparticles size by DLS measured by the intensity method; Size distribution of PEG-GNPs and GNPs-aggregates dispersed in serum-free MEM. b) Zeta potential of GNPs and PEG-GNPs. For the DLS measurement, each sample was measured 2 times and each measurement was independently repeated 3 times. For the zeta potential measurement as well, each sample was measured 2 times and each measurement was independently repeated 3 times at 3 different days.

3.5 Pegylated GNPs and electroporation

Subsequently, we tested the PEG-GNPs in our electroporation experiments in order to further validate if observed enhancement of the electric pulses effects by GNPs was also possible with PEG-GNPs. We

first tested the effect of PEG-GNPs incubated with the cells for 3 h at 4°C, an efficient condition using GNPs-aggregates as previously reported [16]. Results in Fig. 5 show that in the absence of bleomycin, the exposure of the cell monolayers to the eight μ sPEFs of 100 μ s resulted in about 15 % of cell death due to the pulse application. When bleomycin was added, a slight and non-significant increase in the electroporation efficiency was observed in the condition using PEG-GNPs compared to the condition without PEG-GNPs. This absence of effects of the PEG-GNPs can be explained by the fact that the accumulation of individual PEG-GNPs near the cells by sedimentation only (even during 3 h at 4°C) is not efficient enough. There are at least two reasons: not only the individual nanoparticles sediment more slowly than the aggregates but also differences in the interaction NP-cell surface due to PEG coating could explain this slight effect of PEG-GNPs.

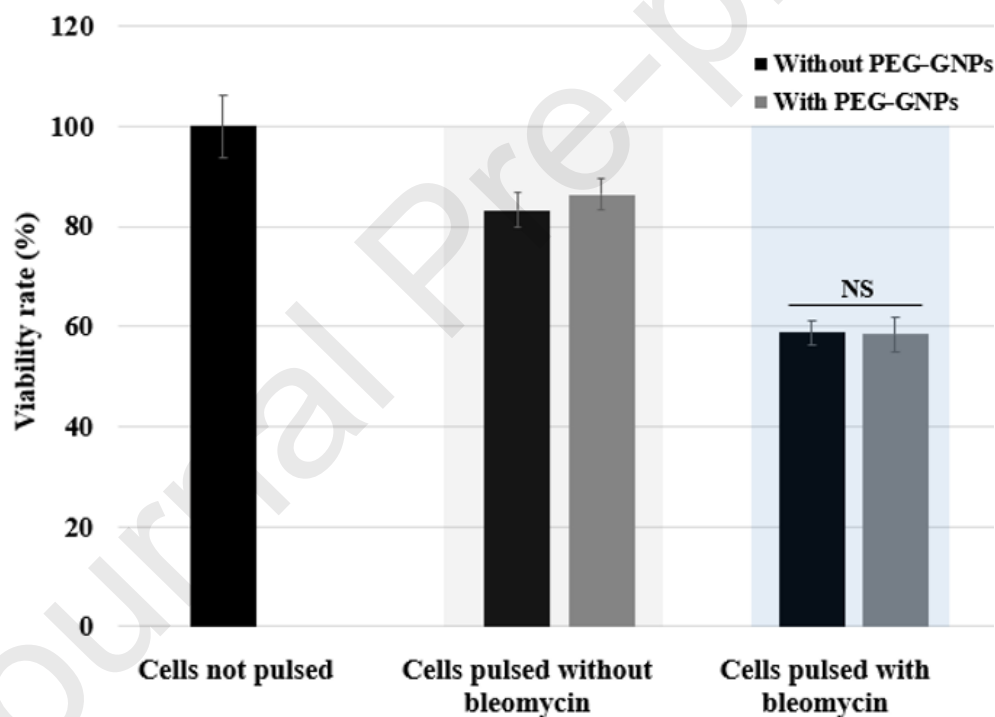


Fig. 5: Clonogenic assay: a train of eight μ sPEFs of 100 μ s applied in combination (or not) with bleomycin in the presence of PEG-GNPs after an incubation of 3 h at 4 °C. Results are expressed as means $\pm$ SD. Experiments were performed in three independent days and each one included a triplicate for each condition.

As only the incubation of the PEG-GNPs did not show any remarkable effect on the enhancement of electroporation, we tested the possibility of using electric pulses to drive PEG-GNPs towards the cell surface. In particular, similar to the uncoated GNPs, after a short incubation of only 1 h at 4°C with the

PEG-GNPs, cells were exposed to the combination of one msPEF of 400 ms and a train of eight μ sPEFs of 100 μ s. In the absence of bleomycin, we observed around 15 % of cell death due to the pulse application as in the previous experiments (Fig. 6c). In the presence of bleomycin, the addition of the PEG-GNPs significantly decreased the viability rate caused by electroporation by around 22 %. As reported above, this increase in the efficacy of the μ sPEFs was not observed with just a long incubation of 3 h at 4°C.

Representative TEM images of cells exposed to one msPEF (Fig. 6a) or to the combination of one msPEF and a train of eight μ sPEFs (Fig. 6b) after the incubation of 1 h at 4°C with the PEG-GNPs confirmed the accumulation of individual nanoparticles around the cell membrane. It is worth mentioning that TEM images of cells incubated for 3 h at 4°C with the PEG-GNPs but not exposed to pulses did not show any GNP nearby the cell membrane, which is in agreement with the observed results (data not shown). This indicates again that electric pulses have an active role in improving the accumulation of PEG-GNPs at the cell surface. Compared to observations made with non-PEGylated GNPs there is a considerably lower number of PEG-GNPs around the cells. This could be explained by a weaker interaction of PEG-GNPs with the cell surface and also the possible loss of NPs at the time of the cells fixation. However, those that are observed in the TEM images are very close to the membrane, what could be enough to produce a localized amplification of the electric field and thus an increased electroporation effect.

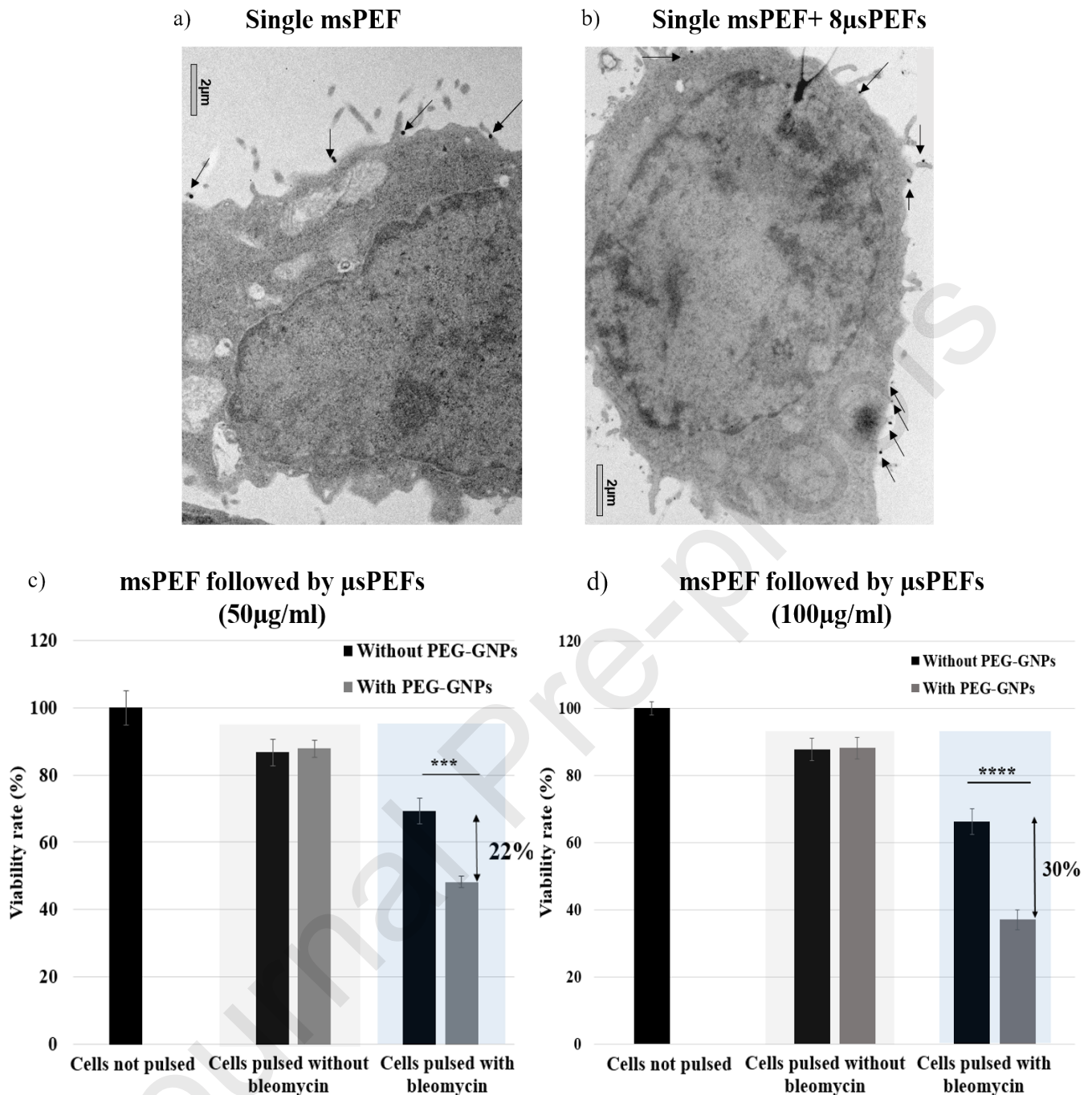


Fig. 6: a) TEM representative image of cells incubated with PEG-GNPs during 1 hour at 4°C and then exposed to one msPEF; b) TEM representative image of cells incubated with PEG-GNPs during 1 h at 4°C and then exposed to one msPEF of 400 ms and a train of eight µsPEFs of 100 µs; c) Clonogenic assay of cells exposed to a combination of one msPEF and a train of eight µsPEFs of 100 µs applied in combination (or not) with bleomycin in the presence (or not) of PEG-GNPs (50 mg.ml⁻¹) previously incubated with the cells for 1 h at 4°C; d) Clonogenic assay of cells exposed to a combination of one msPEF of 400 ms and a train of eight µsPEFs of 100 µs applied in combination (or not) with bleomycin in the presence (or not) of PEG-GNPs at 100 µg.ml⁻¹ incubated with the cells for 1 h at 4°C. Results are expressed as means ±SD. Experiments were performed in three independent days and each one included a triplicate for each condition.

Finally, to further increase the number of PEG-GNPs at the cell surface, we tested the increase of the PEG-GNPs concentration, from 50 $\mu\text{g.ml}^{-1}$ to 100 $\mu\text{g.ml}^{-1}$, alone or combined to the electric pulses (msPEF followed by μsPEFs) (Fig. 6d). In the absence of bleomycin we observed again the same percentage of cell death (around 15 %) due to the electric pulses, independently of the presence or not of the PEG-GNPs. Therefore, the increase of the PEG-GNPs concentration did not result in any toxic effect. In the presence of bleomycin, the addition of PEG-GNPs at a concentration of 100 $\mu\text{g.ml}^{-1}$ significantly increased the permeabilization effect by around 30 %. Additionally, compared to the case of PEG-GNPs at 50 $\mu\text{g.ml}^{-1}$, the msPEF increased the efficacy of the μsPEFs from 22 % to 30 % reinforcing the idea that the increase in the efficacy of the μsPEFs is linked to the local accumulation of PEG-GNPs near the membrane of the cells.

4. Discussion

Encouraged by our previously published results and the observation presented in the first part of the results section from the electron microscopy images, the present work aimed at the further enhancement of cell electroporation caused by the addition of conductive nanoparticles. The relevant observation at the origin of the present study was performed on TEM images of cells incubated with GNPs and exposed to a train of eight classical electropermeabilizing μsPEFs of a duration of 100 μs : the number of GNPs near the membrane seemed higher than in the absence of the electric pulses.

In the present study we tried not only to optimize the potentiation of the μsPEF by the addition of GNPs, but also to overcome the necessity of a long incubation approach. Indeed, in our previous work, a long incubation (for 3 h) produced a statistically significant increase of the μsPEF efficacy, while the short incubations (for 1 h) produced only a non-significant tendency. We supposed that the physical contact between the cells and the nanoparticles (or their presence in the immediate neighbourhood of the cells) was essential to generate an increase of the cell electroporation. According to this hypothesis, non-localized effects of the GNPs, such as a change in the medium conductivity, should not be instrumental in the achievement of the effects of the conductive NPs here reported. Actually, we observed different permeabilization levels with and without the GNPs even though the addition of the GNPs (at least at the concentrations used in our experiments) did not change the medium conductivity. The hypothesis here above was validated *in silico* by the numerical calculations reported in our previous article, which showed that the conductive nanoparticles locally modify the electric field applied and lead to an amplification of

the local electric field at the cell membrane. This *in silico* work teaches us two things. First, the closer are the particles to the membrane, the higher the electric field effects on the membrane. Second, isolated particles should be more efficient than large aggregates. Then, when isolated particles are located very close to the cell membrane, this local amplification of the electric field is sufficient to enhance the transmembrane voltage, locally, and to favour the membrane electroporation at the places located near the nanoparticles.

To ameliorate the placement of the conductive nanoparticles near the surface of the membrane, we sought at a method less time-consuming than the sedimentation, and that could be used not only *in vitro* but *in vivo* as well. Based on the observation recalled here above, we thus explored whether the long sedimentation could be replaced by an electric pulse driven accumulation of conductive GNPs (and the aggregates of GNPs) at the surface of the cell. The most plausible mechanism for this is electrophoresis. Indeed, the electrophoresis of charged GNPs was already proved in previous reports [33,34] where authors showed that the displacement of GNPs under electrophoretic forces is especially related to the size, shape and the electrolyte solution (notably the ionic strength of the medium). The displacement of charged GNPs under electrophoretic forces was used in previous studies for several purposes as, for example, for the thorough understanding of particle surface charge or for biomedical applications[33,34].

In the present study, we found conditions (one long msPEF of 400 ms duration at an amplitude of 5 V.cm⁻¹) that did not electroporate the cells by themselves, while being able to bring the GNPs close to the cell surface (as shown by TEM). These conditions were found as efficient as the long incubations of 3 h at 4°C used in our previous article and showed similar results in the improvement of the cell permeabilization efficiency. This result confirms that the efficacy of the train of μ sPEFs to permeabilize the membrane was actually improved if the NPs are in contact with (or very close to) the cell membrane, which is obtained by the first msPEF application.

The TEM images not only confirmed that the GNPs were located closer to the membranes after the electric pulses application, but moreover allowed to make another surprising observation. The ratio of isolated nanoparticles or very small aggregates (less than 5 nanoparticles) close to the membrane increased with respect to the other sizes of aggregates after the delivery of the electric pulse(s). Maybe this is merely the consequence of a lower loss of the aggregates than the loss of the isolated nanoparticles at the time of the cells fixation, particularly for the isolated particles located far from the

membrane that would be massively lost. However, we cannot exclude another hypothetical explanation that could be linked to a more complex interaction of the electric fields and the aggregates, if the electric fields could cause the destabilisation of the large aggregates and thus their transformation in a larger number of isolated nanoparticles or small aggregates. We did not test these hypotheses, but we wondered whether we could increase the efficacy of the nanoparticles under conditions where most of the nanoparticles could remain isolated.

To this end, we decided to PEGylate the GNPs because it was known that the PEGylation of the conductive nanoparticles results in the generation of repulsive forces at the surface of the nanoparticles that prevent their aggregation. Using DLS measurements, we verified that after PEGylation, mostly (but not only) individual nanoparticles were present in an ionic medium such as the serum-free MEM.

In the absence of electric pulses, the addition of the PEG-GNPs did not result in a significant increase of the permeabilizing efficacy of the μ sPEFs. We supposed that this was linked to the fact that aggregates sediment faster and better than the isolated nanoparticles.

Since the zeta potential of the PEG-GNPs was comparable to the zeta potential of the GNPs aggregates, we anticipated that we could use the electrophoretic msPEF to bring the PEG-GNPs close to the cells. Moreover, several studies had shown that the smaller the size of the nanoparticles is, the faster the rate of migration is [35]. However, according to Patra et al [32], polymer coated GNPs (i.e PEG) should decrease the total electrophoretic force (due to an increase of the electrophoretic retardation force). Although the PEG chains could decrease the zeta-potential of naked GNPs, our data show that the PEG-GNPs are still negatively charged and therefore could be considered as capable of being moved by the electrophoretic pulse. This hypothesis was supported by the increased effectivity of PEG-GNPs after the use of the electrophoretic msPEF providing results comparable to the increase caused by a 3 hincubation of the GNPs aggregates.

Therefore, all our results confirm that the local enhancement of the electric field by conductive nanoparticles is mainly associated to the number of conductive NPs and specifically to their close distance with respect to the surfaces of the cell membrane. This amplification of the effect of the electric field was observed not only in the presence of aggregates of conductive NPs but also in the presence of PEG-GNPs (which are present in the medium mainly as isolated single NPs). The electrophoretic pulse(s) must be performed before the electroporative pulses. This is an important point to highlight,

based on our mechanistic study. Indeed, combination of electroporative pulses (termed HV) and electrophoretic pulses (termed LV) have been already applied, mainly *in vivo*, for a large and reproducible electrotransfer of nucleic acids in tissues such as muscle or skin [22,23]. In all these studies, the HV pulses, that affect the cell membrane, have to be delivered before the LV pulses, that displace the charged molecules across the extracellular matrix and also across the plasma membrane[18]. This combination facilitates the penetration of charged molecules into the cytosol, even for very large molecules such as long coding nucleic acids. Here, the goal is not the introduction of the nanoparticles inside the cells. Indeed, the pulses seek first to displace the conductive nanoparticles towards the surface of cells using a non-permeabilizing pulse (LV) and secondly to facilitate cell electroporation using an already electroporative pulse (HV) whose effects will be locally enhanced due to the presence of conductive NPs at the surface of the cells.

Finally, to reinforce the mechanism of the local reinforcement of the electric pulses due to the presence of the conductive nanoparticles at the cell surface before the delivery of the electroporative pulses, we showed the influence of the concentration of the nanoparticles. When the concentration was doubled and the nanoparticles electrophoretically approached to the cell membrane by one msPEF, the increase of the efficacy of the train of eight electroporative μ sPEFs reached 30%.

5. Conclusion

To the best of our knowledge, this study represents the first application of electrophoretic forces on conductive NPs, either isolated (i.e PEG-GNPs) or in aggregates, in order to displace them towards the cell surface for cell electroporation improvement. This approach permitted the decrease of the incubation time of the NPs with cells while keeping a good interaction of GNPs-cell membrane. Indeed, we achieved the same improvement of the electroporation efficiency than the 3 h-long incubation reported in our previous work [16]. The increased presence of the nanoparticles near the cell membrane after electric field exposure was corroborated by TEM. Surface modification of GNPs by PEGylation enabled to produce stable solutions of mostly isolated NPs in culture medium. The results confirmed that isolated PEG-GNPs can be electrophoretically driven towards the cell membrane and improve the efficiency of electroporation pulses. The increase of the nanoparticles concentration further increased the improvement of the electroporation efficiency. The data here reported, which evidence the importance of the accumulation of the nanoparticles close to, or in contact with, the cell membrane to achieve an

enhancement of the local EF, confirm the role of conductive NPs as local nanoamplifiers of an externally applied EF as modelled in our previous publication [16].

These data could enable us to translate our *in vitro* studies to *in vivo*, where the electrophoretic pulses would act to improve the interaction of the NPs with the target cells (long incubations would not be possible *in vivo*). The double pulse approach combined to the local NPs injection should allow a reduction of the external EF intensity required to achieve *in vivo* effective cell electroporation.

Acknowledgements

We acknowledge Sylvie Souquere from “Plateforme de microscopie electronique cellulaire”, UMS 3655 AMMICA, who acquired the TEM images, Dr. Jean-Remi Bertrand and Dr. Giorgia Urbinati who provided insight and expertise in the DLS measurements.

Funding

This work was partially funded by La Ligue contre le Cancer postdoctoral fellowship program to TGS and a grant of Tunisian government to AG. The authors thank the funding support of the CNRS, Gustave Roussy, Univ. Paris-Sud and Université Paris-Saclay, as well as the ITMO Cancer in the frame of the Plan Cancer 2015-2019 (project PC201517).

References

- [1] S. Gelperina, K. Kisich, M.D. Iseman, L. Heifets, The potential advantages of nanoparticle drug delivery systems in chemotherapy of tuberculosis, *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 172 (2005) 1487–1490. <https://doi.org/10.1164/rccm.200504-613PP>.
- [2] V. V. Mody, A. Cox, S. Shah, A. Singh, W. Bevens, H. Parihar, Magnetic nanoparticle drug delivery systems for targeting tumor, *Appl. Nanosci.* 4 (2014) 385–392. <https://doi.org/10.1007/s13204-013-0216-y>.
- [3] R. Singh, J.W. Lillard, Nanoparticle-based targeted drug delivery, *Exp. Mol. Pathol.* 86 (2009) 215–223. <https://doi.org/10.1016/j.yexmp.2008.12.004>.
- [4] N.R. Popova, A.L. Popov, A.B. Shcherbakov, V.K. Ivanov, Layer-by-layer capsules as smart delivery systems of CeO₂ nanoparticle-based theranostic agents, *Nanosyst. Physics, Chem. Math.* 8 (2017) 282–289. <https://doi.org/10.17586/2220-8054-2017-8-2-282-289>.
- [5] J. Xie, S. Lee, X. Chen, Nanoparticle-based theranostic agents, *Adv. Drug Deliv. Rev.* 62 (2010) 1064–1079. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2010.07.009>.
- [6] S. Jafari, H. Derakhshankhah, L. Alaei, A. Fattahi, B.S. Varnamkhasti, A.A. Saboury, Mesoporous silica nanoparticles for therapeutic/diagnostic applications, *Biomed. Pharmacother.* 109 (2019) 1100–1111. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2018.10.167>.
- [7] S.K. Nune, P. Gunda, P.K. Thallapally, Y.Y. Lin, M. Laird Forrest, C.J. Berkland, Nanoparticles for biomedical imaging, *Expert Opin. Drug Deliv.* 6 (2009) 1175–1194. <https://doi.org/10.1517/17425240903229031>.
- [8] X. Du, X. Li, L. Xiong, X. Zhang, F. Kleitz, S.Z. Qiao, Mesoporous silica nanoparticles with organo-bridged silsesquioxane framework as innovative platforms for bioimaging and therapeutic agent delivery, *Biomaterials.* 91 (2016) 90–127.

- <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2016.03.019>.
- [9] Y. Malam, M. Loizidou, A.M. Seifalian, Liposomes and nanoparticles: nanosized vehicles for drug delivery in cancer, *Trends Pharmacol. Sci.* 30 (2009) 592–599. <https://doi.org/10.1016/j.tips.2009.08.004>.
- [10] I.I. Slowing, J.L. Vivero-Escoto, C.W. Wu, V.S.Y. Lin, Mesoporous silica nanoparticles as controlled release drug delivery and gene transfection carriers, *Adv. Drug Deliv. Rev.* 60 (2008) 1278–1288. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2008.03.012>.
- [11] M. ElMahmoudy, V.F. Curto, M. Ferro, A. Hama, G.G. Malliaras, R.P. O'Connor, S. Sanaur, Electrically controlled cellular migration on a periodically micropatterned PEDOT:PSS conducting polymer platform, *J. Appl. Polym. Sci.* 136 (2019) 47029. <https://doi.org/10.1002/app.47029>.
- [12] M.M. Mahan, A.L. Doiron, Gold Nanoparticles as X-Ray, CT, and Multimodal Imaging Contrast Agents: Formulation, Targeting, and Methodology, *J. Nanomater.* 2018 (2018). <https://doi.org/10.1155/2018/5837276>.
- [13] J.F. Hainfeld, D.N. Slatkin, H.M. Smilowitz, The use of gold nanoparticles to enhance radiotherapy in mice, *Phys. Med. Biol.* 49 (2004) N309–15. <https://doi.org/10.1088/0031-9155/49/18/N03>.
- [14] A.M. Gobin, E.M. Watkins, E. Quevedo, V.L. Colvin, J.L. West, Near-infrared-resonant gold/gold sulfide nanoparticles as a photothermal cancer therapeutic agent, *Small.* 6 (2010) 745–752. <https://doi.org/10.1002/smll.200901557>.
- [15] E.E. Connor, J. Mwamuka, A. Gole, C.J. Murphy, M.D. Wyatt, Gold nanoparticles are taken up by human cells but do not cause acute cytotoxicity, *Small.* 1 (2005) 325–327. <https://doi.org/10.1002/smll.200400093>.
- [16] A. Ghorbel, L.M. Mir, T. García-Sánchez, Conductive nanoparticles improve cell electroporation., *Nanotechnology.* 30 (2019) 495101. <https://doi.org/10.1088/1361-6528/ab3be9>.
- [17] E. Neumann, M. Schaefer-Ridder, Y. Wang, P.H. Hofschneider, Gene transfer into mouse lymphoma cells by electroporation in high electric fields., *EMBO J.* 1 (1982) 841–845. <https://doi.org/10.1002/j.1460-2075.1982.tb01257.x>.
- [18] A. Azan, F. Gaillière, L.M. Mir, M. Breton, Cell membrane electroporation: Chemical analysis of cell membrane modifications and associated transport mechanisms, in: *Adv. Anat. Embryol. Cell Biol.*, Springer Verlag, 2017: pp. 59–71. https://doi.org/10.1007/978-3-319-56895-9_4.
- [19] L.M. Mir, H. Banoun, C. Paoletti, Introduction of definite amounts of nonpermeant molecules into living cells after electroporation: Direct access to the cytosol, *Exp. Cell Res.* 175 (1988) 15–25. [https://doi.org/10.1016/0014-4827\(88\)90251-0](https://doi.org/10.1016/0014-4827(88)90251-0).
- [20] A. Gothelf, L.M. Mir, J. Gehl, Electrochemotherapy: Results of cancer treatment using enhanced delivery of bleomycin by electroporation, *Cancer Treat. Rev.* 29 (2003) 371–387. [https://doi.org/10.1016/S0305-7372\(03\)00073-2](https://doi.org/10.1016/S0305-7372(03)00073-2).
- [21] M. Kandušer, D. Miklavčič, M. Pavlin, Mechanisms involved in gene electrotransfer using high- and low-voltage pulses - An in vitro study, *Bioelectrochemistry.* 74 (2009) 265–271. <https://doi.org/10.1016/j.bioelechem.2008.09.002>.
- [22] F. André, J. Gehl, G. Sersa, V. Prétat, P. Hojman, J. Eriksen, M. Golzio, M. Cemazar, N. Pavselj, M.-P. Rols, F.M. André, J. Gehl, G. Sersa, V. Prétat, P. Hojman, J. Eriksen, M. Golzio, M. Cemazar, N. Pavselj, M.-P. Rols, D. Miklavčič, E. Neumann, J. Teissié, L.M. Mir, Efficiency of high- and low-voltage pulse combinations for gene electrotransfer in muscle, liver, tumor, and skin. Efficiency of High- and Low-Voltage Pulse Combinations for Gene Electrotransfer in Muscle, Liver, Tumor, and Skin, *Hum. Gene Ther.* 19 (2008) 1261–1271. <https://doi.org/10.1089/hgt.2008.060i>.
- [23] S. Šatkauskas, F. André, M.F. Bureau, D. Scherman, D. Miklavčič, L.M. Mir, Electrophoretic component of electric pulses determines the efficacy of in vivo DNA electrotransfer, *Hum. Gene Ther.* 16 (2005) 1194–1201. <https://doi.org/10.1089/hum.2005.16.1194>.
- [24] V. Raffa, C. Riggio, M.W. Smith, K.C. Jordan, W. Cao, A. Cuschieri, BNNT-Mediated Irreversible Electroporation: Its Potential on Cancer Cells, *Technol. Cancer Res. Treat.* 11 (2012) 459–465. <https://doi.org/10.7785/tcrt.2012.500258>.
- [25] V. Raffa, G. Ciofani, A. Cuschieri, Enhanced low voltage cell electroporation by boron nitride nanotubes, *Nanotechnology.* 20 (2009) 075104. <https://doi.org/10.1088/0957-4484/20/7/075104>.
- [26] S. Huang, H. Deshmukh, K.K. Rajagopalan, S. Wang, Gold nanoparticles electroporation enhanced polyplex delivery to mammalian cells, *Electrophoresis.* 35 (2014) 1837–1845. <https://doi.org/10.1002/elps.201300617>.

- [27] Y. Zu, S. Huang, W.C. Liao, Y. Lu, S. Wang, Gold nanoparticles enhanced electroporation for mammalian cell transfection, *J. Biomed. Nanotechnol.* 10 (2014) 982–992. <https://doi.org/10.1166/jbn.2014.1797>.
- [28] K. Rahme, L. Chen, R.G. Hobbs, M.A. Morris, C. O'Driscoll, J.D. Holmes, PEGylated gold nanoparticles: Polymer quantification as a function of PEG lengths and nanoparticle dimensions, *RSC Adv.* 3 (2013) 6085–6094. <https://doi.org/10.1039/c3ra22739a>.
- [29] T.A. Larson, P.P. Joshi, K. Sokolov, Preventing protein adsorption and macrophage uptake of gold nanoparticles via a hydrophobic shield, *ACS Nano.* 6 (2012) 9182–9190. <https://doi.org/10.1021/nn3035155>.
- [30] Y. Liu, M.K. Shipton, J. Ryan, E.D. Kaufman, S. Franzen, D.L. Feldheim, Synthesis, stability, and cellular internalization of gold nanoparticles containing mixed peptide-poly(ethylene glycol) monolayers, *Anal. Chem.* 79 (2007) 2221–2229. <https://doi.org/10.1021/ac061578f>.
- [31] O.N. Pakhomova, B.W. Gregory, V.A. Khorokhorina, A.M. Bowman, S. Xiao, A.G. Pakhomov, Electroporation-induced electrosensitization, *PLoS One.* 6 (2011) e0159434. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0017100>.
- [32] A. Silve, A. Guimerà Brunet, B. Al-Sakere, A. Ivorra, L.M. Mir, Comparison of the effects of the repetition rate between microsecond and nanosecond pulses: Electroporation-induced electro-desensitization?, *Biochim. Biophys. Acta - Gen. Subj.* 1840 (2014) 2139–2151. <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2014.02.011>.
- [33] H.K. Patra, D. GuhaSarkar, A.K. Dasgupta, Multimodal electrophoresis of gold nanoparticles: A real time approach, *Anal. Chim. Acta.* 649 (2009) 128–134. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2009.07.012>.
- [34] C. Pfeiffer, C. Rehbock, D. Hühn, C. Carrillo-Carrion, D.J. De Aberasturi, V. Merk, S. Barcikowski, W.J. Parak, Interaction of colloidal nanoparticles with their local environment: The (ionic) nanoenvironment around nanoparticles is different from bulk and determines the physico-chemical properties of the nanoparticles, *J. R. Soc. Interface.* 11 (2014) 20130931. <https://doi.org/10.1098/rsif.2013.0931>.
- [35] S. Movahed, D. Li, Electrokinetic transport of nanoparticles to opening of nanopores on cell membrane during electroporation, *J. Nanoparticle Res.* 15 (2013) 1511. <https://doi.org/10.1007/s11051-013-1511-y>.

Partie 3 : Les mécanismes impliqués dans l'amplification du champ électrique en présence des nanoparticules conductrices

Résumé :

Les mécanismes impliqués dans l'amplification du champ électrique local par les NPs conductrices restent incompris. Dans cette partie, nous avons essayé de comprendre comment les NPs agissent au niveau de la membrane cellulaire, en appliquant un champ électrique. Etant donné que les résultats obtenus dans cette partie sont la suite des résultats de l'article 1, les mécanismes impliqués dans l'amplification du champ électrique en présence des NPs conductrices ont été étudiés en suivant la stratégie de sédimentation (3h à 4°C). Ainsi, la cinétique de refermeture des pores créés par l'application du champ électrique (electropores), a été étudiée en présence des NPs déjà présents à la surface des cellules DC-3F. Ces cinétiques ont été révélées en utilisant la bléomycine et le YO-PRO-1 comme marqueurs de perméabilisation.

Afin d'étudier les mécanismes impliqués dans l'amplification du champ électrique en présence des NPs d'or (GNPs), la cinétique de refermeture des électropores a été étudiée en présence et en absence des GNPs. L'électroperméabilisation des DC-3F en présence des GNPs (ou pas) a été révélée par le test d'efficacité de clonage, qui va mesurer de façon indirecte l'entrée de la bléomycine à différents temps après l'impulsion électrique. Afin que les GNPs soient à la surface des cellules, les cellules DC-3F ont été cultivées de manière adhérente dans des boîtes de Pétri de 35mm où des inserts de PDMS ont été introduits, afin de pouvoir appliquer à la couche des cellules le champ électrique (cf. Materials and Methods de l'article 1 et 2). Ces cellules adhérentes ont été incubées avec ou sans les GNPs pendant 3h à 4°C. Après 5 minutes à température ambiante, des électrodes ont été placées et les cellules ont été soumises à un train de 8 impulsions de 100 μ s et d'une amplitude de 600V/cm (fréquence de répétition fixée à une seconde). Afin de suivre la re fermeture des électropores, la bléomycine a été rajoutée après l'application de l'impulsion électrique à différents temps. Ceci nous permet ainsi d'avoir une idée sur l'impact des GNPs sur la refermeture des pores créés par le champ électrique, par comparaison avec les cellules non incubées avec les GNPs. Pour chaque condition, 50 μ l de bléomycine ont été ajoutés aux 600 μ l de milieu afin d'atteindre une concentration finale de 30 nM. La cinétique d'entrée a été suivie 1, 3, 5, 10, 15, 30 et 60 minutes, après l'application des impulsions électriques. Pour le contrôle positif, la bléomycine a été rajoutée avant l'application du champ électrique. Huit minutes après l'ajout de bléomycine pour chaque condition, les électrodes ont été retirées et les cellules ont été lavées une fois avec du PBS, détachées avec TrypLE Express (Life Technologies), suspendues dans du milieu, comptées et diluées afin de déposer 250 cellules par puits d'une plaque à six puits (trois puits par condition). Les cellules non pulsées ont été étudiées comme témoin et ont été traitées de la même manière. Après 5 jours de culture, les colonies ont été lavées deux fois avec du PBS (sans Ca^{2+} et Mg^{2+}), fixées avec une solution de cristal violet (0,2% de cristal violet, 10% de formaldéhyde et 20% d'éthanol dans H_2O), et les colonies colorées ont été comptées. Pour chaque condition de traitement, le taux de viabilité des cellules traitées a été rapporté, en pourcentage, au taux de viabilité des cellules non pulsées.

1. La cinétique de refermeture des électropores révélée par l'entrée de la bléomycine

Afin de comprendre l'effet des nanoparticules conductrices sur la re fermeture des électropores, la comparaison de l'entrée de bléomycine en présence et en absence des GNPs

a été réalisée (Figure 28). En appliquant le champ électrique après l'ajout de la bléomycine (contrôle positif), la figure 28 montre que les GNPs ont augmenté l'effet du champ électrique et ont diminué le taux de viabilité de 24% (soit de l'ordre de 60%, en présence de GNPs et de l'ordre de 40%, en absence de GNPs). Cette observation est en parfaite corrélation avec le résultat obtenu précédemment (cf. Fig. 4 de l'article 1), où les cellules ont été incubées 3h à 4°C avec les GNPs. En ajoutant la bléomycine une minute après l'impulsion électrique, les cellules en absence des GNPs montrent une viabilité de l'ordre de 70% alors que le taux de viabilité des cellules en présence de GNPs n'a augmenté que légèrement par comparaison au contrôle positif (en présence des GNPs), soit 40% de viabilité (ce qui résulte à 30% de différence entre la condition avec et sans GNPs). En ajoutant la bléomycine trois minutes après l'impulsion électrique, on observe un taux de viabilité de l'ordre de 80% en absence de GNPs tandis qu'en présence de GNPs, le taux de viabilité est de l'ordre de 55%. Pour expliquer cet effet, on peut dire que la bléomycine rentre jusqu'à trois minutes après l'impulsion électrique dans les cellules en présence des GNPs. En revanche, en absence des GNPs, les cellules semblent être moins perméable à la bléomycine, à une et à trois minutes après l'impulsion électrique. Dans les conditions où la bléomycine est ajoutée 5, 10, 30 minutes après l'impulsion électrique, la différence en pourcentage de viabilité entre la condition sans et avec GNPs est toujours significative. Ainsi, on peut confirmer que les cellules en présence de GNPs restent perméables à la bléomycine même 5, 10 et 30 minutes après l'impulsion électrique. En absence des GNPs, les cellules restent peu perméables à la bléomycine (80% de viabilité, dont 20% de mortalité pourraient être du seulement à l'application du champ électrique). La différence de viabilité significative, entre les cellules sans et avec GNPs est due au fait que les electropores des cellules en présence de GNPs restent plus longtemps ouverts et que la bléomycine en présence des GNPs rentre en quantité suffisante (mais de moins en moins) pour tuer les cellules, pendant 1 à 30 minutes après l'impulsion électrique. Cet effet se traduit par le retard de fermeture de ces pores par comparaison au cas sans GNPs. Ce résultat peut s'expliquer par le fait que les GNPs amplifient localement le champ électrique et donc ces NPs peuvent créer des pores plus grand ou plus nombreux. En ajoutant la bléomycine une heure après l'impulsion électrique, les cellules en présence de GNPs montrent le même taux de viabilité que les cellules sans GNPs (80%). Ce qui confirme qu'après une heure, les cellules avec GNPs referment complètement leurs pores.

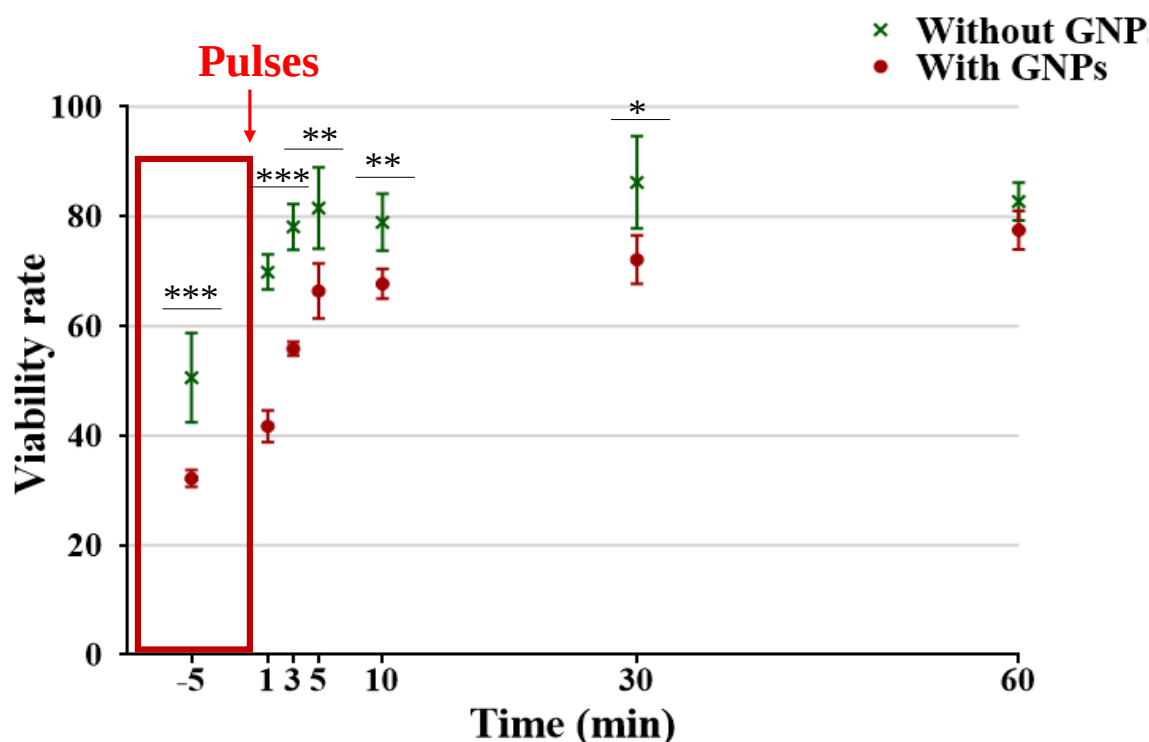


Figure 28 : La cinétique de refermeture des électropores révélée par le test d'efficacité de clonage en utilisant la bléomycine, en présence et en absence de GNPs. Les cellules DC-3F attachées sont incubées 3h à 4°C avec ou sans GNPs. Le contrôle positif est encadré en rouge. Les barres d'erreur correspondent à $\pm$ l'écart type. Les expériences ont été réalisées en trois jours indépendants et chacune comprenait un triplicat pour chaque condition.

2. La cinétique de refermeture des électropores révélée par l'entrée de YO-PRO-1

Afin de confirmer ce résultat, la cinétique de re fermeture des pores a été testée de la même manière et la perméabilisation des cellules a été révélée par le pourcentage de fluorescence (par l'entrée de YO-PRO-1) par FACS. Les cellules DC-3F adhérentes ont été incubées 3h à 4°C avec ou sans les GNPs et ensuite le YO-PRO-1 a été rajouté à la solution des cellules à différents temps après l'impulsion électrique. Pour chaque condition, 20 μ L de YO-PRO-1 ont été rajoutés au 600 μ L de milieu de culture afin d'avoir une concentration de fluorophore de 2 μ M. Pour le contrôle positif, le YO-PRO-1 a été rajouté avant l'impulsion électrique. Ce fluorophore a été rajouté à la solution 3, 10 et 30 minutes, après l'impulsion électrique. Les impulsions électriques appliquées sont les mêmes que précédemment. Après six minutes de l'ajout du YO-PRO-1, les cellules ont été lavées deux fois avec le PBS, détachées avec du TrypLE Express, suspendues dans du PBS (sans Ca^{2+} , sans Mg^{2+}) et passées au FACS. Pour chaque condition de traitement, le pourcentage de perméabilisation

des cellules traitées a été rapporté, en pourcentage, au taux de pourcentage de fluorescence des cellules non pulsées.

La figure 29 montre le pourcentage de perméabilisation qui est traduit par le pourcentage de fluorescence, en présence et en absence des GNPs. En ajoutant le YO-PRO-1 trois minutes après l'impulsion électrique, le pourcentage de perméabilisation en présence des GNPs, de l'ordre de 55%, est significativement plus élevé que celui en absence des GNPs, qui est de l'ordre de 35%. Trois minutes après l'impulsion électrique, les cellules en présence en GNPs semblent être plus perméabilisées et donc plus perméable au YO-PRO-1, comparativement aux cellules sans GNPs. Dix et trente minutes après l'impulsion électrique, le pourcentage de perméabilisation des cellules en présence et en absence de GNPs ne montrent aucune différence significative. Cette absence de différence de perméabilisation pourrait s'expliquer par la non-perméabilité au YO-PRO-1 entre le cas des cellules avec et sans GNPs, à partir de 3 minutes après l'impulsion électrique. Pour le contrôle positif, en ajoutant le YO-PRO-1 avant l'impulsion électrique, le pourcentage de perméabilisation est le même en absence et en présence des GNPs. Ces résultats expliquent qu'en présence et en absence de GNPs, la différence de perméabilité au YO-PRO-1, n'est observée que sur une courte durée après l'impulsion électrique qui ne dépasse pas les trois minutes. Ce qui confirme la différence de perméabilité au YO-PRO-1 avant ou même trois minutes après l'impulsion électrique.

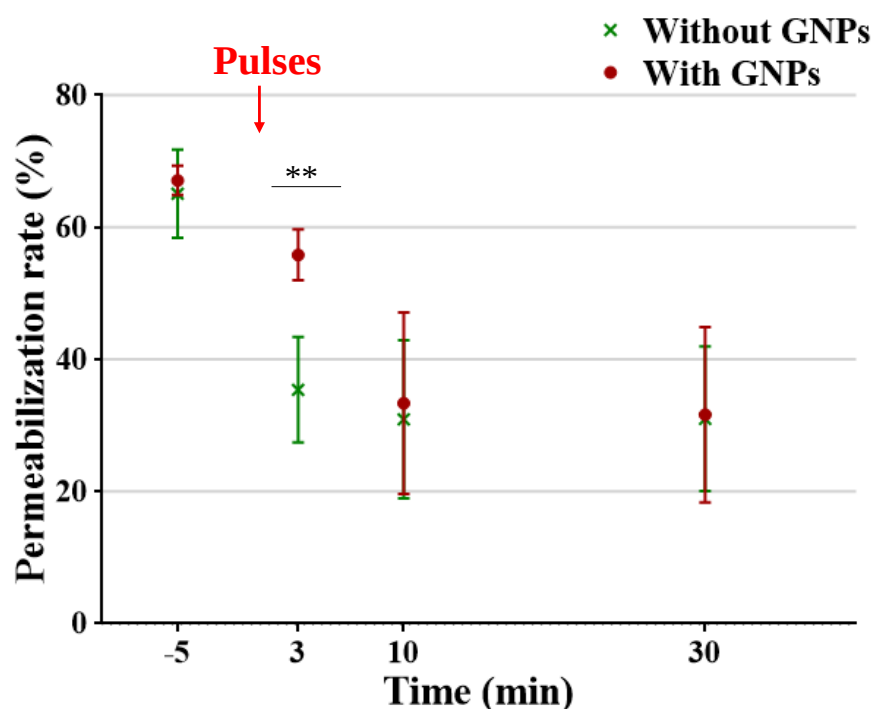


Figure 29 : La cinétique de refermeture des électropores révélée par le pourcentage de fluorescence en utilisant le YO-PRO-1, en présence et en absence de GNPs. Les cellules DC-3F attachées sont incubées 3h à 4°C avec ou sans GNPs. Les barres d'erreur correspondent à $\pm$ l'écart type. Les expériences ont été réalisées en trois jours indépendants et chacune comprenait un triplicat pour chaque condition.

3. Effet des impulsions répétées combinées avec l'incubation de 3h à 4°C

Afin de confirmer l'importance du contact physique entre les NPs et les membranes pour l'amplification du champ électrique, l'incubation des GNPs 3h à 4°C (stratégie de sédimentation) avec les cellules DC-3F attachées a été combinée avec l'application des deux types d'impulsions électrique (msPEF+µsPEFs) (stratégie d'électrophorèse). La combinaison des deux stratégies a été testée via le test d'efficacité de clonage, en présence et en absence de GNPs (Figure 30). Après incubation des cellules avec les GNPs (3h à 4°C), les cellules ont été exposées à une première impulsion électrique de 400 msPEF afin de rapprocher davantage les NPs à la membrane. Après ajout de la bléomycine, un train de 8 impulsions et d'une durée de 100 µsPEF a été appliqué aux cellules avec une amplitude de 600V/cm. Etant donné que les GNPs ne sont pas toxiques (cf. article 1 et 2), la figure 30 montre que les GNPs, en présence de la bléomycine, augmentent de l'effet du champ électrique de 36%, par comparaison au cas des cellules sans GNPs. Ce résultat confirme ainsi qu'en combinant les deux stratégies (sédimentation et deux types de impulsions électriques), l'effet des GNPs sur le champ électrique est amplifié et donc la présence des GNPs augmente l'effet du champ électrique, de 21% (électrophorèse) (cf. Fig.4 de l'article 2) ou 24% (sédimentation) (cf. Fig. 4 de l'article 1) à 36%. La combinaison des deux stratégies (sédimentation et électrophorèse) confirme davantage l'importance du contact physique entre les NPs conductrices et la membrane cellulaire afin d'améliorer l'électroporation des cellules.

Etant donné que la sédimentation 3h à 4°C est une stratégie limitante pour l'étude *in vivo*, nous avons opté pour l'application des deux impulsions électriques en présence des NPs conductrices dans la partie suivante.

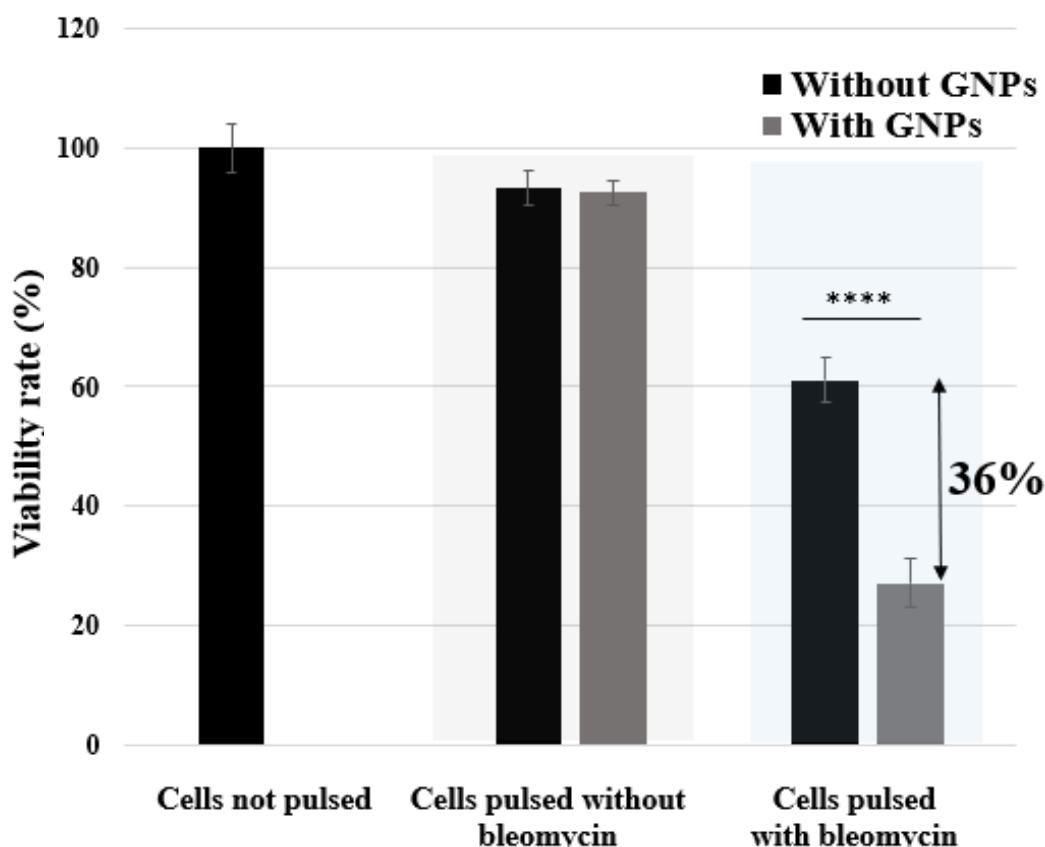


Figure 30 : Efficacité de clonage en présence et en absence de GNPs. Les cellules attachées sont incubées 3h à 4°C avec ou sans GNPs et ensuite exposées à une impulsion msPEF d'une durée de 400 ms (amplitude de 5V/cm) et 8 impulsions μ sPEF d'une durée de 100 μ s (amplitude de 600V/cm). Les barres d'erreur correspondent à $\pm$ l'écart type. Les expériences ont été réalisées en trois jours indépendants et chacune comprenait un triplicat pour chaque condition.

4. Autre tentative de rapprochement des NPs conductrices à la surface des cellules

Afin d'optimiser la stratégie de sédimentation (après article 1), les NPs d'oxyde de fer magnétiques (SPIONs, pour « supra magnetic iron oxide nanoparticles ») ont été utilisées à la place des GNPs pour amplifier le champ électrique local. Ayant des propriétés magnétiques et conductrices (cf I-1.2.3.2), ces NPs sont facilement manipulables par simple application d'un champ magnétique externe (aimant). Ces NPs de diamètre de 50 nm ont été achetées chez Interchim (MP50-1) (Montluçon, France). Ces NPs ont été explorées dans le but d'accélérer la stratégie de sédimentation, tout en ayant la capacité d'amplifier le champ électrique local. Les cellules ont été cultivées dans des boîtes Pétri où les inserts de PDMS ont été introduits de la manière décrite dans la section précédente (cf. paragraphe 1). Un aimant (d'une force de 48.7 Newton) a été mis au-dessous de la boîte de Pétri (contenant les cellules DC-3F attachées) pendant dix minutes pour attirer les NPs vers la surface des

cellules. La boîte petri a été placée au-dessus d'un adaptateur de centrage contenant l'aimant de sorte que ce dernier couvre toute la partie des cellules adhérentes. Un test d'efficacité de clonage (bléomycine) a été réalisé en présence et en absence des NPs d'oxyde de fer et en présence d'aimant (Figure 31). Après deux minutes de l'ajout de la bléomycine, un train de 4 impulsions et d'une durée de 100 μ sPEF a été appliquée aux cellules avec une amplitude de 600V/cm. Huit minutes après, l'aimant a été enlevé et les cellules ont été détachées par le TryplEx et clonées pendant 5 jours. Les cellules ont été exposées au champ magnétique dans toutes les conditions. Par la suite, pour chaque condition, les cellules ont été colorées, comptées et le taux de viabilité des cellules traitées a été rapporté, en pourcentage, au taux de viabilité des cellules non pulsées.

En présence de bléomycine, les SPIONs n'ont pas augmenté l'electroporation des cellules, par comparaison au cas sans SPIONs (différence non significative). En l'absence de bléomycine, la mort cellulaire était similaire en présence ou en absence de SPIONs (environ 20%), ce qui confirme la non-toxicité des SPIONs. L'absence d'effet des SPIONs sur l'amplification du champ électrique pourrait être dû au fait d'attirer les NPs magnétiquement pourrait stresser les cellules et donc l'effet d'amplification de ces NPs est amoindrie.

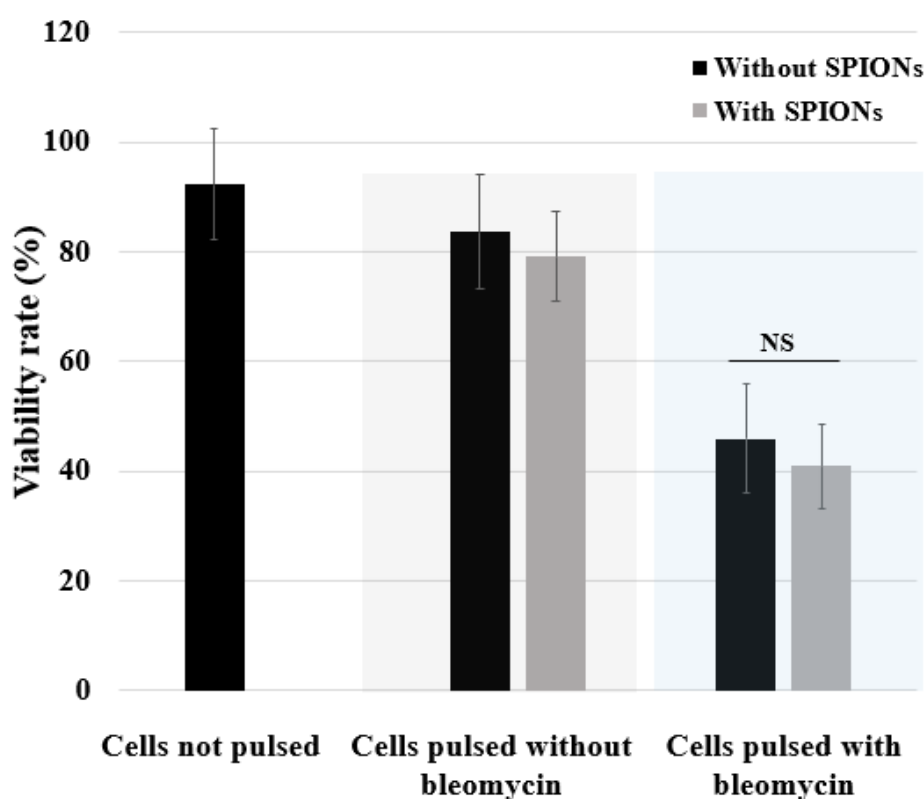


Figure 31 : Efficacité de clonage en présence et en absence de SPIONs. Les cellules attachées sont exposées à 4 impulsions μ sPEF d'une durée de 100 μ s (amplitude de 600V/cm). Les barres d'erreur correspondent à $\pm$ l'écart type. Les expériences ont été réalisées en trois jours indépendants et chacune comprenait un triplicat pour chaque condition

5. Conclusion

Les résultats de cinétique de re fermeture des électropores nous ont permis d'approfondir l'effet amplificateur du champ électrique en présence des NPs conductrices, observés dans l'article 1 et 2. Ces résultats affirment que la présence des NPs à la surface des membranes permet d'améliorer l'électroporation. En effet, les NPs conductrices améliorent l'électroporation en agissant d'une manière indirecte sur la membrane cellulaire. En orientant le champ électrique autour d'elles, la concentration du champ électrique au niveau de la membrane va induire une augmentation de l'intensité du champ électrique à ce niveau. Ainsi, ce champ électrique amplifié va augmenter le potentiel transmembranaire induit localement et donc créer plus de défauts au niveau de la membrane autour de ces NPs. Ces défauts (en plus des défauts causés par l'électroporation) peuvent être associés à une augmentation de nombre des pores ou à l'induction de pore de plus grande taille, en présence des NPs d'or. Dans les deux cas, les NPs vont améliorer l'électroporation en gardant ces pores plus ouverts et donc le médicament cytotoxique va rentrer après une durée plus longue après l'impulsion électrique, par comparaison au cas sans NPs conductrices.

Une deuxième hypothèse pourrait aussi expliquer le retard de fermeture des pores en présence des NPs. En effet, les défauts membranaires induits par l'électroporation peuvent être maintenus par les NPs par la présence des ROS. Tout comme l'oxydation des lipides insaturés par des ROS au cours de l'électropériméabilisation (cf II-3.2), la présence des NPs au niveau de ces pores pourraient contribuer davantage à faire rapprocher des ROS à la surface ou à induire elles-mêmes leur génération. Une troisième hypothèse pouvant expliquer cet effet est que la présence des NPs au niveau de la membrane pourrait bloquer la refermeture des électropores. Toutes ces hypothèses soulignent que l'électropériméabilisation durera plus longtemps en présence de ces NPs conductrices ce qui entraîne une entrée de bléomycine plus prolongée après l'impulsion électrique, tout en conservant la même concentration (de médicament) et la même amplitude du champ électrique.

Partie 4 : Amplification du champ électrique *in vivo* en utilisant des nanoparticules conductrices

Résumé :

L'ensemble des résultats rapportés *in vitro* nous ont encouragé à tester l'effet des NPs conductrices sur le champ électrique *in vivo*. Plus spécifiquement, en déterminant la condition de rapprochement optimale entre les nanoparticules (NPs) et les membranes cellulaires nécessaire pour amplifier le champ électrique, nous avons voulu tester l'amélioration de l'électroporation sur des tumeurs murines. Ainsi, en suivant le raisonnement d'électrophorèse (cf. article 2) qui a pour but de pousser les NPs à la surface des membranes par un premier pulse, l'effet des NPs sur le 2^{ème} train d'impulsions électriques a été testé en suivant la croissance tumorale des souris. De plus, dans cette partie, nous avons essayé d'étudier l'effet des NPs d'or sphériques et des NPs d'or en forme d'étoiles sur les effets du champ électrique appliqué.

1. Matériels et méthodes

Culture cellulaire

Une lignée de fibrosarcome murine (LPB) a été cultivée dans le milieu de culture RPMI (Life Technologies, Saint-Aubin, France). Ce milieu de culture a été supplémenté avec 10% de sérum bovin fœtal (Life Technologies) et 1% de pénicilline-streptomycine. Le sérum bovin fœtal a été decomplémenté pendant 30 minutes à 56 °C avant d'être rajouté au milieu. Les cellules ont été maintenues à 37 °C avec 5% de CO₂ et ont été systématiquement passées tous les deux jours. Les souris ont été inoculées avec ces cellules LPB, suspendues dans du PBS (sans Ca²⁺ et Mg²⁺), à une concentration de 500.000 cellules/souris (soit un volume de 100µL injecté). L'inoculation a été effectuée par voie sous-cutanée au niveau du flanc droit des souris anesthésiées par l'isoflurane. Pour atteindre un volume tumoral de 70 mm³, la croissance tumorale pour cette lignée cellulaire a été poursuivie pendant 12 jours.

Les nanoparticules d'or

Pour les expériences *in vivo*, les mêmes nanoparticules d'or sphériques de 40 nm (GNPs), utilisées *in vitro*, ont été injectées aux souris. Avant injection, ces GNP ont été PEGylées de la manière décrite précédemment (cf. Materials and Methods de l'article 2). Ces PEG-GNPs ont été injectées aux souris par voie intra-tumorale à une concentration de 400 µg/ml. Le volume de NPs injecté correspondait à la moitié du volume de la tumeur de chaque souris. Cette injection a été faite manuellement et d'une manière reproductible pour chaque souris (soit, 10µL/seconde) avec une seringue jaune (30G).

Des nanoparticules d'or sous forme d'étoiles (GNS), ayant une taille moyenne de 50 nm ont été achetées à Creative diagnostics (New York, USA) sous la référence (CGS-50). Tout comme les GNPs, ces GNS ont été PEGylées (PEG-GNS) et injectées aux souris par voie intra-tumorale à une concentration de 400µg/ml. L'injection des PEG-GNS a été réalisée de la même manière décrite pour les PEG-GNPs. Cette concentration de 400µg/ml des NPs d'or PEGylées a été choisie de façon à être largement au-dessous de la concentration des NPs d'or PEGylées toxiques, qui est de 1mg/ml, rapportée dans la littérature [346],[347]. En plus de cette information, la toxicité des NPs d'or a été étudiée durant les deux expériences *in vivo*.

Electrophorèse suivie d'électroporation

Deux types d'impulsions électriques (milli- et microsecondes) ont été délivrées aux tumeurs murines. Pour les impulsions millisecondes (msPEFs), un train de 10 impulsions ayant une amplitude de 60V/cm et une durée de 400 ms a été appliqué. La pause entre les deux impulsions millisecondes a été fixée à 600 ms afin d'avoir une fréquence de répétition d'une impulsion par seconde. Ces impulsions électrophorétiques ont été choisies pour leurs paramètres non-perméabilisant [348].

Pour les impulsions microsecondes (μ sPEFs), un train de 8 impulsions ayant chacune une amplitude de 1000V/cm et une durée de 100 μ s a été appliqué. La fréquence de répétition a été fixée à 1 Hz. Pour les deux types d'impulsions, des électrodes plates (deux plaques parallèles en acier inoxydable distantes de 4.7 mm) ont été utilisées pour exposer la tumeur au champ électrique. Ces électrodes ont été connectées à un Cliniporator™ (IGEA, Carpi, Italie). Avant l'application des impulsions électriques, les tumeurs ont été badigeonnées avec du gel (uni'gel US, Aspet+, Quint-Fonsegrives, France) pour assurer le contact entre les électrodes et la peau de la souris. Ces paramètres électroporatifs ont été choisis de façon à appliquer un champ électrique qui est perméabilisant mais faiblement (au niveau du seuil de perméabilisation *in vivo*) afin de pouvoir observer l'effet des NPs sur l'augmentation de l'électroporation [349].

Caractérisation des propriétés des GNP et GNS

Les diamètres hydrodynamiques et les potentiels zêta des suspensions de PEG-GNPs et PEG-GNS ont été mesurés par DLS en utilisant un Nanobrook 90plus PALS (Brookhaven, USA). Pour avoir une idée sur la taille des NPs utilisées avant de les injecter aux souris, les PEG-GNPs et PEG-GNS ont été remises en suspension dans le PBS et ensuite soniquées (cf. Materials and Methods de l'article 2). Pour chaque type de nanoparticules d'or (sphérique et en étoile), au moins trois mesures ont été réalisées indépendamment. Afin d'avoir une idée sur la charge de ces NPs, le potentiel zêta a été aussi mesuré dans le PBS et chaque échantillon a été mesuré en triplicat.

Inoculation et traitement des souris

Des souris C57Bl / 6J femelles (âgées de 7 semaines) ont été achetées à ENVIGO Rms Sarl (Gannat, France). Les souris ont été hébergées dans la plateforme d'évaluation préclinique

(PFEP) de Gustave Roussy. Les expérimentations sur ces animaux ont été réalisées dans le strict respect des lois éthiques (n° de projet : 2018020711382163 v3). Les souris ont été inoculées par voie sous-cutanée avec des cellules LPB (500 000 cellules/souris), au niveau du flanc droit. Le traitement a commencé lorsque le volume moyen des tumeurs des souris a atteint 70 mm³. Les souris ont été randomisées et divisées en 4 (expérience 1) ou 5 groupes (expérience 2). Chaque groupe se composait de 10 souris et correspondait à une condition du traitement. Durant le traitement, les souris étaient anesthésiées à l'isoflurane.

Expérience 1 (PEG-GNPs)	Expérience 2 (PEG-GNPs et PEG-GNS)
<u>Condition 1</u> : PEG-GNPs + Bléomycine	<u>Condition 1</u> : PEG-GNS + Bléomycine
<u>Condition 2</u> : PBS + Bléomycine	<u>Condition 2</u> : PBS + Bléomycine
<u>Condition 3</u> : PBS + Electrophorèse (msPEFs) suivie d'électroporation (μsPEFs) + Bléomycine	<u>Condition 3</u> : PBS + Electrophorèse (msPEFs) suivie d'électroporation (μsPEFs) + Bléomycine
<u>Condition 4</u> : PEG-GNPs + Electrophorèse (msPEFs) suivie d'électroporation (μsPEFs) + Bléomycine	<u>Condition 4</u> : PEG-GNS + Electrophorèse (msPEF) suivie d'électroporation (μsPEFs) + Bléomycine
	<u>Condition 5</u> : PEG-GNPs + Electrophorèse (msPEFs) suivie d'électroporation (μsPEFs) + Bléomycine

Le traitement consistait à appliquer deux impulsions électriques successives (milli- et microsecondes), en présence et en absence des nanoparticules d'or PEGylées et de bléomycine. Dans un premier temps, les nanoparticules conductrices PEG-GNPs ou PEG-GNS, ou du PBS, ont été injectées aux souris par voie intra tumorale avec un volume qui correspond à la moitié du volume tumoral. Pour les NPs, la concentration du volume injectée était de 400μg/ml. Sept minutes plus tard, 100 μl de bléomycine (0.1μg/μl) ont été injectés par voie intraveineuse en rétro-orbital. Quatre minutes plus tard, un premier train de 10 impulsions électriques millisecondes a été appliqué (msPEFs). Toute de suite après ces impulsions millisecondes, un train de 8 impulsions microsecondes a été appliqué (μsPEFs). La croissance tumorale des souris a été suivie trois fois par semaine pendant au moins 3 semaines.

Microscopie électronique TEM

Pour étudier la localisation des nanoparticules par rapport aux membranes des tumeurs, des images de microscopie électronique ont été prises. Deux tumeurs ont été injectées par voie intra tumorale avec des PEG-GNPs. Onze minutes plus tard, les souris ont été sacrifiées et les tumeurs ont été collectées dans une solution de Sorensen contenant 2% de glutaraldéhyde. Par la suite, ces tumeurs sont fixées pendant une heure à 4°C dans de la glutaraldéhyde 2.5% diluée dans du tampon phosphate 0,1M, pH7,3 (phosphate de sodium disodique + phosphate de sodium monosodique). Ensuite, les tumeurs sont rincées pendant 1 heure (minimum) (3x20') à 4°C dans du tampon phosphate froid, puis post-fixées avec de l'acide osmique à 2% dans le tampon phosphate, pendant 1 heure à température ambiante. Un rinçage de 5 min dans de l'eau distillée a été effectué, suivi d'une déshydratation dans des concentrations croissantes d'éthanol (à température ambiante) avant l'enrobage dans l'épon (polymères) :

- alcool 70° : 2x15'
- alcool 80° : 2x10'
- alcool 95° : 2x15'
- alcool 100° : 3x20'
- alcool-Epon (mélange) 3x20' (bains progressifs)
- Epon une nuit.

Par la suite, les échantillons sont mis dans des capsules avec de l'épon frais et polymérisés à 60°C pendant 48 heures. Des coupes ultrafines de matériel enrobé (90 nm d'épaisseur) sont réalisées à l'ultratome LKB équipé d'un couteau de diamant, puis collectées sur des grilles en cuivre recouvertes de formvar consolidé par une évaporation de carbone, pour finalement être colorées à l'acétate d'uranyle et au citrate de plomb. L'observation des grilles est réalisée à l'aide d'un microscope électronique à transmission (FEI tecnai 12). Les images numériques ont été prises avec une caméra CCD SIS MegaviewIII.

2. Résultats

2.1. Détermination de diamètre hydrodynamique et de la charge des PEG-GNPs et PEG-GNS

La figure 32 rapporte le diamètre hydrodynamique et la charge des NPs PEGylées et injectées aux souris. Pour les PEG-GNPs, le diamètre hydrodynamique obtenu à la concentration de 400µg/ml (70 nm) est similaire aux diamètres de ces même NPs à 50µg/ml (environ 80 nm) (cf. article 2). Ce qui confirme qu'en augmentant la concentration de PEG-GNPs, les NPs ne s'agregent toujours pas grâce à la présence du PEG. La figure 32 montre que le diamètre hydrodynamique des PEG-GNS est de l'ordre de 83 nm. Ce diamètre correspond à la taille de ces NPs (50nm) où des PEG ont été greffés à leurs surfaces. Quant au zêta-potential, la figure 32 montre que les PEG-GNPs sont aussi chargées (à 400µg/ml) et ont une charge globale de -38.1 mV et que les PEG-GNS à la même concentration possèdent une charge globale de -12.7mV.

PEG-GNPs	Diamètre hydrodynamique (nm)	Charge (mV)
1 ^{ère} mesure	75	-38.5
2 ^{ème} mesure	65.3	-37.3
3 ^{ème} mesure	69	-39
Moyenne des mesures	70± 4.8	-38.1±0.8

PEG-GNS	Diamètre hydrodynamique (nm)	Charge (mV)
1 ^{ère} mesure	83	-14.3
2 ^{ème} mesure	84.2	-11.7
3 ^{ème} mesure	81.7	-12.2
Moyenne des mesures	83±1.2	-12.7±1.3

Figure 32 : Détermination par DLS du diamètre hydrodynamique et de la charge des NPs suspendues dans le PBS. Chaque mesure a été répétée 3 fois en 3 jours différents.

2.2. Effet des impulsions millisecondes et microsecondes en présence de PEG-GNPs (expérience *in vivo* 1)

Afin de tester l'effet amplificateur des PEG-GNPs sur le champ électrique *in vivo*, deux types de champs électriques (msPEFs et µs PEF) ont été appliqués aux tumeurs injectées (ou pas) par des PEG-GNPs. Après injection de PEG-GNPs ou du PBS et de la bléomycine, les tumeurs murines ont été exposées à un train de msPEFs suivi d'un train de µsPEFs (Figure

33). En suivant le même raisonnement de l'article 2, où le premier train de msPEFs semblait avoir un effet électrophorétique sur les NPs chargées, le traitement *in vivo* a été effectué de la même manière. Ainsi, en présence des GNP-PEG chargées (-38.1mV), un train de 10 impulsions msPEF (d'une durée individuelle de 400ms) a été délivré dans le but de pousser les NPs vers la surface des cellules des tumeurs. Ensuite, un deuxième train de 8 impulsions μ sPEFs a été délivré dans le but de perméabiliser les membranes des tumeurs en présence des PEG-GNPs. Ainsi, l'application du train de msPEFs suivi d'un train de μ sPEFs est nommée électrophorèse suivie d'électroporation.

La figure 33 montre que les tumeurs traitées avec du PBS et du PEG-GNPs seules (sans impulsions électriques en présence de bléomycine) continuent leur croissance jusqu'à atteindre un volume tumoral maximal de 1700 mm³ (au 19^{ème} jour après le traitement). En l'absence d'impulsions électriques, les souris traitées avec des PEG-GNPs ne montrent aucune différence significative par comparaison avec les souris traitées avec du PBS. Ceci montre la non-toxicité des PEG-GNPs au cours du traitement et la non-potentialisation de la bléomycine par les PEG-GNPs en l'absence des impulsions électriques.

Dans le cas de l'électrophorèse suivie de l'électroporation, les tumeurs traitées avec des PEG-GNPs ou du PBS montrent une légère diminution de la croissance tumorale durant les 14 jours qui suivent le traitement. En l'absence des PEG-GNPs, les tumeurs reprennent leur croissance au bout du 14^{ème} jour et l'une des 10 souris de ce groupe (électrophorèse suivi d'électroporation en présence de PBS) a atteint 1700 mm³, au bout du 19^{ème} jour après le traitement. En revanche, en présence des PEG-GNPs, la première souris de ce groupe (électrophorèse suivi d'électroporation en présence de PEG-GNPs) n'atteint 1700 mm³ qu'au bout du 23^{ème} jour, et donc 5 jours après le groupe de souris non traitées avec des PEG-GNPs. Ce retard statistiquement significatif observé en présence des PEG-GNPs peut s'expliquer par le fait que lorsque les NPs conductrices sont à proximité des membranes, elles sont capables de concentrer le champ électrique appliqué. Ainsi ces NPs peuvent créer des pores plus grands ou plus nombreux et donc la bléomycine peut rentrer plus facilement ou dans plus de cellules en présence des NPs conductrices.

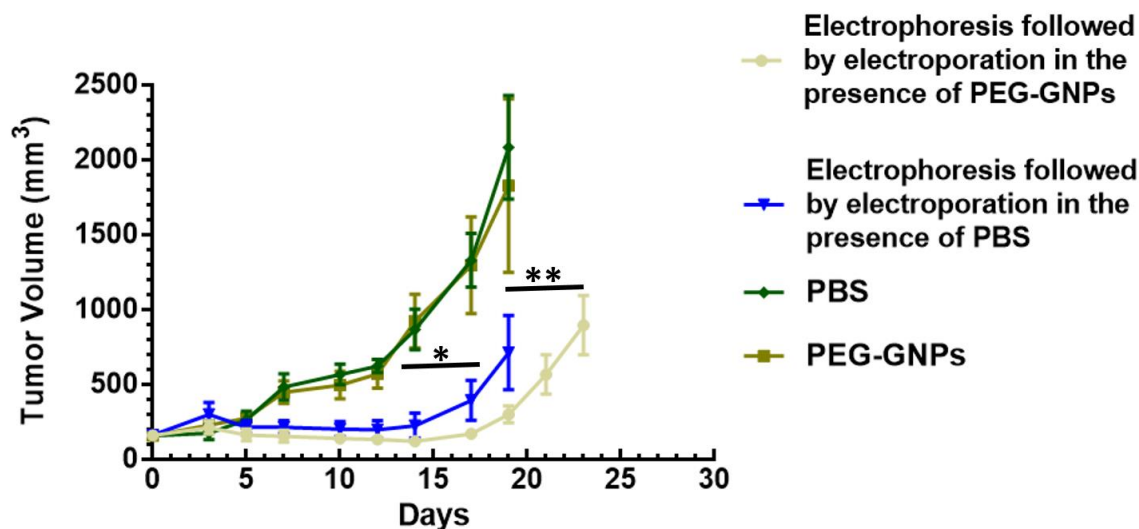


Figure 33 : Effet des nanoparticules conductrices PEG-GNPs sur la croissance tumorale. Chaque courbe représente le volume tumoral moyen du groupe. Dans chaque condition, 10 souris ont été traitées. Electrophorèse correspond à l'application d'un train de 10 impulsions électriques millisecondes avec une amplitude de 60V/cm et d'une durée de 400ms. Electroporation correspond à l'application d'un train de 8 impulsions microsecondes (d'une durée de 100µs) et d'une amplitude de 1000V/cm. Tous les groupes ont reçus de la bléomycine par voie intraveineuse. Les barres correspondent aux écarts types de chaque condition. ** $p=0.007$, * $p=0.02$.

La figure 34 montre un TEM réalisé sur des coupes des tumeurs qui ont été injectées par des PEG-GNPs.

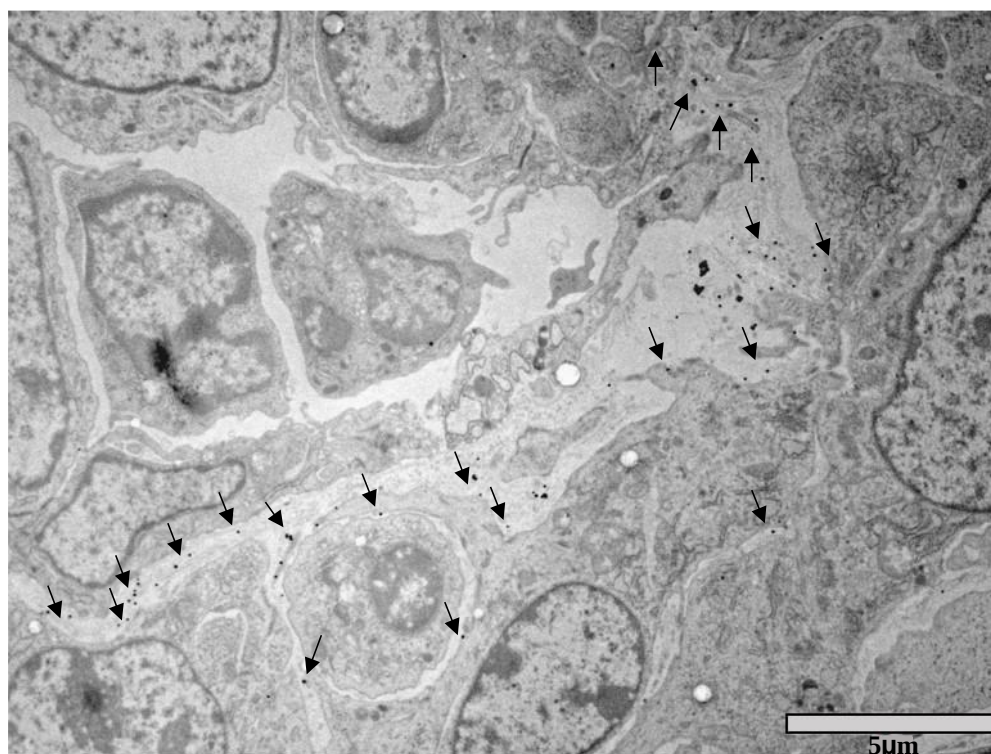


Figure 34 : TEM d'une tumeur murine en présence de PEG-GNPs après 11 minutes d'attente avant de sacrifier l'animal. Les flèches montrent la présence des PEG-GNPs au niveau des surfaces des cellules tumorales.

2.3. Effet des impulsions millisecondes et microsecondes en présence de GNS *in vitro*

Des modélisations ont montré que les GNS amplifient mieux le champ électrique autour d'elles que les GNPs [350], [351]. Cette amélioration d'amplification semble être due à la structure pointue des NPs d'or sous forme d'Etoiles et donc ces dernières concentrent mieux le champ électrique à ce niveau.

Afin de voir l'effet des GNS sur le champ électrique au niveau de la membrane cellulaire et le comparer à celui produit par les GNPs, des tests d'efficacité de clonage ont été réalisés sur les cellules DC-3F attachées en présence et en absence des GNS (Figure 35). Le protocole de l'efficacité de clonage a été effectué exactement de la même manière que pour le cas des GNP (cf. Matériels et méthodes de l'article 2). En suivant le même raisonnement de l'article 2, après incubation des cellules avec les GNS, 1h à 4°C, une impulsion msPEF d'une durée de 400 ms et d'une amplitude de 5V/cm a été appliquée, afin de pousser les GNS chargées (figure non montrée) à la surface des membranes cellulaires. Par la suite, après l'ajout de la bléomycine, un deuxième train de 8 impulsions de 100 μ s a été appliqué dans le but de perméabiliser les cellules, en présence des GNS.

La figure 35 montre en l'absence de bléomycine, 20% de mortalité en présence et en absence des GNS. Ce pourcentage de mortalité est dû essentiellement aux impulsions électriques. Ce premier résultat confirme que les GNS n'apportent pas de toxicité aux cellules. En présence de la bléomycine, les GNS ont augmenté l'effet du champ électrique de 20 % comparativement au cas des cellules sans GNS. En comparant avec l'effet de GNPs sur le champ électrique où ces NPs ont été poussées à la surface par un pulse msPEF et les cellules ont été exposées à un train de 8 impulsions microsecondes (21%) (cf. Fig. 4 de l'article 2), on peut confirmer que les GNS n'amplifient pas l'effet du champ électrique *in vitro* (20%) plus que les GNPs.

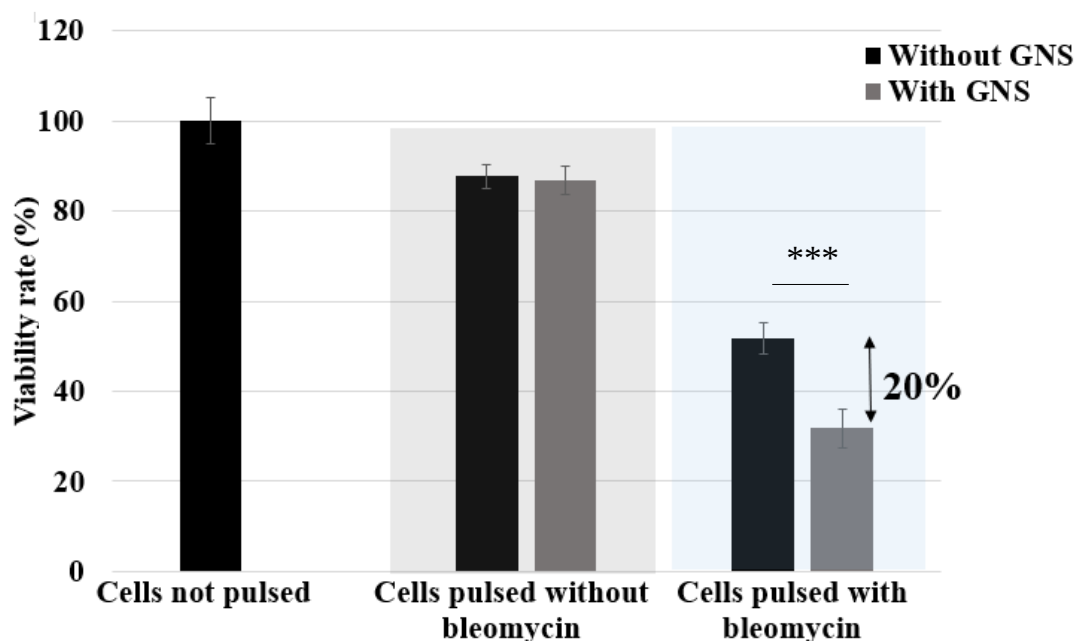


Figure 35 : Efficacité de clonage: Effet des impulsions msPEF et μ sPEFs sur cellules DC-3F en combinaison (ou non) avec de la bléomycine et en présence (ou non) de GNS préalablement incubés avec les cellules pendant 1 h à 4 ° C. Le msPEF correspond à une impulsion d'une durée de 400 ms et à une amplitude de 5V/cm. Le μ sPEF correspond à un train de 8 impulsions de 100 μ s et d'une amplitude de 600V/cm. Les barres d'erreur correspondent à $\pm$ l'écart type. Les expériences ont été réalisées en trois jours différents et chacune comprenait un triplicat pour chaque condition.

2.4. Effet des impulsions millisecondes et microsecondes en présence de GNP-PEG et GNS-PEG (expérience *in vivo* 2)

Une deuxième expérience *in vivo* a été réalisée pour confirmer le rôle amplificateur des PEG-GNPs (Figure 33) et vérifier l'effet des PEG-GNS sur la croissance tumorale. Cette expérience a été effectuée de la même manière décrite précédemment (cf. expérience *in vivo* 1). Après injection de PEG-GNPs ou PEG-GNS ou du PBS et de la bléomycine, les tumeurs murines ont été exposées à un train de msPEFs suivi d'un train de μ sPEFs (Figure 36). En absence des impulsions électriques, les souris traitées avec des PEG-GNS ne montrent aucune différence significative de croissance tumorale par comparaison avec les souris traitées avec du PBS. Comme mentionné précédemment pour les PEG-GNPs, les PEG-GNS, aussi, ne sont pas toxiques pour les souris au cours du traitement et ne potentialisent pas l'effet de la bléomycine en l'absence des impulsions électriques.

Dans le cas de l'électrophorèse suivie de l'électroporation, les tumeurs traitées avec des PEG-GNPs ou PEG-GNS ou du PBS, montrent une légère diminution de la croissance tumorale durant les 10 jours qui suivent le traitement. En absence des deux types de NPs, les tumeurs reprennent leur croissance au bout du 10^{ème} jour et atteignent un volume moyen

tumoral de 900 mm³ au bout du 21^{ème} jour après le traitement. En revanche, en présence des NPs conductrices, l'une des souris dans chaque groupe de souris atteint le volume tumoral limite au bout du 25^{ème} jour après le traitement. A partir ce résultat, on peut dire que les tumeurs traitées par des NPs conductrices montrent un retard significatif de croissance tumoral par rapport aux tumeurs traitées par du PBS en présence des impulsions électriques. Ce résultat confirme davantage le rôle amplificateur des PEG-GNPs sur le champ électrique local. Par ailleurs, la charge globale des PEG-GNS ne semble pas affecter le déplacement de ces NPs par le champ électrophorétique vers la surface des cellules. Bien que les deux types des NPs conductrices ont un effet amplificateur sur le champ électrique au sein des tumeurs, aucune différence significative n'a été observée entre les PEG-GNPs et les PEG-GNS. Ce résultat *in vivo* est en parfaite corrélation avec les résultats observés *in vitro* avec ces deux NPs conductrices (sous formes d'agrégats, soit GNPs et GNS).

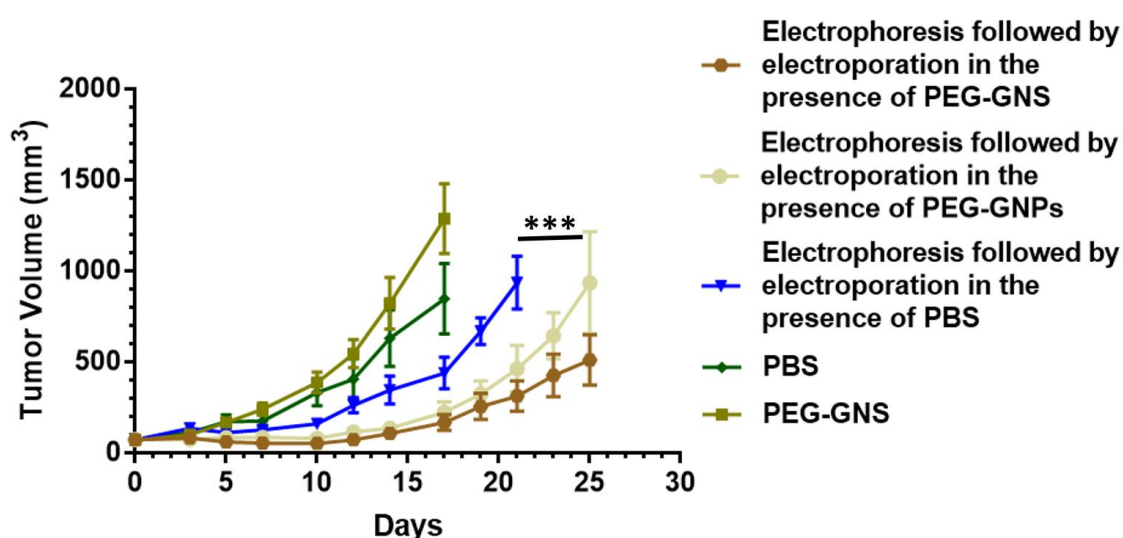


Figure 36 : Effet des nanoparticules conductrices PEG-GNPs et PEG-GNS sur la croissance tumorale. Chaque courbe représente le volume tumoral moyen du groupe. Dans chaque condition, 10 souris ont été traitées. Electrophorèse correspond à l'application d'un train de 10 impulsions électriques millisecondes avec une amplitude de 60V/cm et d'une durée de 400ms. Electroporation correspond à l'application d'un train de 8 impulsions microsecondes (d'une durée de 100µs) et d'une amplitude de 1000V/cm. Tous les groupes ont reçus de la bléomycine par voie intraveineuse. Les barres correspondent aux écarts types de chaque condition. ** $p=0.007$.

3. Conclusion

Ces deux expériences *in vivo* confirment encore le rôle amplificateur des NPs conductrices sur le champ électrique local, qui a été traduit par un retard de croissance tumorale, par rapport au cas en absence des NPs. Ce retard de croissance tumoral, observé en présence des

deux types de NPs conductrices s'explique par l'entrée prolongée de la bléomycine, dans le cas des NPs. Cette entrée de la bléomycine plus facile ou dans plus de cellules des tumeurs est être en parfaite corrélation avec les mécanismes impliqués *in vitro* dans l'amplification locale du champ électrique par les GNPs (cf. conclusion de la partie 3).

DISCUSSION ET PERSPECTIVES

DISCUSSION ET PERSPECTIVES

Durant cette thèse, une nouvelle approche faisant intervenir des nanoparticules (NPs) conductrices a été proposée pour réduire le champ électrique, plus spécifiquement le voltage appliqué, tout en maintenant l'efficacité de l'ECT. La réduction du voltage appliqué est associée à l'amplification locale du champ électrique autour des NPs conductrices présentes à la surface des membranes cellulaires. Cette réduction du champ électrique devrait permettre de diminuer la douleur ressentie par les patients et également les contractions musculaires produites lors de l'exposition à des impulsions électriques, durant l'ECT.

En effet, la principale limite de l'ECT est associée à la sensation de douleur de la zone traitée, autrement-dit, de la région où l'électrode a touché la peau. Cette douleur est généralement ressentie pendant et après le traitement ECT. Par exemple, une étude a été réalisée pour prédire les risques de douleurs associées à l'ECT. Dans cette étude, la majorité des patients n'ont ressenti aucune douleur ou une douleur légère après l'ECT. En revanche, la douleur ressentie a été significativement associée à un fort champ électrique [352]. Cette douleur est plus forte dans les tissus très conducteurs (selon l'endroit de la tumeur). De plus, lorsqu'une plus grande partie de l'électrode à aiguille est immergée dans le tissu tumoral (par exemple dans le cas des métastases profondes), la douleur est amplifiée. Par ailleurs, il est important de noter que la douleur peut s'aggraver avec les traitements ECT répétés. Diverses autres études ont rapporté les pourcentages des douleurs causées par l'ECT (cf. II-9). Afin de diminuer cette douleur et améliorer l'ECT clinique, une approche faisant intervenir les nanoparticules conductrices a été proposée pour réduire le champ électrique local. Durant ma thèse, mon but était de valider l'hypothèse d'utiliser les nanoparticules conductrices en tant que nano amplificateurs du champ électrique afin de pouvoir réduire le voltage appliqué. Pour cela, l'utilisation des NPs conductrices dans le but d'amplifier le champ électrique a été étudié *in vitro* d'une façon approfondie avant de passer à l'étude *in vivo*.

1. Importance du contact physique entre les NPs conductrices et les membranes des cellules cancéreuses pour amplifier le champ électrique local

Durant l'étude *in vitro*, les cellules cancéreuses adhérentes ont été étudiées comme modèles afin de se rapprocher des propriétés des cellules tumorales en conditions physiologiques. Des calculs numériques (COMSOL) (cf. Matériel et méthodes de l'article 1) ont été réalisés au début de ma thèse, et ont prédit qu'afin d'amplifier localement le champ électrique autour des NPs conductrices, ces dernières doivent être en contact avec la membrane des cellules. En vue de cette importance du contact NPs/membranes cellulaires, différentes méthodes d'interaction ont été étudiées entre les NPs conductrices et les cellules. En utilisant des cellules adhérentes, la stratégie d'accumulation des NPs conductrices à la surface des cellules par sédimentation était la première technique à adopter. Afin d'avoir des NPs à la surface des cellules sans qu'elles soient internalisées, la stratégie de sédimentation correspondait à incuber les cellules avec les NPs à 4°C. Etant donné que l'endocytose est quasiment bloquée à basse température (4°C)[353], [354], l'accumulation des NPs à la surface des cellules a été produite par sédimentation (par gravité) à 4°C. Bien que les tests d'efficacité de clonage aient confirmé l'augmentation des effets du champ électrique, en incubant les cellules avec les NPs d'or 3h à 4°C, cette stratégie de sédimentation demeure limitante pour la suite de mon projet de thèse. L'accumulation des NPs conductrices à la surface des cellules a ensuite été produite par application d'un champ électrophorétique. Ce dernier avait essentiellement pour but de pousser les NPs à la surface des cellules par électrophorèse. Cette deuxième stratégie a permis de réduire le temps d'incubation (de 3h à 1h) nécessaire pour avoir un contact étroit *in vitro* entre les NPs et les membranes cellulaires et d'améliorer l'amplification du champ électrique au niveau de la membrane. Un deuxième train d'impulsions qui a pour but de perméabiliser les cellules a été appliqué après l'ajout de la bléomycine afin de pouvoir étudier l'effet des NPs sur l'électroperméabilisation des cellules. En suivant cette stratégie d'électrophorèse, l'augmentation de la perméabilisation a été également confirmée. Bien que les phénomènes d'endocytoses soient bloqués à 4°C, les interactions des constituants de la membrane avec le milieu extracellulaire ne sont pas inhibées. En adoptant les deux stratégies (sédimentation et électrophorèse) de rapprochement des NPs par rapport aux membranes cellulaires, l'interaction NPs/membrane

semblait être étroite (selon les images TEM). De plus, les NPs conductrices utilisées présentaient des charges à leur surface qui leur permettent non seulement d'être transportées par un champ électrique mais aussi d'interagir avec les constituants de la membrane

Etant donné que les NPs sont chargées négativement et la membrane cellulaire est aussi chargée négativement, on pourrait se demander sur la nature de l'interaction entre les NPs et la membrane. Bien que les NPs chargées positivement devraient être plus attirés par la membrane des cellules (attraction électrostatique), Torino et al [355] ont montré que l'interaction des NPs d'or chargées négativement avec un modèle de membrane lipidique (le dipalmitoylphosphatidyl glycérol (DPPG) chargé négativement) est purement électrostatique. Ils soulignent que ce contact provient de l'interaction entre l'ion Na^+ et le DPPG, lorsque les NPs d'or sont présentes dans une solution de citrate de sodium. Ces chercheurs mentionnent également que les charges négatives affectent les propriétés des lipides en raison de l'influence des contre-ions et que l'interaction des NPs chargées négativement avec la membrane provient essentiellement de la nature des contre-ions. Cette observation est en parfaite corrélation avec l'article de Giljohan et al [356], où ils montrent que plus les protéines extracellulaires sont adsorbées à la surface des NPs d'or, plus l'interaction entre les NPs et la membrane plasmique et donc l'internalisation sont améliorées. Hu et al [357] ont montré qu'une forte interaction électrostatique entre les NPs d'or chargées négativement et les têtes des phospholipides est capable de déclencher un flip-flop. Cependant, il a été démontré que les NPs revêtues d'un ligand neutre, le poly (éthylène glycol) (PEG), n'interagissent pas avec la membrane en raison de la répulsion stérique créée par le PEG [358]. En effet, mise à part son rôle de prévention d'agrégation entre les NPs, autour des NPs PEGylées, une couche d'eau est créée (en raison de la présence de l'OH à l'extrémité du PEG) qui rend les NPs hydrophobes et empêche leur interaction avec les lipides membranaires, qui sont lipophiles. De plus, lors de mes travaux, la masse du PEG utilisée (5000Da) était suffisamment longue pour permettre une interaction entre la NP et la membrane. Ceci a été confirmé par Needham et al [359], où ils soulignent une répulsion stérique entre des molécules de PEG qui sont greffées sur une surface et les phospholipides, sachant que le PEG a une masse de 750 Da. Ainsi, on pourrait confirmer que dans le cas des GNPs incubés 3h à 4°C, la présence des NPs d'or dans le milieu de culture favorise l'agrégation et l'adsorption des contre-ions, d'où le contact étroit entre les NPs et la membrane (observé sur TEM). Malgré les études rapportées dans la littérature, on ne peut

pas affirmer que l'interaction des GNPs avec la membrane des cellules (observé sur les TEM) est purement électrostatique, elle pourrait aussi correspondre à un simple contact physique obtenu par sédimentation. En revanche, dans le cas des NPs PEGylées, dans les mêmes conditions et en suivant la même stratégie de sédimentation, ces NPs semblaient être repoussées de la membrane (aucune augmentation de l'électroporation). D'une manière intéressante, malgré cette répulsion stérique, l'application d'un champ électrophorétique nous a permis de pousser ces NPs PEGylées à la surface, ce qui souligne l'importance de cette stratégie.

Par ailleurs, en combinant les deux stratégies de rapprochement des NPs (sédimentation et électrophorèse), l'effet amplificateur du champ électrique par les NPs conductrices a été significativement amélioré, comparativement à la condition où une seule des deux stratégies est appliquée (en utilisant les mêmes NPs d'or). Ce résultat confirme l'importance de l'interaction des NPs avec la membrane pour amplifier le champ électrique.

2. Importance du choix du type des NPs conductrices pour amplifier localement le champ électrique

Afin de caractériser l'impact des NPs conductrices sur le champ électrique, différentes formes et matériaux ont été étudiées. Dans la littérature, la taille optimale des NP d'or utilisées est de l'ordre 50 nm [360]. En effet, les NPs ayant un diamètre aux alentours de 10 nm, sont rapidement éliminées par les reins. Les nanoparticules ayant un diamètre supérieur à 200 nm sont capables d'activer le système réticulo-endothélial et sont par conséquent rapidement éliminées de la circulation sanguine [361]. De plus, les NP d'or d'une taille d'environ 50 nm semblent être moins toxiques pour les cellules. Etant biocompatibles et conductrices, les NPs d'or sphériques (40nm) sont les NPs conductrices standard utilisées durant cette thèse. En conservant la forme sphérique, deux autres types de nanoparticules ont été explorées (les NPs de platine et les NPs de silice). Etant conductrices, l'amplification du champ électrique médiée par les NPs de platine a été testée et comparée aux NPs d'or. Ces NPs de platine ont confirmé la nécessité d'avoir un matériel conducteur pour augmenter l'effet du champ électrique appliqué et donc améliorer l'électroporation des cellules. Etant non conductrices, les NPs de silice ont été testées dans les mêmes conditions que les NPs d'or. Ces NPs de silice n'ont montré aucune augmentation de l'électroporation, bien que les particules étaient en contact étroit avec les membranes cellulaires. Ce résultat confirme

encore que l'effet amplificateur du champ électrique local créé par les NPs provient principalement du matériel conducteur, afin de pouvoir concentrer le champ électrique autour d'elles. Par ailleurs, des NPs d'oxyde de fer (supramagnetic iron oxide NPs) ont été également étudiées. En vue de leurs propriétés magnétiques, ces NPs ont été ramenées mécaniquement à la surface des cellules à l'aide d'un aimant. Bien que ces NPs soient conductrices et collées à la membrane cellulaire, ces NPs ont montré une légère augmentation de l'électroporation non significative, qui a été révélée par un test d'efficacité de clonage. Bien que les NPs d'oxyde de fer soient plus conductrices que les NPs de platine, ces dernières ont montré un effet significatif sur l'amplification du champ électrique. L'absence de l'effet amplificateur des NPs d'oxyde de fer peut s'expliquer par le fait que quand les NPs sont attirées (instantanément) vers la surface des cellules par un champ magnétique extérieur (ayant une force de 48.7 Newton), les cellules peuvent être stressées et donc la différence d'effets en présence et en absence des NPs conductrices d'oxyde de fer est amoindrie. De plus, la centrifugation des cellules adhérentes avec les NPs d'or (sous forme d'agrégats) pendant 5 minutes a été testée (cf. section supplementary de l'article 1), dans le but d'accélérer la stratégie de sédimentation. Dans ce cas de figure, les NPs d'or n'ont montré aucune augmentation de l'électroporation, par comparaison avec le cas des cellules sans NPs. Ce résultat confirme la nécessité d'avoir une interaction électrostatique et non pas un déplacement mécanique (par aimant ou par centrifugation) entre les NPs et la membrane cellulaire, afin que les NPs amplifient autour d'elle le champ électrique externe. En changeant la forme des NPs mais en gardant le même matériel conducteur, les NPs d'or sous forme d'étoiles confirment encore que l'effet amplificateur du champ électrique provient essentiellement du matériel conducteur de l'or. De plus, des simulations COMSOL ont été réalisées sur des cellules en présence des NPs d'or sous forme d'étoiles. Théoriquement, ces NPs d'or sous forme d'étoiles causent une amplification du champ électrique local plus importante que les NPs d'or sphériques. Cette amplification plus élevée provient de la concentration du champ électrique au niveau de la pointe des NPs étoilées (figure non montrée). Ces résultats confirment que l'effet amplificateur est liée principalement à la nature du matériel, qui est l'or. Pour toutes ces raisons, les NPs d'or ont été choisies comme candidat pour la suite de ma thèse.

3. Importance de la distribution des NPs d'or

Par ailleurs, il est important de noter que la concentration du champ électrique autour des NPs conductrices varie selon la taille des NPs présentes à la surface des membranes. En effet, l'amélioration de l'électroporation révélée par l'amplification de l'effet du champ électrique a été observé non seulement en présence d'agrégats de NPs conductrices mais également en présence de ces mêmes NPs individuelles (revêtues par le polyéthylène glycol (PEG)). Selon les simulations COMSOL, réalisées sur des NPs d'or sphérique présentes près de la membrane (cf. article 1), les NPs isolées concentrent mieux le champ électrique autour d'elles et donc amplifient plus son effet, comparativement aux NPs agrégées. Ainsi, on peut confirmer que l'application du champ électrique est influencée non seulement par le nombre total de NPs (agrégées ou isolées) mais également par la présence de NPs conductrices isolées près de la membrane cellulaire. Par ailleurs, en suivant le raisonnement de l'électrophorèse des NPs conductrices, les NPs isolées ont davantage augmenté l'effet du champ électrique comparativement aux NPs agrégées. En ayant la même charge globale, les NPs d'or PEGylées améliorent plus l'électroporation non pas par ce que l'électrophorèse des NPs isolées est plus simple que l'électrophorèse d'un agrégat des NPs mais parce que l'effet d'amplification du champ électrique est bien plus important autour des NPs isolées.

Le revêtement des NPs d'or par le PEG nous a permis non seulement d'améliorer l'effet du champ électrique sur les cellules mais aussi d'avancer vers l'étude *in vivo*. En effet, la PEGylation des NPs nous a permis de réduire l'agrégation des NPs d'or (sphérique et sous forme d'étoiles), tout en conservant une charge globale des NPs nécessaire pour créer un champ électrophorétique et de pouvoir rapprocher les NPs isolées à la surface des tumeurs. En effet, en suivant ce raisonnement, la présence des NPs conductrices a conduit à une amélioration significative de l'ECT, par comparaison aux tumeurs sans NPs. Cette amélioration de l'électroporation *in vivo* a été observée aussi bien avec les NPs d'or sphériques et sous forme d'étoiles, ce qui confirme davantage le potentiel de l'or à concentrer localement le champ électrique. Afin de comprendre les mécanismes impliqués dans l'amplification du champ électrique en présence des NPs conductrices *in vitro* et *in vivo*, les cinétiques de refermeture des cellules révélées indirectement par un marqueur perméabilisant ou un fluorophore, ont été étudiées *in vitro*. Ces cinétiques de refermeture des électropores étaient plus lentes par comparaison aux cellules sans NPs. Ces résultats préliminaires *in vitro* suggèrent qu'en présence des NPs conductrices, le champ électrique

autour d'elles au niveau de la membrane est concentré et donc le champ électrique est localement amplifié. En présence d'une forte intensité locale du champ électrique, cette amplification du champ médiée par les NPs pourrait créer plus de dégâts au niveau de la membrane cellulaire. En plus des effets induits par les impulsions électriques (pores), ces NPs pourraient contribuer au maintien de défauts causés par l'électroporation. Ainsi, les NPs participeraient à garder les pores ouverts plus longtemps ou créer plus de pores. Dans les deux cas, le médicament cytotoxique et le fluorophore rentreraient plus et donc l'électroporation est améliorée en présence des NPs conductrices. Afin d'expliquer cet effet, deux hypothèses pourraient être émises. La première hypothèse est qu'on pourrait suggérer que la présence des NPs conductrices est associée à celle des ROS. Dans ce cas, ces NPs seraient-elles capables de générer des ROS qui vont induire par la suite des dommages dans les lipides insaturés de la membrane et augmenter ainsi la perméabilité de la membrane. Dans la littérature, il a été démontré que les NPs d'or sont capables de générer des ROS. Par exemple, Ramalingam et al [362] ont montré que l'internalisation des NPs d'or (37nm) à l'intérieur des cellules humaines du cancer des poumons induit l'apoptose de ces cellules. En effet, ces NPs d'or induisent un stress oxydatif au niveau de la membrane mitochondriale (détecté par la Rhodamine 123 stain, un marqueur fluorescent sensible au potentiel transmembranaire de la membrane mitochondriale). Ainsi, la mitochondrie va à son tour déclencher l'apoptose. De plus, l'analyse du cycle cellulaire a montré que les NPs d'or arrêtent le cycle cellulaire en phase G0 / G2 de ces cellules. Par ailleurs, Raji et al [363] ont confirmé cette observation. Ces chercheurs ont montré que l'irradiation des NPs d'or présentes dans des cellules cancéreuses A431, induit la mort cellulaire. Une fois excitées par le laser, ces NPs d'or vont générer des ROS qui vont induire l'apoptose d'une manière indirecte (c'est-à-dire via le déclenchement de l'activité caspase-3). Diverses autres études ont confirmé la génération des ROS par les NPs d'or *in vitro* et *in vivo* [364]–[366]. Bien que la génération des ROS par les NPs d'or a été rapportée, dans la littérature, lorsque ces NPs sont à l'intérieur de la cellule et que dans la plupart des études, elles sont excitées par un champ électromagnétique, on ne peut pas négliger l'hypothèse que, dans notre cas, les NPs d'or peuvent aussi contribuer à ramener à la surface ou induire des ROS au niveau de la membrane. De plus, il a été démontré que l'électroperméabilisation des cellules est associée à l'oxydation des lipides par des ROS (cf. II-3.2). Par ailleurs, la deuxième hypothèse qui pourrait expliquer le retard de fermeture des électropores en présence des NPs est la suivante. En raison du contact physique observée entre les NPs et la membrane cellulaire, la présence

des NPs pourrait bloquer la refermeture des électropores et donc empêcherait la cellule à revenir à son état initial, d'où l'entrée massive du médicament cytotoxique et du fluorophore. D'une façon intéressante, cette amplification du champ électrique peut jouer sur la durée des électropores et donc contribue à l'amélioration de l'ECT avec un champ électrique réduit.

4. Perspectives

À présent, ce qui suscite principalement notre intérêt est de tester la réduction du champ électrique local en présence des NPs conductrices. Etant donné que les NPs conductrices ont amélioré *in vivo* l'électroporation, il est intéressant de tester cet effet amplificateur en réduisant le champ électrique appliquée aux tumeurs, en présence des NPs conductrices. Ainsi, la croissance tumorale serait comparée à deux voltages différents du champ électriques, soit à un voltage faible en présence des NPs conductrices soit à un voltage plus fort en absence des NPs. Cette expérience devrait permettre d'estimer le taux de réduction du voltage médiée par ces nano amplificateurs.

En réduisant le voltage appliqué, divers facteurs peuvent contribuer à l'amélioration de l'ECT. Premièrement, cette réduction du champ électrique pourrait participer de minimiser les procédures liées au pré-ECT (notamment les dispositifs d'application d'impulsions, nécessité de fabrication d'électrodes spécifiques aux tumeurs, dans certains cas). Deuxièmement, en utilisant des NPs conductrices et en diminuant l'intensité du champ électrique appliqué, l'homogénéité des lignes du champ pourrait être améliorée. Etant donné que le champ électrique appliqué n'est pas homogène au niveau de la tumeur et surtout au centre de la tumeur (vu que les électrodes sont plutôt placées à la périphérie), les NPs conductrices injectées dans le centre de la tumeur vont concentrer d'une façon locale ce champ électrique. Ainsi, la couverture de tout le tissu tumoral par le champ électrique pourrait être améliorée dans la zone où le courant n'était pas suffisant pour perméabiliser les cellules. Ceci contribuerait à l'amélioration des réponses de l'ECT. Troisièmement, en amplifiant le champ électrique local et en améliorant l'effet de l'ECT, la nécessité de répéter le traitement pourrait être amoindrie. L'ensemble de tous ces avantages conduirait à une baisse de la douleur produite par l'ECT et contribuerait à rendre son utilisation beaucoup plus répandue en clinique.

En diminuant l'amplitude du champ électrique on pourrait espérer une disparition complète des effets nocifs produits sur les tissus non ciblés (tissus voisins sains). De plus, le ciblage actif des tissus tumoraux par les NPs conductrices contribuerait à l'amélioration de l'ECT mais également à minimiser les effets secondaires sur les tissus sains.

5. Conclusion

Pour conclure, l'ensemble de nos résultats indique que les NPs conductrices agissent comme des nano amplificateurs et permettent l'amélioration de l'électroporation. Cette augmentation d'électroporation est associée à l'amplification local de l'effet du champ électrique. Durant ma thèse, cet effet amplificateur a été prouvé *in vitro* et *in vivo*. L'étude *in vitro* nous a permis d'adopter la condition de rapprochement optimal entre les NPs et la membrane cellulaire, afin d'augmenter l'intensité du champ électrique localement autour des NPs. La capacité à amplifier le champ électrique local par différents NPs a été étudié, afin de pouvoir reproduire l'effet amplificateur en utilisant les propriétés appropriées de ces NPs *in vivo*. Durant l'étude *in vivo*, l'augmentation d'électroporation des cellules a été validée en utilisant deux types de NPs conductrices (NPs d'or sphériques et sous forme d'étoiles). Tous les résultats obtenus ont été vérifiés avec des images TEM afin de confirmer la présence des NPs conductrices durant l'électroporation. Finalement, en continuant ces travaux, la réduction du voltage appliqué permettra de diminuer les limites de l'ECT et donc l'améliorer et la rendre plus diffuse pour les traitements du cancer.

BIBLIOGRAPHIE

BIBLIOGRAPHIE

- [1] F. Cainelli and Vallone, "Safety and efficacy of pegylated liposomal doxorubicin in HIV-associated Kaposi's sarcoma," *Biol. Targets Ther.*, vol. 3, p. 385, Aug. 2009.
- [2] M. Harrison, D. Tomlinson, and S. Stewart, "Liposomal-entrapped doxorubicin: An active agent in AIDS-related Kaposi's sarcoma," *J. Clin. Oncol.*, vol. 13, no. 4, pp. 914–920, Apr. 1995.
- [3] D. W. Nyman *et al.*, "Phase I and pharmacokinetics trial of ABI-007, a novel nanoparticle formulation of paclitaxel in patients with advanced nonhematologic malignancies," *J. Clin. Oncol.*, vol. 23, no. 31, pp. 7785–7793, Nov. 2005.
- [4] E. Miele, G. P. Spinelli, E. Miele, F. Tomao, and S. Tomao, "Albumin-bound formulation of paclitaxel (Abraxane® ABI-007) in the treatment of breast cancer," *International Journal of Nanomedicine*, vol. 4, no. 1. Dove Press, pp. 99–105, 2009.
- [5] T. Sun, Y. S. Zhang, B. Pang, D. C. Hyun, M. Yang, and Y. Xia, "Engineered Nanoparticles for Drug Delivery in Cancer Therapy," *Angew. Chemie Int. Ed.*, vol. 53, no. 46, p. n/a-n/a, Oct. 2014.
- [6] A. Z. Wang, R. Langer, and O. C. Farokhzad, "Nanoparticle Delivery of Cancer Drugs," *Annu. Rev. Med.*, vol. 63, no. 1, pp. 185–198, Feb. 2012.
- [7] "Nanomedicine in Action: An Overview of Cancer Nanomedicine on the Market and in Clinical Trials." [Online]. Available: <https://www.hindawi.com/journals/jnm/2013/629681/?viewtype=print&viewclass=print>. [Accessed: 06-Apr-2020].
- [8] K. Cho, X. Wang, S. Nie, Z. Chen, and D. M. Shin, "Therapeutic nanoparticles for drug delivery in cancer," *Clinical Cancer Research*, vol. 14, no. 5. American Association for Cancer Research, pp. 1310–1316, 01-Mar-2008.
- [9] R. Sinha, G. J. Kim, S. Nie, and D. M. Shin, "Nanotechnology in cancer therapeutics: Bioconjugated nanoparticles for drug delivery," *Molecular Cancer Therapeutics*, vol. 5, no. 8. American Association for Cancer Research, pp. 1909–1917, 01-Aug-2006.
- [10] B. Haley and E. Frenkel, "Nanoparticles for drug delivery in cancer treatment," *Urologic Oncology: Seminars and Original Investigations*, vol. 26, no. 1. Elsevier, pp. 57–64, 01-Jan-2008.
- [11] S. Guo and L. Huang, "Nanoparticles containing insoluble drug for cancer therapy," *Biotechnology Advances*, vol. 32, no. 4. Elsevier Inc., pp. 778–788, 01-Jul-2014.
- [12] S. Gelperina, K. Kisich, M. D. Iseman, and L. Heifets, "The potential advantages of nanoparticle drug delivery systems in chemotherapy of tuberculosis," *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, vol. 172, no. 12. pp. 1487–1490, Dec-2005.
- [13] V. V. Mody, A. Cox, S. Shah, A. Singh, W. Bevins, and H. Parihar, "Magnetic nanoparticle drug delivery systems for targeting tumor," *Applied Nanoscience (Switzerland)*, vol. 4, no. 4. Springer Nature, pp. 385–392, 01-Apr-2014.
- [14] R. Singh and J. W. Lillard, "Nanoparticle-based targeted drug delivery," *Experimental and Molecular Pathology*, vol. 86, no. 3. pp. 215–223, Jun-2009.
- [15] N. R. Popova, A. L. Popov, A. B. Shcherbakov, and V. K. Ivanov, "Layer-by-layer capsules as smart delivery systems of CeO₂ nanoparticle-based theranostic agents," *Nanosyst. Physics, Chem. Math.*, vol. 8, pp. 282–289, Apr. 2017.
- [16] M. D. Mauricio *et al.*, "Nanoparticles in medicine: A focus on vascular oxidative stress," *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, vol. 2018. Hindawi Limited, 2018.
- [17] P. A. Stapleton and T. R. Nurkiewicz, "Vascular distribution of nanomaterials," *Wiley Interdiscip. Rev. Nanomedicine Nanobiotechnology*, vol. 6, no. 4, pp. 338–348, Jul. 2014.
- [18] R. Ghosh Chaudhuri and S. Paria, "Core/shell nanoparticles: Classes, properties, synthesis mechanisms, characterization, and applications," *Chemical Reviews*, vol. 112, no. 4. pp. 2373–2433, 11-Apr-2012.
- [19] B. D. Chithrani and W. C. W. Chan, "Elucidating the Mechanism of Cellular Uptake and Removal of

- Protein-Coated Gold Nanoparticles of Different Sizes and Shapes,” *Nano Lett.*, vol. 7, no. 6, pp. 1542–1550, Jun. 2007.
- [20] Y. Panahi *et al.*, “Recent advances on liposomal nanoparticles: synthesis, characterization and biomedical applications,” *Artif. Cells, Nanomedicine, Biotechnol.*, vol. 45, no. 4, pp. 788–799, May 2017.
- [21] Y. Malam, M. Loizidou, and A. M. Seifalian, “Liposomes and nanoparticles: nanosized vehicles for drug delivery in cancer,” *Trends in Pharmacological Sciences*, vol. 30, no. 11. Elsevier Current Trends, pp. 592–599, 01-Nov-2009.
- [22] L. A. Kelly and M. Plains, “Liposome drug delivery systems,” Jun. 1981.
- [23] A. Sharma and U. S. Sharma, “international journal of pharmaceutics Review Liposomes in drug delivery: progress and limitations,” 1997.
- [24] A. Sharma, N. L. Straubinger, and R. M. Straubinger, “Modulation of Human Ovarian Tumor Cell Sensitivity to N-(Phosphonacetyl)-L-Aspartate (PALA) by Liposome Drug Carriers,” *Pharm. Res. An Off. J. Am. Assoc. Pharm. Sci.*, vol. 10, no. 10, pp. 1434–1441, 1993.
- [25] “Enhanced Gene Delivery and Mechanism Studies With a Novel Series of Cationic Lipid Formulations - PubMed.” [Online]. Available: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8300583/>. [Accessed: 04-May-2020].
- [26] Y. Malam, M. Loizidou, and A. M. Seifalian, “Liposomes and nanoparticles: nanosized vehicles for drug delivery in cancer,” *Trends in Pharmacological Sciences*, vol. 30, no. 11. pp. 592–599, Nov-2009.
- [27] M. S. Muthu and S.-S. Feng, “Theranostic liposomes for cancer diagnosis and treatment: current development and pre-clinical success,” *Expert Opin. Drug Deliv.*, vol. 10, no. 2, pp. 151–155, Feb. 2013.
- [28] V. Torchilin, “Antibody-modified liposomes for cancer chemotherapy,” *Expert Opinion on Drug Delivery*, vol. 5, no. 9. Taylor & Francis, pp. 1003–1025, Sep-2008.
- [29] P. Sapra, P. Tyagi, and T. Allen, “Ligand-Targeted Liposomes for Cancer Treatment,” *Curr. Drug Deliv.*, vol. 2, no. 4, pp. 369–381, Oct. 2005.
- [30] G. A. Reineccius, “Liposomes for Controlled Release in the Food Industry,” 1995, pp. 113–131.
- [31] H. R. Ahmadi Ashtiani, P. Bishe, N.-A. Lashgari, M. A. Nilforoushzadeh, and S. Zare, “Liposomes in Cosmetics,” *J. Ski. Stem Cell*, vol. 3, no. 3, Jun. 2016.
- [32] T. Bhatia *et al.*, “Preparing giant unilamellar vesicles (GUVs) of complex lipid mixtures on demand: Mixing small unilamellar vesicles of compositionally heterogeneous mixtures,” *Biochim. Biophys. Acta - Biomembr.*, vol. 1848, no. 12, pp. 3175–3180, Dec. 2015.
- [33] A. Witkowska, L. Jablonski, and R. Jahn, “A convenient protocol for generating giant unilamellar vesicles containing SNARE proteins using electroformation,” *Sci. Rep.*, vol. 8, no. 1, pp. 1–8, Dec. 2018.
- [34] E. A. Belenkov and V. A. Greshnyakov, “Classification schemes for carbon phases and nanostructures,” *Xinxing Tan Cailiao/New Carbon Mater.*, vol. 28, no. 4, pp. 273–282, 2013.
- [35] “Single-shell carbon nanotubes of 1-nm diameter Sumio Iijima 8c Toshinari Ichihashi,” 1993.
- [36] Á. Kukovecz, G. Kozma, and Z. Kónya, “Multi-walled carbon nanotubes,” in *Springer Handbook of Nanomaterials*, Springer Berlin Heidelberg, 2013, pp. 147–188.
- [37] B. Ribeiro, E. C. Botelho, M. L. Costa, and C. F. Bandeira, “Carbon nanotube buckypaper reinforced polymer composites: A review,” *Polimeros*, vol. 27, no. 3. Associacao Brasileira de Polimeros, pp. 247–255, 01-Sep-2017.
- [38] M. S. Dresselhaus, G. Dresselhaus, J. C. Charlier, and E. H E R N ´ A N D E Z, “Electronic, thermal and mechanical properties of carbon nanotubes.”
- [39] J. Robertson, “Growth of nanotubes for electronics,” *Materials Today*, vol. 10, no. 1–2. pp. 36–43, Jan-2007.
- [40] M. Paradise and T. Goswami, “Carbon nanotubes - Production and industrial applications,” *Mater.*

- Des., vol. 28, no. 5, pp. 1477–1489, 2007.
- [41] P. G. Collins and P. Avouris, “Nanotubes for Electronics,” *Scientific American*, vol. 283. Scientific American, a division of Nature America, Inc., pp. 62–69, 2000.
 - [42] M. Schulz *et al.*, “Carbon nanotube responsive materials and applications,” *Access Sci.*, 2012.
 - [43] N. W. S. Kam, M. O’Connell, J. A. Wisdom, and H. Dai, “Carbon nanotubes as multifunctional biological transporters and near-infrared agents for selective cancer cell destruction,” *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 102, no. 33, pp. 11600–11605, Aug. 2005.
 - [44] A. A. Bhirde *et al.*, “Targeted killing of cancer cells in vivo and in vitro with EGF-directed carbon nanotube-based drug delivery,” *ACS Nano*, vol. 3, no. 2, pp. 307–316, Feb. 2009.
 - [45] N. G. Sahoo *et al.*, “Functionalized carbon nanomaterials as nanocarriers for loading and delivery of a poorly water-soluble anticancer drug: A comparative study,” *Chem. Commun.*, vol. 47, no. 18, pp. 5235–5237, Apr. 2011.
 - [46] M. S. Digge, R. S. Moon, and S. G. Gattani, “Application of Carbon Nanotubes in Drug Delivery: A Review.” 2012.
 - [47] F. Zhou, D. Xing, Z. Ou, B. Wu, D. E. Resasco, and W. R. Chen, “Cancer photothermal therapy in the near-infrared region by using single-walled carbon nanotubes,” *J. Biomed. Opt.*, vol. 14, no. 2, p. 021009, 2009.
 - [48] C. Fabbro, H. Ali-Boucetta, T. Da Ros, A. Bianco, K. Kostarelos, and M. Prato, “Targeting carbon nanotubes against cancer,” *Chem. Commun.*, vol. 48, no. 33, pp. 3911–3926, Mar. 2012.
 - [49] S. Y. Madani, N. Naderi, O. Dissanayake, A. Tan, and A. M. Seifalian, “A new era of cancer treatment: carbon nanotubes as drug delivery tools,” *International journal of nanomedicine*, vol. 6. Dove Press, pp. 2963–2979, 2011.
 - [50] “(PDF) Synthesis and Applications of Platinum Nanoparticles: A Review.” [Online]. Available: https://www.researchgate.net/publication/275768797_Synthesis_and_Applications_of_Platinum_Nanoparticles_A_Review. [Accessed: 10-Mar-2020].
 - [51] A. T. Bell, “The impact of nanoscience on heterogeneous catalysis,” *Science*, vol. 299, no. 5613. American Association for the Advancement of Science, pp. 1688–1691, 14-Mar-2003.
 - [52] “Platinum nanoparticles: a promising material for future cancer therapy? - IOPscience.” [Online]. Available: <https://iopscience.iop.org/article/10.1088/0957-4484/21/8/085103/meta>. [Accessed: 11-Mar-2020].
 - [53] P. V. Asharani, N. Xinyi, M. P. Hande, and S. Valiyaveetil, “DNA damage and p53-mediated growth arrest in human cells treated with platinum nanoparticles,” *Nanomedicine*, vol. 5, no. 1, pp. 51–64, Jan. 2010.
 - [54] M. Manikandan, N. Hasan, and H. F. Wu, “Platinum nanoparticles for the photothermal treatment of Neuro 2A cancer cells,” *Biomaterials*, vol. 34, no. 23, pp. 5833–5842, Jul. 2013.
 - [55] N. Tsapis, “Agents de contraste pour l’imagerie médicale - Les exemples de l’IRM et de l’ultrasonographie,” *médecine/sciences*, vol. 33, no. 1, pp. 18–24, Jan. 2017.
 - [56] E. D. Smolensky *et al.*, “Scaling laws at the nanosize: The effect of particle size and shape on the magnetism and relaxivity of iron oxide nanoparticle contrast agents,” *J. Mater. Chem. B*, vol. 1, no. 22, pp. 2818–2828, Jun. 2013.
 - [57] D. Pouliquen, J. J. Le Jeune, R. Perdrisot, A. Ermias, and P. Jallet, “Iron oxide nanoparticles for use as an MRI contrast agent: Pharmacokinetics and metabolism,” *Magn. Reson. Imaging*, vol. 9, no. 3, pp. 275–283, Jan. 1991.
 - [58] “Synthesis and characterization of PVP-coated large core iron oxide nanoparticles as an MRI contrast agent - IOPscience.” [Online]. Available: <https://iopscience.iop.org/article/10.1088/0957-4484/19/16/165101/meta>. [Accessed: 06-May-2020].
 - [59] R. Tietze *et al.*, “Magnetic nanoparticle-based drug delivery for cancer therapy,” *Biochemical and Biophysical Research Communications*, vol. 468, no. 3. Academic Press Inc., pp. 463–470, 18-Dec-2015.
 - [60] R. Tietze, S. Lyer, S. Dürr, and C. Alexiou, “Nanoparticles for cancer therapy using magnetic forces,”

- Nanomedicine*, vol. 7, no. 3. Future Medicine Ltd London, UK, pp. 447–457, 02-Mar-2012.
- [61] H. Unterweger *et al.*, “Hypericin-bearing magnetic iron oxide nanoparticles for selective drug delivery in photodynamic therapy,” *Int. J. Nanomedicine*, vol. 10, pp. 6985–6996, Nov. 2015.
 - [62] J. Estelrich, E. Escribano, J. Queralt, and M. Busquets, “Iron Oxide Nanoparticles for Magnetically-Guided and Magnetically-Responsive Drug Delivery,” *Int. J. Mol. Sci.*, vol. 16, no. 12, pp. 8070–8101, Apr. 2015.
 - [63] S. Lyer *et al.*, “Nanomedical innovation: the SEON-concept for an improved cancer therapy with magnetic nanoparticles,” *Nanomedicine*, vol. 10, no. 21, pp. 3287–3304, Nov. 2015.
 - [64] P. B. Santhosh and N. P. Ulrih, “Multifunctional superparamagnetic iron oxide nanoparticles: Promising tools in cancer theranostics,” *Cancer Letters*, vol. 336, no. 1. Elsevier, pp. 8–17, 09-Aug-2013.
 - [65] J. Gautier, E. Allard-Vannier, E. Munnier, M. Soucé, and I. Chourpa, “Recent advances in theranostic nanocarriers of doxorubicin based on iron oxide and gold nanoparticles,” *Journal of Controlled Release*, vol. 169, no. 1–2. Elsevier, pp. 48–61, 10-Jul-2013.
 - [66] T. Lam, P. Pouliot, P. K. Avti, F. Lesage, and A. K. Kakkar, “Superparamagnetic iron oxide based nanoprobe for imaging and theranostics,” *Advances in Colloid and Interface Science*, vol. 199–200. Elsevier B.V., pp. 95–113, 01-Nov-2013.
 - [67] W. Cha *et al.*, “Mesoporous Silica Nanoparticles as Carriers for Intracellular Delivery of Nucleic Acids and Subsequent Therapeutic Applications,” *Molecules*, vol. 22, no. 5, p. 782, May 2017.
 - [68] Y. Gao, C. Yang, X. Liu, R. Ma, D. Kong, and L. Shi, “A Multifunctional Nanocarrier Based on Nanogated Mesoporous Silica for Enhanced Tumor-Specific Uptake and Intracellular Delivery,” *Macromol. Biosci.*, vol. 12, no. 2, pp. 251–259, Feb. 2012.
 - [69] I. I. Slowing, B. G. Trewyn, and V. S. Y. Lin, “Mesoporous silica nanoparticles for intracellular delivery of membrane-impermeable proteins,” *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 129, no. 28, pp. 8845–8849, Jul. 2007.
 - [70] R. Mortera, J. Vivero-Escoto, I. I. Slowing, E. Garrone, B. Onida, and V. S. Y. Lin, “Cell-induced intracellular controlled release of membrane impermeable cysteine from a mesoporous silica nanoparticle-based drug delivery system,” *Chem. Commun.*, no. 22, pp. 3219–3221, Jun. 2009.
 - [71] J. F. Chen, H. M. Ding, J. X. Wang, and L. Shao, “Preparation and characterization of porous hollow silica nanoparticles for drug delivery application,” *Biomaterials*, vol. 25, no. 4, pp. 723–727, Feb. 2004.
 - [72] Ferrari, “Cosmetic composition comprising silica particles, reflecting particles, and at least one polymer, preparative processes, and uses thereof,” Apr. 2006.
 - [73] R. Peters *et al.*, “Presence of nano-sized silica during in vitro digestion of foods containing silica as a food additive,” *ACS Nano*, vol. 6, no. 3, pp. 2441–2451, Mar. 2012.
 - [74] Y.-X. Yang *et al.*, “Evaluation of the toxicity of food additive silica nanoparticles on gastrointestinal cells,” *J. Appl. Toxicol.*, vol. 34, no. 4, pp. 424–435, Apr. 2014.
 - [75] P. B. Santhosh and N. P. Ulrih, “Multifunctional superparamagnetic iron oxide nanoparticles: Promising tools in cancer theranostics,” *Cancer Letters*, vol. 336, no. 1. Elsevier, pp. 8–17, 09-Aug-2013.
 - [76] Z. Luo, J. Manders, and J. Yurek, “Television’s Quantum dots will be the next darling of TV manufacturers,” *IEEE Spectr.*, vol. 55, no. 3, Mar. 2018.
 - [77] S. T. Holgate, “Exposure, uptake, distribution and toxicity of nanomaterials in humans,” *Journal of Biomedical Nanotechnology*, vol. 6, no. 1. pp. 1–19, Feb-2010.
 - [78] “Physicochemical Properties of Nanomaterials: Implication in Associated Toxic Manifestations.” [Online]. Available: <https://www.hindawi.com/journals/bmri/2014/498420/#B22>. [Accessed: 20-Mar-2020].
 - [79] K. Donaldson and V. Stone, “Current hypotheses on the mechanisms of toxicity of ultrafine particles,” *Annali dell’Istituto Superiore di Sanita*, vol. 39, no. 3. pp. 405–410, 01-Jan-2003.
 - [80] A. Verma and F. Stellacci, “Effect of Surface Properties on Nanoparticle–Cell Interactions,” *Small*, vol. 6, no. 1, pp. 12–21, Jan. 2010.

- [81] S. Patil, A. Sandberg, E. Heckert, W. Self, and S. Seal, "Protein adsorption and cellular uptake of cerium oxide nanoparticles as a function of zeta potential," *Biomaterials*, vol. 28, no. 31, pp. 4600–4607, Nov. 2007.
- [82] S. Kralj, M. Rojnik, R. Romih, M. Jagodic, J. Kos, and D. Makovec, "Effect of surface charge on the cellular uptake of fluorescent magnetic nanoparticles," *J. Nanoparticle Res.*, vol. 14, no. 10, pp. 1–14, Sep. 2012.
- [83] M. Nazareus *et al.*, "In vitro interaction of colloidal nanoparticles with mammalian cells: What have we learned thus far?," *Beilstein J. Nanotechnol.*, vol. 5, no. 1, pp. 1477–1490, Sep. 2014.
- [84] F. Zhao, Y. Zhao, Y. Liu, X. Chang, C. Chen, and Y. Zhao, "Cellular Uptake, Intracellular Trafficking, and Cytotoxicity of Nanomaterials," *Small*, vol. 7, no. 10, pp. 1322–1337, May 2011.
- [85] R. H. Wu, T. P. Nguyen, G. W. Marquart, T. J. Miesen, T. Mau, and M. R. Mackiewicz, "A facile route to tailoring peptide-stabilized gold nanoparticles using glutathione as a synthon," *Molecules*, vol. 19, no. 5, pp. 6754–6775, 2014.
- [86] S. Rodrigues, M. Dionísio, C. R. López, and A. Grenha, "Biocompatibility of Chitosan Carriers with Application in Drug Delivery," *J. Funct. Biomater.*, vol. 3, no. 3, pp. 615–641, Sep. 2012.
- [87] Y. Pang *et al.*, "Biodegradable and biocompatible high elastic chitosan scaffold is cell-friendly both *in vitro* and *in vivo*," *Oncotarget*, vol. 8, no. 22, p. 35583, May 2017.
- [88] N. A. Alcantar, E. S. Aydil, and J. N. Israelachvili, "Polyethylene glycol-coated biocompatible surfaces," *J. Biomed. Mater. Res.*, vol. 51, no. 3, pp. 343–351, Sep. 2000.
- [89] S. M. Lai *et al.*, "Polyethylene glycol-based biocompatible and highly stable superparamagnetic iron oxide nanoclusters for magnetic resonance imaging," *J. Mater. Chem.*, vol. 22, no. 30, pp. 15160–15167, Aug. 2012.
- [90] M. M. Van Schooneveld *et al.*, "Improved Biocompatibility and Pharmacokinetics of Silica Nanoparticles by Means of a Lipid Coating: A Multimodality Investigation," *Nano Lett*, vol. 8, no. 8, pp. 2517–2525, 2008.
- [91] D. J. Shaw, *Introduction to colloid and surface chemistry*. 1992.
- [92] B. Vincent, "Introduction to Colloidal Dispersions," in *Colloid Science*, Oxford, UK: Blackwell Publishing Ltd., 2009, pp. 1–13.
- [93] "Investigations on the Theory of the Brownian Movement - Albert Einstein - Google Livres." [Online]. Available: https://books.google.fr/books?id=AOIVupH_hboC. [Accessed: 23-Mar-2020].
- [94] "Brownian motion." [Online]. Available: <http://www1.lsbu.ac.uk/water/Brownian.html>. [Accessed: 04-Jun-2020].
- [95] J. Israelachvili, "Intermolecular and surface forces," 2011.
- [96] A. Taketoshi and M. Haruta, "Size- and Structure-specificity in Catalysis by Gold Clusters," *Chem. Lett.*, vol. 43, no. 4, pp. 380–387, Apr. 2014.
- [97] M. Haruta, "Size-and support-dependency in the catalysis of gold," 1997.
- [98] Y. Niu, L. K. Yeung, and R. M. Crooks, "Size-selective hydrogenation of olefins by Dendrimer-encapsulated palladium nanoparticles," *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 123, no. 28, pp. 6840–6846, 2001.
- [99] M. Haruta, "Catalysis of gold nanoparticles deposited on metal oxides," *CATTECH*, vol. 6, no. 3, pp. 102–115, Jun. 2002.
- [100] R. Sardar, A. M. Funston, P. Mulvaney, and R. W. Murray, "Gold nanoparticles: Past, present, and future," *Langmuir*, vol. 25, no. 24, pp. 13840–13851, Dec. 2009.
- [101] X. C. Jiang, A. Brioude, and M. P. Pileni, "Gold nanorods: Limitations on their synthesis and optical properties," *Colloids Surfaces A Physicochem. Eng. Asp.*, vol. 277, no. 1–3, pp. 201–206, Apr. 2006.
- [102] X. Huang, S. Neretina, and M. A. El-Sayed, "Gold Nanorods: From Synthesis and Properties to Biological and Biomedical Applications," *Adv. Mater.*, vol. 21, no. 48, pp. 4880–4910, Dec. 2009.
- [103] B. Kong, J. H. Seog, L. M. Graham, and S. B. Lee, "Experimental considerations on the cytotoxicity of nanoparticles," *Nanomedicine*, vol. 6, no. 5, pp. 929–941, Jul-2011.

- [104] I. M. M. Paino, V. S. Marangoni, R. de C. S. de Oliveira, L. M. G. Antunes, and V. Zucolotto, "Cyto and genotoxicity of gold nanoparticles in human hepatocellular carcinoma and peripheral blood mononuclear cells," *Toxicol. Lett.*, vol. 215, no. 2, pp. 119–125, Nov. 2012.
- [105] J. Turkevich, P. C. Stevenson, and J. Hillier, "A study of the nucleation and growth processes in the synthesis of colloidal gold," *Discussions of the Faraday Society*, vol. 11, no. 0. The Royal Society of Chemistry, pp. 55–75, 01-Jan-1951.
- [106] G. Frens, "Particle size and sol stability in metal colloids," *Kolloid-Zeitschrift Zeitschrift für Polym.*, vol. 250, no. 7, pp. 736–741, Jul. 1972.
- [107] M. Henry, J.-P. Jolivet, and J. Livage, *De la solution à l'oxyde: condensation des cations en solution aqueuse, chimie de surface des oxydes (Savoirs actuels)*. EDP Sciences, 1994.
- [108] M. Brust, M. Walker, D. Bethell, D. J. Schiffrin, and R. Whyman, "Synthesis of thiol-derivatised gold nanoparticles in a two-phase liquid-liquid system," *J. Chem. Soc. Chem. Commun.*, no. 7, pp. 801–802, Jan. 1994.
- [109] A. Tiselius, "A new apparatus for electrophoretic analysis of colloidal mixtures," *Trans. Faraday Soc.*, vol. 33, no. 0, pp. 524–531, Jan. 1937.
- [110] Y. Elakneswaran, T. Nawa, and K. Kurumisawa, "Zeta potential study of paste blends with slag," *Cem. Concr. Compos.*, vol. 31, no. 1, pp. 72–76, Jan. 2009.
- [111] H. Li, S. Wei, C. Qing, and J. Yang, "Discussion on the position of the shear plane," *J. Colloid Interface Sci.*, vol. 258, no. 1, pp. 40–44, Feb. 2003.
- [112] S. Honary and F. Zahir, "Effect of zeta potential on the properties of nano-drug delivery systems - A review (Part 2)," *Trop. J. Pharm. Res.*, vol. 12, no. 2, pp. 265–273, Apr. 2013.
- [113] D. Berti and G. Palazzo, *Colloidal foundations of nanoscience*. .
- [114] L. H. Bac, J. S. Kim, and J. C. Kim, "Size, optical and stability properties of gold nanoparticles synthesized by electrical explosion of wire in different aqueous media," 2011.
- [115] R. W. O'Brien and L. R. White, "Electrophoretic mobility of a spherical colloidal particle," *Journal of the Chemical Society, Faraday Transactions 2: Molecular and Chemical Physics*, vol. 74, no. 0. The Royal Society of Chemistry, pp. 1607–1626, 01-Jan-1978.
- [116] B. J. Kirby and E. F. Hasselbrink, "Zeta potential of microfluidic substrates: 1. Theory, experimental techniques, and effects on separations," *Electrophoresis*, vol. 25, no. 2, pp. 187–202, Jan. 2004.
- [117] H. Ohshima, *Biophysical chemistry of biointerfaces*. Wiley, 2010.
- [118] Q. Chang, *Colloid and interface chemistry for water quality control*. .
- [119] S. Bhattacharjee, "DLS and zeta potential - What they are and what they are not?," *Journal of Controlled Release*, vol. 235. Elsevier B.V., pp. 337–351, 10-Aug-2016.
- [120] G. Maulucci, M. De Spirito, G. Arcovito, F. Boffi, A. C. Castellano, and G. Briganti, "Particle distribution in DMPC vesicles solutions undergoing different sonication times," *Biophys. J.*, vol. 88, no. 5, pp. 3545–3550, May 2005.
- [121] Z. Varga *et al.*, "Towards traceable size determination of extracellular vesicles," *J. Extracell. Vesicles*, vol. 3, no. 1, pp. 1–10, Jan. 2014.
- [122] E. Boisselier and D. Astruc, "Gold nanoparticles in nanomedicine: Preparations, imaging, diagnostics, therapies and toxicity," *Chemical Society Reviews*, vol. 38, no. 6. The Royal Society of Chemistry, pp. 1759–1782, 27-May-2009.
- [123] P. Ghosh, G. Han, M. De, C. K. Kim, and V. M. Rotello, "Gold nanoparticles in delivery applications," *Advanced Drug Delivery Reviews*, vol. 60, no. 11. Elsevier, pp. 1307–1315, 17-Aug-2008.
- [124] I. Fratoddi, I. Venditti, C. Cametti, and M. V. Russo, "Gold nanoparticles and gold nanoparticle-conjugates for delivery of therapeutic molecules. Progress and challenges," *Journal of Materials Chemistry B*, vol. 2, no. 27. Royal Society of Chemistry, pp. 4204–4220, 21-Jul-2014.
- [125] D. P. Cormode, P. A. Jarzyna, W. J. M. Mulder, and Z. A. Fayad, "Modified natural nanoparticles as contrast agents for medical imaging," *Advanced Drug Delivery Reviews*, vol. 62, no. 3. Elsevier, pp. 329–338, 08-Mar-2010.

- [126] S. Ahn, S. Jung, and S. Lee, "Gold Nanoparticle Contrast Agents in Advanced X-ray Imaging Technologies," *Molecules*, vol. 18, no. 5, pp. 5858–5890, May 2013.
- [127] A. Herskovic *et al.*, "Combined Chemotherapy and Radiotherapy Compared with Radiotherapy Alone in Patients with Cancer of the Esophagus," *N. Engl. J. Med.*, vol. 326, no. 24, pp. 1593–1598, Jun. 1992.
- [128] P. G. Rose *et al.*, "Concurrent Cisplatin-Based Radiotherapy and Chemotherapy for Locally Advanced Cervical Cancer," *N. Engl. J. Med.*, vol. 340, no. 15, pp. 1144–1153, Apr. 1999.
- [129] W. Ngwa *et al.*, "Targeted radiotherapy with gold nanoparticles: Current status and future perspectives," *Nanomedicine*, vol. 9, no. 7. Future Medicine Ltd., pp. 1063–1082, 2014.
- [130] W. Roa *et al.*, "Gold nanoparticle sensitize radiotherapy of prostate cancer cells by regulation of the cell cycle," *Nanotechnology*, vol. 20, no. 37, p. 375101, Sep. 2009.
- [131] J. F. Hainfeld, H. M. Smilowitz, M. J. O'connor, F. A. Dilmanian, and D. N. Slatkin, "Gold nanoparticle imaging and radiotherapy of brain tumors in mice," *Nanomedicine*, vol. 8, no. 10, pp. 1601–1609, Sep. 2013.
- [132] R. S. Riley and E. S. Day, "Gold nanoparticle-mediated photothermal therapy: applications and opportunities for multimodal cancer treatment," *Wiley Interdisciplinary Reviews: Nanomedicine and Nanobiotechnology*, vol. 9, no. 4. Wiley-Blackwell, 01-Jul-2017.
- [133] G. S. Terentyuk *et al.*, "Laser-induced tissue hyperthermia mediated by gold nanoparticles: toward cancer phototherapy," *J. Biomed. Opt.*, vol. 14, no. 2, p. 021016, 2009.
- [134] I. Salas-García *et al.*, "Effect of gold nanoparticles in the local heating of skin tumors induced by phototherapy," in *Medical Laser Applications and Laser-Tissue Interactions V*, 2011, p. 809204.
- [135] P. Couvreur, "[Drug vectorization or how to modulate tissular and cellular distribution of biologically active compounds].," *Ann. Pharm. Fr.*, vol. 59, no. 4, pp. 232–8, Jul. 2001.
- [136] H. Daraee, A. Eatemadi, E. Abbasi, S. Fekri Aval, M. Kouhi, and A. Akbarzadeh, "Application of gold nanoparticles in biomedical and drug delivery," *Artif. Cells, Nanomedicine, Biotechnol.*, vol. 44, no. 1, pp. 410–422, Jan. 2016.
- [137] D. Cabuzu, A. Cirja, R. Puiu, and A. Grumezescu, "Biomedical Applications of Gold Nanoparticles," *Curr. Top. Med. Chem.*, vol. 15, no. 16, pp. 1605–1613, Apr. 2015.
- [138] P. R. Chandran and R. T. Thomas, "Gold Nanoparticles in Cancer Drug Delivery," in *Nanotechnology Applications for Tissue Engineering*, Elsevier Inc., 2015, pp. 221–237.
- [139] D. Pissuwan, T. Niidome, and M. B. Cortie, "The forthcoming applications of gold nanoparticles in drug and gene delivery systems," *Journal of Controlled Release*, vol. 149, no. 1. Elsevier, pp. 65–71, 05-Jan-2011.
- [140] G. Han, P. Ghosh, M. De, and V. M. Rotello, "Drug and gene delivery using gold nanoparticles," *Nanobiotechnology*, vol. 3, no. 1. Springer, pp. 40–45, 26-Mar-2007.
- [141] G. Chen, M. Takezawa, N. Kawazoe, and T. Tateishi, "Preparation of Cationic Gold Nanoparticles for Gene Delivery," *Open Biotechnol. J.*, vol. 2, no. 1, pp. 152–156, Feb. 2014.
- [142] A. A. D'souza and R. Shegokar, "Polyethylene glycol (PEG): a versatile polymer for pharmaceutical applications," *Expert Opinion on Drug Delivery*, vol. 13, no. 9. Taylor and Francis Ltd, pp. 1257–1275, 01-Sep-2016.
- [143] J. Manson, D. Kumar, B. J. Meenan, and D. Dixon, "Polyethylene glycol functionalized gold nanoparticles: The influence of capping density on stability in various media," *Gold Bull.*, vol. 44, no. 2, pp. 99–105, Apr. 2011.
- [144] J. M. Bergen, H. A. von Recum, T. T. Goodman, A. P. Massey, and S. H. Pun, "Gold Nanoparticles as a Versatile Platform for Optimizing Physicochemical Parameters for Targeted Drug Delivery," *Macromol. Biosci.*, vol. 6, no. 7, pp. 506–516, Jul. 2006.
- [145] R. Langer, "New methods of drug delivery," *Science (80-.)*, vol. 249, no. 4976, pp. 1527–1533, Sep. 1990.
- [146] F. M. Veronese and G. Pasut, "PEGylation, successful approach to drug delivery," *Drug Discovery Today*, vol. 10, no. 21. pp. 1451–1458, 01-Nov-2005.

- [147] “One-Step Synthesis of PEGylated Gold Nanoparticles with Tunable Surface Charge.” [Online]. Available: <https://www.hindawi.com/journals/jnm/2013/146031/>. [Accessed: 10-Apr-2020].
- [148] H. K. Patra, D. GuhaSarkar, and A. K. Dasgupta, “Multimodal electrophoresis of gold nanoparticles: A real time approach,” *Anal. Chim. Acta*, vol. 649, no. 1, pp. 128–134, Sep. 2009.
- [149] J. V. Jokerst, T. Lobovkina, R. N. Zare, and S. S. Gambhir, “Nanoparticle PEGylation for imaging and therapy,” *Nanomedicine*, vol. 6, no. 4, pp. 715–728, Jun-2011.
- [150] E. Lee *et al.*, “Molecular origin of AuNPs-induced cytotoxicity and mechanistic study,” *Sci. Rep.*, vol. 9, no. 1, pp. 1–13, Dec. 2019.
- [151] K. Rahme, L. Chen, R. G. Hobbs, M. A. Morris, C. O’Driscoll, and J. D. Holmes, “PEGylated gold nanoparticles: Polymer quantification as a function of PEG lengths and nanoparticle dimensions,” *RSC Adv.*, vol. 3, no. 17, pp. 6085–6094, May 2013.
- [152] W. Wang, Q. Q. Wei, J. Wang, B. C. Wang, S. hui Zhang, and Z. Yuan, “Role of thiol-containing polyethylene glycol (thiol-PEG) in the modification process of gold nanoparticles (AuNPs): Stabilizer or coagulant?,” *J. Colloid Interface Sci.*, vol. 404, pp. 223–229, Aug. 2013.
- [153] J. Nicolas and P. Couvreur, “Les nanoparticules polymères pour la délivrance de principes actifs anticancéreux,” *médecine/sciences*, vol. 33, no. 1, pp. 11–17, Jan. 2017.
- [154] G. Ajnai, A. Chiu, T. Kan, C. C. Cheng, T. H. Tsai, and J. Chang, “Trends of Gold Nanoparticle-based Drug Delivery System in Cancer Therapy,” *Journal of Experimental and Clinical Medicine (Taiwan)*, vol. 6, no. 6. Elsevier Taiwan LLC, pp. 172–178, 01-Dec-2014.
- [155] V. Torchilin, “Tumor delivery of macromolecular drugs based on the EPR effect,” *Advanced Drug Delivery Reviews*, vol. 63, no. 3. Elsevier, pp. 131–135, 18-Mar-2011.
- [156] H. Maeda, “The enhanced permeability and retention (EPR) effect in tumor vasculature: The key role of tumor-selective macromolecular drug targeting,” *Adv. Enzyme Regul.*, vol. 41, no. 1, pp. 189–207, 2001.
- [157] H. Maeda, J. Wu, T. Sawa, Y. Matsumura, and K. Hori, “Tumor vascular permeability and the EPR effect in macromolecular therapeutics: A review,” *J. Control. Release*, vol. 65, no. 1–2, pp. 271–284, Mar. 2000.
- [158] F. Danhier, O. Feron, and V. Préat, “To exploit the tumor microenvironment: Passive and active tumor targeting of nanocarriers for anti-cancer drug delivery,” *Journal of Controlled Release*, vol. 148, no. 2. Elsevier, pp. 135–146, 01-Dec-2010.
- [159] S. Hirsjarvi, C. Passirani, and J.-P. Benoit, “Passive and Active Tumour Targeting with Nanocarriers,” *Curr. Drug Discov. Technol.*, vol. 8, no. 3, pp. 188–196, Aug. 2011.
- [160] P. Ghosh, G. Han, M. De, C. K. Kim, and V. M. Rotello, “Gold nanoparticles in delivery applications,” *Advanced Drug Delivery Reviews*, vol. 60, no. 11. Elsevier, pp. 1307–1315, 17-Aug-2008.
- [161] C. K. Kim, P. Ghosh, and V. M. Rotello, “Multimodal drug delivery using gold nanoparticles,” *Nanoscale*, vol. 1, no. 1, pp. 61–67, Sep. 2009.
- [162] S. D. Brown *et al.*, “Gold nanoparticles for the improved anticancer drug delivery of the active component of oxaliplatin,” *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 132, no. 13, pp. 4678–4684, Apr. 2010.
- [163] N. S. Elbially, M. M. Fathy, and W. M. Khalil, “Doxorubicin loaded magnetic gold nanoparticles for in vivo targeted drug delivery,” *Int. J. Pharm.*, vol. 490, no. 1–2, pp. 190–199, Jun. 2015.
- [164] B. Duncan, C. Kim, and V. M. Rotello, “Gold nanoparticle platforms as drug and biomacromolecule delivery systems,” *J. Control. Release*, vol. 148, no. 1, pp. 122–127, Nov. 2010.
- [165] J. L. Li *et al.*, “In vitro cancer cell imaging and therapy using transferrin-conjugated gold nanoparticles,” *Cancer Lett.*, vol. 274, no. 2, pp. 319–326, Feb. 2009.
- [166] P. H. Yang, X. Sun, J. F. Chiu, H. Sun, and Q. Y. He, “Transferrin-mediated gold nanoparticle cellular uptake,” *Bioconjug. Chem.*, vol. 16, no. 3, pp. 494–496, May 2005.
- [167] H. Samadian, S. Hosseini-Nami, S. K. Kamrava, H. Ghaznavi, and A. Shakeri-Zadeh, “Folate-conjugated gold nanoparticle as a new nanoplatform for targeted cancer therapy,” *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology*, vol. 142, no. 11. Springer Verlag, pp. 2217–2229, 01-Nov-2016.

- [168] F. Danhier, O. Feron, and V. Préat, "To exploit the tumor microenvironment: Passive and active tumor targeting of nanocarriers for anti-cancer drug delivery," *Journal of Controlled Release*, vol. 148, no. 2, pp. 135–146, 01-Dec-2010.
- [169] P. Ciaurriz, F. Fernández, E. Tellechea, J. F. Moran, and A. C. Asensio, "Comparison of four functionalization methods of gold nanoparticles for enhancing the enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)," *Beilstein J. Nanotechnol.*, vol. 8, no. 1, pp. 244–253, 2017.
- [170] A. Panariti, G. Miserocchi, and I. Rivolta, "The effect of nanoparticle uptake on cellular behavior: Disrupting or enabling functions?," *Nanotechnology, Science and Applications*, vol. 5, no. 1. Dove Press, pp. 87–100, 2012.
- [171] Arnida, M. M. Janát-Amsbury, A. Ray, C. M. Peterson, and H. Ghandehari, "Geometry and surface characteristics of gold nanoparticles influence their biodistribution and uptake by macrophages," *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, vol. 77, no. 3, pp. 417–423, Apr. 2011.
- [172] Arnida, A. Malugin, and H. Ghandehari, "Cellular uptake and toxicity of gold nanoparticles in prostate cancer cells: a comparative study of rods and spheres," *J. Appl. Toxicol.*, vol. 30, no. 3, p. n/a-n/a, Apr. 2009.
- [173] I. Fratoddi, I. Venditti, C. Cametti, and M. V. Russo, "How toxic are gold nanoparticles? The state-of-the-art," *Nano Res.*, vol. 8, no. 6, pp. 1771–1799, Jun. 2015.
- [174] H. Hillaireau and P. Couvreur, "Nanocarriers' entry into the cell: Relevance to drug delivery," *Cellular and Molecular Life Sciences*, vol. 66, no. 17. Birkhauser Verlag Basel, pp. 2873–2896, 2009.
- [175] Y. P. Jia, B. Y. Ma, X. W. Wei, and Z. Y. Qian, "The in vitro and in vivo toxicity of gold nanoparticles," *Chinese Chem. Lett.*, vol. 28, no. 4, pp. 691–702, Apr. 2017.
- [176] Shuguang Wang, R. Lawson, P. C. Ray, and Hongtao Yu, "Toxic effects of gold nanoparticles on *Salmonella typhimurium* bacteria," *Toxicol. Ind. Health*, vol. 27, no. 6, pp. 547–554, 2011.
- [177] Y. S. Chen, Y. C. Hung, I. Liao, and G. S. Huang, "Assessment of the in vivo toxicity of gold nanoparticles," *Nanoscale Res. Lett.*, vol. 4, no. 8, pp. 858–864, May 2009.
- [178] Y. Wang *et al.*, "Comparison study of gold nanohexapods, nanorods, and nanocages for photothermal cancer treatment," *ACS Nano*, vol. 7, no. 3, pp. 2068–2077, Mar. 2013.
- [179] T. Niidome *et al.*, "PEG-modified gold nanorods with a stealth character for in vivo applications," *J. Control. Release*, vol. 114, no. 3, pp. 343–347, Sep. 2006.
- [180] H. K. Patra, S. Banerjee, U. Chaudhuri, P. Lahiri, and A. K. Dasgupta, "Cell selective response to gold nanoparticles," *Nanomedicine Nanotechnology, Biol. Med.*, vol. 3, no. 2, pp. 111–119, Jun. 2007.
- [181] H. Lodish, A. Berk, S. L. Zipursky, P. Matsudaira, D. Baltimore, and J. Darnell, "Biomembranes: Structural Organization and Basic Functions," 2000.
- [182] B. Alberts, A. Johnson, J. Lewis, M. Raff, K. Roberts, and P. Walter, "Membrane Proteins," 2002.
- [183] M. P. Czech and W. S. Lynn, "Studies on the Topography of the Fat Cell Plasma Membrane," *Biochemistry*, vol. 12, no. 19, pp. 3597–3601, Sep. 1973.
- [184] R. Gennis, "Biomembranes: molecular structure and function," 2013.
- [185] M. Edidin, "The State of Lipid Rafts: From Model Membranes to Cells," *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.*, vol. 32, no. 1, pp. 257–283, Jun. 2003.
- [186] D. J. Müller, N. Wu, and K. Palczewski, "Vertebrate membrane proteins: Structure, function, and insights from biophysical approaches," *Pharmacological Reviews*, vol. 60, no. 1. American Society for Pharmacology and Experimental Therapeutics, pp. 43–78, 01-Mar-2008.
- [187] "Biologie cellulaire et moléculaire: Concepts and experiments - Gerald Karp - Google Livres." [Online]. Available: <https://books.google.fr/books?hl=fr&lr=&id=DSJ1mJkOzzAC&oi=fnd&pg=PA1&dq=Biologie+cellulaire+et+moléculaire:+Concepts+and+experiments&ots=1A1f7aaD6v&sig=AwWdOIV3qrrvNfj07Z2q8OOV1PM#v=onepage&q=equilibre&f=false>. [Accessed: 17-Apr-2020].
- [188] W. C. E. Thomas D. Pollard, *Biologie cellulaire*. Campus référence, 2004.
- [189] N. Sperelakis, "Origin of Resting Membrane Potentials**Adapted and reprinted by permission from

- the author's chapter 3 in *PHYSIOLOGY* (Sperelakis, N. and Banks, R. O., Editors). Copyright © 1993 by Nicholas Sperelakis and Robert O. Banks. Published by Little, Brown and Company.,” in *Cell Physiology Source Book*, Elsevier, 1995, pp. 67–90.
- [190] J. A. Williams, “Origin of transmembrane potentials in non-excitabile cells,” *J. Theor. Biol.*, vol. 28, no. 2, pp. 287–296, Aug. 1970.
 - [191] A. J. H. Sale and W. A. Hamilton, “Effects of high electric fields on micro-organisms. III. Lysis of erythrocytes and protoplasts,” *BBA - Biomembr.*, vol. 163, no. 1, pp. 37–43, Aug. 1968.
 - [192] W. A. Hamilton and A. J. H. Sale, “Effects of high electric fields on microorganisms. II. Mechanism of action of the lethal effect,” *BBA - Gen. Subj.*, vol. 148, no. 3, pp. 789–800, Dec. 1967.
 - [193] E. Neumann and K. Rosenheck, “Permeability changes induced by electric impulses in vesicular membranes,” *J. Membr. Biol.*, vol. 10, no. 1, pp. 279–290, Dec. 1972.
 - [194] K. Kinosita and T. Y. Tsong, “Formation and resealing of pores of controlled sizes in human erythrocyte membrane,” *Nature*, vol. 268, no. 5619, pp. 438–441, 1977.
 - [195] E. Neumann, M. Schaefer-Ridder, Y. Wang, and P. H. Hofschneider, “Gene transfer into mouse lyoma cells by electroporation in high electric fields,” *EMBO J.*, vol. 1, no. 7, pp. 841–845, Jul. 1982.
 - [196] L. M. Mir, H. Banoun, and C. Paoletti, “Introduction of definite amounts of nonpermeant molecules into living cells after electroporation: Direct access to the cytosol,” *Exp. Cell Res.*, vol. 175, no. 1, pp. 15–25, Mar. 1988.
 - [197] T. Y. Tsong, “Electroporation of Cell Membranes,” in *Electroporation and Electrofusion in Cell Biology*, Springer US, 1989, pp. 149–163.
 - [198] J. Teissié, N. Eynard, B. Gabriel, and M. . Rols, “Electroporation of cell membranes,” *Adv. Drug Deliv. Rev.*, vol. 35, no. 1, pp. 3–19, Jan. 1999.
 - [199] U. Zimmermann, U. Friedrich, H. Mussauer, P. Gessner, K. Hämel, and V. Sukhorukov, “Electromanipulation of mammalian cells: fundamentals and application,” *IEEE Trans. Plasma Sci.*, vol. 28, no. 1, pp. 72–82, 2000.
 - [200] C. Chen, S. W. Smye, M. P. Robinson, and J. A. Evans, “Membrane electroporation theories: A review,” *Medical and Biological Engineering and Computing*, vol. 44, no. 1–2, pp. 5–14, Mar-2006.
 - [201] J. M. Escoffre, T. Portet, L. Wasungu, J. Teissié, D. Dean, and M. P. Rols, “What is (Still not) known of the mechanism by which electroporation mediates gene transfer and expression in cells and tissues,” *Molecular Biotechnology*, vol. 41, no. 3, Springer, pp. 286–295, 18-Mar-2009.
 - [202] G. A. Hofmann, S. B. Dev, G. S. Nanda, and D. Rabussay, “Electroporation therapy of solid tumors,” *Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems*, vol. 16, no. 6, Begel House Inc., pp. 523–569, 1999.
 - [203] L. M. Mir, P. H. Moller, F. André, and J. Gehl, “Electric Pulse-Mediated Gene Delivery to Various Animal Tissues,” *Advances in Genetics*, vol. 54, Academic Press, pp. 83–114, 01-Jan-2005.
 - [204] M. L. Lucas and R. Heller, “IL-12 Gene Therapy Using an Electrically Mediated Nonviral Approach Reduces Metastatic Growth of Melanoma,” *DNA Cell Biol.*, vol. 22, no. 12, pp. 755–763, Dec. 2003.
 - [205] B. Claude and T. Justin, “Homokaryon production by electrofusion: A convenient way to produce a large number of viable mammalian fused cells,” *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, vol. 114, no. 2, pp. 663–669, Jul. 1983.
 - [206] B. Al-Sakere *et al.*, “Tumor ablation with irreversible electroporation,” *PLoS One*, vol. 2, no. 11, Nov. 2007.
 - [207] T. Subhra, P.-C. Wang, and F. Gang, “Electroporation Based Drug Delivery and Its Applications,” in *Advances in Micro/Nano Electromechanical Systems and Fabrication Technologies*, InTech, 2013.
 - [208] T. Kotnik, F. Bobanovic, and D. Miklavcic, “Sensitivity of transmembrane voltage induced by applied electric fields-a theoretical analysis,” 1997.
 - [209] P. M. Vlahovska, “Voltage-morphology coupling in biomimetic membranes: dynamics of giant vesicles in applied electric fields,” *Soft Matter*, vol. 11, no. 37, pp. 7232–7236, Aug. 2015.
 - [210] K. Kinosita *et al.*, “Electroporation of cell membrane visualized under a pulsed-laser fluorescence

- microscope,” *Biophys. J.*, vol. 53, no. 6, pp. 1015–1019, 1988.
- [211] T. Kotnik, G. Pucihar, and D. Miklavčič, “Induced transmembrane voltage and its correlation with electroporation-mediated molecular transport,” *J. Membr. Biol.*, vol. 236, no. 1, pp. 3–13, Jul. 2010.
 - [212] J. Gehl *et al.*, “In vivo electroporation of skeletal muscle: threshold, efficacy and relation to electric field distribution.”
 - [213] G. Saulis and R. Saul, “Article in Acta Physica Polonica Series a,” 2009.
 - [214] R. J. O’Neill and L. Tung, “Cell-attached patch clamp study of the electropermeabilization of amphibian cardiac cells,” *Biophys. J.*, vol. 59, no. 5, pp. 1028–1039, May 1991.
 - [215] L. H. Wegner *et al.*, “A patch clamp study on the electro-permeabilization of higher plant cells: Supraphysiological voltages induce a high-conductance, K⁺ selective state of the plasma membrane,” *Biochim. Biophys. Acta - Biomembr.*, vol. 1808, no. 6, pp. 1728–1736, Jun. 2011.
 - [216] J. Teissie and T. Y. Tsong, “Electric Field Induced Transient Pores in Phospholipid Bilayer Vesicles,” *Biochemistry*, vol. 20, no. 6, pp. 1548–1554, Mar. 1981.
 - [217] J. M. Escoffre, T. Portet, L. Wasungu, J. Teissie, D. Dean, and M. P. Rols, “What is (Still not) known of the mechanism by which electroporation mediates gene transfer and expression in cells and tissues,” *Molecular Biotechnology*, vol. 41, no. 3, pp. 286–295, Mar-2009.
 - [218] I. Abidor, V. Arakelyan, ... L. C.-... chemistry and interfacial, and undefined 1979, “Electric breakdown of bilayer lipid membranes: I. The main experimental facts and their qualitative discussion,” *Elsevier*.
 - [219] I. P. Sugar and E. Neumann, “Stochastic model for electric field-induced membrane pores electroporation,” *Biophys. Chem.*, vol. 19, no. 3, pp. 211–225, 1984.
 - [220] S. A. Freeman, M. A. Wang, and J. C. Weaver, “Theory of electroporation of planar bilayer membranes: predictions of the aqueous area, change in capacitance, and pore-pore separation,” *Biophys. J.*, vol. 67, no. 1, pp. 42–56, 1994.
 - [221] J. C. Weaver and Y. A. Chizmadzhev, “Theory of electroporation: A review,” 1996.
 - [222] D. P. Tieleman, “The molecular basis of electroporation,” *BMC Biochem.*, vol. 5, no. 1, pp. 1–12, Jul. 2004.
 - [223] M. Tarek, “Membrane electroporation: A molecular dynamics simulation,” *Biophys. J.*, vol. 88, no. 6, pp. 4045–4053, 2005.
 - [224] M. Tokman, J. H. J. Lee, Z. A. Levine, M. C. Ho, M. E. Colvin, and P. T. Vernier, “Electric Field-Driven Water Dipoles: Nanoscale Architecture of Electroporation,” *PLoS One*, vol. 8, no. 4, Apr. 2013.
 - [225] P. T. Vernier and M. J. Ziegler, “Nanosecond field alignment of head group and water dipoles in electroporating phospholipid bilayers,” *J. Phys. Chem. B*, vol. 111, no. 45, pp. 12993–12996, Nov. 2007.
 - [226] M. Breton, L. Delemotte, A. Silve, L. M. Mir, and M. Tarek, “Transport of siRNA through lipid membranes driven by nanosecond electric pulses: An experimental and computational study,” *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 134, no. 34, pp. 13938–13941, Aug. 2012.
 - [227] T. Kotnik, L. Rems, M. Tarek, and D. Miklavčič, “Membrane Electroporation and Electropermeabilization: Mechanisms and Models,” *Annu. Rev. Biophys.*, vol. 48, no. 1, pp. 63–91, May 2019.
 - [228] S.-K. Yeo and M.-T. Liong, “Effect of electroporation on viability and bioconversion of isoflavones in mannitol-soymilk fermented by lactobacilli and bifidobacteria,” *J. Sci. Food Agric.*, vol. 93, no. 2, pp. 396–409, Jan. 2013.
 - [229] O. Yun, X.-A. Zeng, C. Brennan, and Z. Han, “Effect of Pulsed Electric Field on Membrane Lipids and Oxidative Injury of *Salmonella typhimurium*,” *Int. J. Mol. Sci.*, vol. 17, no. 8, p. 1374, Aug. 2016.
 - [230] M. Maccarrone, M. R. Bladergroen, N. Rosato, and A. F. Agrò, “Role of lipid peroxidation in electroporation-induced cell permeability,” *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, vol. 209, no. 2, pp. 417–425, Apr. 1995.
 - [231] U. Biedinger, R. J. Youngman, and H. Schnabl, “Differential effects of electrofusion and

- electropermeabilization parameters on the membrane integrity of plant protoplasts,” *Planta*, vol. 180, no. 4, pp. 598–602, Mar. 1990.
- [232] A. Tanyeli, F. N. Ekinici, E. Eraslan, M. C. Güler, and T. Nacar, “Anti-oxidant and anti-inflamatuar effectiveness of caftaric acid on gastric ulcer induced by indomethacin in rats,” *Gen. Physiol. Biophys.*, vol. 38, no. 02, pp. 175–181, 2019.
- [233] M. Maccarrone, N. Rosato, and A. F. Agrò, “Electroporation enhances cell membrane peroxidation and luminescence,” *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, vol. 206, no. 1, pp. 238–245, Jan. 1995.
- [234] W. Zhao, R. Yang, Q. Liang, W. Zhang, X. Hua, and Y. Tang, “Electrochemical reaction and oxidation of lecithin under pulsed electric fields (PEF) processing,” *J. Agric. Food Chem.*, vol. 60, no. 49, pp. 12204–12209, Dec. 2012.
- [235] M. Breton and L. M. Mir, “Investigation of the chemical mechanisms involved in the electropulsation of membranes at the molecular level,” *Bioelectrochemistry*, vol. 119, pp. 76–83, Feb. 2018.
- [236] L. C. Benov, P. A. Antonov, and S. R. Ribarov, “Oxidative damage of the membrane lipids after electroporation,” *Gen. Physiol. Biophys.*, vol. 13, no. 2, pp. 85–97, 1994.
- [237] P. Jurkiewicz *et al.*, “Biophysics of lipid bilayers containing oxidatively modified phospholipids: Insights from fluorescence and EPR experiments and from MD simulations,” *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes*, vol. 1818, no. 10. Elsevier, pp. 2388–2402, 01-Oct-2012.
- [238] J. Wong-Ekkabut, Z. Xu, W. Triampo, I. T.-B. journal, and undefined 2007, “Effect of lipid peroxidation on the properties of lipid bilayers: a molecular dynamics study,” *Elsevier*.
- [239] A. Azan *et al.*, “Demonstration of the Protein Involvement in Cell Electropermeabilization using Confocal Raman Microspectroscopy,” *Sci. Rep.*, vol. 7, no. 1, pp. 1–10, Jan. 2017.
- [240] K. A. DeBruin and W. Krassowska, “Modeling electroporation in a single cell. I. Effects of field strength and rest potential,” *Biophys. J.*, vol. 77, no. 3, pp. 1213–1224, Sep. 1999.
- [241] R. W. Glaser, S. L. Leikin, L. V. Chernomordik, V. F. Pastushenko, and A. I. Sokirko, “Reversible electrical breakdown of lipid bilayers: formation and evolution of pores,” *BBA - Biomembr.*, vol. 940, no. 2, pp. 275–287, May 1988.
- [242] A. E. Sowers, “The long-lived fusogenic state induced in erythrocyte ghosts by electric pulses is not laterally mobile,” *Biophys. J.*, vol. 52, no. 6, pp. 1015–1020, Dec. 1987.
- [243] J. C. Ullery, M. Tarango, C. C. Roth, and B. L. Ibey, “Activation of autophagy in response to nanosecond pulsed electric field exposure,” *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, vol. 458, no. 2, pp. 411–417, Mar. 2015.
- [244] P. L. Mcneil and M. Terasaki, “Coping with the inevitable: How cells repair a torn surface membrane,” *Nature Cell Biology*, vol. 3, no. 5. 2001.
- [245] “No Title,” in *Electroporation and electropermeabilisation*.
- [246] M. P. Rols and J. Teissié, “Modulation of Electrically Induced Permeabilization and Fusion of Chinese Hamster Ovary Cells by Osmotic Pressure,” *Biochemistry*, vol. 29, no. 19, pp. 4561–4567, May 1990.
- [247] A. Lopez, M. P. Rols, and J. Teissie, “³¹P NMR Analysis of Membrane Phospholipid Organization in Viable, Reversibly Electropermeabilized Chinese Hamster Ovary Cells1,” 1988.
- [248] M.-P. ROLS and J. TEISSIE, “Ionic-strength modulation of electrically induced permeabilization and associated fusion of mammalian cells,” *Eur. J. Biochem.*, vol. 179, no. 1, pp. 109–115, Jan. 1989.
- [249] M. P. Rols and J. Teissié, “Electropermeabilization of mammalian cells. Quantitative analysis of the phenomenon,” *Biophys. J.*, vol. 58, no. 5, pp. 1089–1098, 1990.
- [250] M. P. Rols and J. Teissié, “Electropermeabilization of mammalian cells. Quantitative analysis of the phenomenon,” *Biophys. J.*, vol. 58, no. 5, pp. 1089–1098, Nov. 1990.
- [251] R. Shirakashi, V. L. Sukhorukov, I. Tanasawa, and U. Zimmermann, “Measurement of the permeability and resealing time constant of the electroporated mammalian cell membranes,” *Int. J. Heat Mass Transf.*, vol. 47, no. 21, pp. 4517–4524, Oct. 2004.
- [252] B. Gabriel and J. Teissie, “Generation of reactive-oxygen species induced by electropermeabilization of Chinese hamster ovary cells and their consequence on cell viability,” 1994.

- [253] J. TEISSIE and M. -P ROLS, "Manipulation of Cell Cytoskeleton Affects the Lifetime of Cell Membrane Electroporabilization," *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, vol. 720, no. 1, pp. 98–110, 1994.
- [254] M. Kandušer, M. Šentjurc, and D. Miklavčič, "Cell membrane fluidity related to electroporation and resealing," *Eur. Biophys. J.*, vol. 35, no. 3, pp. 196–204, Feb. 2006.
- [255] M. Golzio, J. Teissié, and M.-P. Rols, "Direct visualization at the single-cell level of electrically mediated gene delivery."
- [256] M. Coustets, N. Al-Karablieh, C. Thomsen, and J. Teissié, "Flow process for electroextraction of total proteins from microalgae," in *Journal of Membrane Biology*, 2013, vol. 246, no. 10, pp. 751–760.
- [257] E. Luengo *et al.*, "A Comparative Study on the Effects of Millisecond- and Microsecond-Pulsed Electric Field Treatments on the Permeabilization and Extraction of Pigments from *Chlorella vulgaris*," *J. Membr. Biol.*, vol. 248, no. 5, pp. 883–891, Oct. 2015.
- [258] M.-P. ROLS, D. COULET, and J. TEISSIE, "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.*, vol. 206, no. 1, pp. 115–121, May 1992.
- [259] M. P. Rols, C. Delteil, M. Golzio, P. Dumond, S. Gros, and J. Teissie, "In vivo electrically mediated protein and gene transfer in murine melanoma," *Nat. Biotechnol.*, vol. 16, no. 2, pp. 168–171, 1998.
- [260] L. M. Mir, H. Banoun, and C. Paoletti, "Introduction of definite amounts of nonpermeant molecules into living cells after electroporabilization: Direct access to the cytosol," *Exp. Cell Res.*, vol. 175, no. 1, pp. 15–25, 1988.
- [261] B. Poddevin, S. Orlowski, J. Belehradek, and L. M. Mir, "Very high cytotoxicity of bleomycin introduced into the cytosol of cells in culture," *Biochem. Pharmacol.*, vol. 42, no. SUPPL. 1, pp. S67–S75, Dec. 1991.
- [262] J. C. Mohr, J. J. De Pablo, and S. P. Palecek, "Electroporation of human embryonic stem cells: Small and macromolecule loading and DNA transfection," *Biotechnol. Prog.*, vol. 22, no. 3, pp. 825–834, May 2006.
- [263] M. J. Jaroszeski, R. Gilbert, C. Nicolau, and R. Heller, "In vivo gene delivery by electroporation," *Adv. Drug Deliv. Rev.*, vol. 35, no. 1, pp. 131–137, Jan. 1999.
- [264] S. Šatkauskas, F. André, M. F. Bureau, D. Scherman, D. Miklavčič, and L. M. Mir, "Electrophoretic component of electric pulses determines the efficacy of in vivo DNA electrotransfer," *Hum. Gene Ther.*, vol. 16, no. 10, pp. 1194–1201, Oct. 2005.
- [265] F. Andre *et al.*, "EFFICIENCY OF HIGH AND LOW VOLTAGE PULSE COMBINATIONS FOR GENE ELECTROTRANSFER IN MUSCLE, LIVER, TUMOR AND SKIN," *Hum. Gene Ther.*, vol. 0, no. ja, p. 081015093227032, Aug. 2008.
- [266] P. Hojman *et al.*, "Physiological Effects of High-and Low-Voltage Pulse Combinations for Gene Electrotransfer in Muscle," *Hum. Gene Ther.*, vol. 19, no. 11, pp. 1249–1260, Nov. 2008.
- [267] M. Cemazar *et al.*, "Control by pulse parameters of DNA electrotransfer into solid tumors in mice," *Gene Ther.*, vol. 16, no. 5, pp. 635–644, Feb. 2009.
- [268] I. Spanggaard *et al.*, "Gene electrotransfer of plasmid antiangiogenic metargidin peptide (AMEP) in disseminated melanoma: Safety and efficacy results of a phase i first-in-man study," *Hum. Gene Ther. Clin. Dev.*, vol. 24, no. 3, pp. 99–107, Sep. 2013.
- [269] J. Gehl *et al.*, "Results of the ESOPE (European Standard Operating Procedures on Electrochemotherapy) study: Efficient, highly tolerable and simple palliative treatment of cutaneous and subcutaneous metastases from cancers of any histology," *J. Clin. Oncol.*, vol. 24, no. 18_suppl, pp. 8047–8047, Jun. 2006.
- [270] M. Marty *et al.*, "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.*, vol. 4, no. 11, pp. 3–13, Nov. 2006.
- [271] M. Reberšek, D. Miklavčič, and M. Sack, "Cell Membrane Electroporation-Part 3: The Equipment."
- [272] D. Miklavčič *et al.*, "Electrochemotherapy: Technological advancements for efficient electroporation-based treatment of internal tumors," *Medical and Biological Engineering and Computing*, vol. 50, no.

12. Springer, pp. 1213–1225, 21-Dec-2012.
- [273] B. Rubinsky, “Irreversible electroporation in medicine,” *Technol. Cancer Res. Treat.*, vol. 6, no. 4, pp. 255–60, Aug. 2007.
- [274] “Irreversible Electroporation (NanoKnife) - Medical Clinical Policy Bulletins | Aetna.” [Online]. Available: http://www.aetna.com/cpb/medical/data/800_899/0828.html. [Accessed: 22-May-2020].
- [275] C. Y. Hsiao and K. W. Huang, “Irreversible Electroporation: A Novel Ultrasound-guided Modality for Non-thermal Tumor Ablation,” *Journal of Medical Ultrasound*, vol. 25, no. 4. Elsevier (Singapore) Pte Ltd, pp. 195–200, 01-Dec-2017.
- [276] M. Breton and L. M. Mir, “Microsecond and nanosecond electric pulses in cancer treatments,” *Bioelectromagnetics*, vol. 33, no. 2, pp. 106–123, Feb. 2012.
- [277] C. Y. Calvet and L. M. Mir, “The promising alliance of anti-cancer electrochemotherapy with immunotherapy,” *Cancer and Metastasis Reviews*, vol. 35, no. 2. Springer New York LLC, pp. 165–177, 01-Jun-2016.
- [278] G. Sersa, D. Miklavcic, M. Cemazar, Z. Rudolf, G. Pucihar, and M. Snoj, “Electrochemotherapy in treatment of tumours,” *Eur. J. Surg. Oncol.*, vol. 34, no. 2, pp. 232–240, Feb. 2008.
- [279] L. M. Mir, S. Orlowski, J. Belehradek, and C. Paoletti, “Electrochemotherapy potentiation of antitumour effect of bleomycin by local electric pulses,” *Eur. J. Cancer Clin. Oncol.*, vol. 27, no. 1, pp. 68–72, Jan. 1991.
- [280] S. Orlowski, J. Belehradek, C. Paoletti, and L. M. Mir, “Transient electroporation of cells in culture. Increase of the cytotoxicity of anticancer drugs,” *Biochem. Pharmacol.*, vol. 37, no. 24, pp. 4727–4733, Dec. 1988.
- [281] J. Belehradek, S. Orlowski, B. Poddevin, C. Paoletti, and L. M. Mir, “Electrochemotherapy of spontaneous mammary tumours in mice,” *Eur. J. Cancer Clin. Oncol.*, vol. 27, no. 1, pp. 73–76, Jan. 1991.
- [282] M. Okino and K. Esato, “The effects of a single high voltage electrical stimulation with an anticancer drug on in vivo growing malignant tumors,” *Jpn. J. Surg.*, vol. 20, no. 2, pp. 197–204, Mar. 1990.
- [283] J. Gehl, T. Skovsgaard, and L. M. Mir, “Enhancement of cytotoxicity by electroporation: An improved method for screening drugs,” *Anticancer. Drugs*, vol. 9, no. 4, pp. 319–325, 1998.
- [284] L. M. Mir *et al.*, “[Electrochemotherapy, a new antitumor treatment: first clinical trial],” *C. R. Acad. Sci. III.*, vol. 313, no. 13, pp. 613–8, Jan. 1991.
- [285] J. F. Danielli and H. Davson, “A contribution to the theory of permeability of thin films,” *J. Cell. Comp. Physiol.*, vol. 5, no. 4, pp. 495–508, Feb. 1935.
- [286] G. Sersa, “The state-of-the-art of electrochemotherapy before the ESOPE study; advantages and clinical uses,” *Eur. J. Cancer, Suppl.*, vol. 4, no. 11, pp. 52–59, Nov. 2006.
- [287] M. Đokic *et al.*, “Treatment of primary liver tumors with electrochemotherapy – clinical trial,” in *IFMBE Proceedings*, 2016, vol. 53, pp. 267–270.
- [288] M. Linnert, B. Agerholm-Larsen, F. Mahmood, H. K. Iversen, and J. Gehl, “Treatment of Brain Tumors: Electrochemotherapy,” Springer, Dordrecht, 2014, pp. 247–259.
- [289] S. Bimonte *et al.*, “Electrochemotherapy in pancreatic adenocarcinoma treatment: Pre-clinical and clinical studies,” *Radiology and Oncology*, vol. 50, no. 1. Association of Radiology and Oncology, pp. 14–20, 01-Jan-2016.
- [290] H. Umezawa, K. Maeda, T. T. ... J. of antibiotics, and undefined 1966, “New antibiotics, bleomycin A and B,” *jstage.jst.go.jp*.
- [291] B. Poddevin, S. Orlowski, ... J. B. J.-B., and undefined 1991, “Very high cytotoxicity of bleomycin introduced into the cytosol of cells in culture,” *Elsevier*.
- [292] G. Pron *et al.*, “Internalisation of the Bleomycin Molecules Responsible for Bleomycin Toxicity: A Receptor-mediated Endocytosis Mechanism,” 1998.
- [293] J. C. Quada, D. Boturyn, and S. M. Hecht, “Photoactivated DNA cleavage by compounds structurally related to the bithiazole moiety of bleomycin,” *Bioorganic Med. Chem.*, vol. 9, no. 9, pp. 2303–2314,

- Sep. 2001.
- [294] L. M. Mir, O. Tounekti, and S. Orlowski, "Bleomycin: Revival of an Old Drug," 1996.
 - [295] M. Takeuchi and T. Yamamoto, "Effects of bleomycin on mouse transplantable tumors," *J. Antibiot. (Tokyo)*, vol. 21, no. 11, pp. 631–637, 1968.
 - [296] Y. Suzuki, H. Miyake, M. Sakai, Y. Inuyama, J. Matsukawa, and K. Fujii, "Bleomycin in malignant tumors of head and neck," *Keio J. Med.*, vol. 18, no. 3, pp. 153–162, 1969.
 - [297] O. Tounekti, J. Belehradek, and L. M. Mir, "Bleomycin, an Apoptosis-mimetic Drug That Induces Two Types of Cell Death Depending on the Number of Molecules Internalized1," 1993.
 - [298] J. Stubbe and J. W. Kozarich, "Mechanisms of Bleomycin-Induced DNA Degradation," 1987.
 - [299] L. F. Povirk, Y. H. Han, and R. J. Steighner, "Structure of Bleomycin-Induced DNA Double-Strand Breaks: Predominance of Blunt Ends and Single-Base 5' Extensions," *Biochemistry*, vol. 28, no. 14, pp. 5808–5814, 1989.
 - [300] "DNA double-strand breaks and alkali-labile bonds produced by bleomycin | Nucleic Acids Research | Oxford Academic." [Online]. Available: <https://academic.oup.com/nar/article-abstract/4/10/3573/2380543?redirectedFrom=fulltext>. [Accessed: 29-Apr-2020].
 - [301] M. Cemazar, C. S. Parkins, A. L. Holder, D. J. Chaplin, G. M. Tozer, and G. Sersa, "Electroporation of human microvascular endothelial cells: Evidence for an anti-vascular mechanism of electrochemotherapy," *Br. J. Cancer*, vol. 84, no. 4, pp. 565–570, Feb. 2001.
 - [302] T. Jarm, M. Cemazar, D. Miklavcic, and G. Sersa, "Antivascular effects of electrochemotherapy: implications in treatment of bleeding metastases," *Expert Rev. Anticancer Ther.*, vol. 10, no. 5, pp. 729–746, May 2010.
 - [303] C. Y. Calvet, D. Famin, F. M. André, and L. M. Mir, "Electrochemotherapy with bleomycin induces hallmarks of immunogenic cell death in murine colon cancer cells," *Oncoimmunology*, vol. 3, no. 4, p. e28131, Apr. 2014.
 - [304] M. LM *et al.*, "[Potentiation of the antitumoral effect of electrochemotherapy by immunotherapy with allogeneic cells producing interleukin 2]," *C. R. Acad. Sci. III.*, vol. 314, no. 12, pp. 539–544, Jan. 1992.
 - [305] L. M. Mir *et al.*, "Systemic Antitumor Effects of Electrochemotherapy Combined with Histoincompatible Cells Secreting Interleukin-2," *J. Immunother.*, vol. 17, no. 1, pp. 30–38, 1995.
 - [306] S. Roux *et al.*, "Tumor destruction using electrochemotherapy followed by CpG oligodeoxynucleotide injection induces distant tumor responses," *Cancer Immunol. Immunother.*, vol. 57, no. 9, pp. 1291–1300, Sep. 2008.
 - [307] "WHO/Europe | Home." [Online]. Available: <http://www.euro.who.int/en/home>. [Accessed: 30-Apr-2020].
 - [308] "Cancers: les chiffres clés - Qu'est-ce qu'un cancer?" [Online]. Available: <https://www.e-cancer.fr/Comprendre-prevenir-depister/Qu'est-ce-qu'un-cancer/Chiffres-cles>. [Accessed: 30-Apr-2020].
 - [309] L. Științifice and M. Veterinară, "COMPARATIVE ONCOLOGY Review," 2008.
 - [310] "The Effects of Surgery on Tumor Growth: A Century of Investigations - PubMed." [Online]. Available: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18550576/>. [Accessed: 30-Apr-2020].
 - [311] F. ST, "Methods and related drawbacks in the estimation of surgical risks in cirrhotic patients undergoing hepatectomy," *Hepatogastroenterology*, vol. 49, no. 43, pp. 17–20, Jan. 2002.
 - [312] S. Tohme, R. L. Simmons, and A. Tsung, "Surgery for cancer: A trigger for metastases," *Cancer Research*, vol. 77, no. 7. American Association for Cancer Research Inc., pp. 1548–1552, 2017.
 - [313] N. Tozon *et al.*, "Electrochemotherapy Compared to Surgery for Treatment of Canine Mast Cell Tumours," 2009.
 - [314] R. P. Gehdoo, "Anticancer Chemotherapy and its Anaesthetic Implications (Current Concepts)," *Indian J. Anaesth.*, vol. 53, no. 1, p. 18, 2009.
 - [315] L. M. Mir, S. Orlowski, J. Belehradek, and C. Paoletti, "Electrochemotherapy potentiation of

- antitumour effect of bleomycin by local electric pulses,” *Eur. J. Cancer Clin. Oncol.*, vol. 27, no. 1, pp. 68–72, Jan. 1991.
- [316] G. Serša, B. Štabuc, M. Čemažar, B. Jančar, D. Miklavčič, and Z. Rudolf, “Electrochemotherapy with cisplatin: Potentiation of local cisplatin antitumour effectiveness by application of electric pulses in cancer patients,” *Eur. J. Cancer*, vol. 34, no. 8, pp. 1213–1218, Jul. 1998.
- [317] R. Giardino, M. Fini, V. Bonazzi, ... R. C.-B. &, and undefined 2006, “Electrochemotherapy a novel approach to the treatment of metastatic nodules on the skin and subcutaneous tissues,” *Elsevier*.
- [318] R. Baskar, K. A. Lee, R. Yeo, and K. W. Yeoh, “Cancer and radiation therapy: Current advances and future directions,” *International Journal of Medical Sciences*, vol. 9, no. 3. Ivyspring International Publisher, pp. 193–199, 27-Feb-2012.
- [319] A. C. Begg, F. A. Stewart, and C. Vens, “Strategies to improve radiotherapy with targeted drugs,” *Nature Reviews Cancer*, vol. 11, no. 4. Nat Rev Cancer, pp. 239–253, Apr-2011.
- [320] J. M. Brown, “Therapeutic targets in radiotherapy,” in *International Journal of Radiation Oncology Biology Physics*, 2001, vol. 49, no. 2, pp. 319–326.
- [321] J. F. Hainfeld, F. A. Dilmanian, D. N. Slatkin, and H. M. Smilowitz, “Radiotherapy enhancement with gold nanoparticles,” *J. Pharm. Pharmacol.*, vol. 60, no. 8, pp. 977–985, Aug. 2008.
- [322] P. Retif *et al.*, “Nanoparticles for radiation therapy enhancement: The key parameters,” *Theranostics*, vol. 5, no. 9. Ivyspring International Publisher, pp. 1030–1044, 2015.
- [323] J. A. Bluestone and E. J. Small, “The Future of Cancer Treatment: Will It Include Immunotherapy?,” *Cancer Cell*, vol. 22, pp. 7–8, 2012.
- [324] J. M. Kirkwood, L. H. Butterfield, A. A. Tarhini, H. Zarour, P. Kalinski, and S. Ferrone, “Immunotherapy of cancer in 2012,” *CA. Cancer J. Clin.*, vol. 62, no. 5, pp. 309–335, Sep. 2012.
- [325] J.-M. Escoffre and M.-P. Rols, “Electrochemotherapy: Progress and Prospects,” *Curr. Pharm. Des.*, vol. 18, no. 23, pp. 3406–3415, Jun. 2012.
- [326] R. Heller, R. Gilbert, and M. J. Jaroszeski, “Clinical applications of electrochemotherapy,” *Adv. Drug Deliv. Rev.*, vol. 35, no. 1, pp. 119–129, Jan. 1999.
- [327] J. Gehl, A. Gothelf, and L. M. Mir, “Electrochemotherapy: results of cancer treatment using enhanced delivery of bleomycin by electroporation. Enhanced Perioperative Oncology (EPEONC) Consortium View project Calcium Electroporation View project Electrochemotherapy: results of cancer treatment using enhanced delivery of bleomycin by electroporation,” *Elsevier*, 2003.
- [328] D. Miklavčič, B. Mali, B. Kos, R. Heller, and G. Serša, “Electrochemotherapy: from the drawing board into medical practice,” 2014.
- [329] D. E. Spratt *et al.*, “Efficacy of skin-directed therapy for cutaneous metastases from advanced cancer: A meta-analysis,” *J. Clin. Oncol.*, vol. 32, no. 28, pp. 3144–3155, Oct. 2014.
- [330] L. G. Campana, A. Testori, N. Mozzillo, and C. R. Rossi, “Treatment of metastatic melanoma with electrochemotherapy,” *Journal of Surgical Oncology*, vol. 109, no. 4. pp. 301–307, Mar-2014.
- [331] L. G. Campana *et al.*, “The activity and safety of electrochemotherapy in persistent chest wall recurrence from breast cancer after mastectomy: A phase-II study,” *Breast Cancer Res. Treat.*, vol. 134, no. 3, pp. 1169–1178, Aug. 2012.
- [332] L. W. Matthiessen, H. H. Johannesen, H. W. Hendel, T. Moss, C. Kamby, and J. Gehl, “Electrochemotherapy for large cutaneous recurrence of breast cancer: A phase II clinical trial,” *Acta Oncol. (Madr)*, vol. 51, no. 6, pp. 713–721, Jul. 2012.
- [333] L. W. Matthiessen *et al.*, “Management of cutaneous metastases using electrochemotherapy,” *Acta Oncol. (Madr)*, vol. 50, no. 5, pp. 621–629, Jun. 2011.
- [334] J. Gehl *et al.*, “Updated standard operating procedures for electrochemotherapy of cutaneous tumours and skin metastases,” *Acta Oncologica*, vol. 57, no. 7. Taylor and Francis Ltd, pp. 874–882, 03-Jul-2018.
- [335] J. Gehl, “[Investigational treatment of cancer using electrochemotherapy, electrochemoimmunotherapy and electro-gene transfer].,” *Ugeskr. Laeger*, vol. 167, no. 34, pp. 3156–9, Aug. 2005.

- [336] N. Esmacili and M. Friebe, "Electrochemotherapy: A Review of Current Status, Alternative IGP Approaches, and Future Perspectives," 2019.
- [337] L. M. Mir *et al.*, "Standard operating procedures of the electrochemotherapy: Instructions for the use of bleomycin or cisplatin administered either systemically or locally and electric pulses delivered by the Cliniporator TM by means of invasive or non-invasive electrodes."
- [338] C. Cabula *et al.*, "Electrochemotherapy in the Treatment of Cutaneous Metastases from Breast Cancer: A Multicenter Cohort Analysis," *Ann. Surg. Oncol.*, vol. 22, pp. 442–450, Dec. 2015.
- [339] D. Miklavcic *et al.*, "Towards treatment planning and treatment of deep-seated solid tumors by electrochemotherapy," 2010.
- [340] A. Denzi *et al.*, "Modeling the positioning of single needle electrodes for the treatment of breast cancer in a clinical case," *Biomed. Eng. Online*, vol. 14, no. Suppl 3, p. S1, 2015.
- [341] F. Mahmood and J. Gehl, "Optimizing clinical performance and geometrical robustness of a new electrode device for intracranial tumor electroporation," *Bioelectrochemistry*, vol. 81, no. 1, pp. 10–16, Apr. 2011.
- [342] B. Kos, A. Zupanic, T. Kotnik, M. Snoj, G. Sersa, and D. Miklavcic, "Robustness of treatment planning for electrochemotherapy of deep-seated tumors," *J. Membr. Biol.*, vol. 236, no. 1, pp. 147–153, Jul. 2010.
- [343] L. Zhang and D. P. Rabussay, "Clinical evaluation of safety and human tolerance of electrical sensation induced by electric fields with non-invasive electrodes," in *Bioelectrochemistry*, 2002, vol. 56, no. 1–2, pp. 233–236.
- [344] D. Miklavčič *et al.*, "The effect of high frequency electric pulses on muscle contractions and antitumor efficiency in vivo for a potential use in clinical electrochemotherapy," *Bioelectrochemistry*, vol. 65, no. 2, pp. 121–128, Feb. 2005.
- [345] G. Sersa, M. Cemazar, and Z. Rudolf, "Electrochemotherapy: advantages and drawbacks in treatment of cancer patients Review Article," 2003.
- [346] V. Phuc Nguyen *et al.*, "Contrast Agent enhanced Multimodal photoacoustic Microscopy and optical Coherence tomography for Imaging of Rabbit Choroidal and Retinal Vessels in vivo."
- [347] X. D. Zhang *et al.*, "Size-dependent in vivo toxicity of PEG-coated gold nanoparticles.," *Int. J. Nanomedicine*, vol. 6, pp. 2071–2081, 2011.
- [348] S. S. ~ Atkauskas, F. André, M. F. Bureau, D. Scherman, D. Miklavčič, and L. M. Mir, "Electrophoretic Component of Electric Pulses Determines the Efficacy of In Vivo DNA Electrotransfer," 2005.
- [349] J. Gehl, T. Skovsgaard, and L. M. Mir, "Enhancement of cytotoxicity by electroporation: An improved method for screening drugs," *Anticancer. Drugs*, vol. 9, no. 4, pp. 319–325, 1998.
- [350] S. Barbosa *et al.*, "Tuning size and sensing properties in colloidal gold nanostars," *Langmuir*, vol. 26, no. 18, pp. 14943–14950, Sep. 2010.
- [351] H. Chatterjee, D. S. Rahman, M. Sengupta, and S. K. Ghosh, "Gold Nanostars in Plasmonic Photothermal Therapy: The Role of Tip Heads in the Thermoplasmonic Landscape," *J. Phys. Chem. C*, vol. 122, no. 24, pp. 13082–13094, Jun. 2018.
- [352] P. Quaglino *et al.*, "Predicting patients at risk for pain associated with electrochemotherapy," *Acta Oncol. (Madr)*, vol. 54, no. 3, pp. 298–306, Mar. 2015.
- [353] E. Kuismanen and J. Saraste, "Low Temperature-Induced Transport Blocks as Tools to Manipulate Membrane Traffic," *Methods Cell Biol.*, vol. 32, no. C, pp. 257–274, Jan. 1989.
- [354] R. C. B. Q. De Figueiredo and M. J. Soares, "Low temperature blocks fluid-phase pinocytosis and receptor-mediated endocytosis in Trypanosoma cruzi epimastigotes," *Parasitol. Res.*, vol. 86, no. 5, pp. 413–418, 2000.
- [355] A. A. Torrano, Â. S. Pereira, O. N. Oliveira, and A. Barros-Timmons, "Probing the interaction of oppositely charged gold nanoparticles with DPPG and DPPC Langmuir monolayers as cell membrane models," *Colloids Surfaces B Biointerfaces*, vol. 108, pp. 120–126, Aug. 2013.
- [356] D. A. Giljohann, D. S. Seferos, P. C. Patel, J. E. Millstone, N. L. Rosi, and C. A. Mirkin,

- “Oligonucleotide loading determines cellular uptake of DNA-modified gold nanoparticles,” *Nano Lett.*, vol. 7, no. 12, pp. 3818–3821, Dec. 2007.
- [357] P. Hu, X. Zhang, C. Zhang, and Z. Chen, “Molecular interactions between gold nanoparticles and model cell membranes,” *Phys. Chem. Chem. Phys.*, vol. 17, no. 15, pp. 9873–9884, Apr. 2015.
- [358] A. Verma and F. Stellacci, “Effect of surface properties on nanoparticle-cell interactions,” *Small*, vol. 6, no. 1. John Wiley & Sons, Ltd, pp. 12–21, 04-Jan-2010.
- [359] D. Needham and D. H. Kim, “PEG-covered lipid surfaces: Bilayers and monolayers,” *Colloids Surfaces B Biointerfaces*, vol. 18, no. 3–4, pp. 183–195, Oct. 2000.
- [360] “Optimal Size of Gold Nanoparticles for Surface-Enhanced Raman Spectroscopy under Different Conditions.” [Online]. Available: <https://www.hindawi.com/journals/jnm/2013/790323/>. [Accessed: 23-Jun-2020].
- [361] N. Hoshyar, S. Gray, H. Han, and G. Bao, “The effect of nanoparticle size on in vivo pharmacokinetics and cellular interaction,” *Nanomedicine*, vol. 11, no. 6. Future Medicine Ltd., pp. 673–692, 01-Mar-2016.
- [362] V. Ramalingam, S. Revathidevi, T. Shanmuganayagam, L. Muthulakshmi, and R. Rajaram, “Biogenic gold nanoparticles induce cell cycle arrest through oxidative stress and sensitize mitochondrial membranes in A549 lung cancer cells,” *RSC Adv.*, vol. 6, no. 25, pp. 20598–20608, 2016.
- [363] V. Raji, J. Kumar, C. S. Rejiya, M. Vibin, V. N. Shenoi, and A. Abraham, “Selective photothermal efficiency of citrate capped gold nanoparticles for destruction of cancer cells,” *Exp. Cell Res.*, vol. 317, no. 14, pp. 2052–2058, Aug. 2011.
- [364] M. Misawa and J. Takahashi, “Generation of reactive oxygen species induced by gold nanoparticles under x-ray and UV Irradiations,” *Nanomedicine Nanotechnology, Biol. Med.*, vol. 7, no. 5, pp. 604–614, Oct. 2011.
- [365] A. A. Dayem *et al.*, “The role of reactive oxygen species (ROS) in the biological activities of metallic nanoparticles,” *International Journal of Molecular Sciences*, vol. 18, no. 1. MDPI AG, 10-Jan-2017.
- [366] V. Guerrero-Florez, S. C. Mendez-Sanchez, O. A. Patrón-Soberano, V. Rodríguez-González, D. Blach, and O. Fernando Martínez, “Gold nanoparticle-mediated generation of reactive oxygen species during plasmonic photothermal therapy: A comparative study for different particle sizes, shapes, and surface conjugations,” *J. Mater. Chem. B*, vol. 8, no. 14, pp. 2862–2875, Apr. 2020.

Titre: Potentiel des nanoparticules conductrices à amplifier le champ électrique local pour l'optimisation de l'électroporation et ses applications médicales

Mots clés: électrochimiothérapie, électroporation, électroperméabilisation, nanoparticules d'or, effets antitumoraux.

Résumé : Afin de surmonter certaines limites de l'électrochimiothérapie, une nouvelle approche basée sur l'utilisation de nanoparticules conductrices (NPs) a été proposée pour améliorer l'électroperméabilisation. Etant conductrices, ces NPs provoqueraient une modification très localisée de la distribution des lignes de champ de façon à les concentrer autour d'elles. Durant cette thèse, l'augmentation de l'électroperméabilisation des cellules en présence des NPs conductrices a été prouvée in vitro et in vivo. Au cours de l'étude in vitro, différentes compositions et états d'agrégation des NPs ont été testés. Des images de microscopie électronique (TEM) ont été réalisées afin de confirmer la localisation des NPs conductrices par rapport à la membrane lors de l'électroporation. Cette étude in vitro nous a permis de proposer des conditions appropriées d'utilisation des NPs pour une interaction optimale avec la membrane cellulaire permettant d'augmenter localement l'intensité du champ électrique. Au cours de l'étude in vivo, l'augmentation de l'électroporation des cellules a été validée en présence de deux types de NPs conductrices (sphériques et sous forme d'étoiles). La combinaison de chacune de deux types de NPs conductrices avec l'électrochimiothérapie a montré une diminution du volume tumoral par rapport à la condition sans NPs. Ces résultats suggèrent que la présence de NPs conductrices améliore l'électrochimiothérapie via l'amplification locale du champ électrique. En réduisant l'amplitude du voltage appliqué, l'électrochimiothérapie peut être optimisée et donc son utilisation serait plus répandue pour traiter le cancer.

Title: Potential of conductive nanoparticles to locally amplify the electric field for the optimization of electroporation and its medical applications

Keywords: electrochemotherapy, electroporation, electropermeabilisation, gold nanoparticles, anti-tumoral effects

Abstract: To improve the outcome of electroporation, a novel approach based on the use of conductive nanoparticles (NPs) is proposed to enhance cell electropermeabilisation. Used as nanoamplifiers, these NPs would provoke a local modification of the electric field around them leading to areas of more intense electric fields. Consequently, the external electric field required to achieve effective cell electropermeabilization could be reduced. During this thesis, the increase of the electropermeabilization effect in the presence of NPs was proved in vitro and in vivo. During the in vitro study, different compositions and aggregation states of NPs were tested. TEM images were made in order to confirm the location of conductive NPs with respect to the membrane during electroporation. The in vitro study allowed us to find out the appropriate conditions for an optimum interaction of NPs with the cell membrane, leading to a local increase of the electric field. During the in vivo study, the increase of cell electroporation was validated using two types of conductive NPs (spherical and stars). The combination of each type of conductive NPs with electrochemotherapy showed a decrease in the tumor volume with respect to the condition without NPs. These results suggest that the presence of conductive NPs improve the electrochemotherapy outcome via a local amplification of the external electric field. By reducing the applied voltage, the limits of electrochemotherapy will be minimized, which make this antitumor treatment easily applicable.